



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

82838

C (12) Pat. 111 1981 1347
Patent mällning 05 04 1991

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07K 7/40

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	843593
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.09.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.09.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	18.03.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.01.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
17.09.83 DE 3333640 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Obermeier, Rainer, Langenhainer Weg 14, Hattersheim am Main, BRD, (DE)
2. Geiger, Rolf, Heinrich-Bleicher-Strasse 33, Frankfurt am Main, BRD, (DE)
3. Grau, Ulrich, Zeil 17, Hofheim am Taunus, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

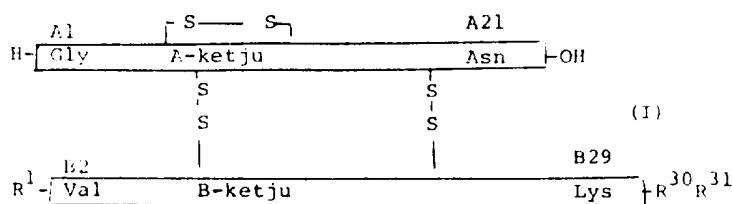
Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen insuliinijohdannaisten valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart insulinderivat

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP C 56951 (C 07K 7/40), EP C 89007 (C 12P 21/02), SE C 451143 (C 12P 21/02)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

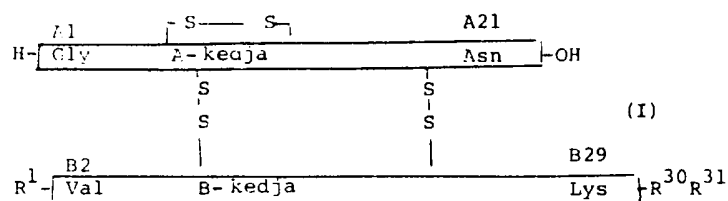
Keksintö koskee menetelmää kaavan I mukaisten insuliini-johdannaisten valmistamiseksi,



jossa kaavassa R^1 on H tai H-Phe, R^{30} merkitsee jonkin luonnossa esiintyvän L-aminohapon tähdettä ja R^{31} merkitsee fysiologisesti turvallista orgaanista ryhmää, joka on luonteeltaan neutraali tai emäksinen ja jonka isoelektrinen piste on 5,8:n yläpuolella. Menetelmässä a) kaavan I mukainen insuliini, jossa kaavassa R^{30} merkitsee geneettisesti koodattavan L-aminohapon tähdettä ja R^{31} on OH tai karboksi-ryhmän suojaryhmä, tai b) pro-insuliini, proinsuliinianalogi, esi-proinsuliini tai esi-proinsuliinianalogi, saatetaan reagoimaan peptidin tai aminohappojohdannaisen kanssa, jolla on kaava $H-R^{30}-R^{31}$, endopeptidaasin läsnäollessa, pH-arvossa, joka on insuliinin isoelektrisen pisteen alapuolella, ja mahdollisesti liitetty suojaryhmä lohkaistaan.

Keksintö koskee edelleen uusia, emäksisesti muunnettuja insuliini-johdannaista, näitä sisältäviä lääkkeitä sekä niiden käyttöä.

Uppfinningen hänför sig till ett förfarande för framställning av insulin-derivat med formeln I



vari R^1 är H eller H-Phe, R^{30} står för en rest av en i naturen förekommande L-aminosyra och R^{31} står för en fysiologiskt godtagbar organisk grupp av neutral eller basisk karaktär, och vilket uppvisar en isoelektrisk punkt över 5,8. Enligt förfarandet omsätter man

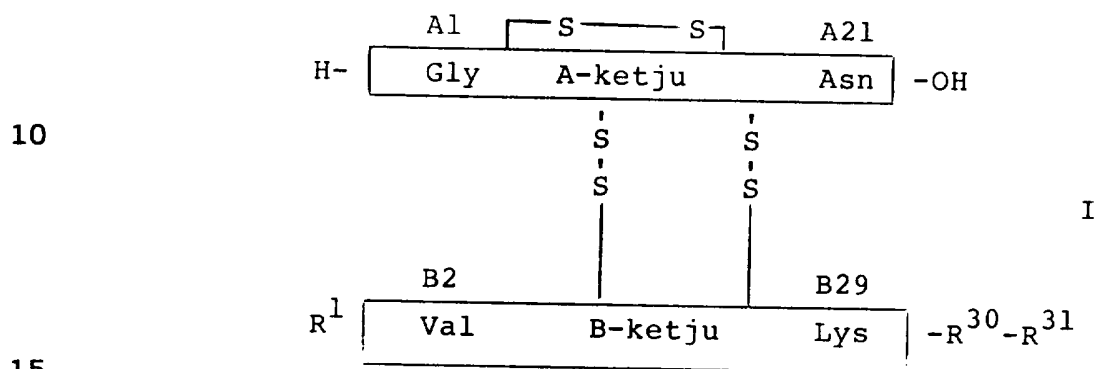
(a) ett insulin med formeln I, vari R^{30} betyder en rest av en genetiskt kodbar L-aminosyra och R^{31} står för OH eller en skyddsgrupp för karboxifunktionen, eller

(b) ett proinsulin, en proinsulinanalogi, ett preproinsulin eller en preproinsulinanalogi med en peptid respektive ett aminosyraderivat med formeln $\text{H}-\text{R}^{30}-\text{R}^{31}$ i närvaro av ett endopeptidas vid ett pH-värde under insulinets isoelektriska punkt och avspjälkar eventuellt införda skyddsgrupper.

Uppfinningen avser vidare nya basiskt modifierade insulinderivat, dessa innehållande medel och deras användning.

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen insuliinijohdannaisen valmistamiseksi

Keksinnön kohteena on menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen insuliinijohdannaisen valmistamiseksi, jolla on kaava I



jossa

R^1 on H tai H-Phe, R^{30} on Ala- tai Thr-tähde ja R^{31} on 1-3 α -aminohappoa ryhmästä Thr, Arg ja Lys, joissa mahdollisesti läsnäoleva päätekarboksiryhmä voi olla vapaana, esteröityneenä, laktonina tai CH_2OH :ksi pelkistettynä, ja jonka kaavan I mukaisen insuliinijohdannaisen isoelektrinen piste on yli 5,8.

Insuliini-Arg³¹-OH, insuliini-Arg³¹-Arg³²-OH sekä muut B-ketjun kohdalla C-terminaalaisesti emäksisesti muunnetut insuliinit osoittavat lääkeaineissa ilman erikoisia lisäyksiä, kuten Surfen[®]:a tai protamiinia, depot-luonnetta. Sellaisia insuliineja, menetelmää niiden valmistamiseksi, näitä sisältäviä lääkeaineita sekä niiden käyttöä on jo esitetty (saksalaiset patenttihakemukset P 33 26 472,4, P 33 26 473,2, P 33 27 709,5 sekä P 33 27 928,4). Sellaisen hidastetusti vaikuttavien insuliinivalmisteiden edut perustuvat parempaan siedettävyyteen, ja insuliinilla suoritetusta pitkäaikaishoidosta puuttuu ennen kaikkea denot-apuaineiden immunogeenisuus.

