



H U 0 0 0 2 1 5 5 8 2 B

(19) Országkód

**HU****MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL****SZABADALMI  
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**215 582 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: 2697/90

(22) A bejelentés napja: 1990. 05. 07.

(30) Elsőbbségi adatok:

07/349,472 1989. 05. 09. US

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>**C 12 P 21/02**

C 07 K 14/62

(40) A közzététel napja: 1991. 01. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Becker, Gerald Wayne, Indianapolis, Indiana (US)

Furman, Thomas Charles, Indianapolis, Indiana  
(US)

MacKellar, Warren C., Indianapolis, Indiana (US)

McDonough, James Patrick, Indianapolis, Indiana  
(US)

(73) Szabadalmaz:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(74) Képviseelő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest**(54) Eljárás humán inzulin N-terminális szekvenciájának enzimes eltávolítására****KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás humán inzulin vagy módosított humán inzulin előanyagának előállítására, amelynek során egy

*Met-Y-Protein*

általános képletű vegyületet, ahol „Protein” jelentése a humán inzulin vagy módosított humán inzulin

prekurzorának aminosav-szekvenciáját tartalmazza, mely szekvencia N-terminálisa nem védett, a hasítási hely két oldalán álló aminosavgyök prolintól eltérő, és az N-terminális aminosavgyök lizintől és arginintől eltérő, és Y Tyr vagy Arg, katepszin C enzimmel hasítják, kloridion és szulfhidril-reagens jelenlétében.

A genetikailag megváltozott prokariota sejtekben bioszintetizálódó fehérjék általában olyan proteinként nyilvánulnak meg, amelyek amino-végénél egy metionin kapcsolódik. A természetes fehérjéhez kapcsolódó metionin megváltoztatja a természetes fehérje biológiai aktivitását, konformációs stabilitását, antigenicitását stb., ezért – ha lehet – a legelőnyösebb eltávolítani a molekuláról.

Elméletileg az a leghatásosabb módja a kívánt természetes peptid előállításának, hogy a natív fehérje és az amino-terminális metionin közé egy hasítóhelyet helyezünk be. Valóságban azonban nagyon korlátozott azoknak a tényleges módszereknek a száma, melyekkel szelektív hasítást tudunk végezni.

Így például azoknál a természetes fehérjéknél, melyek nem tartalmaznak máshol metionint, a bróm-ciános módszer (szelektíven a metioninnál hasít) nagyon hatásos eljárás a természetes protein előállítására. A közepes nagyságú peptideknél és proteineknél azonban ritka a metionin hiánya. Továbbá a bróm-cián igen toxikus anyag, kezelésénél nagyon nagy elővigyázatossággal kell eljárni. Ezért olyan fontos egy olyan alternatív eljárást kidolgozni, mellyel lehasíthatjuk a természetes fehérje amino-végéről a felesleges metionint.

Az N-terminális metionilcsoport eltávolítására alkalmas módszer katepszin C enzimet, más néven dipeptidil-aminopeptidáz 1 enzimet (DAP-1) használni. A katepszin C olyan enzim, mely a protein vagy polipeptid N-terminális végéről két aminosavból álló egységeket hasít le. Megfelelő körülmények között megkezdődik a dipeptid lehasítása, és addig folytatódik, amíg az N-terminális aminosav nincs blokkolva; a hasítóhely bármelyik oldalán nincs egy prolin vagy az N-terminális aminosav nem lizin vagy arginin.

A bioszintetikus úton nyert protein előállításánál így felhasználhatjuk a katepszin C-t, ha a prekursor-molekulát úgy tervezzük meg, hogy egy aminosavat tartalmaz a végső metionin és a kívánt termék között. Az ilyen prekursor katepszin C enzimmel kezelve elérhetjük, hogy az enzim eltávolítja a végső dipeptidet és így hozzájutunk a kívánt termékhez. Ez az eljárás azonban szigorúan korlátozottan alkalmazható, minthogy a dipeptid-egységek eltávolítása várhatóan addig folytatódik, amíg a fent felsorolt befejező szekvenciák egyikéhez nem érünk. Vagyis a katepszin C alkalmazásának korlátozott felhasználhatósága általában csak azokra az esetekre szorítkozik, ahol a kívánt termék N-terminális része egyúttal egy katepszin C leállási pontot is jelent.

