



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 788 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27.10.1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 K 7/40  
C 12 P 21/06  
A 61 K 37/26

## DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | DD C 07 K / 338 860 4 | (22) | 19.03.90 | (44) | 12.03.92 |
| (31) | 1341/89               | (32) | 20.03.89 | (33) | DK       |

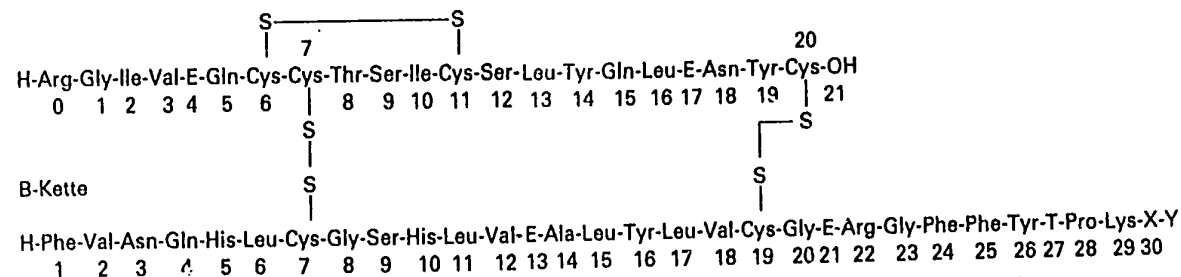
(71) siehe (73)  
(72) Balschmidt, Pär; Hansen, Finn B., DK  
(73) Novo-Nordisk A/S, Bagsvaerd, DK  
(74) Boehmert u. Boehmert, Hollerallee 32, W - 2800 Bremen 1, DE

## (54) Neue Insulinverbindungen

(55) neuartige Humaninsuline; verzögerte Insulinwirkung und/oder Antigenizität; vorgeschriebene Reste an den Positionen A0, A4, A17, A21, B13, B21, B27 und B30 der Aminosäuresequenz

(57) Neuartige Insulinverbindungen mit einer wünschenswerten verzögerten Insulinwirkung und/oder Antigenizität werden geschaffen. Die neuartigen Insulinverbindungen werden dargestellt durch die Formel II:

A-Kette

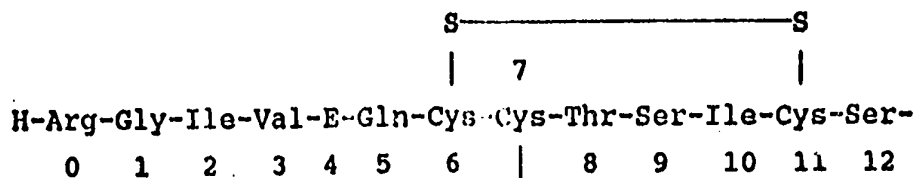


worin E jeweils Glu oder einen neutralen Aminosäurerest darstellt, durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, N einen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, T Thr oder Arg darstellt, X Thr, Ser, Ala oder OH darstellt und Y OR oder NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> darstellt, wobei R, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils Wasserstoff oder ein niederes Alkyl darstellen, es aber nicht vorhanden ist, wenn X OH darstellt.

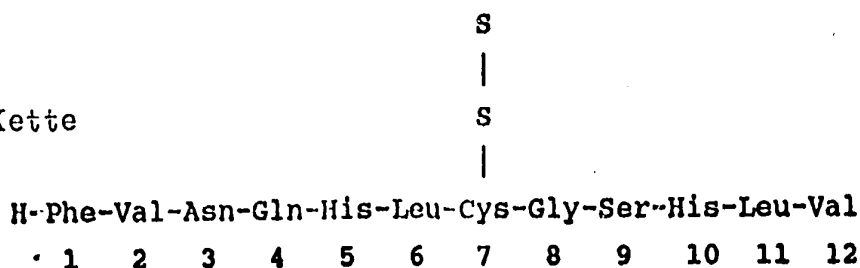
**Patentansprüche:**

1. Insulinverbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel II haben:

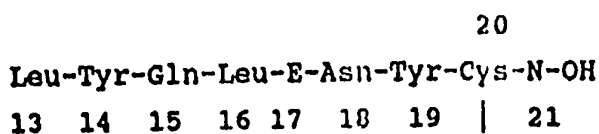
A-Kette



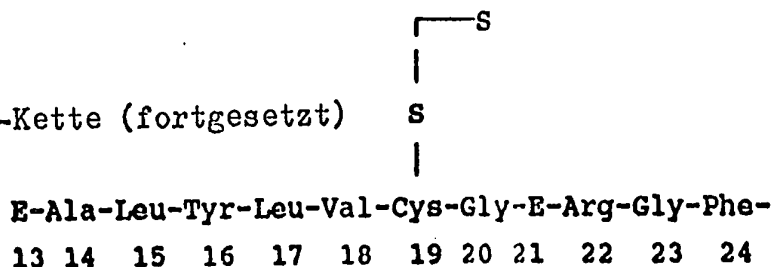
B-Kette



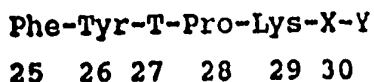
A-Kette (fortgesetzt)



B-Kette (fortgesetzt)



B-Kette (fortgesetzt)



worin

E jeweils Glu oder einen neutralen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, N einen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann,

T Thr oder Arg darstellt,

X Thr, Ser, Ala oder OH darstellt und

Y OR oder  $\text{NR}^1\text{R}^2$  darstellt, wobei R,  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  jeweils Wasserstoff oder ein niederes Alkyl darstellen, mit der Ausnahme, daß Y nicht vorhanden ist, wenn X gleich OH ist.

2. Insulinverbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jedes E jeweils Glu oder Gln darstellt, N Asn, Asp, Ser oder Gly darstellt, T Thr oder Arg darstellt, X Thr darstellt und Y  $\text{NH}_2$  darstellt.

3. Insulinverbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle E Glu darstellen, N Asn darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.
4. Insulinverbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle E Glu darstellen, N Ser darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.
5. Insulinverbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß E in der Position B 13 Gln darstellt und die restlichen E alle Glu darstellen, daß N Asn darstellt, daß T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.
6. Insulinverbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß E in der Position A 4 Gln darstellt und alle übrigen E Glu darstellen, N Asp darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.
7. Insulinverbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle E Glu darstellen, N Asn darstellt, T Arg darstellt und X OH darstellt.
8. Verfahren für die Herstellung von Insulinverbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Insulinvorläufer mit der allgemeinen Formel III

[illegible]

worin

E, N und T die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 haben, (AA)<sub>n</sub> eine Peptidkette mit n Aminosäureresten und Lys als C-Terminalrest darstellt oder eine Peptidbindung ist, wenn n = 0, und

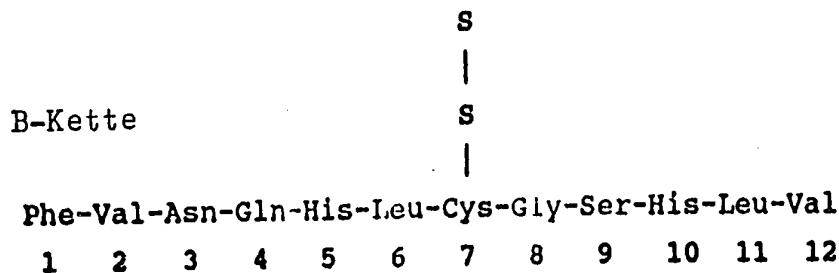
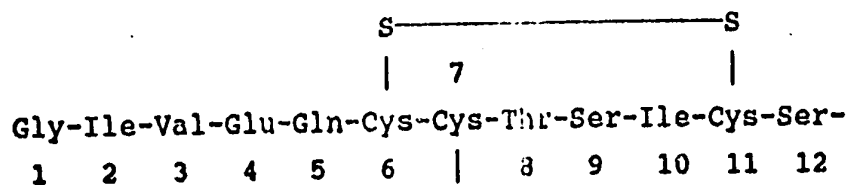
Z Wasserstoff oder eine Peptidkette von willkürlicher Länge mit Lys als dem C-Terminalrest darstellt, transpeptidiert oder durch eine Endopeptidase mit einer ausschließlichen Spezifität zum Schneiden an der Karboxyseite eines Lysinrestes geschnitten wird.

9. Insulinpräparate, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie wenigstens eine Insulinverbindung nach Anspruch 1 und wahlweise auch ein schnellwirkendes Insulin, wie menschliches Insulin, Insulin von Haustieren oder deren Analoge oder Derivate, enthalten.
10. Insulinpräparate nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie bestehen aus einer Lösung von wenigstens einer Insulinverbindung nach Anspruch 1 in einem wäßrigen Medium, das mit Blutserum isoosmotisch ist, einen pH-Wert zwischen 4 und 5,5 hat und wahlweise einen Puffer und/oder ein Präservierungsmittel enthält, und wahlweise einem schnellwirkenden Insulin.