Insuliinin biosynteesissä syntyy välittömästi esi-

asteesta, yksiketjuisesta proinsuliinista, niin sanottujen yhdyspeptidien entsymaattisen pilkkoutumisen avulla kaksiketjuinen insuliini. Epätäydellisen valmistumisen yhteydessä on eristetystä raakainsuliinista löydettävissä niin
5 sanottujen välivaiheinsuliinien erittäin vähäisiä määriä. Nämä insuliinin biosynteesin välituotteet on selvitetty rakenteellisesti. Ne koostuvat pääasiallisesti B31-Arg- ja B31-32Arg-Arg-insuliinijohdannaisista.

Jos in vitro käsitellään naudan, sian tai ihmisen proinsuliinia trypsiinillä (Chance, Excerpta Medica International Congress Series no 231, sivu 292 ja seur. sivut), niin syntyy vastaavien desoktapeptidi-B23-30-insuliinien rinnalla ennen kaikkea B31-Arg sekä B32-Arg-Arg-insuliinien seos. Näiden tuotteiden varma erottaminen ja
15 perusteellinen puhdistus on erittäin työlästä ja edellyttää moninkertaista ioninvaihtokromatografiaa, johon liittyy tappioita. Preparatiivisten määrien valmistusta raakainsuliinista terapiassa suoritettavaa käyttöä varten ei sen tähden ole mahdollista suorittaa. Sitä paitsi ei
20 ole käytettävissä humaani-insuliinia vastaavia tuotteita.

Eräs mahdollinen sellaisten johdannaisten valmistustapa perustuu siihen, että entsymaattisesti pilkotaan geeniteknologisesti valmistettua proinsuliinia tai sen analogeja. Kuten mainittiin, puhdistusmenetelmän yhteydessä muodostuu tappiota.
25

Kyseessä olevan keksinnön kohteena on löytää menetelmä, jolla voidaan valmistaa yksinkertaisella tavalla uusien, galeenisten valmisteiden terapeutista käyttöä varten tarvittavat määrät emäksisesti muunnettuja insuliinijohdannaisia.
30

Seuraavassa kuvatussa, keksinnön mukaisessa menetelmässä tehtävä ratkaistaan muuttamalla halpa, biosynteettinen insuliini, kuten humaani-insuliini, sianinsuliini tai mahdollisesti niiden esiastet entsyymikatalyyysin avulla sekä käyttämällä sopivia peptidijohdannaisia toivotuiksi tuotteiksi.
35

Viime vuosina ovat monet erilaiset kemialliset ja entsymaattiset menetelmät tulleet tunnetuiksi (Biochem. J. 211 (1983) 671-676, US-patentti 3 902 068, 3 276 961, 4 320 197, GB-A-2069502, EP-A-56951 mm), joiden avulla esim. sianinsuliini voidaan muuntaa. Edelleen on myös ehdotettu menetelmiä, jotka sallivat sopivien esi-proinsuliinijohdannaisten sekä välivaiheinsuliinien muuttamisen esimerkiksi humaani-insuliiniksi (DE-patenttihakemus P 32 09 184.2).

Nyt havaittiin yllättäen, että insuliinin lyysiintähteessä, asemassa B29, tapahtuu selektiivinen transamidointi jopa peptidien kanssa, jotka sisältävät Arg tai Arg-Arg, ja huolimatta arginiinista insuliinin asemassa B22, suurin saannoin. Tämä koskee myös proinsuliineja (Lys-Arg-AO) sekä analogeja.

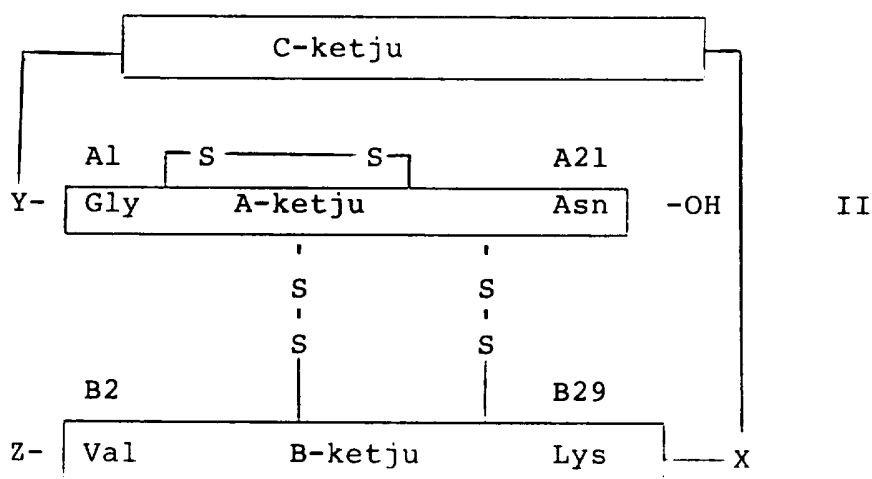
Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että

a) kaavan I mukainen insuliini, jossa R^1 on H tai H-Phe,

R^{30} on geneettisesti koodattavan L-aminohapon tähde ja R^{31} on OH tai karboksiryhmän suojaryhmä, tai

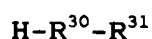
b) proinsuliini, jolla on kaava

II



jossa

C-ketju ja X yhdessä ovat geneettisesti koodattavien L-aminohappojen sekvenssi, Z on H- tai ryhmä $H-(D)_m-Y-(Phe)_n-$, m ja n ovat toisistaan riippumatta 0 tai 1, D on geneettisesti koodattava L-aminohappojen esisekvenssi ja Y on Arg tai Lys, saatetaan reagoimaan peptidin kanssa, jolla on kaava III



III

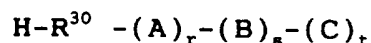
10 jossa

R^{30} on Ala- tai Thr-tähde ja R^{31} on 1 - 3 α -aminohappoa ryhmästä Thr, Arg ja Lys, joissa mahdollisesti läsnä-oleva päätekarboksiryhmä voi olla vapaana, esteröityneenä, amidina, laktonina tai CH_2OH :ksi pelkistettynä trypsiinin tai trypsiinin kaltaisen endopeptidaasin läsnäollessa vedessä, johon on mahdollisesti lisätty sopivaa orgaanista liuotinta, pH-arvossa, joka on insuliinin isoelektrisen pisteen alapuolella, ja mahdollisesti lisätyt suojaryhmät poistetaan.

20 X merkitsee ensi sijassa Ala, Thr tai Ser, mutta se merkitsee erityisesti Thr pH arvo on etupäässä pH 5,4:n alapuolella.

Erityisesti valmistetaan sellaisia kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R^1 merkitsee H-Phe. Etupäässä valmistetaan yhdisteitä, joissa A-ketjulla ja ketjulla (B2-30) on humaani-insuliinin sekvenssi.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä lähdetään edullisesti kaavan I mukaisista insuliineista. Edelleen ovat edullisia sellaiset kaavan III mukaiset lähtöyhdisteet, joissa on sekvenssi



jossa

35 R^{30} merkitsee Ala tai Thr, A ja B ovat samanlaisia tai eri-

laisia ja merkitsevät D-Arg, D-Lys, suojattua Arg tai suojattua Lys, C merkitsee D-Arg, D-Lys, suojattua Arg, suojattua Lys tai koliiniesteri-ryhmää,

5 r, s ja t ovat samanlaisia tai erilaisia ja merkitsevät 0 tai 1, ja $r+s+t > 1$, jolloin C-terminaaliset aminohapot voivat olla myös vastaaviksi aminohapoiksi pelkistettyjä.