Felismertük azonban, hogy a prekursor molekula N-terminális dipeptidjének milyensége befolyásolja annak mértékét, ahogyan a katepszin C a dipeptidet eltávolítja a molekuláról. Ez a felismerés a találmányunk alapja. Felismertük, hogy ha a végálló dipeptid Met-Tyr vagy Met-Arg, a dipeptid eltávolítását óvatosan végezve a hasítás ellenőrizhető, és megkaphatjuk a kívánt terméket anélkül, hogy egy katepszin C leállási pont lenne a következő dipeptid után.

A találmány tárgya eljárás humán inzulin vagy módosított humán inzulin előanyagának előállítására, melynek során egy

### Met-Y-Protein

általános képletű vegyületet, ahol „Protein” jelentése a humán inzulin vagy módosított humán inzulin prekursorának aminosav-szekvenciáját tartalmazza, mely szekvencia N-terminálisa nem védett, a hasítási hely két oldalán álló aminosavgyökök prolintól eltérő és az N-terminális aminosavgyökök lizintől és argintől eltérő, és Y Tyr vagy Arg, katepszin C enzimmel hasítjuk, klordion és szulfhidril-reagens jelenlétében.

Ugyancsak a találmány tárgya a Met-Y-protein általános képletű vegyület.

Mint említettük, a találmány olyan vegyületekre irányul, melynek egyik részét úgy jelöltük meg, mint „protein”. A „protein” aminosavsorrendje megfelel a humán inzulin vagy egy humán inzulin-analóg előanyagának, továbbá jellemző rá, hogy az amino-terminális végénél nem tartalmaz a dipeptidet lehasító katepszin C leállási helyének megfelelő szekvenciát. A molekula általában három aminosav-szekvenciából áll, melyeket – az N-terminális végtől kezdve – B, X és A betűkkel jelölünk. A B-vel jelölt szekvencia jelöli a humán inzulin B láncát vagy módosított B láncát. Az A-val jelölt szekvencia jelenti a humán inzulin A láncát vagy módosított A láncát. A „módosított B lánc” vagy „módosított A lánc” olyan aminosavláncot jelent, amelyik diszulfid-kötéssel keresztül kapcsolódva a másik lánc natív vagy módosított alakjához, olyan molekulát alkot, mely inzulinszerű tulajdonsággal rendelkezik.

Az X csoport az inzulin A lánc vagy a módosított A lánc amino-terminális végéhez, illetve az inzulin B lánc vagy a módosított B lánc karboxil-terminális végéhez kapcsolódik. Az előanyag X kötőcsoportja változatos szerkezetű polipeptid lehet. Ez a polipeptid legalább 2, előnyösen 2–35, legelőnyösebben 6–35 aminosavból áll. Legelőnyösebb, ha az X kötőcsoport az a peptid, amelyik a humán proinzulin természetes kötőpeptidje. Ennek a kötőpeptidnek az aminosav-szekvenciája:

–Arg–Arg–Glu–Ala–Asp–Leu–Gln–Val–Gly–Gln–Val–Glu–Leu–Gly–Gly–Gly–Pro–Gly–Ala–Gly–Ser–Leu–Gln–Pro–Leu–Ala–Leu–Glu–Gly–Ser–Leu–Gln–Lys–Arg–.

Noha mint említettük, az az előnyös, ha az X csoport aminosavsorrendje megfelel a természetes kötőcsoport szekvenciájának, az X csoport lehet rövidebb peptidszekvencia különféle változata is. A követelmény csak annyi, hogy a szekvencia hossza tegye lehetővé a diszulfid-kötés kialakulását az A és B lánc között és lehasítható legyen az inzulin vagy módosított inzulin előanyagáról, megkapva így az inzulint vagy a módosított inzulint. Tipikus ilyen dipeptid X csoport lehet az –Arg–Arg– csoport. Az említett dipeptid kibővíthető, nevezetesen egy –Arg–X'–Arg– szekvenciává, ahol X' jelentése legalább egy aminosav. Igen előnyös az –Arg–Arg–Lys–Arg– peptid, valamint az ennél hosszabb, –Arg–Arg–X<sup>2</sup>–Lys–Arg– összetételű peptid, ahol X<sup>2</sup> jelentése legalább egy, előnyösebben legalább két aminosav. Ez a szekvencia természetesen maga foglalja a természetes kötőpeptidet is.