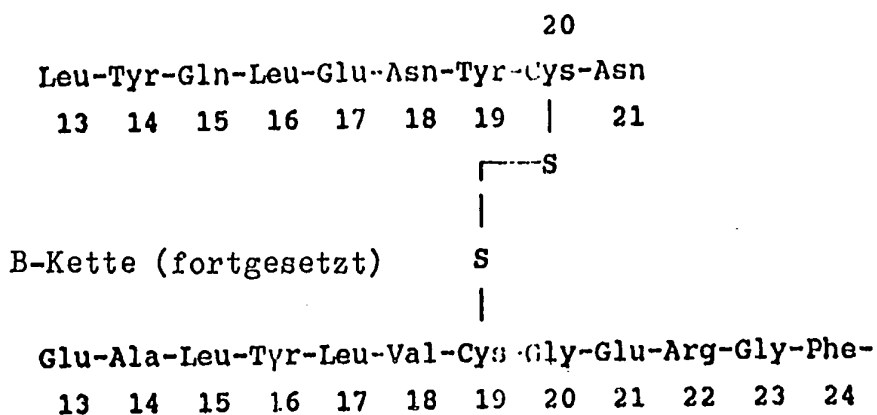
Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Vorliegende Erfindung bezieht sich auf neuartige Insulinverbindungen, auf ein Verfahren zur Herstellung der neuartigen Insulinverbindungen und auf therapeutische Präparate, welche Langzeitwirkung haben und wenigstens eine der neuartigen Insulinverbindungen und, wenn das gewünscht wird, ein schnell wirkendes Insulin enthalten. Seit der Entdeckung des Insulins im Jahre 1922 wurden viele verschiedene Typen von Insulinpräparaten für die Behandlung von Diabetes mellitus eingesetzt. Zunächst wurden ausschließlich Insulinlösungen eingesetzt, die eine rasch beginnende und eine relativ rasch endende Insulinaktivität aufwiesen, aber später wurden Insulinpräparate mit einem breiteren Aktivitätsprofil durch Senkung der Löslichkeit des Insulins durch den Zusatz von z. B. Zinksalz und/oder Protaminen entwickelt. Auf Grund der Verfügbarkeit wurde das bisher eingesetzte Insulin traditionell in der Regel aus der Pankreas von Haustieren, vor allem Rindern, Schweinen und Schafen, gewonnen. In jüngster Zeit erschienen auf dem Markt aber auch Insulinpräparate, die menschliches Insulin biotechnischer Herkunft enthielten. Die Struktur des menschlichen Insulins wird in der Formel I gezeig.

A-Kette



A-Kette (fortgesetzt)



### B-Kette (fortgesetzt)

**Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr**

**25    26    27    28    29    30**

Die Insuline von bestimmten Haustieren sind in der Struktur dem menschlichen Insulin sehr ähnlich. Hunde- und Schweineinsulin unterscheidet sich vom menschlichen Insulin nur darin, daß es Ala anstelle von Thr in der Position 30 in der B-Kette enthält, und Kanincheninsulin enthält in der gleichen Position Ser. Diese Insuline können durch Ersatz des B30-Aminosäurerestes durch Thr nach semisynthetischen Verfahren, wie sie beispielsweise von Morihara u. a., *Nature* **280** (1979), 412–413, und Marcussen (US-PS4343898) beschrieben werden, in menschliches Insulin umgewandelt werden. Präparate, die Insulin in Lösung enthalten, sind in der Regel schnellwirkend, wobei die Insulinaktivität wenige Stunden nach der Injektion aufhört. Folglich müssen häufige Injektionen, normalerweise mehrere am Tag, gegeben werden, um den Blutglukosepegel des Diabetikers zu normalisieren.

Um diesen Nachteil zu überwinden, wurden Insulinpräparate mit Langzeitwirkung zusammengestellt, um die Insulinaktivität über mehrere Stunden aufrechtzuerhalten, bis zu 24 Stunden oder sogar noch länger. Bei Anwendung dieser Langzeitpräparate brauchen einige Diabetespatienten nur wenige Injektionen täglich zu erhalten, beispielsweise ein oder zwei Injektionen in 24 Stunden.

Eine solche Langzeitwirkung kann durch Umwandlung des Insulins in ein leicht lösliches Salz, beispielsweise Zinkinsulin oder Protamininsulin, erreicht werden. Die leicht löslichen Insulinsalze werden in Form von Suspensionen verwendet, aus denen das Insulin nach der subkutanen oder intramuskulären Injektion allmählich freigesetzt wird.

In jüngerer Zeit wurden andere Methoden entwickelt, um eine Langzeitwirkung zu erreichen. Ein Beispiel dafür ist die Einkapselung von Insulinkristallen in polymerisiertes Serumalbumin. Ein anderes Beispiel ist die ständig wirkende Infusionsvorrichtung, die sogenannte Insulinpumpe, die jedoch unbequem sein und ein Risiko für den Patienten bergen kann. Die Beschreibungen der europäischen Patentveröffentlichungen Nr. EP 132770, EP 132769 und EP 135720 legen die Herstellung und den Einsatz von Insulinderivaten offen, bei denen der C-Terminus der B-Kette durch eine organische Gruppe erweitert wird, die wenigstens eine positive Ladung trägt, vorzugsweise Arg-OH oder Arg-Arg-OH. Präparate, die Suspensionen solcher Insulinderivate enthalten, weisen eine hinausschiebende Wirkung auf. Diese Insulinverbindungen sind jedoch für die Zubereitung von neuartigen, brauchbaren Insulinpräparaten mit Langzeitwirkung nicht sehr geeignet, da festgestellt wurde, daß der Grad der hinausschiebenden Wirkung sehr begrenzt ist (J. Markussen u. a., *Protein Engineering* 1, 205-213 [1987]). Die Eigenschaften von Insulinderivaten, bei denen der N-Terminus der B-Kette durch das Dipeptid Arg-Arg erweitert wird, wurden von R. Geiger und F. Enzman in Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide, Tokushima 1978; *Excerpta Medica*, Amsterdam 1979, S. 306-310, beschrieben. Es wurde festgestellt, daß die Löslichkeit dieser Insulinverbindung um deren isoelektrischen Punkt sogar noch höher als die des normalen Insulins ist.

und deren Isoelektrischer Punkt sogar noch höher als der des natürlichen Insulins. Substitutionen im Insulinmolekül können mit dem Zweck eingeführt werden, das Aktivitätsprofil des Insulins bei der Behandlung von Diabetes zu verbessern. So legt die europäische Patentveröffentlichung Nr. EP 194864 offen, daß eine oder mehrere Substitutionen von Glu durch beispielsweise Gln und/oder die Substitution von Thr.<sup>B27</sup> durch Arg, verbunden mit einem Blockieren der C-Terminal-Karboxylgruppe in Form eines Esters oder Amids, eine Verschiebung der Aussäulungszone des Insulins auf eine Art und Weise bewirken, welche eine langsame Freisetzung nach der Injektion ermöglicht.

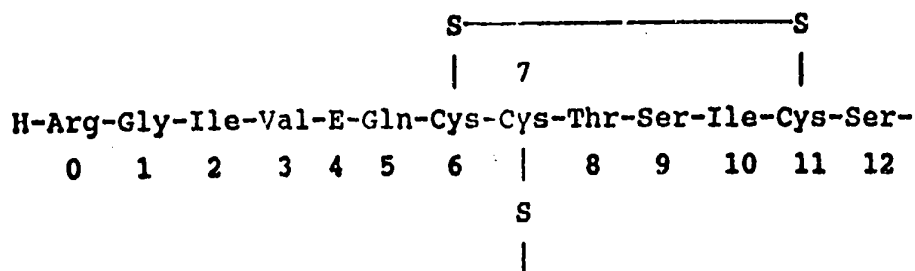
Die Verwendung von Insulinverbindungen dieser Art, die innere Aminosäuresubstitutionen enthalten, in Präparaten für die lebenslange Verabreichung zur Behandlung von Diabetes birgt ein beachtliches Risiko der Aktivierung des Immunsystems des Patienten, was zur Einführung von Insulinantikörpern in das Blut führt.

Patienten, was zur Einführung von Insulinanalogen in das Blut führte. In den letzten Jahren wurden verschiedene Versuche unternommen, Substitutionen für die herkömmlichen Insulinpräparate mit verzögerter Insulinwirkung zu finden. Die Gründe dafür liegen darin, daß Diabetologen festgestellt haben, daß die herkömmlichen Insulinlangzeitpräparate eine zu kurze Wirkungsdauer haben, vor allem nach Einführung des menschlichen Insulins, und daß die Einführung des sogenannten Insulinstiftes die Forderung nach einem gelösten, langwirkenden Insulin verstärkt hat.

**Ziel der Erfindung ist die Schaffung von neuartigen Insulinanalogen, die eine hinausschiebende Insulinwirkung haben und die eine möglichst niedrige Antigenizität aufweisen.**

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß Insulinverbindungen mit der allgemeinen Formel II

### A-Kette



B-Kette

S

H-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A-Kette (fortgesetzt)

20

Leu-Tyr-Gln-Leu-E-Asn-Tyr-Cys-N-OH

13 14 15 16 17 18 19 | 21

B-Kette (fortgesetzt)

S

S

E-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-E-Arg-Gly-Phe-

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

B-Kette (fortgesetzt)

Phe-Tyr-T-Pro-Lys-X-Y

25 26 27 28 29 30

worin

E einzeln Glu oder einen neutralen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, N einen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, T Thr oder Arg darstellt, X Thr, Ser, Ala oder OH darstellt und Y OR oder NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> darstellt, worin R, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils Wasserstoff oder ein niederes Alkyl sind, nicht aber vorhanden sind, wenn X OH darstellt, die gewünschte hinauschiebende Insulinwirkung und/oder Antigenizität aufweisen. Die Erfindung bezieht sich daher auf Insulinverbindungen mit der allgemeinen Formel II:

A-Kette

S-----S

| 7 |

H-Arg-Gly-Ile-Val-E-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-

0 1 2 3 4 5 6 | 8 9 10 11 12

S

|

B-Kette

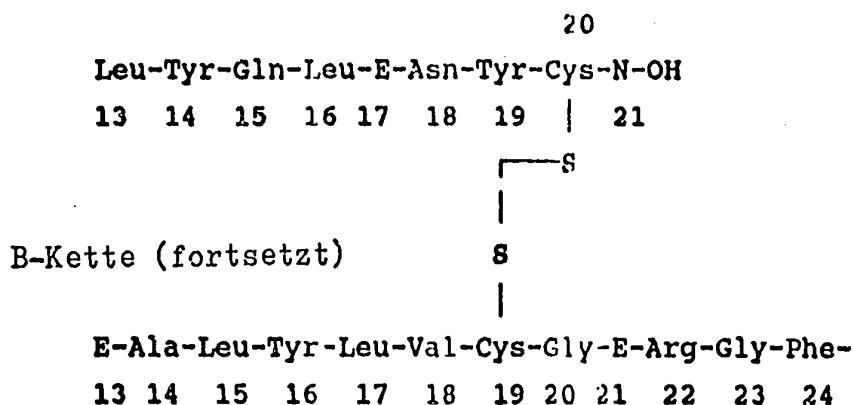
S

|

H-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A-Kette (fortgesetzt)



B-Kette (fortgesetzt)

B-Kette (fortgesetzt)

Phe-Tyr-T-Pro-Lys-X-Y  
25 26 27 28 29 30

worin E jeweils Glu oder einen neutralen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, N einen Aminosäurerest darstellt, der durch Nukleotidsequenzen codiert werden kann, T Thr oder Arg darstellt, X Thr, Ser, Ala oder OH darstellt und Y C<sub>1</sub> oder NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> darstellt, wobei R, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> jeweils Wasserstoff oder ein niederes Alkyl darstellen, aber nicht vorhanden sind, wenn X OH darstellt.

Unter dem Begriff „niederes Alkyl“ versteht man im vorliegenden Zusammenhang gerade oder verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen.

Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen E jeweils Glu oder Gln darstellt, N Asn, Asp, Ser oder Gly darstellt, T Thr oder Arg darstellt, X Thr darstellt und Y NH<sub>2</sub> darstellt.

Die Erfindung bezieht sich vorzugsweise auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen wenigstens eines der Symbole E, N und T einen Aminosäurerest darstellt, der sich von dem entsprechenden Rest des menschlichen Insulins unterscheidet, wenn Y OH darstellt.

Die Erfindung bezieht sich speziell auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen alle E Glu darstellen, N Asn darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.

Die Erfindung bezieht sich speziell auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen alle E Glu darstellen, N Ser darstellt, R und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.

Die Erfindung bezieht sich speziell auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen E in der Position B13 Gln und alle übrigen E Glu darstellen, N Asn darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.

Die Erfindung bezieht sich speziell auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen E in der Position A4 Gln und alle übrigen E Glu darstellen, N Asp darstellt, T und X beide Thr darstellen und Y NH<sub>2</sub> darstellt.

Die Erfindung bezieht sich speziell auf Insulinverbindungen mit der Formel II, bei denen alle E Glu darstellen, N Asn darstellt, T Arg darstellt und X OH darstellt.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Herstellung von Insulinverbindungen mit der Formel II, nach welcher ein Insulinvorläufer mit der allgemeinen Formel III



|                                                                                        |   |  |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---|--|-------------------|
|                                                                                        | S |  | (AA) <sup>n</sup> |
| Arg-Gly-Ile-Val-E-Gln-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-E-Asn-Tyr-Cys-N-OH       |   |  |                   |
| 1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19      21     |   |  |                   |
| B-Kette                                                                                | S |  |                   |
| Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-E-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-E-Arg  |   |  |                   |
| 1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22 |   |  |                   |
| B-Kette (fortgesetzt)                                                                  |   |  |                   |
| Gly-Phe-Phe-Tyr-T-Pro-Lys                                                              |   |  |                   |
| 23  24  25  26  27  28  29                                                             |   |  |                   |

worin E, N und T alle die oben angegebene Bedeutung haben, (AA)<sub>n</sub> eine Peptidkette mit n Aminosäureresten und Lys als C-Terminalrest darstellt oder eine Peptidbindung ist, wenn n = 0, und Z Wasserstoff oder eine Peptidkette von willkürlicher Länge mit Lys als C-Terminalrest darstellt, transpeptidiert oder durch eine Endopeptidas geschnitten wird, welche eine ausschließliche Spezifität für das Schneiden an der Karboxyseite eines Lysinrestes hat.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Insulinpräparate, die wenigstens eine Insulinverbindung mit der Formel II und wahlweise auch ein schnell wirkendes Insulin, wie menschliches Insulin, das Insulin von Haustieren oder deren Derivate oder Analoge, enthält. Diese Präparate können die Form einer anwendungsbereiten Lösung oder eines lyophilisierten Präparates, das beispielsweise durch sterilisiertes Wasser vor der Anwendung wiederhergestellt werden muß.

Ein besonders vorteilhaftes Ausführungsbeispiel des Insulinpräparates nach der Erfindung ist ein Präparat für die parenterale Verabreichung mit hinauszögernder Insulinwirkung, das aus einer Lösung von wenigstens einer Insulinverbindung nach der Erfindung in einem wäßrigen Medium, das mit dem Blutserum isosmotisch ist, einen pH-Wert zwischen 4 und 5,5 hat und wahlweise einen Puffer und/oder ein Präservierungsmittel enthält, und gegebenenfalls einem schnellwirkenden Insulin besteht. Die Insulinverbindungen nach der Erfindung erfüllen die Forderungen der Diabetologen durch minimale Änderungen am menschlichen Insulinmolekül, die jeweils entweder dem menschlichen Körper vertraut oder über mehrere Jahre hinweg geprüft sind und bei denen auf diese Weise keine Auslösung einer Immunreaktion festgestellt wurde. Das Hauptmerkmal der Insulinverbindungen nach der Erfindung besteht darin, daß sie als menschliches Insulin beschrieben werden können, bei dem an das N-Terminal und die A-Kette ein Argininrest angefügt wurde und bei dem die C-Terminal-Karboxyl-Gruppe der B-Kette vorzugsweise in Form des Amids blockiert wurde. Es ist vorgesehen, die Insulinverbindungen so einzusetzen, daß sie in einer schwach sauren Lösung aufgelöst werden, und unter diesen Bedingungen kann während der Lagerungszeit des Präparates eine beachtliche Deamidierung des Asparginrestes in der Position A21 eintreten, was der verlängerten Wirkung entgegenwirkt. Durch Einführung einer Substitution von einem oder möglicherweise zwei der Glutaminsäurereste durch Glutamin kann diese Wirkung kontrolliert werden.

Bei einem insulinabhängigen Diabetes besteht eine häufig angewandte Therapie in der Verabreichung von zwei täglichen Injektionen eines Langzeit-Insulinpräparates, einer am Morgen und der anderen am Abend, unmittelbar vor dem Schlafengehen, um einen Insulinbasalpegel zu schaffen. Außerdem werden drei Injektionen eines schnellwirkenden Insulinpräparates vor den Hauptmahlzeiten gegeben. Der Nachteil dieser Therapie besteht darin, daß die späte Injektion des Langzeitpräparates zu einem gefährlich niedrigen Glukoseblutpegel im Verlauf der Nacht führen kann. Das kann dadurch vermieden werden, daß man vor dem Abendessen ein gemischtes Präparat aus einem verzögert wirkenden und einem schnellwirkenden Insulin injiziert, wodurch Hypoglykämie, wenn überhaupt, während des Abends auftritt, wo sie durch beispielsweise einen leichten Imbiß behoben werden kann. Bei dieser Art von Therapie kommt es aber oft am Morgen zu Hyperglykämie, da die am häufigsten gebrauchten Insulinpräparate mit verzögerter Wirkung, „Insulatard“® und „Monotard“®, nicht über eine ausreichend lange Zeit wirken. Es ist also notwendig, für die Diabetes-Patienten ein Insulinpräparat zu schaffen, das länger als die normalerweise eingesetzten Präparate wirkt, besonders, wenn eine Injektion eines solchen Präparates über einen oder sogar mehrere Tage ausreicht. Insulinpräparate, die nach der Erfindung hergestellt werden, weisen eine verzögerte Insulinwirkung von längerer Dauer als das gegenwärtig angewendete Insulinpräparat mit verzögerter Wirkung, „Monotard“®, auf.

Die bevorzugten Insulinverbindungen der Erfindung sind besonders vorteilhaft bei der Anwendung in Lösungspräparaten, da die Löslichkeit hoch ist, selbst bei einem pH-Wert von etwa 5 (bei dem die Deamidierung wesentlich verringert wird), und eine ausgeprägte verzögerte Wirkung nach der subkutanen Injektion beibehalten wird.

Die Erfindung bezieht sich besonders auf die folgenden spezifischen Verbindungen:

[Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid)

[Arg<sup>A0</sup>, Gln<sup>B13</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid)

[Arg<sup>A0</sup>, Gln<sup>A4</sup>, Asp<sup>A21</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid)

[Arg<sup>A0</sup>, Ser<sup>A21</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid)

[Arg<sup>A0</sup>, Arg<sup>B27</sup>]-des [Thr<sup>B30</sup>]-menschliches Insulin.