Keksinnön mukaisen menetelmän mukaan voidaan valmistaa:

Des-Phe^{B1}-sianinsuliini-Arg^{B31}-OH

10 Des-Phe^{B1}-humaani-insuliini-Arg^{B31}-OH

Des-Phe^{B1}-sianinsuliini-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

Des-Phe^{B1}-humaani-insuliini-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

Sianinsuliini-Arg^{B31}-OCH₃

Humaani-insuliini-Arg^{B31}-OCH₃

15 Naudaninsuliini-Arg^{B31}-OCH₃

Sianinsuliini-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OCH₃

Humaani-insuliini-Arg^{B32}-OCH₃

Humaani-insuliini-Lys^{B31}-OH

Humaani-insuliini-D-Arg^{B31}-OH

20 Humaani-insuliini-D-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

Humaani-insuliini-Arg^{B31}-D-Arg^{B32}-OH

Humaani-insuliini-Lys^{B31}-Arg^{B32}-OH

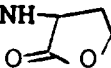
Humaani-insuliini-Arg^{B31}-Lys^{B32}-OH

Humaani-insuliini-Argininoli^{B31}

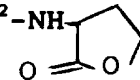
25 Humaani-insuliini-Arg^{B31}-Arginioli^{B32}

Humaani-insuliini-Lys^{B31}-Arg^{B32}-Arg^{B33}-OH

Humaani-insuliini-Arg^{B31}-NH



30 Humaani-insuliini-Arg^{B31}-Arg^{B32}-NH



Des-Thr^{B30}-humaani-insuliini-Arg^{B30}-OH

Des-Thr^{B30}-humaani-insuliini-Lys^{B30}-OCH₃

Des-Thr^{B30}-humaani-insuliini-Arg^{B30}-Arg^{B31}-OH

35 mutta erikoisesti

Humaani-insuliini-Arg^{B31}-OH

Humaani-insuliini-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

Seuraavat L-aminohapot ovat geneettisesti koodatavissa: Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu,
5 Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro (neutraalit aminohapot ovat alleviivatut).

Neutraalilla, luonnossa esiintyvällä aminohapolla tarkoitetaan erityisesti aminohappoja Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro tai Hyp.
10 Emäksisellä, luonnossa esiintyvällä aminohapolla tarkoitetaan erityisesti aminohappoja Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit tai His.

Ryhmillä, jotka mahdollisesti salpaavat keksinnön mukaisesti valmistettujen yhdisteiden C-terminaalisten
15 päiden vapaan karboksiryhmän, tarkoitetaan ennen kaikkea esterijä amidi-ryhmiä, etupäässä (C₁-C₆)-alkoksia, (C₃-C₆)-sykloalkoksia, NH₂, (C₁-C₆)-alkyyliaminoa tai di-(C₁-C₆)-alkyyliaminoa, tai emäksisiä ryhmiä, kuten amino-(C₁-C₆)-alkoksia, (C₁-C₄)-alkyyliamino-(C₂-C₆)-alkoksia, di-(C₁-C₄)-alkyyliamino-(C₂-C₆)-alkoksia, tri-(C₁-C₄)-ammonio-(C₂-C₆)-alkoksia, amino-(C₂-C₆)-alkyyliaminoa, [(C₁-C₄)-alkyyliamino]-(C₂-C₆)-alkyyliamino, [di-(C₁-C₄)-alkyyliamino]-(C₂-C₆)-alkyyliaminoa tai [tri-(C₁-C₄)-alkyyliammonio]-(C₂-C₆)-alkyyliaminoa, erityisesti -O-[CH₂]_p-NR₂, -O-[CH₂]_p-NR₃⁺, tai
20 -NH-[CH₂]_p-NR_p⁺, jossa p = 2-6 ja R on samanlainen tai erilainen sekä merkitsee vetyä tai (C₁-C₄)-alkyyliä.

Insuliineina voidaan käyttää kaikkia luonnosta eristettyjä insuliineja, joissa on Lys (B29), edullista on kuitenkin käyttää insuliineja, jotka ovat peräisin siasta tai ihmisestä; sama koskee proinsuliinia. Sopivina esiproinsuliineina tulevat ennen kaikkea kysymykseen sellaiset
30 geeniteknologian avulla saadut esi-proinsuliinit, joissa vastaavan koodauksen kautta on esisekvenssissä asemassa BO emäksinen aminohappotähde, joka voidaan pilkkoa trypsiinillä tai jollain trypsiinin kaltaisella, vapaalla tai
35

kantajaan kiinnitetyllä entsyymillä.

Keksinnön mukaisen menetelmän lähtöyhdisteistä Des-Phe^{B1}-insuliinit ovat tunnettuja esim. DE-PS 20 05 658:n tai EP-A- 46 979:n perusteella.

5 Geeniteknologisin menetelmin on sitä vastoin mahdollista hankkia lähtömateriaaleina humaani- tai kädellisten proinsuliinia. Mutta lisäksi voidaan rakentaa myös suhteellisen yksinkertaisia plasmideja, joista loh-
 10 kaisemalla vastaavia esi-proinsuliini-johdannaisia saadaan uusia insuliinijohdannaisia, koska ne luonnossa, kohdassa B31 ja B32 esiintyvien arginiinien tilalla, koodaavat muita neutraaleja tai emäksisiä aminohappoja.

Proinsuliinin valmistus käyttämällä yhdistelmä-DNA-metodiikkaa edellyttää DNA-sekvenssin muodostamista, joka
 15 koodaa proinsuliinin aminohapposekvenssiä, joka voidaan saada aikaan joko eristyksen avulla, konstruoimalla tai molempien yhdistelmän avulla. Proinsuliini-DNA käytetään sitten lukuvaiheessa jossain sopivassa pesäke- ja ekspres-
 -sionkantajassa. Kantaja käytetään jonkin sopivan mikro-
 20 organismin transformointiin, ja tällöin saatu transfor-
 moitu mikro-organismi kasvatetaan sitten käymisolosuhteis-
 sa, jotka johtavat proinsuliinia sisältävän vektorin lisä-
 kopioiden muodostumiseen sekä proinsuliinin, jonkin proin-
 suliinijohdannaisen tai proinsuliiniesiasteen (tai esi-
 25 proinsuliini-johdannaisen) ekpressioon.

Jos ekspressiotuotteena on kysymys proinsuliinin esiasteesta, sellainen tuote yleensä saa proinsuliiniami-
 nohapposekvenssin, joka pääteaminoryhmänsä kohdalla on
 sidottu proteiinin katkelmaan, joka normaalisti ilmentyy
 30 geenisekvenssin kautta, jossa proinsuliini tai proin-
 suliinijohdannainen pannaan käyntiin.