A natív humán inzulin B láncának aminosavsorrendje:

**Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-**  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-**  
 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

**Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr.**  
 26 27 28 29 30

A találmány szerinti vegyületek közül az a legelőnyösebb, ha a B lánc megfelel a természetes B lánc-szekvenciának. Ugyancsak előnyösek azonban azok a szekvenciák is, melyeknél egymástól függetlenül, az alábbi egy vagy több aminosav-módosítás található:

1. a 28. Prolint Asp, Val, Leu, Ile, Nle, Arg, His, Lys, Phe, Ala, Gly, citrulin vagy ornitin helyettesíti; ezek közül előnyös, ha a helyettesítés Val, Leu, Ile, Nle, Arg, His, Lys vagy ornitin aminosavval történik; legelőnyösebb a Lys;

**Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-**  
 1 2 2 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn.**  
 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Igen előnyös, ha a találmány szerinti vegyületben a természetes humán inzulin A lánc szerepel. Ugyancsak előnyös azonban az a módosulat is, ahol a 21. Asn-t Ala helyettesíti.

A használt rövidítések:

| rövidítés | aminosav    |
|-----------|-------------|
| Ala       | Alanin      |
| Arg       | Arginin     |
| Asn       | Aszparagin  |
| Cys       | Cisztein    |
| Gln       | Glutamin    |
| Glu       | Glutaminsav |
| Gly       | Glicin      |
| His       | Hisztidin   |
| Ile       | Izoleucin   |
| Leu       | Leucin      |
| Nle       | Norleucin   |
| Phe       | Fenilalanin |
| Pro       | Prolin      |
| Ser       | Szerin      |
| Thr       | Treonin     |
| Tyr       | Tirozin     |
| Val       | Valin       |

Azokat a találmány szerinti vegyületeket, ahol a humán inzulin vagy a humán inzulin-analóg előanyag egy Met-Tyr- vagy Met-Arg- peptiddel hosszabb, katepszin C enzimmel kezelve szelektíven át tudjuk alakítani az előnyossá. A katepszin C-vel való kezelés röviden az alábbiak szerint történik.

A katepszin C ahhoz, hogy aktívabbá váljon, kloridion (Cl<sup>-</sup>) jelenlétét igényli. Ezért a találmány szerinti vegyületnek átalakításához kloridiont adunk a reakcióelegyhez. A kloridion mennyisége minimális lehet,

2. a 29. lizint L-Pro-D-Pro, D-hidroxi-prolin, L-hidroxi-prolin, L-(N-metil)-Lys, D-Lys, L-(N-metil)-Arg vagy D-Arg helyettesíti; ezek közül a legelőnyösebb az L-Pro;

3. a 10. hisztidint Asp helyettesíti;

4. kiejtjük a 30. helyről a Thr-t.

A természetes humán inzulin A láncának aminosav-szekvenciája:

elég, ha katalitikus mennyiségben van jelen. Elegendő az a mennyiség, ami a protein előzetes kezeléséből visszamarad, például nátrium-klorid formájában. Elegendő tehát a nyomnyi mennyiségű kloridion jelenléte.

Minthogy a találmány szerinti vegyületek átalakítása enzimatis reakció, a katepszin C mennyisége ugyancsak minimális a kiindulási Met-Y-protein mennyiségéhez képest. A katepszin C/protein moláris aránya körülbelül 1:1000–100 000. Előnyösen az az arány nem nagyobb, mint 1:10 000, általában 1:10 000–70 000.

A reakciót általában alkalmas vizes pufferben végezzük, melynek kémhatása pH=2,5–10. Előnyösen ez a kémhatás a gyengén savanyú és a semleges közé esik, azaz pH=2,5–7, legelőnyösebben pH=3,0–6,0.

Bizonyos esetekben oldódást elősegítő anyagot alkalmazhatunk, ilyen például a karbamid, nátrium-dodecil-szulfát, guanidin stb.

Bármelyik olyan puffert alkalmazhatjuk, amellyel a kívánt pH-tartomány beállítható. Tipikus ilyen puffer például a nátrium-foszfát, nátrium-acetát, nátrium-citrát, kálium-foszfát, kálium-acetát, kálium-citrát stb. Előnyös puffer a nátrium-acetát és a kálium-acetát.