Die Insulinverbindungen nach der Erfindung können aus anderen Insulinen unter großen Schwierigkeiten durch Einführung des zusätzlichen Arginin-Restes am N-Terminal der A-Kette des Insulinmoleküls durch chemische Synthese hergestellt werden. Eine weit attraktivere Route ist die enzymatisch katalysierte Umwandlung eines einzelnen Kettenvorläufers, z. B. eines natürlich vorkommenden Proinsulins oder Präproinsulins oder eines biosynthetisch hergestellten Vorläufers mit der allgemeinen Formel III:

[illegible]

worin E, N und T alle die in der Formel II gegebene Bedeutung haben, (AA)<sub>n</sub> eine Peptidkette mit n Aminosäureresten und Lys als dem C-Terminalrest darstellt oder eine Peptidbindung ist, wenn n = 0, und Z Wasserstoff oder eine Peptidkette von willkürlicher Länge mit Lys als dem C-Terminalrest darstellt.

Das für die enzymatische Umwandlung verwendete Enzym sollte eine trypsinartige Endopeptidas sein, die eine Peptidkette an der Karboxyseite eines Lysinrests schneiden kann. Oft kann Trypsin direkt verwendet werden, besonders vorteilhaft aber ist eine Endopeptidase, die Lysinspezifität aufweist, z. B. Endoproteinase Lys-C von Lysobacter-Enzymogenen (Boehringer Mannheim) oder Lysyl-Endopeptidase von *Achromobacter lyticus* (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Die Reaktion kann als Transpeptidation unter Verwendung von Threoninamid unter ähnlichen Bedingungen ausgeführt werden, wie sie z. B. in der europäischen Patentveröffentlichung Nr. EP 163529 beschrieben werden, was dann direkt zum B30-Amid führt, sie kann aber auch als zweistufige Reaktion ausgeführt werden, wobei mit einer enzymatischen Schneidung begonnen wird, die zu einer des (Thr<sup>830</sup>)-Verbindung führt, die dann durch eine Kopplungsreaktion, wie sie von Morihara u. a., ebenda, beschrieben wurde, in das B30-Amid umgewandelt wird.

Die Vorläufer der Insulinverbindungen nach der Erfindung können biosynthetisch in einem Hefewirt, der eine DNA-Folge exprimiert, die den Vorläufer codiert, hergestellt werden. Um die Sekretion in das Wachstumsmedium zu erreichen, kann die DNA-Folge, welche den Insulinvorläufer codiert, mit einer anderen DNA-Folge verschmolzen werden, welche ein in Hefe funktionelles Signalpeptid codiert. Die Sekretion kann erreicht werden durch Einführung der MFa 1-Führungsfolge von *Saccharomyces cerevisiae* in das Expressionsplasmid (Kurjan und Herskowitz, Cell 30, 933-943 [1982]). Bei einer bevorzugten Konstruktion wird die DNA-Folge, welche die gesamte MFa 1-Führungsfolge, einschließlich der dibasischen Stelle LysArg, aber ausschließlich der Peptidfolge GluAlaGluAla, die das Substrat für die Hefeprotease DPAP (Dipeptidylaminopeptidase) ist, codiert, verwendet. Auf diese Weise wird eine effektive Sekretion der Insulinvorläufer mit dem korrekten N-Terminal erreicht. DNA-Folgen mit der Codierung für modifizierte Insulinvorläufer wurden unter Durchführung der In-vitro-Mutagenese auf der Expressionskassette konstruiert, welche im BamHI-Restriktionsfragment des Expressionsplasmids pYGABA enthalten ist, wie das in der Abb. 1 gezeigt wird. Das Plasmid enthält Selektionsmarker und Replikationssignale, die in Hefe funktional sind, und hat eine Länge von 1 103 Basenpaaren. Das BamHI-Fragment enthält folgendes: Den GAPDH-Fußaufwärts-Bereich (Glyzeraledehyd-3-phosphatdehydrogenase), der die Promotersequenzen von Position -389 bis -1 nach Bitter und Egan, Gene 32 (1984), 263-274, enthält. Dem 5'-Ende des Flußaufwärts-Bereiches wurden BamHI-Linker angefügt. Diese Promotersequenz wird direkt an die von Kurjan und Herskowitz beschriebene Sequenz verschmolzen, welche die 85 N-Terminal-Aminosäuren der MFa 1-Führungssequenz codiert. Die MFa 1-Führungsfolge wird direkt mit der Codierungssequenz für die einzelne Kette des Insulinvorläufers des-[Thr<sup>830</sup>]-menschliches Insulin (SCI) verschmolzen, das ein synthetisches, konstruiertes Gen mit folgender Sequenz ist:

**TTTCGTTAACCAACACTTGTGTGGTTCTCACTTGCTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGT-  
AAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGAAACATGAACCAACACCA-  
PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly-**

**GAAAGAGGTTTCTTCTACACTCCAAAGGGTATTGTTGAACAATGTTGTACTTCTATTTGT-  
CTTTCTCCAAAGAAGATGTGAGGTTTCCCATAACAACCTTGTTACAACATGAAGATAACA-  
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCys-**

**Sall**

**TCTTTGTACCAATTGGAAACTACTGTAACATAAGCGTCG  
AGAAACATGGTTAACCTTTTGATGACATTGATTATCGCAGCAGCT  
SerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsnEndEnd**

Gezeigt wird auch, daß die Translation des Insulinvorläufer-Gens mit zwei Stoppkodonen beendet wird, und unmittelbar dahinter befindet sich eine Sall-Restriktionsstelle. Der Terminatorbereich ist mit dem Sall-BamHI-Restriktionsfragment identisch, das in der europäischen Patentveröffentlichung Nr. 0116201 A1 beschrieben wird. Die Sequenz wird vollständig unter Anwendung von Standardtechniken konstruiert.

Angewendet wurde die Mutagenesemethode der „auf die Oligonukleotidstelle gerichteten Mutagenese“, die von Zoller und Schmith, DNA, Bd. 3, Nr. 6, 479-488 (1984), beschrieben wurde. Die Methode ist nachstehend kurz aufgeführt und wird ausführlicher im Beispiel 1 beschrieben. Die Insulinvorläuferfolge, die aus dem Expressionsplasmid isoliert wurde, wird in einen einzelsträngigen, runden M13-Bakteriophag-Vektor eingefügt. An das einzelsträngige Genom wird ein chemisch synthetisierter, komplementärer DNA-Strang hybridisiert. Der DNA-Strang enthält die gewünschte Sequenz, umgeben von Sequenzen, die zu den Insulinsequenzen auf der runden DNA vollkommen homolog sind. Der Starter wird dann in vitro über die gesamte Länge des runden Genoms unter Verwendung von Klenow-Polymerase biochemisch erweitert. Dieser Strang ergibt einzelsträngige Phase, die, wenn sie in *E. coli* gezogen werden, die Möglichkeit der Isolierung von doppelsträngiger DNA mit der gewünschten Folge bieten. Aus dieser doppelsträngigen DNA wird ein Restriktionsfragment isoliert und wieder in den Expressionsvektor eingesetzt.

Die Erfindung wird unten ausführlicher unter Bezugnahme auf die Zeichnungen erklärt, in denen

Abb. 1 das Expressionsplasmid pYGABA 14276 zeigt,  
Abb. 2 den Hefevektor pAB 24 zeigt und  
Abb. 3 eine grafische Darstellung der Absorption des Insulins aus einem subkutanen Depot zeigt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

#### Beispiel I

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das zur Expression des Vorläufers B(1-29)-AKR-A(1-21) verwendet werden kann. Die Expressionskassette, die im Expressionsplasmid pYGABA (das in der Abb. 1 gezeigt wird) an einem BamHI-Restriktionsfragment enthalten ist, wurde isoliert: Das Expressionsplasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease BamHI inkubiert. Es wurden folgende Bedingungen angewendet: 20 µg Plasmid, 50 Einheiten BamHI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM DTT in einem Volumen von 100 µl. Die Temperatur betrug 37°C, die Reaktionszeit 2 Stunden. Die beiden DNA-Fragmente wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel getrennt, und das gewünschte Fragment wurde isoliert.

#### Ligation an den M13-Vektor M13mp18:

Das isolierte Restriktionsfragment wurde an den Bakteriophag-Vektor M13mp18 ligiert, der ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease BamHI im folgenden Reaktionsgemisch geschnitten worden war: Fragment 0,2 µg, Vektor 0,02 µg, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und 1 mM ATP in einem Volumen von 20 µl. Es wurden 5 µl dieses Gemischs in den E. coli-Stamm JM101 transformiert. Das Vorhandensein des Fragments im Vektor und die Orientierung des Fragmentes wurden durch Restriktionsenzymkartierung auf doppelsträngiger M13-DNA, die aus den Transformanten isoliert wurde, bestimmt.

#### Isolierung von einzelsträngiger (ss) DNA (Matrize):

Aus dem oben beschriebenen Transformaten wurde ss-DNA nach einer Methode isoliert, die von Messing in Gene, 19, 269 bis 276 (1982), beschrieben wurde.

#### 5'-Phosphorylierung des Mutagenisationsstarters:

Der Mutagenisationsstarter mit der Folge 5'-CAACAATACCTCTCTAGCCTTTGGAGTG-3' wurde am 5'-Ende in 30 µl Reaktionsgemisch phosphoryliert, das 70 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 pMol Oligonukleotid und 3,6 Einheiten von T4-Polynukleotidkinase enthielt. Die Reaktion wurde 30 Minuten lang bei 37°C ausgeführt. Dann wurde das Enzym durch zehnminütiges Inkubieren des Gemischs bei 65°C inaktiviert.

#### Hybridisierung von Matrize und phosphoryliertem Mutagenisationsstarter:

Die Hybridisierung von Matrize und Starter erfolgte in 10 µl eines Volumens, das 0,5 pMol Matrize, 5 pMol Starter, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl und 1 mM DTT enthielt, durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C und anschließendes Abkühlen auf 0°C.