Peptideinä tai aminohappojohdannaisina, joita voi-
 daan käyttää entsyymin katalysoimaan reaktioon, tulevat
 kysymykseen ennen kaikkea kaikki mahdollisesti sivuket-
 35 jussa ja karboksyylipäässä suojatut di-, tri- ja tetrapep-

tidit, joiden N-päätteenä on Gly, L- tai D-aminohappo, paitsi sellaiset, joissa aminohapon karboksyyliä on emäksisenä amidi- tai juuri samanlaisena esterijohdannaisena, edullisesti koliiniesterinä tai amidina jonkin
5 ylimääräisen kvaternäärisen ammoniumtähteen kanssa. Olemassa olevat vapaat COOH-, OH-, SH-, ω -NH₂-, guanidino- ja/tai imidatsoliryhmät ovat tarvittaessa sinänsä tunnetulla tavalla suojattuina (vertaa esim. Bodantsky et al., kirjassa Pentide Synthesis, toinen painos (1976),
10 John Wiley & Sons).

Lysiinin tai ornitiinin ϵ -aminoryhmän uretaanisuo- jaryhmät ovat esimerkiksi Fmoc, Fcboc, Z, Boc, Ddz, Bpoc, Z (NO₂), Pyoc, Dobz, Moc, Mboc, Iboc, Adoc, Adpoc, Mac tai Pioc; edullisia ovat Z ja Boc. Näiden aminosuojaryhmien
15 poistaminen tapahtuu happojen emästen tai pelkisteiden kanssa (vrt. Kontakte Merck 3/79, s. 14 ja seuraavat sivut).

Arginiinin guanidino-ryhmän suojaryhmät ovat esim. Adoc, Tosyl, Boc, Z, mesityleeni-2-sulfonyyli (Mts) ym.
20 Lohkaiseminen voidaan suorittaa joko hydrolyyttisesti tai hydrogenolyttisesti (vrt. Kontakte Merck 1/80, s. 23, 30).

Asp:n ja Glu:n COOH-sivuryhmät voidaan suojata alkyyliesterinä, etupäässä metyyli-, etyyli- tai tert. butyyliesterinä, tai bentsyyliesterinä tai muunnettuna bent-
25 syyliesterinä (mm. p-NO₂, p-Cl, p-Br). Suojauksen poistaminen suoritetaan alkalisen tai happamen saippuoinnin tai hydrauksen avulla (vrt. Kontakte Merck 3/79, s. 14, 20).

Thr:n tai Ser:n OH- sivuryhmät voidaan tunnetulla tavalla suojata eetteri- tai asyyli-suojaryhmien, kuten esimerkiksi (C₁-C₆)-alkyylin, etupäässä tert. butyylin tai (C₁-C₆)-alkanoyylin avulla.
30

Suojaryhmän valinta sekä synteessin suoritustapa
35 määräytyy aminohappojen sekä C-terminaalisen, karbok-

siryhmän salpaavan ryhmän laadun perusteella.

Edullisina dipeptideinä voidaan käyttää sellaisia dipeptidejä, joissa N-terminaalinen alanyyli- tai treonyyli- tai threonyyli- tai tyrosyylitähde, joka on sidottu L-/D-arginiini- tai L-/D-lysiini- tai D-lysiini- tai D-tyrosiini- tai D-threonyyli- tai D-tyrosyylitähteen kanssa, on suljettu sopivan, happamissa tai emäksisissä olosuhteissa lohkaistavan suojaryhmän avulla. L- tai D-Arg:n tai vastaavasti L- tai D-Lys:n irreversiibelinä karboksyyli-ryhmän suojaryhmänä voidaan peptidiin liittää myös emäksinen diamiini. Sellaiset dipeptidihydrolysaattorit ovat edullisia ennen kaikkea silloin, kun aminohappotähteenä käytetään D-Arg tai D-pLys, koska steeriselektiivinen trypsiini tai esimerkiksi lysyyliendopeptidaasi-Lys-C₁ ei voi tunnistaa näitä peptidijohdannaisia ja sen tähden muuntoreaktiota varten ei tarvita mitään sivuketjun suojausta.

Amiinikomponenttina on myös mahdollinen jokin emäksinen aminohappo, edullisesti D-, L-arginiini ja D-, L-lysiini. Vastaavat tripeptidit täytyy karboksyyli-ryhmän lisäksi ainoastaan sivuketjussa sijaitsevien muunnosten tapauksessa sulkea sopivien, happamissa tai emäksisissä olosuhteissa lohkaistavien suojaryhmien avulla. Mutta D-aminohappotähtien sivuketjusuojaus voidaan valita myös reaktion jälkeisen puhdistusoperaation parantamiseksi.

Yllä mainitut peptidit tai aminohappojohdannaiset syntetisoidaan standardimenetelmien mukaisesti, kuten esimerkiksi on kuvattu kirjassa "The Pentides Analysis, Synthesis, Biology, osa 1 Major Methods of Peptide Bond Formation, osa A", julk. E. Gross, J. Meierhofer, Academic Press N.Y. (1979).

Trypsiinin ohella soveltuvat keksinnön mukaiseen menetelmään myös sellaiset endopeptidaasit, jotka kirjallisuuden perusteella tunnetaan trypsiinin kaltaisina, se on sellaiset, jotka spesifisesti lohkaisevat peptidisidoksia emäksisten aminohappojen karboksipäässä (vrt. esim. EP-A-17938).

Entsyyimaattiseen reaktioon käytettyjä aminohappoja tai peptidiyhdisteitä käytetään etupäässä 40 - 150 -kertaisena ylimääränä insuliinikomponentin suhteen. Entsyymisubstraatti-suhteena voidaan käyttää painosuhdetta, etupäässä 1:5 - 1:20 erityisesti 1:10 entsyymiä insuliinikomponentin suhteen.

Jotta kuvatut aminohappo- ja peptidiyhdisteet, jotka liukenevat huonommin veteen, saadaan reagoimaan, voidaan muutoin vettä sisältävään reaktioliuokseen lisätä jotain sopivaa, veden kanssa sekoittuvaa, orgaanista liuotinta, kuten esimerkiksi metanolia, dimetyyliformamidia tai dioksaania, kunnes muodostuu homogeeninen liuos.

Reaktioseoksen sisältämän veden määrän ei tulisi kuitenkaan laskea alle 50 %:n veden ja orgaanisen liuottimen muodostamasta seoksesta, jotta vähennetään insuliinikomponentin ja/tai trypsiinin denaturoitumista, joka vähentää saantoa.

pH-arvot, joissa entsyyimaattinen reaktio suoritetaan, ovat tavallisesti 4-5 etupäässä noin pH 4,5. Korkeammissa pH-arvoissa kuin annetulla alueella, asemassa Lys B²⁹ tapahtuvien edullisten transamidointireaktioiden saannot vähenevät Arg^{B22}:ssa tapahtuvan ei-toivotun proteolyyttisen pilkkoutumisen vuoksi.

Edullisia keksinnön mukaisesti valmistettuja johdannaisia ovat ne, joissa R¹ merkitsee H-Phe ja/tai A-ketju sekä ketju (B2-29) ilmaisevat humaani-insuliinin sekvenssiä.

Kaikille näille insuliini-johdannaisille on yhteistä, että molekyylin pinnalla sijaitseva(t), ylimääräinen(set), positiivinen(set) varaus(varaukset) antaa (antavat) isoelektrisen pisteen, joka on neutraalilla alueella. Kustakin johdannaisesta riippuen saadaan isoelektrisessä fokusoinnissa isoelektriset pisteet, jotka ovat 5,8 - noin 8,5, erityisesti 6,2 - 8,2. Johdannaiset ovat siten neutraalialueella vähemmän liukoisia kuin natiivi

insuliini tai proinsuliini, joiden isoelektrinen piste ja siten maksimaalisen liukenemattomuuden alue on pH:ssa 5,4, kun taas ne neutraalialueella ovat normaalisti liuenneina.