A találmány szerinti vegyület átalakítása igényli továbbá egy szulfhidril reagens jelenlétét is. Tipikus ilyen reagens a β-merkaptó-etanol, ditiotritol, ditió-eritritol, β-merkaptó-etil-amin, cisztein és hasonló. Előnyös ezek közül a β-merkaptó-etanol, ditiotritol és a cisztein alkalmazása, legelőnyösebb a cisztein.

A szulfhidril reagens moláris koncentrációja a végső reakcióelegyben 0,1–200 mM, előnyösen 1–20 mM.

A reakciót általában 15–45 °C közötti hőmérsékleten hajtjuk végre, a reakcióidő 1–24 óra. Az előnyös

hőmérséklet-tartomány: 20–45 °C, még előnyösebben: 22–45 °C; 6–20 óra reakcióidővel.

A találmány szerinti vegyületnek katepszin C-vel történő kezelése eredményeként keletkezik a „protein”-ként jelölt szerkezet, mely a humán inzulin vagy a humán inzulin-analóg előanyagának felel meg.

Az így keletkezett „protein”-t olyan körülmények közé visszük, ahol kialakulnak a molekula diszulfid kötései („hajtogatott” molekula). A humán inzulin vagy inzulin-analóg előanyag „hajtogatott” molekulájára jellemző:

1. A humán inzulin A láncából (vagy analógjából) és a humán inzulin B láncából (vagy analógjából) áll;

2. Három diszulfid kötéssel rendelkezik, melyek az A- és B lánc Cys aminosavjainak kénatomjait köti össze, nevezetesen az A-6 és A-11, az A-7 és B-7, illetőleg az A-20 és B-19 ciszteinek között;

3. Tartalmaz egy eltávolítható kötőcsoportot az inzulin A lánc (vagy analóg) amino-terminális és az inzulin B lánc (vagy analóg) amino-terminális és az inzulin B lánc (vagy analóg) karboxil-terminális vége között.

A „protein” összehajtogatásához alkalmazott körülmények biztosításához a 20 mM glicines pufferben pH=9 készített tömény „protein”-oldatot vízzel annyira hígítjuk meg, hogy a „protein” végső koncentrációja 1 g/l legyen. Cisztein-hidrokloridot adunk hozzá 1,25 mM koncentrációban, és a kémhatást nátrium-hidroxiddal pH=10,5–10,7 értékre állítjuk be, majd az oldatot 5 °C hőmérsékleten inkubáljuk 16 órán keresztül.

Az „összehajtogatott” molekulát ezután enzimátikus kezelésnek vetjük alá, mely eltávolítja a kötőcsoportot és kialakul a humán inzulin vagy inzulin-analóg kívánt szerkezete. Ehhez a hasításhoz jól ismert módszer a tripszin és a karboxi-peptidáz B együttes alkalmazása. Ezt a módszert már évekkal ezelőtt leírták [például W. Kemmler, J. L. Clark, J. Borg és D. F. Steiner, Fed. Proc., 30: 1210 (1971); W. Kemmler, J. D. Peterson és D. F. Steiner, J. Biol. Chem., 246: 6786–6791 (1971)].

A találmány szerinti vegyületeket a rekombináns DNS-módszerrel állítjuk elő. Előállításánál a kívánt vegyületet kódoló nukleotidszekvenciát a ma már rutinszerűen alkalmazott módszerrel készítjük el. Ez a módszer általában abból áll, hogy a kívánt szekvenciának elkészítjük az oligonukleotid fragmenseit és ezek komplementer szekvenciáit. Az oligonukleotidokat úgy tervezzük meg, hogy a kódolószekvencia egy fragmensét két komplementer szekvencia lapolja át és viszont. Az oligonukleotidokat párosítjuk és összekapcsoljuk, kialakítva a kívánt génszekvenciát.

A szekvenciát úgy építjük be egy klónozó vektorba, hogy a kódolt termék kifejeződhessen. Az alkalmas klónozó vektor az expresszió irányítószekvenciájának legalább egy részét tartalmazza.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célt szolgálnak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

### 1. Példa

#### A „nemhajtogatott” Met-Tyr-proinzulin hasítása

Fagyaszttva szárított Met-Tyr-proinzulint (cisztein formában; 36%-os tisztaságú) 0,25n ecetsav, 7M karbamidrendszerben oldunk fel, hogy a végső fehérjekoncentráció 4,68 mg/ml legyen ( $A_{276}$ , E=1). Ezt az oldatot 0,25n ecetsavval kétszeresére hígítjuk. 334 µl hígított oldathoz hozzáadunk 290 µl 0,25n ecetsav/7M karbamid-oldatot, 136 µl 0,25n ecetsavat és 40 µl 1M nátrium-dihidrogén-foszfát-oldatot: a végső térfogat 0,8 ml. 5n nátrium-hidroxid-oldattal a kémhatást pH=6,0 értékre állítjuk be. DAP-1(cisztein)nátrium-klorid-oldatot állítunk össze az alábbi alkotórészekből: 400 µl 1M nátrium-klorid-oldat, 250 µl 100 mM cisztein-hidroklorid (vízben, pH=6) és 400 µl 1,93 egység/ml dipeptidil-aminopeptidáz-1 (DAP-1)-oldat, melyet 50 mM citrát, 10 mM nátrium-klorid-oldatban készítettünk, pH=5.

53 µl DAP-1(cisztein)nátrium-klorid-oldatot összekeverünk 375 µl meghígított Met-Tyr-proinzulin-oldattal és szobahőmérsékleten (22 °C) tartjuk 30 percen át (a végső arány: DAP-1(Met-Tyr-proinzulin = 120 U/g). Hat térfogatnyi szulfitolizil-oldat (7M karbamid, 0,5M Tris pH=8,5, 0,2M dinátrium-szulfát, 0,01M kálium-tetratónát,  $K_2S_4O_6$ ) hozzáadásával leállítjuk a reakciót és fordított fázisú HPLC-vel analizálunk. Ilyen körülmények között a Met-Tyr-proinzulin kevert diszulfid kvantitatív átalakulása megtörténik proinzulin S-szulfonáttá.

### 2. példa

#### A „nemhajtogatott” Met-Tyr-proinzulin-analóg

(B lánc 28. aminosavja, a B-28: lizin, a B lánc

29. aminosavja, a B-29: prolin) hasítása

A Met-Tyr-proinzulin-analógot (B-28 Lys, B-29 Pro) nem oldott állapotú proteinként állítjuk elő az E. coli citoplazmájában. A nem oldott fehérjét a sejtek felszakításával és differenciál-centrifugálással különítjük el. Az oldatbavitelhez 7M karbamid, 5 mM cisztein koncentrációjú közegben, pH=11,5 kémhatáson inkubáljuk 10 percen át a fehérjét, majd az inkubációt pH=8,9 kémhatásnál folytatjuk. A proteint kationcserélő kromatográfiával tisztítjuk, elúcióhoz pH=4 kémhatású 50 mM ecetsav, 7M karbamidoldatban lineáris nátrium-klorid-grádiens alkalmazunk. A kapott preparátum – mely 1,5–1,7 mg/ml proinzulin-analógot tartalmaz 30–50%-os OD-tisztaság mellett – kémhatását pH=5,7 értékre állítjuk be 6n nátrium-hidroxid-oldattal. Az oldat 1,5 ml kivétjét hozzáadjuk 1,35 ml pH=5,7 kémhatású puffer (50 mM ecetsav, 50 mM nátrium-dihidrogén-foszfát), 0,075 ml 200 mM ciszteinoldat (pH=5,7 kémhatású pufferben) és 0,075 ml milliliterenként 7,76 DAP-1-egységet tartalmazó oldat (pH=5,7 kémhatású pufferben) elegyéhez. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten (22 °C) inkubáljuk 0,7–20 órán keresztül.

A reakciót 9 térfogatnyi szulfitolízis-reagens (7M karbamid, 0,5M Tris, pH=8,5, 0,2M nátrium-szulfát, 0,01M kálium-tetratónát) hozzáadásával állítjuk le és fordított HPLC-vel analizáljuk. Ilyen

körülmények között a Met-Tyr-proinzulin-analóg kevert diszulfid 80–86%-os mértékben alakul át proinzulin-analóg S-szulfonáttá anélkül, hogy a további enzimatis hasítás kimutathatóan károsítaná a terméket.

### 3. példa

*A „nemhajtogatott” Met-Arg-proinzulin-analóg (B–28: Lys, B–29: Pro) hasítása*

A Met-Arg-proinzulin-analógot (B–28 Lys, B–29 Pro) nem oldott állapotú proteinként állítjuk elő az *E. coli* citoplazmájában. A nem oldott fehérjét a sejtek felszakításával és differenciál-centrifugálással különítjük el. Az oldatbavitelhez 7M karbamid, 5 mM cisztein koncentrációjú közegben, pH=11,5 kémhatáson inkubáljuk 10 percen át a fehérjét, majd az inkubációt pH=8,9 kémhatásnál folytatjuk. A proteint kationcserélő kromatográfiával tisztítjuk, elúcióhoz pH=4 kémhatású 50 mM ecetsav, 7M karbamidoldatban lineáris nátrium-klorid-grádienszt alkalmazunk. A kapott preparátum – mely 1,5–1,7 mg/ml proinzulin-analógot tartalmaz 30–50%-os OD-tisztaság mellett – kémhatását pH=5,7 értékre állítjuk be 6n nátrium-hidroxid-oldattal. Az oldat 1,5 ml kivétjét hozzáadjuk 1,35 ml pH=5,7 kémhatású puffer (50 mM ecetsav, 50 mM nátrium-dihidrogén-foszfát), 0,075 ml 200 mM cisztein-oldat (pH=5,7 kémhatású pufferben) és 0,075 ml, milliliterenként 7,76 DAP–1-egységet tartalmazó oldat (pH=5,7 kémhatású pufferben) elegyéhez. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten (22 °C) inkubáljuk 0,7–20 órán keresztül.

A reakciót 9 térfogatnyi szulfitolízis-reagens (7M karbamid, 0,5M Tris, pH=8,5, 0,2M nátrium-szulfid, 0,01M kálium-tetra-tionát) hozzáadásával állítjuk le és fordított fázisú HPLC-vel analizáljuk. Ilyen körülmények között a Met-Tyr-proinzulin-analóg kevert diszulfid 80–86%-os mértékben alakul át proinzulin-analóg S-szulfonáttá anélkül, hogy a további enzimatis hasítás kimutathatóan károsítaná a terméket.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán inzulin vagy módosított humán inzulin előanyagának előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy

### *Met-Y-Protein*

általános képletű vegyületet, ahol „Protein” jelentése a humán inzulin vagy módosított humán inzulin prekursorának aminosav-szekvenciáját tartalmazza, mely szekvencia N-terminálisa nem védett, a hasítási hely két oldalán álló aminosavgyökök prolintól eltérő, és az N-terminális aminosavgyökök lizintől és argintól eltérő, és Y Tyr vagy Arg, katepszin C enzimmel hasítjuk, kloridion- és szulfhidril-reagens jelenlétében.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan Met-Y-Protein általános képletű vegyületet használunk, melyben Y az 1. igénypontban megadott, „Protein” három, B, A és X jelű aminosav-szekvenciából áll, ahol B jelentése a humán inzulin B lánc vagy egy módosított B lánc, A jelentése a humán inzulin A lánc vagy egy módosított A lánc, és X egy, az inzulin A lánc vagy módosított A lánc amino-terminális végéhez és az inzulin B lánc vagy módosított B lánc karboxi-terminális végéhez kapcsolódó csoport azzal a feltétellel, hogy (1) az X csoport legalább olyan hosszú szekvencia, mely az A és B lánc között diszulfid-kötésképződést tesz lehetővé, és (2) lehasítható az inzulinról vagy módosított inzulinról.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy A részként a humán inzulin A láncát alkalmazzuk.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy B-részként a humán inzulin B láncát alkalmazzuk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy X részként a humán proinzulin természetes kapcsolópeptidjét alkalmazzuk.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Met-Y-Protein általános képletű vegyületben Y-ként tirozint, B részként a 28 helyzetű prolinja helyett lizint, a 29 helyzetű lizin helyett prolint tartalmazó humán inzulin B láncot és X-ként a humán inzulin természetes kapcsolópeptidjét alkalmazzuk.