#### Erweiterungs-/Ligationsreaktion:

Dem oben gewonnenen Reaktionsgemisch wurden 10 µl des folgenden Gemischs zugesetzt: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 3 Einheiten von T4-DNA-Ligase und 2,5 Einheiten der Klenow-Polymerase. Anschließend wurde die Reaktion über 16 Stunden bei 16°C ausgeführt.

#### Transformation von JM101:

Das oben genannte Reaktionsgemisch wurde in verschiedenen Verdünnungen in CaCl<sub>2</sub>-behandelte E. coli-JM101-Zellen unter Anwendung von Standardtechniken transformiert und in 2x YT-Topagar auf 2x YT-Agarplatten plattiert. (Es wurden 2x YT = Trypton, 16 g/l, Hefeextrakt, 10 g/l, NaCl, 5 g/l als Abkürzung verwandt. 2x YT-Topagar = 2x YT unter Zusatz von 0,4% Agarose und Autoklavbehandlung. 2x YT-Agarplatten = 2x YT unter Zusatz von 2% Agar und Autoklavbehandlung). Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### Identifizierung der positiven Klone:

Es wurde die Methode der „plaque“-Lift-Hybridisierung angewendet, die nachstehend beschrieben wird: Ein Nitrozellulosefilter wurde auf eine Platte mit einer geeigneten „plaque“-Dichte gebracht, so daß der Filter benetzt wurde. Dann wurde der Filter in folgenden Lösungen gebadet: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH über 30 s, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH-Wert 8,0, für 1 Minute, 2x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumzitat) bis zur späteren Verwendung. Der Filter wurde auf 3-mm-Filterpapier getrocknet und 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken.

Der Mutagenisationsstarter mit der Folge 5'-CAACAATACCTCTCTAGCCTTTGGAGTG-3' wurde am 5'-Ende in 30 µl eines Volumens radioaktiv markiert, welches 70 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10 pMol Oligonukleotid, 20 pMol Gamma-<sup>32</sup>P-ATP und 3,5 Einheiten von T4-Polynukleotidkinase enthielt. Das Gemisch wurde bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert und dann 5 Minuten lang bei 100°C.

Der getrocknete Filter wurde 2 Stunden lang bei 65°C in 6x SSC, 0,2% Rinderserumalbumin, 0,2% Ficoll, 0,2% Polyvinylpyrrolidon, 0,2% Natriumdodekylsulfat (SDS) und 50 µg/ml Lackssperma-DNA vorhybridisiert. Dann wurde das Reaktionsgemisch, das die markierte Sonde enthielt, zu 15 ml frischem Vorhybridisationsgemisch gegeben, und der Filter wurde dann darin über Nacht bei 40°C unter sanftem Rühren gebadet. Nach dem Hybridisieren wurde der Filter dreimal über jeweils 15 Minuten in 2x SSC + 0,1% SDS gewaschen und einer Autoradiographbehandlung unterzogen. Nach dem Waschen in der gleichen Lösung, jetzt aber bei 62°C, und einer weiteren Autoradiographbehandlung wurden „plaques“ identifiziert, die DNA-Folgen enthielten, welche zum Mutagenisationsstarter komplementär waren.

#### Erneutes Screenieren auf positive Klone:

Da der identifizierte Klon ein Ergebnis eines Heteroduplexes ist, wurde das „plaque“ erneut plattiert. Hybridisierung und Identifizierung wurden wiederholt.

#### Reinigung der doppelsträngigen M13-Phag-DNA:

Ein re-screenierter Klon wurde für die Infizierung des *E. coli*-Stammes JM 101 verwendet. Eine Kultur, die etwa  $10^8$  Phage und 5 Kolonien von JM 101 enthielt, wurde 5 Stunden lang in 5 ml eines 2× YT-Mediums bei 37°C gezogen. Dann wurde die doppelsträngige, runde DNA aus dem Pellet nach einer Methode gereinigt, die von Birnboim und Doly, *Nucleic Acids Res.* 2, 1513 (1979), beschrieben wurde.

#### Isolierung eines Restriktionsfragmentes, welches den modifizierten Insulinvorläufer enthält:

Das DNA-Präparat (etwa 5 µg), das oben isoliert worden war, wurde mit 10 Einheiten der Restriktionsendonuklease BamHI in 60 µl 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM DTT 2 Stunden lang bei 37°C verdaut. Die DNA-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel getrennt, und die Fragmente wurden aus dem Gel gereinigt.

#### Ligation an den Hefevektor pAB24 (Abb.2):

Das isolierte Restriktionsfragment wurde an den Hefevektor pAB 24 ligiert, der mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut worden war, in folgendem Reaktionsgemisch: Fragment 0,2 µg, Vektor 0,02 µg, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Von diesem Reaktionsgemisch wurden 5 µl für die Transformation des *E. coli*-Stammes MC 1061 verwendet, worin das modifizierte Expressionsplasmid identifiziert und vermehrt wurde. Das Plasmid wurde pYGAB-AKR-A bezeichnet und war mit Ausnahme des angefügten Kodons mit pYGABA identisch.

#### Transformation von Hefe:

Die Transformation des Expressionsplasmids in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* JC482  $\Delta$  pep  $\Delta$  Leu2 cir<sup>o</sup> ( $\alpha$ 1, his4, pcp4, ura3, leu2, cir<sup>o</sup>) wurde so ausgeführt, wie das von Ito u. a., *J. Bact.*, Bd. 153, Nr. 1, 163–168 (1983), beschrieben wurde. Die transformierten Zellen wurden auf SC-ura-Medium (0,7% Hefestickstoffbasis, 2,0% Glukose, 0,5% Kasaminosäuren, 2,0% Agar) zur Selektion nach den plasmidhaltigen Zellen plattiert.

#### Beispiel II

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das für die Produktion des Vorläufers B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21) genutzt werden kann.

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie im Beispiel I, mit der Ausnahme, daß der eingesetzte Mutagenisationsstarter die Folge 5'-CAACAATACCTCTCTTAGAACCTTTGGAGTG-3' hatte, daß die Hybridisierungstemperatur 42°C betrug und daß die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren 64°C betrug. Das modifizierte Plasmid hatte eine mit pYGABA identische Sequenz, ausgenommen die hinzugefügten Codone.

#### Beispiel III

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das für die Produktion des Vorläufers [Gln<sup>B13</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) genutzt werden kann.

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie im Beispiel I, mit der Ausnahme, daß die verwendete Matrize durch Klonierung der BamHI-Kassette von pYGAB-AKR-A in M13 gewonnen wurde, daß der Mutagenisationsstarter die Folge 5'-GTACAAAGCTTGAACCAAGTG-3' hatte, daß die Hybridisierungstemperatur 31°C betrug und daß die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren 53°C betrug. Das modifizierte Plasmid hatte eine mit pYGABA identische Sequenz, ausgenommen die geänderten und hinzugefügten Codone.

#### Beispiel IV

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das für die Produktion des Vorläufers [Gln<sup>A4</sup>, Asp<sup>A21</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) genutzt werden kann.

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie im Beispiel I, mit den Ausnahmen, daß die verwendete Matrize durch Klonierung der BamHI-Kassette von pYGAB-AKR-A in M13 gewonnen wurde und daß die Mutagenese in zwei Schritten ausgeführt wurde. Beim Schritt 1 hatte der Starter die Sequenz 5'-ACAACATTGTTGAACAATACC-3', die Hybridisierungstemperatur betrug 27°C und die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren betrug 49°C, und im Schritt 2 hatte der Starter die Sequenz 5'-CGCTATTAGTCACAGTAGTTT-3', die Hybridisierungstemperatur betrug 29°C, und die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren lag bei 51°C. Das modifizierte Plasmid hatte eine mit pYGABA identische Sequenz, ausgenommen die geänderten und hinzugefügten Codone.

#### Beispiel V

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das für die Produktion des Vorläufers Ser<sup>A21</sup>-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) genutzt werden kann.

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie im Beispiel I, mit den Ausnahmen, daß die eingesetzte Matrize durch Klonierung der BamHI-Kassette von pYGAB-AKR-A in M13 gewonnen wurde, daß der Mutagenisationsstarter die Sequenz 5'-GACGCTATTAAGTACAGTAGT-3' hatte, daß die Hybridisierungstemperatur 29°C betrug und daß die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren bei 51°C lag. Das modifizierte Plasmid hatte eine mit pYGABA identische Sequenz, ausgenommen die geänderten und hinzugefügten Codone.

#### Beispiel VI

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das für die Produktion des Vorläufers [Arg<sup>827</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) genutzt werden kann.

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie im Beispiel I, mit den Ausnahmen, daß die eingesetzte Matrize durch Klonieren der BamHI-Kassette von pYGAB-AKR-A in M13 gewonnen wurde, daß der Mutagenisationsstarter die Sequenz 5'-CAACAATACCTCTTAGCCTTTGGTCTGTAGAAGA-3' hatte, daß die Hybridisierungstemperatur 43°C betrug und daß die Waschttemperatur nach dem Hybridisieren bei 65°C lag. Das modifizierte Plasmid hatte eine mit pYGABA identische Folge, ausgenommen die geänderten und hinzugefügten Kodone.

#### Beispiel VII

Expression des Vorläufers und Isolierung aus dem Kulturmedium.

Hefe, die auf die in den Beispielen I bis VI beschriebene Art und Weise transformiert worden war, wurde auf Petrischalen vermehrt, die Minimalmedium ohne Uracil enthielten, Dauer 48 Stunden bei 30°C. Rüttelflaschen zu 100ml, die Minimalmedium ohne Uracil + 5g/l Kasaminoäuren + 10g/l Sukzinsäure + 30g/l Glukose bei einem pH-Wert von 5,0 enthielten, wurden mit einer einzigen Kolonie von den Petrischalen geimpft. Die Flaschen wurden dann bei 30°C in einem Inkubator 72 Stunden lang gerüttelt.

Nach dem Zentrifugieren wurde 1l der zusammengefaßten, obenaufschwimmenden Schichten durch Filtern sterilisiert und durch den Zusatz von 5M HCl und Wasser auf einen pH-Wert von 4-4,5 und eine Leitfähigkeit von <10 mS abgestimmt. Mit einem Strom von 120ml/h wurde die obenaufschwimmende Schicht dann einer S-Sepharose®-FF-Kolonne, 1,6 x 6 cm, zugeführt, welche vorher mit 50mM Essigsäure, 50% (Volumenbasis) Ethanol, mit NaOH auf einen pH-Wert von 4,0 abgestimmt, äquilibriert worden war. Die Kolonne wurde mit 60ml Puffer gewaschen, und der Vorläufer wurde durch einen linearen Gradienten von NaCl von 0 bis 0,35M in 360ml Puffer mit einem Strom von 10ml/h eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 4ml aufgeteilt und auf UV-Absorbanz untersucht. Fraktionen, die den Vorläufer enthielten, wurden durch RP-HPLC-Analyse identifiziert und zusammengefaßt. Nach dem Entsalzen auf einer Sephadex® G 25-Kolonne in 1 M Essigsäure wurde der Vorläufer durch Lyophilisieren isoliert.

#### Beispiel VIII

Herstellung von [Arg<sup>80</sup>]-des[Thr<sup>830</sup>]-menschlichem Insulin aus dem Vorläufer B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21).

Bei 4°C wurden 250mg von B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21), das nach den Methoden in den Beispielen I und VII hergestellt worden war, in 25ml von 50mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 20% Ethanol, mit HCl auf einen pH-Wert von 10 abgestimmt, aufgelöst. Sepharose®, die 0,8mg immobilisiertes Trypsin/ml enthielt, wurde auf einem Glasfilter mit dem gleichen Puffer gewaschen und abgeleitet. Es wurde Puffer zu 40g des abgeleiteten Gels gegeben und das Volumen auf 75ml abgestimmt. Die Lösung, die den Vorläufer enthielt, wurde der Suspension zugesetzt, und man ließ das Gemisch eine Stunde lang bei 4°C unter sanftem Rühren stehen, anschließend wurde es gefiltert.

Die HPLC-Analyse (Analyse durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie) ergab eine 61%ige Umwandlung in [Arg<sup>80</sup>]-des[Thr<sup>830</sup>]-menschliches Insulin.

Das Gel wurde mit 50ml Puffer (ohne Ethanol) gewaschen und abgeleitet, und die Proteine in den zusammengefaßten Filtraten wurden durch Abstimmung des pH-Wertes auf 6 ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren und Lyophilisieren isoliert.

Der Niederschlag wurde bei 4°C in 20ml von 7M Harnstoff durch Abstimmung des pH-Wertes auf 8,1 aufgelöst, und die Lösung wurde einer Kolonne von Q-Sepharose®FF von 1,6cm x 20cm zugeführt, die vorher mit 20mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 7M Harnstoff, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,1 abgestimmt, bei 4°C äquilibriert worden war. Unter Anwendung eines Stromes von 40ml/h wurde die Kolonne dann mit einem linearen Gradienten von 0mM bis 50mM NaCl in dem gleichen Puffer über 24 Stunden eluiert. Das Eluat wurde durch UV-Absorption nachgewiesen, und die erste der beiden eluierten Hauptspitzen wurde aufgefangen. Das zusammengefaßte Material wurde in 1 M Essigsäure auf einer Sephadex® G 25-Kolonne entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 75mg an [Arg<sup>80</sup>]-des[Thr<sup>830</sup>]-menschlichem Insulin.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäureanalyse, durch Plasmadesorptionsmassenspektrometrie und durch sequentiellen Edman-Abbau der getrennten vinylpyridylierten A- und B-Ketten bestätigt.

#### Beispiel IX

Herstellung von Arg<sup>80</sup>-des Thr<sup>830</sup>-menschlichem Insulin aus dem Vorläufer B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21).

In 50ml von 50mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 20% Ethanol, mit HCl auf einen pH-Wert von 10 abgestimmt, wurden 400mg B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21), hergestellt nach den in den Beispielen II und VII beschriebenen Methoden, aufgelöst. Sepharose®, die 0,8g immobilisiertes Trypsin/ml enthielt, wurde auf einem Glasfilter mit dem gleichen Puffer gewaschen und dann abgeleitet. Zu 80g des abgeleiteten Gels wurde Puffer gegeben, und das Volumen wurde auf 150ml abgestimmt. Die Lösung, die den Vorläufer enthielt, wurde zu der Suspension gegeben, und man ließ das Gemisch 30 Minuten lang unter sanftem Rühren bei 20°C stehen, anschließend wurde es gefiltert.

Die HPLC-Analyse zeigte eine Umwandlung von 50% in [Arg<sup>80</sup>]-des[Thr<sup>830</sup>]-menschliches Insulin.

Das Gel wurde mit 100ml Puffer (ohne Ethanol) gewaschen und abgeleitet, und die in den Filtraten zusammengefaßten Proteine wurden durch Abstimmung des pH-Wertes auf 6 ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren und Lyophilisieren isoliert.

Der Niederschlag wurde bei 4°C in 20ml von 7M Harnstoff durch Abstimmung des pH-Wertes auf 8,1 aufgelöst, und die Lösung wurde einer Q-Sepharose®FF-Kolonne von 1,6cm x 20cm zugeführt, die vorher bei 4°C in 20mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 7M Harnstoff, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,1 abgestimmt, äquilibriert worden war. Unter Anwendung eines Stromes von 40ml/h wurde die Kolonne dann mit einem linearen Gradienten von 0mM bis 50mM NaCl in dem gleichen Puffer über 24 Stunden eluiert. Das Eluat wurde durch UV-Absorption nachgewiesen, und die erste der beiden eluierten Hauptspitzen wurde aufgefangen. Das zusammengefaßte Material wurde in 1 M Essigsäure auf einer Sephadex® G 25-Kolonne entsalzen und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 145mg [Arg<sup>80</sup>]-des[Thr<sup>830</sup>]-menschliches Insulin.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäureanalyse, durch HPLC-Analyse und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel X

Herstellung von [Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschlichem Insulin aus Schweins-Proinsulin.

In 800 µl von 0,1 M HCl wurden 40 mg Schweins-Proinsulin aufgelöst, und es wurden 8 ml von 50 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan zugesetzt. Es wurde eine Lösung von einer Einheit Endoproteinase Lys-C von Lysobacterenzymogenen (Boehringer, Mannheim) in 200 µl von 0,1 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,5 abgestimmt, hergestellt. Die beiden Lösungen wurden miteinander gemischt und 16 Stunden lang bei 12°C stehengelassen.

Die Reaktion wurde durch Abstimmung des pH-Wertes auf 6,2 nach dem Zusatz von 1,8 ml 96%igen Ethanol gestoppt, und die resultierende Suspension wurde bei 4°C über Nacht stehengelassen. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren isoliert und bei 4°C wieder in 2 ml von 7 M Harnstoff unter Abstimmung des pH-Wertes auf 8,1 aufgelöst. Diese Lösung wurde einer Q-Sepharose®FF-Kolonne von 1,6 cm × 20 cm, die vorher bei 4°C in 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 7 M Harnstoff, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,1 abgestimmt, äquilibriert worden war. Unter Anwendung eines Stroms von 40 ml/h wurde die Kolonne dann mit einem linearen Gradienten von 0 mM bis zu 50 mM NaCl in dem gleichen Puffer über 24 Stunden eluiert. Das Eluat wurde durch UV-Absorption nachgewiesen, und die Hauptspitze wurde aufgefangen. Das zusammengefaßte Material wurde in 1 M Essigsäure auf einer Sephadex®G 25-Kolonne entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 15 mg [Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschliches Insulin.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäurenanalyse, durch HPLC-Analyse und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XI

Herstellung von [Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-Amid).

Es wurden 200 mg an [Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschlichem Insulin, das nach einer der Methoden in den Beispielen VIII bis X hergestellt worden war, in einem Gemisch aufgelöst, das 400 mg Threoninamid, 2,0 ml Ethanol und 0,8 ml Wasser enthielt. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 6,3 abgestimmt, und es wurde ein (abgesetztes) Volumen von 4 ml Sepharose® zugesetzt, das 3,2 mg immobilisiertes Trypsin enthielt. Diese Mischung wurde 2 Stunden bei 20°C unter sanftem Rühren stehengelassen, anschließend wurde das Gel durch Filtern entfernt, und das Protein wurde durch den Zusatz von 10 Volumen an 2-Propanol ausgefällt. Der luftgetrocknete Niederschlag wurde bei 4°C in 20 ml von 7 M Harnstoff unter Abstimmung des pH-Wertes auf 8,1 aufgelöst, und die Lösung wurde einer Q-Sepharose®FF-Kolonne von 1,6 cm × 20 cm, die vorher bei 4°C mit 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 7 M Harnstoff, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,1 abgestimmt, äquilibriert worden war. Unter Anwendung eines Stroms von 40 ml/h wurde die Kolonne dann mit einem linearen Gradienten von 0 mM bis zu 50 mM NaCl in dem gleichen Puffer über 24 Stunden eluiert. Das Eluat wurde durch UV-Absorption nachgewiesen, und die Hauptspitze wurde aufgefangen. Das zusammengefaßte Material wurde in 1 M Essigsäure auf einer Sephadex®G 25-Kolonne entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 80 mg [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid).

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäurenanalyse, durch Plasmadesorptionsmassenspektrometrie und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XII

Herstellung von [Gln<sup>B13</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschlichem Insulin.

Es wurden 250 mg von [Gln<sup>B13</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21), das nach den in den Beispielen III und VII beschriebenen Methoden hergestellt worden war, mit immobilisiertem Trypsin behandelt, und das Reaktionsprodukt wurde im wesentlichen so gereinigt, wie das im Beispiel VIII beschrieben wurde. Die Ausbeute betrug 60 mg [Gln<sup>B13</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschliches Insulin.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäureanalyse, durch Plasmadesorptionsspektrometrie und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XIII

Herstellung von [Gln<sup>A4</sup>,Asp<sup>A21</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-Amid).

Es wurden 500 mg von [Gln<sup>A4</sup>,Asp<sup>A21</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21), die nach den in den Beispielen IV und VII beschriebenen Methoden hergestellt worden waren, mit immobilisiertem Trypsin behandelt, und das resultierende Produkt wurde im wesentlichen so gereinigt, wie das im Beispiel VIII beschrieben wurde. Die Ausbeute betrug 175 mg an [Gln<sup>A4</sup>,Asp<sup>A21</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschlichem Insulin.

Das wurde durch Kopplung mit Threoninamid nach der im Beispiel XI beschriebenen Methode in das B30-Amid umgewandelt. Die Ausbeute an gereinigtem [Gln<sup>A4</sup>,Asp<sup>A21</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-Amid) betrug 50 mg.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäurenanalyse, durch Plasmadesorptionsmassenspektrometrie und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XIV

Herstellung von [Ser<sup>A21</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-amid).

Es wurden 400 mg [Ser<sup>A21</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21), das nach den in den Beispielen V und VII beschriebenen Methoden hergestellt worden war, mit immobilisiertem Trypsin behandelt, und das resultierende Produkt wurde im wesentlichen so gereinigt, wie das im Beispiel VIII beschrieben wurde. Die Ausbeute betrug 125 mg [Ser<sup>A21</sup>,Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschliches Insulin.



Das wurde durch Kopplung mit Threoninamid nach der im Beispiel XI beschriebenen Methode in das B30-Amid umgewandelt. Die Ausbeute an gereinigtem [Ser<sup>A21</sup>, Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-Amid) betrug 40 mg. Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäurenanalyse, durch Plasmadesorptionsmassenspektrometrie und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XV

Herstellung von [Arg<sup>B27</sup>, Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschlichem Insulin.

Es wurden 250 mg [Arg<sup>B27</sup>]-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21), das nach den in den Beispielen VI und VII beschriebenen Methoden hergestellt worden war, mit immobilisiertem Trypsin behandelt, und das resultierende Produkt wurde im wesentlichen so gereinigt, wie das im Beispiel VIII beschrieben wurde. Die Ausbeute betrug 50 mg [Arg<sup>B27</sup>, Arg<sup>A0</sup>]-des[Thr<sup>B30</sup>]-menschliches Insulin.

Die Identität des Produktes wurde durch Aminosäurenanalyse und durch sequentiellen Edman-Abbau bestätigt.

#### Beispiel XVI

Zubereitung eines injizierbaren Präparates mit verzögernder Wirkung, das aufgelöstes [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid) enthält.

Es wurden 60 µMol des [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amids) in 4 ml von 0,1 M HCl aufgelöst, und es wurden 20 ml 1,5%iges m-Kresol zugesetzt. Die Lösung wurde mit 70 ml von 1%igem NaCl und 3,25 ml von 0,1 M ZnCl<sub>2</sub> gemischt, und der pH-Wert wurde auf 4,0 abgestimmt. Das Volumen wurde abschließend auf 100 ml mit Wasser abgestimmt und durch Filtern sterilisiert.

#### Beispiel XVII

Zubereitung eines injizierbaren Präparates mit verzögernder Wirkung, das eine kristalline Suspension von [Arg<sup>A0</sup>]-menschlichem Insulin-(B30-Amid) enthält.

Es wurden 60 µMol von [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-amid) in 70 ml einer 1%igen NaCl-Lösung aufgelöst, die 0,5% m-Kresol enthielt, wobei der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 9,7 abgestimmt wurde, und es wurden 325 µl von 0,1 M Zinkacetat zugesetzt. Nach der erneuten Abstimmung des pH-Wertes auf 9,7 wurde das Volumen mit Wasser auf 80 ml abgestimmt, und die Lösung wurde durch Filtern sterilisiert.

Es wurden 20 ml von 65 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, die 0,3% m-Kresol enthielten und mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 abgestimmt worden waren, durch Filtern sterilisiert.

Unter sterilen Bedingungen wurden die beiden Lösungen gemischt, und die resultierende Suspension ließ man unter sehr sanftem Rühren bei 20°C eine Stunde lang stehen. Abschließend wurde der pH-Wert mit HCl auf 7,3 abgestimmt.

#### Beispiel XVIII

Nachweis der hinauszögernden Wirkung nach der subkutanen Injektion bei Ratten durch Gammazählung von außen.

Für die Experimente wurden weibliche Wistar-Ratten von ca. 250 g Körpergewicht und einem Alter von mehr als 90 Tagen verwendet. Die Ratten wurden vor der Verwendung etwa eine Woche lang akklimatisiert und wurden ad libitum gefüttert. Vier Tage vor den Experimenten erhielten die Ratten eine wäßrige Lösung von 20 mM Kaliumjodid als Trinkwasser.

Verwendet wurden folgende Testpräparate:

- I. Suspensionspräparat, das [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid) enthielt und nach dem Beispiel XVII hergestellt worden war.
- II. Lösungspräparat, das [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid) enthielt und nach dem Beispiel XVI hergestellt worden war.
- III. Schnellwirkendes Lösungspräparat, das semisynthetisches menschliches Insulin enthielt (Velosulin®, 100 Einheiten/ml).

Alle drei Zubereitungen enthielten zusätzliche 50 µCi/ml [Mono-<sup>125</sup>I]-Insulin bzw. -Insulinverbindungsmarker, das nach Standardmethoden der Radiojodierung hergestellt worden war.

Den Ratten wurden auf der Rückseite des Femur subkutan 50 µl Präparat injiziert, das 3,5 nMol Insulinverbindung und 2,5 µCi [<sup>125</sup>I]-markiertem Tracer enthielt. Während der Untersuchung wurden die Ratten in einer Rattenhalterung immobilisiert. Das Verschwinden des Tracers aus der Injektionsstelle, das ein Maß für die Absorption des Insulins aus dem subkutanen Depot ist (C. Binder, Absorption of Injected Insulin [Absorption von injiziertem Insulin]. Munksgaard, Kopenhagen, 1969), wurde unter Verwendung von zwei stationären Mengenstrommessern MIP-10 und Detektoren E 749 mit 3 mm NaI-Szintillationskristallen mit Be-Fenstern und Kollimatoren mit 60° Sichtwinkel und 10-mm-Öffnungen (Raytronic) gemessen. Die Mengenstrommesser wurden mit Minirecordern 121 N (Raytronic) verbunden. Die Detektoren wurden 2 cm über der Haut an der Injektionsstelle angebracht. Die Radioaktivität wurde jeweils über einen Fünfminutenzeitraum zu Stunde 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, und 24 nach der Injektion des Präparates überwacht. Nach Abzug der Hintergrundszählung wurden die Zählraten in Prozentsätze der anfänglichen Zählrate umgewandelt.

In der Abb. 3 werden die Mittelwerte für die Restradioaktivität als Funktion der Zeit für jedes Präparat gegeben. Wenn man den Zeitpunkt der Restradioaktivität von 50% (T<sub>50%</sub>) als Maß für die hinauszögernde Wirkung nimmt, ergeben sich aus den Kurven folgende Werte:

|                |                  |
|----------------|------------------|
|                | T <sub>50%</sub> |
| Präparat I >   | 12 Stunden       |
| Präparat II ≈  | 8 Stunden        |
| Präparat III ≈ | 0,5 Stunden      |

Diese Ergebnisse zeigen, daß beide Präparate, die [Arg<sup>A0</sup>]-menschliches Insulin-(B30-Amid) enthalten, eine ausgeprägte hinauszögernde Wirkung gegenüber dem schnellwirkenden menschlichen Insulinpräparat haben.

#### Beispiel XIX

Zubereitung eines injizierbaren Präparates, das eine Lösung von  $[\text{Arg}^{\text{A}0}, \text{Arg}^{\text{B}27}]$ -des $[\text{Thr}^{\text{B}30}]$ -menschliches Insulin enthält und eine hinauszögernde Wirkung hat.

Es wurden 12  $\mu\text{Mol}$  von  $[\text{Arg}^{\text{A}0}, \text{Arg}^{\text{B}27}]$ -des $[\text{Thr}^{\text{B}30}]$ -menschliches Insulin in 35 ml einer 1%igen NaCl-Lösung aufgelöst, die 0,5% m-Kresol enthielt, wobei der pH-Wert mit 1 M HCl auf 3,5 abgestimmt wurde, und es wurden 650  $\mu\text{l}$  von 0,1 M Zinkacetat zugesetzt. Nach erneuter Abstimmung des pH-Wertes auf 3,5 wurde das Volumen mit Wasser auf 50 ml gebracht, und die Lösung wurde durch Filtern sterilisiert.

#### Beispiel XX

Nachweis der hinauszögernden Wirkung bei Kaninchen nach subkutaner Injektion.

Der Grad der hinauszögernden Wirkung eines Lösungspräparates, das 0,1 M  $[\text{Arg}^{\text{A}0}, \text{Arg}^{\text{B}27}]$ -des $[\text{Thr}^{\text{B}30}]$ -menschliches Insulin enthielt und wie im Beispiel XIX hergestellt worden war, wurde bei Kaninchen nach der Methode bestimmt, die in der British Pharmacopoeia 1980 beschrieben wurde.

Sechs Kaninchen wurde subkutan jeweils 65  $\mu\text{l}$  des Präparats injiziert, und zur Glukosebestimmung wurden unmittelbar vor der Injektion und 1, 2, 4 und 6 Stunden nach der Injektion Blutproben entnommen. Die Glukosewerte wurden als Prozentsatz des Wertes vor der Injektion ausgedrückt.

Die Bestimmung ergab folgende Mittelwerte:

| Zeit nach der Injektion:     | 0 h   | 1 h    | 2 h    | 4 h    | 6 h    |
|------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| % Glukose des Anfangswertes: | 100 % | 68,2 % | 65,0 % | 80,1 % | 79,4 % |

Durch Bestimmung des Prolongationsindex nach der Methode, die von Markussen u. a., Protein Engineering, Bd. 1, Nr. 3, S. 205–213 (1987), beschrieben wurde, wurde ein Wert von 42 berechnet. Durch den Vergleich der Ergebnisse mit denen in der Tabelle 1, ebenda, kann festgestellt werden, daß das Lösungspräparat, das  $[\text{Arg}^{\text{A}0}, \text{Arg}^{\text{B}27}]$ -des $[\text{Thr}^{\text{B}30}]$ -menschliches Insulin enthält, die gleiche Prolongation wie das normalerweise eingesetzte Zink-Insulin-Suspensions-Präparat mit verzögernder Wirkung, Actrapid® Human, aufweist.

Figure 1.

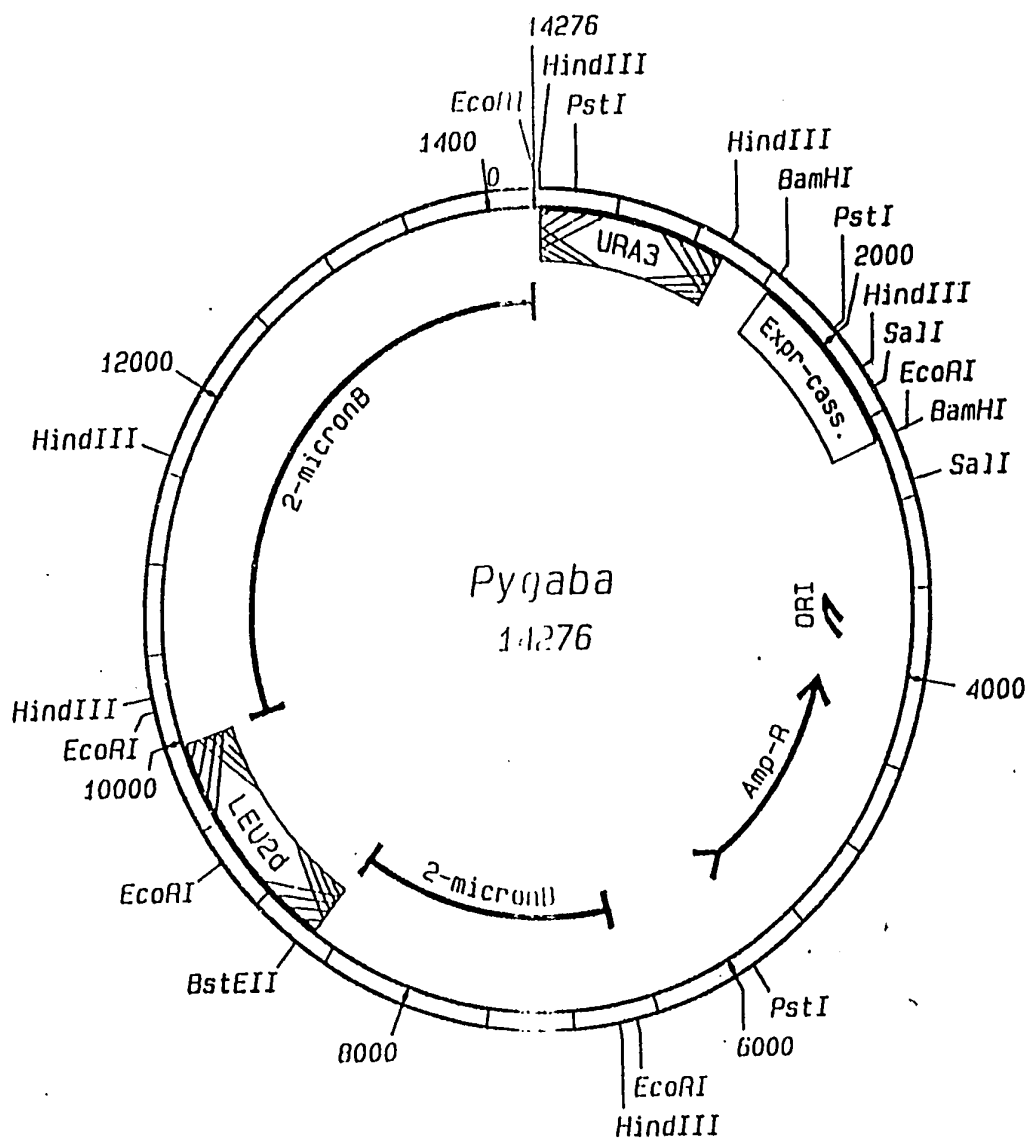


Figure 2.

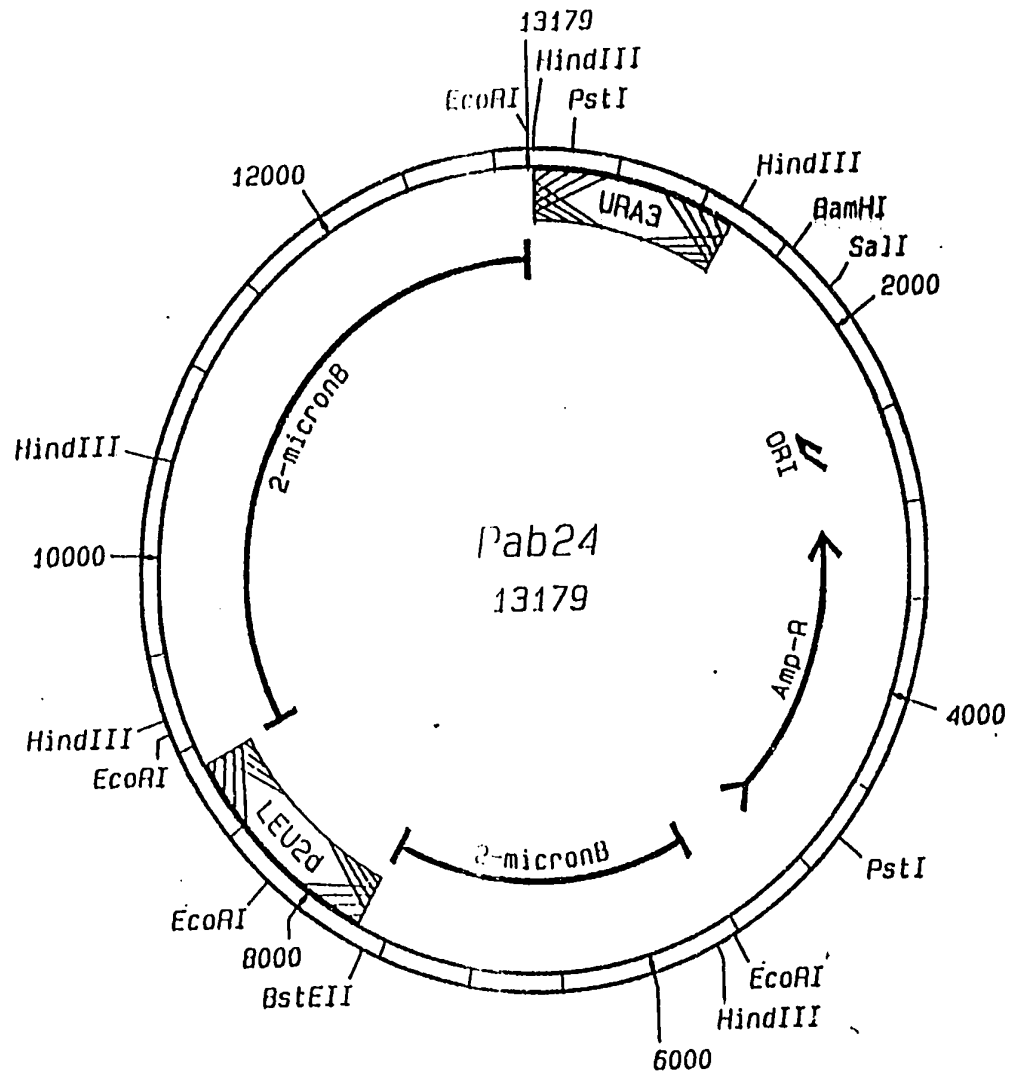


FIGURE 3.