5 Insuliinin ja proinsuliinin liukoisuusominaisuuksiin voidaan vaikuttaa isoelektrisen pisteen yläpuolella, t.s. terapeuttisesti erittäin mielenkiintoisella neutraalilla alueella, lisäämällä sinkki-ioneja. Sinkki vaikuttaa depot-periaatteen mukaisesti siten, että se stabiloi insuliinin heksameerista tilaa sekä sen kiteytymistäipumusta. 10 Ihonalaisissa kudoksissa nämä aggregaatit jälleen liukenevat.

Eräs muu sopiva depot-periaate on insuliinin tai proinsulinin kiteyttäminen kompleksina jonkin emäksisen proteiinin, esim, globiinin tai protamiinin kanssa.

15 Käytettäessä proinsuliinia liuoksessa tai jonkin kuvatun depot-periaatteen mukaisessa yhdisteessä tarvittiin lisäksi proteolyyttistä lohkamista natiivin, täysin tehokkaan insuliinin vapauttamiseksi. Koskemattomalla proinsuliinilla on ainoastaan noin 1/8 insuliinin biologisesta 20 tehosta, koska kuvitellaan, että osa biologisesti aktiivisesta pinta-alueesta, reseptorinsitoutumisalue, on proinsuliinissa olemassa olevan C-peptidin peittämänä. Proinsuliinina tulee epäilemättä diabetes-hoidon suhteen kysymykseen ainoastaan homologi, siis vain sellainen yhdiste, 25 jolla on humaanisekvenssi (vert. esim. DE-Al-32 32 036). Heterologisella proinsuliinilla on merkittävä immunogeenisuus. Tässä yhteydessä on huomioitava, että myös humaan-proinsuliinimuunnoksissa voi ilmetä C-peptidiosa.

30 Havaittiin yllättäen, että insuliini-Arg^{B30}-OH:lla sekä muilla insuliini-johdannaisilla, joiden B-ketjussa on C-terminaalisesti orgaaninen ryhmä, joka on emäksinen luonteeltaan, erotuksena proinsuliiniin on lähes yhtä korkea biologinen aktiivisuus kuin natiivilla insuliinilla.

35 Diabetes mellituksen hoitoon voidaan käyttää lääke-

ainetta, joka koostuu farmaseuttisesti turvallisesta kantaja-aineesta sekä vaikuttavasta aineesta, jona on jokin kaavan I mukainen insuliini-johdannainen.

5 Nämä lääkeaineet edustavat siten täydellisesti uusia hidastusmenetelmiä, jotka voivat saada aikaan vaikutuksen ilman depot-aineita, kuten sinkkiä tai protamiinisulfaattia. Depot-vaikutus perustuu luontaiseen, proteiinikemiasta riippuvaan fysikaaliseen periaatteeseen, insuliinijohdannaisen vaikealiukoisuuteen isoelektrisessä
10 pisteessään. Sen uudelleenliukeneminen fysiologisissa olosuhteissa saadaan mahdollisesti aikaan lohkaisemalla ylimääräiset, emäksiset ryhmät, mikä suoritetaan kustakin johdannaisesta riippuen tryptisen tai trypsiinin kaltaisen ja/tai karboksipeptidaasi B- tai karboksipentidaasin B
15 kaltaisen ja/tai esteraasiaktiivisuuden avulla. Kulloinkin lohkaistut ryhmät ovat joko puhtaasti fysiologisia metaboliitteja, kuten aminohappo, tai helposti metaboloituvia, fysiologisesti turvallisia aineita.

Insuliinijohdannaiset tämän uuden lääkeaineen vaikuttavana aineena eivät säännöllisesti myöskään ole voimakkaammin immunogeenisiä kuin vastaava insuliini itse, erotuksena kirjallisuudessa kuvattuihin väliasteisiin nähden, jotka vielä sisältävät heterologisen C-peptidin osia.

25 Kuvattu aine sisältää vaikuttavana aineena yhtä tai useampaa kaavan I mukaista uutta insuliini-johdannaista.

Niiden pH-arvo on edullisesti 2,5 - 8,5, ja ne sisältävät sopivan isotonisuuden säilyttävän aineen, sopivan säilytysaineen ja mahdollisesti jonkin pH-alueelle 5,0 - 8,5 soveltuvan puskurin.

30 Kuvattujen johdannaisten tyypillistä käyttömuotoa edustavat valmisteet, jotka isoelektrisen pisteen alapuolella ovat liuoksina jossain fysiologisesti turvallisessa kantaja-aineessa. Tällöin liuoksen pH voi olla tyypillisesti 5,0, joka on siis selvästi korkeampi kuin happamien, vanhojen insuliinivalmisteiden pH (tyypillisesti
35

pH = 3). Neutraalilla injektioliuoksella on tietyissä olosuhteissa selviä etuja niiden siedettävyyden suhteen.

Eräs uusi tyypillinen käyttömuoto ovat kuvattujen johdannaisten amorfisten tai kiteisten saostumien suspensiot jossain fysiologisesti turvallisessa kantaja-aineessa, jolla on noin neutraali pH.

On kuitenkin myös mahdollista vahvistaa johdannaisten luontaista vaikealiukoisuutta fysiologisella pH-alueella ylimääräisten menettelytapojen avulla, kuten esimerkiksi lisäämällä sinkkiä tai protamiinisulfaattia. Lisätyt sinkkimäärät voivat tällöin nousta aina 100 µg:aan Zn^{2+} /100 insuliiniyksikköä, tyypillisesti noin 50 µg:aan Zn^{2+} /100 insuliiniyksikköä. Protamiinimäärät voivat olla 0,28-0,6 mg 100 yksikköä kohti (protamiinisulfaatin suhteen). Tällä tavalla on valmistetavissa erityisen pitkävaikutteisia preparaatteja, joilla tulevaisuudessa on tähänastista laajempaa käyttöä, koska tämälleen perusmäärä insuliinia näyttää terapeuttisesti edulliselta. Tämä on jo nyt insuliiniannostuslaittein suoritettusta hoidosta saatu käsitys.

Fysiologisesti turvallisena ja insuliinijohdannaisen kanssa soveltuvana kantaja-aineena käy steriili vesiliuos, joka tavanomaisella tavalla, esim. glyseriinin, keittosuolan tai glukoosin avulla tehdään isotoniseksi ja joka tämän lisäksi sisältää vielä jotain tavallista säilöntäainetta, esim. fenolia, m-kresolia tai p-hydroksibentsoehappoesteriä. Kantaja-aine voi lisäksi sisältää puskuria, esim. natriumasetaattia, natriumsitraattia, natriumfosfaattia. pH:n säätämiseen käytetään laimennettuja happoja (tyypillisesti HCl) tai emäksiä (tyypillisesti NaOH).

Insuliinijohdannaisia voidaan yllä kuvatuissa lääkeaineissa käyttää myös alkali- tai ammoniumsuoloina. Mielivaltainen osa yhtä tai useampaa kaavan I mukaista insuliini-johdannaista tai jokin kaavan I mukainen in-

suliini johdannainen voi olla näiden uusien insuliini-johdannaisten seoksessa toisistaan riippumatta joko liuotetussa, amorfisessa ja/tai kiteisessä muodossa.

Usein on edullista keksinnön mukaisessa valmistuksessa lisätä sopiva määrä jotain soveliaasta stabilisaattoria, joka estää proteiinin saostumisen erilaisten materiaalien kanssa tapahtuvan kosketuksen aiheuttaman termomekaanisen kuormituksen seurauksena. Sellaiset stabilisaattorit ovat tunnettuja esimerkiksi EP-A-18609:n DE-A-32 40 177:n tai WO-83/00288:n perusteella.

Esillä olevissa lääkeaineissa, jotka voivat sisältää jonkin tunnetuista hidastustekijöistä, kuten vähän protamiinisulfaattia, globiinia tai sinkkiä sopivissa määrin, voidaan sellaista hidastustekijää soveltaa yhdistelmänä koko vaikuttavan aineosan kanssa tai sen osien kanssa tai seoksena yhden tai useamman kaavan I mukaisen insuliini-johdannaisen kanssa. Lääkeaine voi sisältää kaavan I mukaisia, erilaisia insuliini-johdannaisia yhdistelmänä useampien erilaisten, hidastavasti vaikuttavien apuaineiden kanssa.

Mainituilla terapeuttisilla lääkeaineilla on saavutettavissa myös selvästi runsaita erittäin hienosti säädettävissä olevia vaikutusominaisuuksia; täten tulisi alussa tehtyjen huomioiden mukaisesti edistysaskeleiden erityisesti liittyä sokeritaudin myöhäiskomplikaatioihin.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 1

6 g sianinsuliinia liuotetaan 20 ml:ssa vettä ja 5 ml:ssa jäädetikkaa yhdessä 37 g:n kanssa H-Thr-Arg(Adoc)₂-OBut·Hac:a, ja pH säädetään jäädetikalla pH-arvoon 4,6. 0°C:seen suoritettun jäädyttämisen jälkeen lisätään liuokseen 0,6 g trypsiiniä, joka on liuotettu 2 ml:aan vettä. Reaktioseos pidetään 24 tunnin ajan 4 - 10°C:ssa. Tämän jälkeen reaktiotuote humaani-insuliini-B31-Arg(Adoc)₂-OBut saostetaan lisäämällä 200 ml metanolia tai asetonia sekä

poistetaan sentrifugoimalla. Kirkasta jäännöstä käsitellään dipeptidi-johdannaisen takaisin saamiseksi.

5 Saostuma pestään vielä kerran metanoli/eetteri-seoksella sekä kuivataan tyhjössä. HPLC:n avulla määritetään raakaseoksesta 47 % tuotetta. HI-Arg^{B31} (Adoc)₂-OBut:n puhdistus ja eristys suoritetaan pihappogeelillä, kuten on kuvattu saksalaisissa patenttihakemuksissa P3147845,5 - 42.

10 HI-Arg^{B31}OH saadaan yhden tunnin mittaisella tri-fluorietikkahapolla suoritettulla käsittelyllä sekä tämän jälkeen eetterillä suoritettun saostuksen avulla.

Esimerkki 2

15 600 mg sianinsuliinia liuotetaan 2 ml:aan H₂O, 0,8 ml:aan DMF sekä 0,5 ml:aan etikkahappoa yhdessä 12,6 g:n kanssa Hac·Thr·Arg-(Adoc)₂-Arg(Adoc)₂-OBut sekä jäähdytetään 0°C:seen. Seokseen lisätään 60 mg trypsiiniä, joka on liuotettu 0,2 ml:aan vettä. 24 tunnin kuluttua voidaan näytteessä määrittää HPLC:n avulla 40 % HI-Arg^{B31}- (Adoc)₂-Arg^{B32} (Adoc)₂-OBut.

20 Esimerkki 3

60 mg sianinsuliinia liuotetaan 0,5 ml:aan vettä, 0,2 ml:aan dimetyyliformamidia sekä 0,1 ml:aan etikkahappoa yhdessä 676 mg:n kanssa Hac·2 HCl+Thr(but)-D-Arg-(Adoc)₂-OBut. pH säädetään trietyyliamiinin avulla arvoon 5,0, ja lisätään 6 mg trypsiiniä, joka on liuotettu 0,1 ml:aan vettä. 24 tunnin kulutta voidaan HPLC:n avulla määrittää 34 % reaktiotuotteesta HI-(B30)-(But)-D-Arg^{B31}-Arg^{B32}-(Adoc)₂-OBut.

Esimerkki 4

30 6 g humaani-insuliinia liuotetaan 20 ml:aan vettä ja 5 ml:aan etikkahappoa yhdessä 48 g:n kanssa HCl·Hac·Thr(But)·Arg(Adoc)₂-OBut, ja annetaan reagoida 0,6 g:n kanssa trypsiiniä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Reagoinut erä 16 tunnin kuluttua: 35 %.

Esimerkki 5

85 mg sian proinsuliinia liuotetaan 483 mg:n kanssa
 Hac·HCl·Thr(But)-Arg(Adoc)₂-OBut 0,5 ml:aan vettä ja 0,3
 ml:aan etikkahappoa. pH säädetään arvoon 5,0 ja lisätään 8
 5 mg trypsiiniä, joka on liuotettu 0,1 ml:aan vettä. Reagoi-
 nut erä 24 tunnin kuluttua: 37 %.

Esimerkki 6

85 mg sian proinsuliinia reagoi 1,2 g:n kanssa
 Hac·Thr-Arg(Adoc)₂-Arg(Adoc)₂-OBut esimerkissä 5 kuvatulla
 10 tavalla. Reagoi nut erä HPLC:n avulla määritettynä: 33 %.

Esimerkkien 1 - 6 analytiikka:

HI (humaani-insuliini)-Arg^{B31}-OH ja HI-Arg^{B31}-Arg^{B32}-
 OH identifioitiin aminohappoanalyysin avulla, kuten myös
 L-Arg-tähteen ollessa kyseessä, vapauttamalla C-terminaa-
 15 linen arginiini karboksipeptidaasi B:llä (= emäksisten
 aminohappojen eksopeptidaasi).

Yhdisteiden isoelektriset pisteet määritettiin iso-
 elektrisen fokusoinnin avulla pH:n ollessa 6,5 HI-Arg^{B31}-OH
 analysoitaessa tai 7,0 HI-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH analysoitaessa.

20 Vastaavat retentioajat HPLC-systeemissä määritet-
 tiin sen jälkeen, kun suojaryhmät oli lohkaistu CF₃COOH:lla
 ja raaka-aine oli saostettu eetterillä. HPLC-systeemi: Wa-
 ters Rad/Pak C18, 10 µm, 0,05 M tetraetyyliammoniumfos-
 faatti, 0,25M NaClO₄, 10 % CH₃CN; pH 3 (puskuri A);
 25 0,05 M tetraetyyliammoniumfosfaatti; 90 % CH₃CN; pH 3
 (puskuri B); 28 - 40 % B-gradientti, 1,5 ml/minuutti, huo-
 neen lämpötilassa, 210 nm.

Retentioajat: sianinsuliini: t = 23 min.

HI-Arg^{B31}-OH : t = 26 min

30 HI-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH : t = 28 min.

Esimerkki 7

600 mg Des-Phe^{B1}-sianinsuliinia liuotetaan 2 ml:aan
 H₂O, 0,8 ml:aan DMF ja 0,5 ml:aan etikkahappoa yhdessä 12,6
 g:n kanssa Hac·Thr·Arg(Adoc)₂-Arg(Adoc)₂-OBut ja jäähdyte-
 35 tään 0°C:ssa. 60 mg trypsiiniä liuotettuna 0,2 ml:aan vet-

tä lisätään seokseen. 24 tunnin jälkeen voidaan näytteestä HPLC:n avulla määrittää 45 % Des-Phe^{B1}-HI-Arg^{B31}(Adoc)₂-Arg^{B32}(Adoc)₂-OBut.

HPLC-kromatografia suoritettiin seuraavasti:

- 5 RPS-pylväs Waters RCCS, 10 µm, 8 - 10 mm; liikkuva faasi: 0,05 M tetraetyyliammoniumfosfaatti; 0,15 M NaClO₄; pH 3,0; lineaarinen 32 - 47 %:inen asetonitriiligradiенти.

Esimerkki 8

- 10 450 mg sianinsuliinia (kiteistä) sekoitetaan 3,7 g:aan (tert.-butyyli)treonyyliarginiinia ja 1,5 ml:aan vettä ja suuriviskoosisen liuoksen pH:ta säädetään tri-etyyliaminilla arvoon 5,0, jolloin 0,1 ml liuosta laimennetaan 0,2 ml:lla vettä ja pH-arvo mitataan lasielektrodilla. Reaktioseokseen lisätään 2 mg lysyyliendopeptidaa-
- 15 sivalmistetta, jonka aktiivisuus on 10 yksikköä.

- Reaktiota ylläpidetään 4 päivää huoneen lämpötilassa, kunnes HPLC:llä mitattu reagoanut erä on 72 %. Reaktioseos laimennetaan sen jälkeen 50 ml:lla vettä ja saatu humaani-insuliini-(tert.-butyyli)-B-30-Arg-B31 yhdessä
- 20 reagoimattoman sianinsuliinin kanssa saostetaan lisäämällä 1 ml 1-%:ista ZnCl₂:n liuosta vedessä pH:ssa 6,3. Muodostunut sakka sentrifugoidaan talteen, pestään vähäisellä määrällä vettä ja kuivataan alipaineessa. Saanto 420 mg.

- Eristetty tuote liuotetaan 2 ml:aan trifluorietik-
- 25 kahappoa ja pidetään 45 minuuttia huoneen lämpötilassa B30-aseman treoniinitähteen tert.-butyyლისuojaryhmän lohkaisemiseksi. Insuliinin eristämiseksi liuokseen lisätään 10 ml di-isopropyylieetteriä. Muodostunut sakka sentrifugoidaan talteen, pestään di-isopropyylieetterillä ja kuivataan.
- 30 Saanto 417 mg. Arg-B31-humaani-insuliinista erotetaan reagoimaton sianinsuliini kationinvaihtajassa ja Arg-B31-humaani-insuliini eristetään sitä sisältävistä fraktioista tunnetulla kiteytysmenetelmällä. Kiteytymä kuivataan alipaineessa. Saanto 205 mg. Aminohappoanalyysi
- 35 vastaa teoreettisia arvoja, ts. ylimääräisen arginiiniryh-

män sisältävän humaani-insuliinin aminohappokoostumusta.

Esimerkki 9

500 mg sianinsuliinia saatetaan reagoimaan esimerkissä 8 kuvatulla tavalla 9,2 g:n kanssa (tert.-butyyli)-treonyyliarginyyliarginiinia (Thr(But)-Arg-Arg) 5 ml:ssa vettä, jolloin lisätään 20 entsyymiyksikköä lysyyliendopeptidaasia (eristetty *Lysobacterium enzymogenes*-kannasta) pH:n ollessa 5,1.

Kolmen päivän kuluttua voidaan tavanomaisella HPLC-menetelmällä mitata 50 %:n reaktiosaanto. Reaktio lopetetaan kuten esimerkissä 1 ja tuote eristetään. Saanto 443 g.

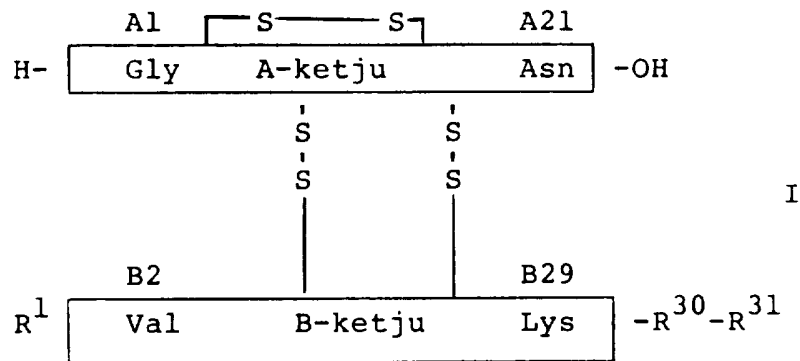
Tert.-butyyლისუოჯარყჲმჲნ ლოჲკაისუ ჯა Arg-B31-32-humaani-insuliinin puhdistus tapahtuu kuten esimerkissä 8. Saanto: 186 mg haluttua tuotetta, jonka aminohappoanalyysi vastaa teoreettista arvoa.

Esimerkki 10

5,0 g Thr-Arg saatetaan reagoimaan esimerkissä 8 kuvatulla tavalla 500 mg:n kanssa sianinsuliinia ja 10 entsyymiyksikön kanssa lysyyliendopeptidaasia 6 ml:ssa vettä pH:n ollessa 5. Jatkokäsittely ja puhdistus tapahtuu analogisesti edellisten esimerkkien kanssa. Pitkälle puhdistetun Arg-B31-humaani-insuliinin saanto on 215 mg, ja sen aminohappoanalyysi vastaa teoreettista arvoa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen insuliiniinjohdannaisen valmistamiseksi, jolla on kaava I



jossa

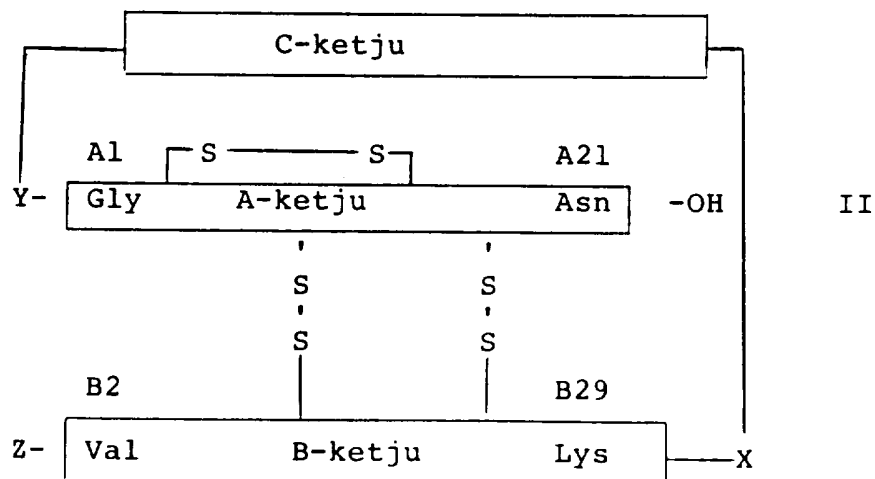
R^1 on H tai H-Phe, R^{30} on Ala- tai Thr-tähde ja R^{31} on 1 - 3 α -aminohappoa ryhmästä Thr, Arg ja Lys, joissa mahdollisesti läsnäoleva päätekarboksiryhmä voi olla vapaana, esteröityneenä, laktonina tai CH_2OH :ksi pelkistettynä, ja jonka kaavan I mukaisen insuliiniinjohdannaisen isoelektrinen piste on yli 5,8, t u n n e t t u siitä, että

a) kaavan I mukainen insuliini, jossa R^1 on H tai H-Phe,

R^{30} on geneettisesti koodattavan L-aminohapon tähde ja R^{31} on OH tai karboksiryhmän suojaryhmä, tai

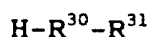
b) proinsuliini, jolla on kaava

II



jossa

C-ketju ja X yhdessä ovat geneettisesti koodattavien
L-aminohappojen sekvenssi, Z on H- tai ryhmä $H-(D)_m-Y-$
(Phe)_n-, m ja n ovat toisistaan riippumatta 0 tai 1, D on
5 geneettisesti koodattava L-aminohappojen esisekvenssi ja
Y on Arg tai Lys, saatetaan reagoimaan peptidin kanssa,
jolla on kaava III



III

10

jossa

R^{30} on Ala- tai Thr-tähde ja R^{31} on 1 - 3 α -aminohap-
poa ryhmästä Thr, Arg ja Lys, joissa mahdollisesti läsnä-
oleva päätekarboksiryhmä voi olla vapaana, esteröityneenä,
15 amidina, laktonina tai $CH_2 OH$:ksi pelkistettynä trypsiinin
tai trypsiinin kaltaisen endopeptidaasin läsnäollessa ve-
dessä, johon on mahdollisesti lisätty sopivaa orgaanista
liuotinta, pH-arvossa, joka on insuliinin isoelektrisen
pisteen alapuolella, ja mahdollisesti lisätyt suojaryhmät
20 poistetaan.

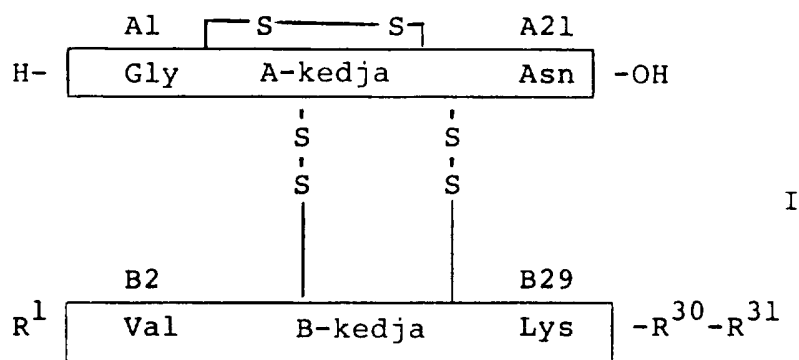
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukai-
nen insuliinijohdannainen, jossa R^1 on H-Phe.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan I mukai-
nen insuliinijohdannainen, jossa A-ketjulla ja ketjulla
(B2 - 30) on humaani-insuliinin sekvenssi.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen me-
netelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan hu-
30 maani-insuliini-Arg^{B31}-OH tai humaani-insuliini-Arg^{B31}-
Arg^{B32}-OH.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart insulinderivat med formeln I



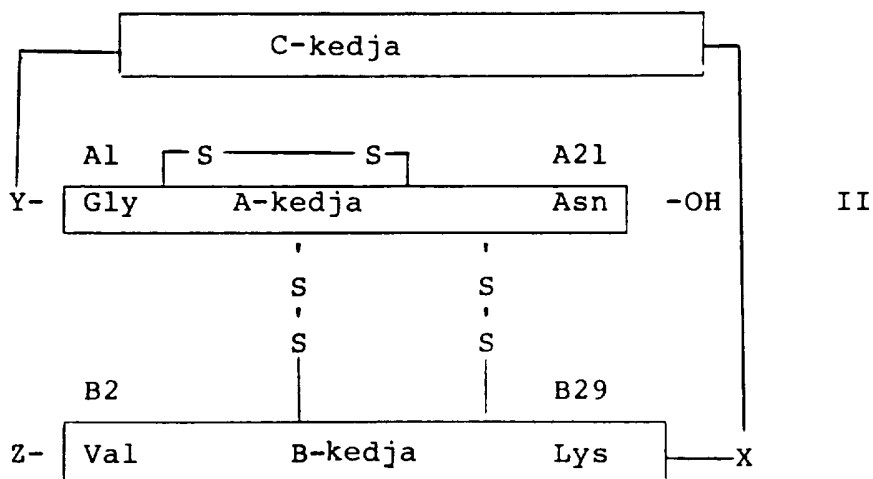
vari

15 R^1 är H eller H-Phe, R^{30} är en rest av Ala eller Thr och R^{31} är 1-3 α -aminosyror ur gruppen Thr, Arg och Lys, i vilka den eventuellt föreliggande terminala karboxigruppen kan föreligga fri, förestrad, som lakton eller reducerad till CH_2OH , och vilket insulinderivat enligt formeln I uppvisar en isoelektrisk punkt över 5,8, k ä n n e t e c k n a t

20 därav, att man

a) omsätter ett insulin med formeln I, vari R^1 är H eller H-Phe, R^{30} är en rest av en genetiskt kodbar L-aminosyra och R^{31} är OH eller en skyddsgrupp för karboxigruppen, eller

25 b) omsätter ett proinsulin, med formeln II



vari C-kedjan och X tillsammans utgör en sekvens för genetiskt kodbara L-aminosyror, Z är H- eller gruppen $H-(D)_m-Y(Phe)_n-$, m och n är oberoende av varandra 0 eller 1, D är en genetiskt kodbar försekvens för L-aminosyror och Y är Arg eller Lys; med en peptid med formeln III



vari

10 R^{30} är en rest av Ala eller Thr och R^{31} är 1-3 α -aminosyror ur gruppen Thr, Arg och Lys i vilka den eventuellt föreliggande terminala karboxigruppen kan föreligga fri, förestrad, som amid, som lakton eller reducerad till CH_2OH , i närvaro av trypsin eller ett trypsinliknande endopeptidas i vatten till vilket eventuellt tillsatts ett lämpligt organiskt lösningsmedel, vid ett pH-värde under den isoelektriska punkten hos insulinet, och eventuellt avspjälker införda skyddsgrupper.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att man framställer ett insulinderivat med formeln I, vari R^1 är H-Phe.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ett insulinderivat med formeln I, vari A-kedjan och kedjan
25 (B2-30) uppvisar sekvensen för humaninsulin.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer humaninsulin-Arg^{B31}-OH eller humaninsulin-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH.