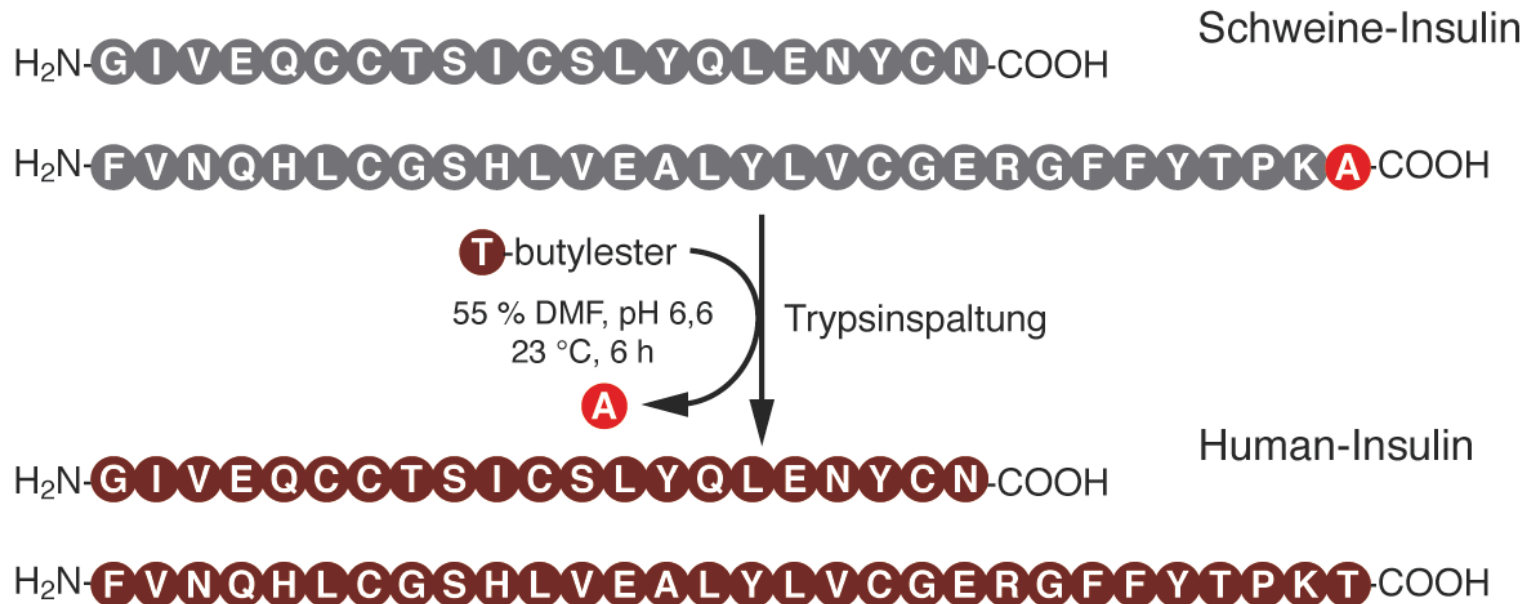


Humanisierung von Schweine-Insulin

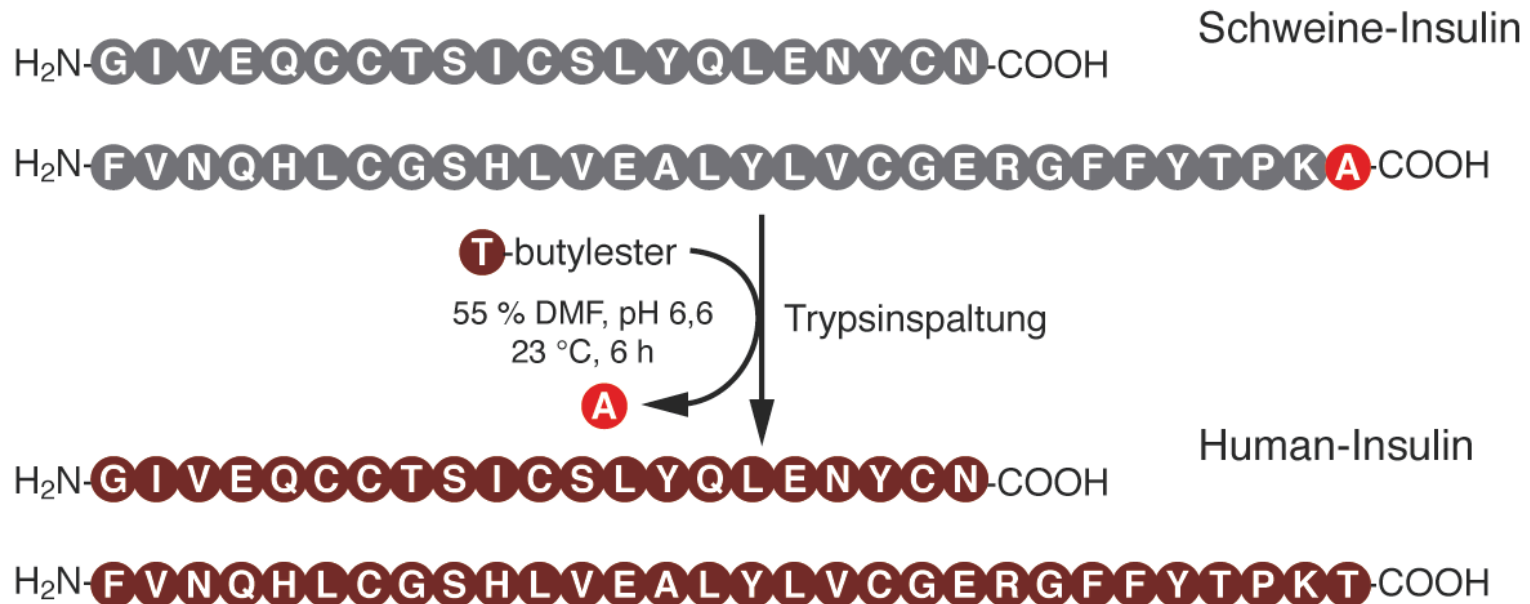
Für die Herstellung von Humaninsulin werden zwei Alternativen erwähnt:

- Die enzymatische Umwandlung von Insulin aus Schweinepankreas, wobei hier darauf hingewiesen wird, dass durch Validierung sicherzustellen ist, dass restliche proteolytische Aktivitäten vollständig entfernt wurden.
- Die gentechnische Herstellung von Humaninsulin. In diesem Fall muss vor der Freigabe jede Charge des fertigen Produktes als Bulk die Einhaltung der Grenzwerte von Wirtszellproteinen und einkettigen Präkursor-Molekülen geprüft werden

Humanisierung von Schweine-Insulin



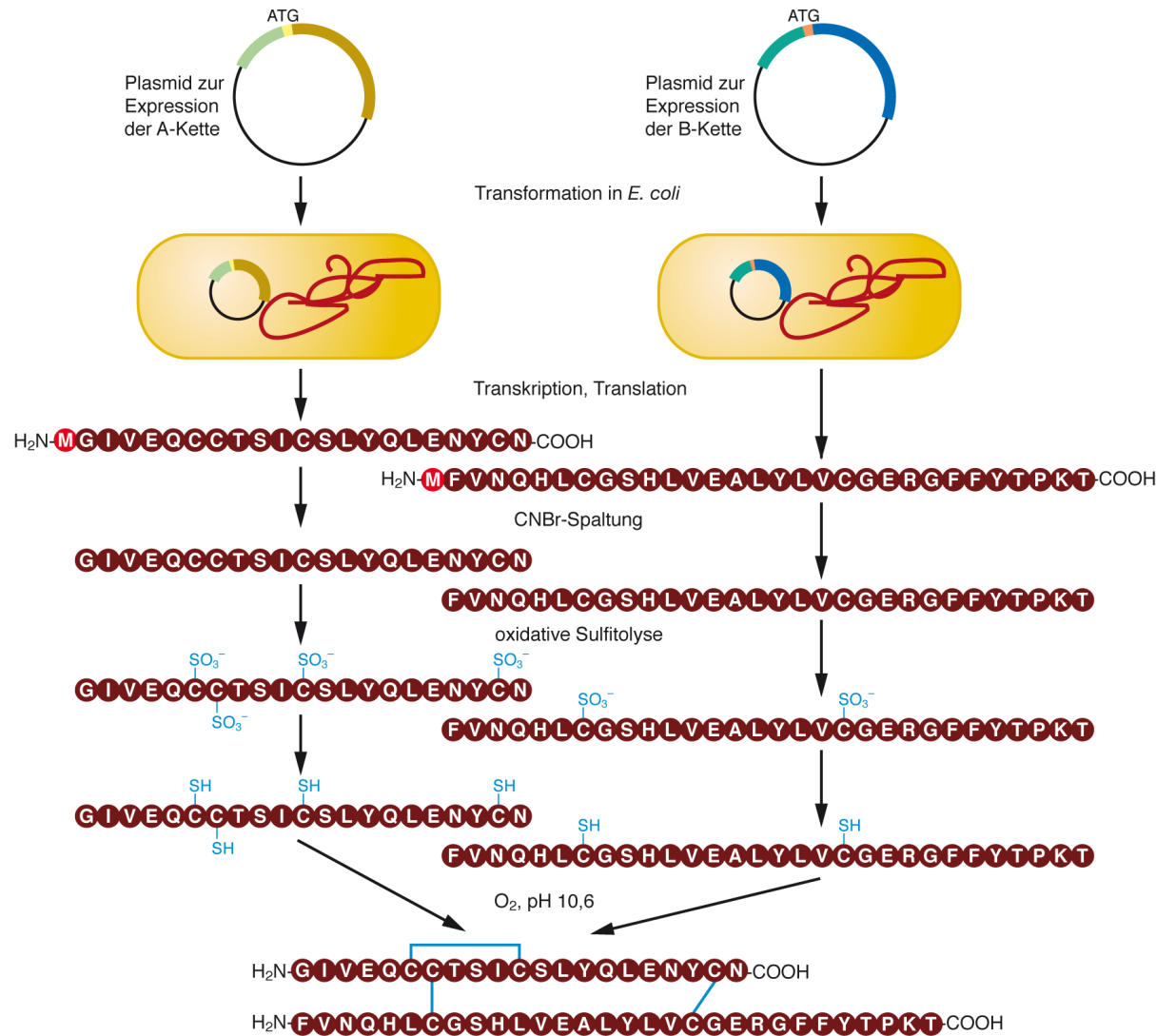
Humanisierung von Schweineinsulin



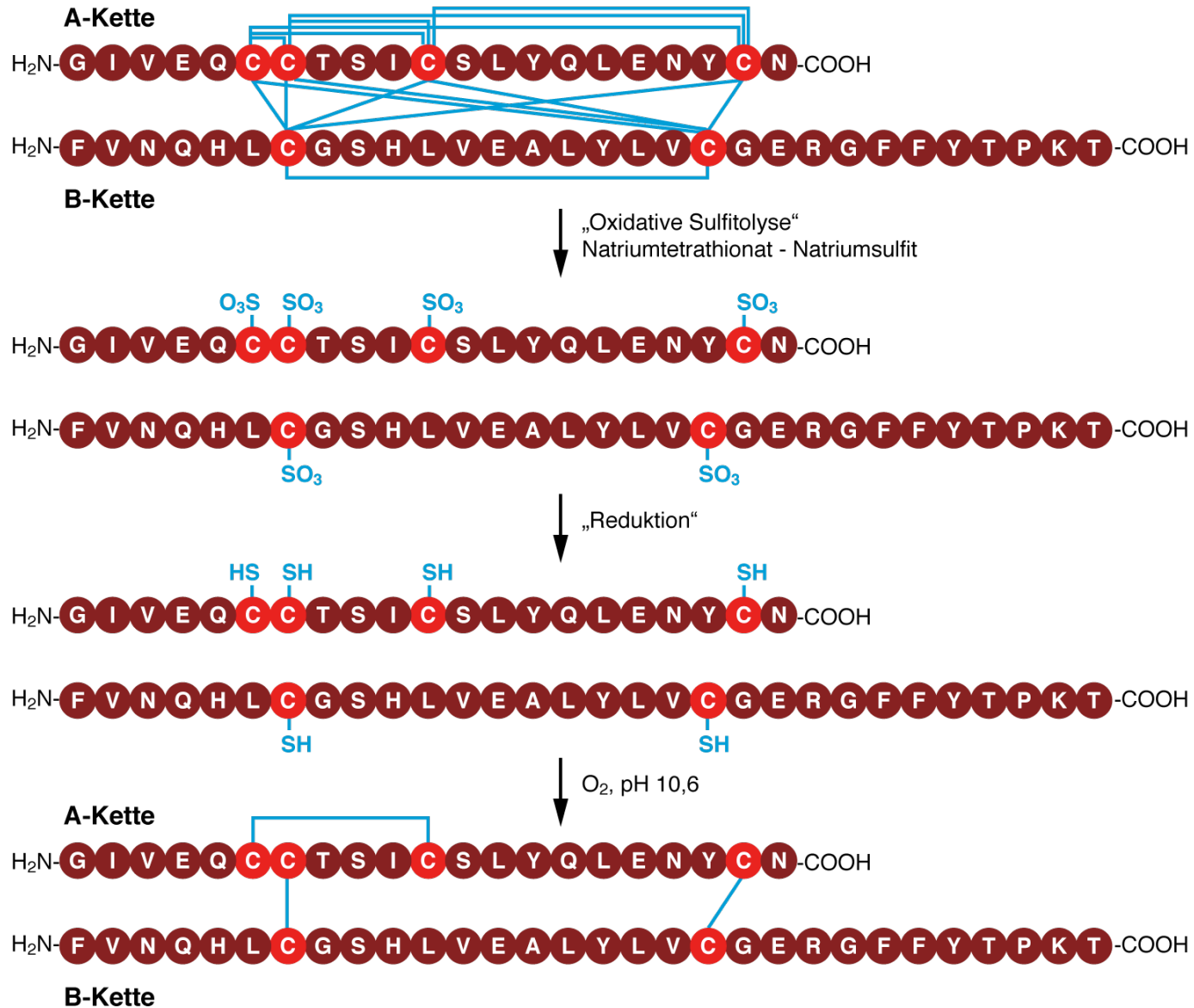
1. Expression von zwei Teilgenen in zwei *E. coli*-Stämmen

Dieses Verfahren hat nur noch historische Bedeutung!

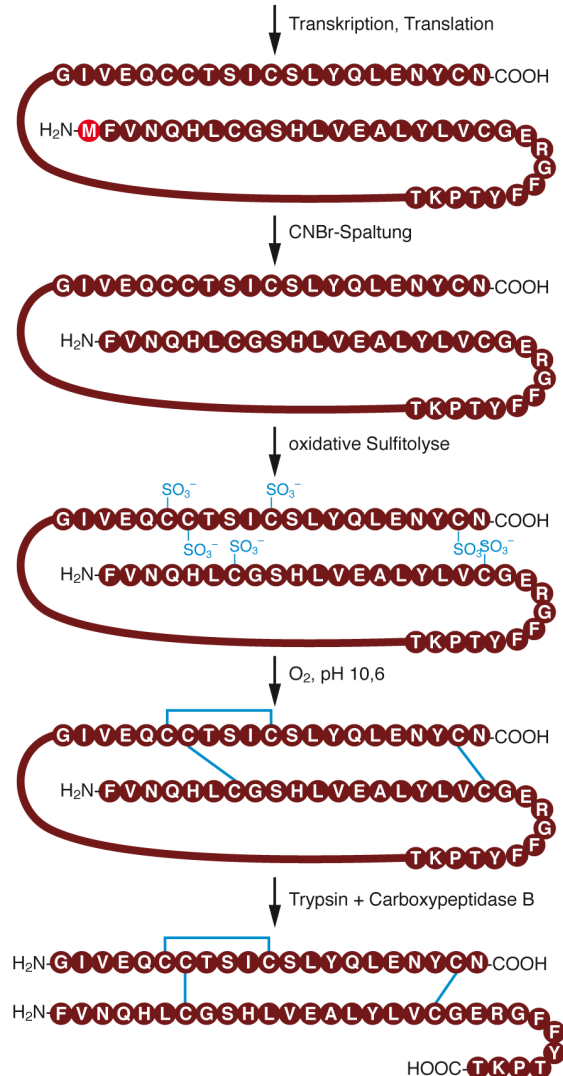
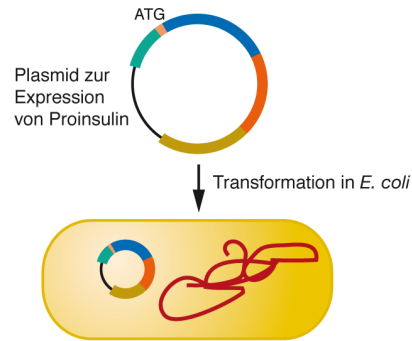
www.uni-frankfurt.de



Sulfitolyse



2. Expression von Proinsulin in *E. coli*



Bei diesem Verfahren wird nur ein einziges Plasmid und nur ein transgener *E.-coli*-Stamm für die Produktion verwendet.

Das Plasmid trägt das komplette Insulin-Gen, also die genetische Information für die Insulin-A-, B- und C-Kette.

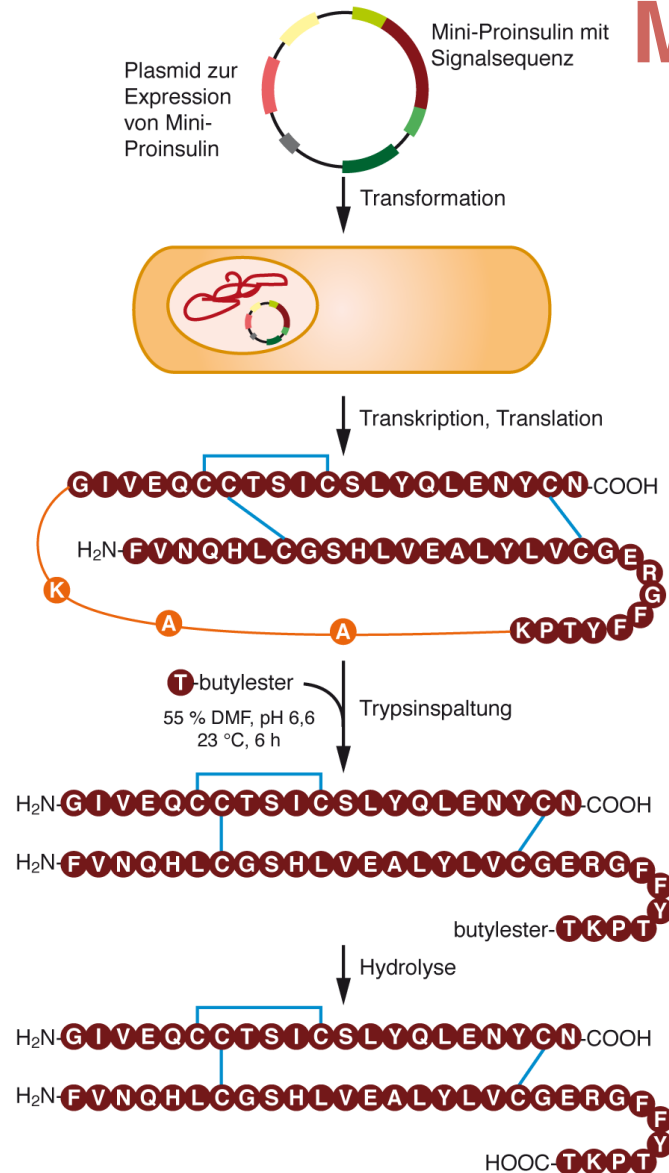
Das Gen wird exakt hinter einem Methionin-Codon des Tryptophan-Synthase-Gens inseriert, so dass wiederum ein Fusionsprotein synthetisiert wird. Das Proinsulin wird aus dem Fusionsprotein durch CNBr-Behandlung freigesetzt und durch oxidative Sulfitolyse in das Sulfonatderivat überführt.

Durch Behandlung von Proinsulin mit Carboxypeptidase B und Trypsin wird das C-Peptid entfernt, und man erhält aktives Insulin in guter Ausbeute.

3. Antidiabetika (Humaninsuline)

Humaninsulin	Insuman [®] Rapid/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Insuman [®] Basal/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Insuman [®] Comb 15/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Insuman [®] Comb 25/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Insuman [®] Comb 50/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Insuman [®] Infusat/Sanofi-Aventis Pharma	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Berlinsulin [®] H Basal/Berlin-Chemie	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Huminsulin Basal [®] /Lilly	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Huminsulin Normal [®] /Lilly	<i>E. coli</i>
Humaninsulin	Huminsulin Profil [®] /Lilly	<i>E. coli</i>

3. Expression von Mini-Proinsulin



Statt das Protein von Bakterien synthetisieren zu lassen, wird hierbei die **Bäckerhefe *S. cerevisiae*** als Wirts-System verwendet.

Ferner sollte das rekombinante Protein von dem Hefe-Produktionsstamm sezerniert werden, um das Rohprodukt bereits soweit wie möglich frei von Wirts-Proteinen isolieren zu können.

Das Protein stammt von einem Kunst-Gen darin, das nur einen sehr kurzen C-Peptid-Anteil (9 Nukleotide) enthält.

Die rekombinanten Hefezellen sezernieren eine Proinsulin-Variante, die einen korrekten N-Terminus besitzen und in denen alle Disulfidbrücken korrekt geknüpft sind.

Zur Entfernung des Mini-C-Peptids wird die gleiche Technologie angewendet, wie sie bereits für die Umwandlung von Schweine-Insulin in Human-Insulin etabliert ist.

3. Antidiabetika (Humaninsuline)

Humaninsulin	Actrapid®/Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Actraphane®/Novo Nordisc	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Insulatard®/Novo Nordisc	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Velosulin®/Novo Nordisc	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Insuman® Comb 50/Sanofi-Aventis Pharma	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Protaphane®/Novo Nordisc	<i>S. cerevisiae</i>
Humaninsulin	Mixtard®/Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>

Exubera[®], ein inhalativ zu applizierendes Normal-Insulin

www.uni-frankfurt.de

Inhalatives Humaninsulin ist ein schnell wirkendes Humaninsulin zur Behandlung von Typ-1- und Typ-2-Diabetes. Es kann zur Verbesserung der glykämischen Kontrolle allein oder in Kombination mit anderen oralen Antidiabetika und/oder lang wirkenden oder verzögert wirkenden, subkutan injizierbaren Insulinen verwendet werden.

Obwohl das in Exubera[®] enthaltene Insulin nicht zu den modifizierten Insulinen zählt, besitzt es einen schnelleren Wirkungseintritt als subkutan injiziertes, schnell wirkendes Humaninsulin. Daher sollte es innerhalb von 10 Minuten vor Beginn einer Mahlzeit gegeben werden.

Während einer Therapie mit Exubera[®] dürfen die Patienten nicht rauchen. Das Rauchen muss mindestens 6 Monate vor Beginn der Behandlung mit Exubera[®] aufgegeben worden sein.

Auch bei Patienten mit bestehenden Lungenerkrankungen, wie z.B. Asthma oder COPD, sollte Exubera[®] nicht angewendet werden, da nur begrenzte Daten über die Sicherheit der Anwendung bei diesen Patienten vorliegen.

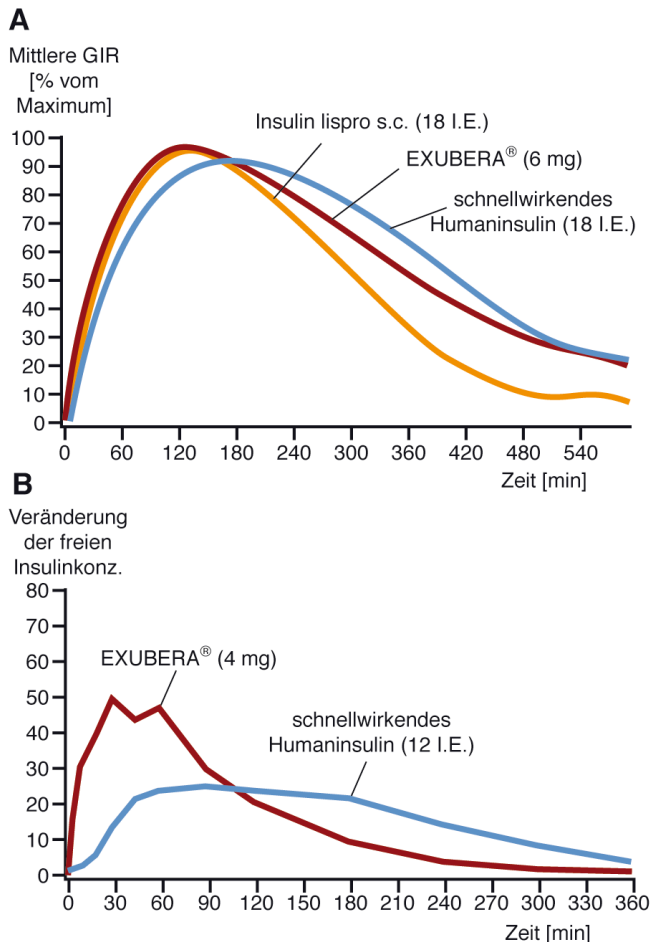
Im Herbst 2007 stellte Pfizer die Produktion von Exubera[®] in Frankfurt ein – die Patienten hatten das Medikament nicht ausreichend nachgefragt. Nach 11 Jahren Entwicklung war Exubera[®] knapp ein Jahr auf dem Markt.

3. Antidiabetika (Humaninsuline)

Humaninsulin

Exubera®/Pizer

E. coli



- A. Mittlere Glukoseinfusionsrate (GIR) im Verhältnis zur maximalen GIR verschiedener Therapieregime bei Probanden bezogen auf die Zeit.
- B. Durchschnittliche Veränderung der freien Insulinkonzentrationen im Serum ($\mu\text{E}/\text{ml}$) nach Inhalation von 4 mg Humaninsulin bzw. einer subkutanen Injektion von 12 Einheiten schnell wirkendem Humaninsulin bei adipösen Personen mit Typ-2-Diabetes.

Modifizierte Human-Insuline

Die Kinetik der Insulinsekretion zeichnet sich bei stoffwechselgesunden Personen durch eine weitgehend konstante basale Sekretion im Nüchternzustand und über Nacht (ca. 0,5-1 U Insulin/h) und durch einen mahlzeitabhängigen kurzen Anstieg (ca. 1-2 U Insulin / Brot Einheit (BE)) aus.

Dadurch wird die Blutglukosekonzentration sehr konstant im Bereich der Norm gehalten.

Dieses Bild einer normalen physiologischen Insulinsekretion versucht man im Rahmen einer intensivierten Insulintherapie zu kopieren.

Hierzu wird der basale und prandiale Insulinbedarfs mit Hilfe mehrfacher täglicher Injektionen von Insulinpräparationen in das subkutane Fettgewebe substituiert.

Zwar kommt diese Therapie den physiologischen Verhältnissen recht nahe.

Dennoch lässt sich eine optimale Nachahmung der normalen endogenen Insulinsekretion mit den zur Zeit im Handel verfügbaren Human-Insulinen nicht realisieren.

Modifizierte Human-Insuline

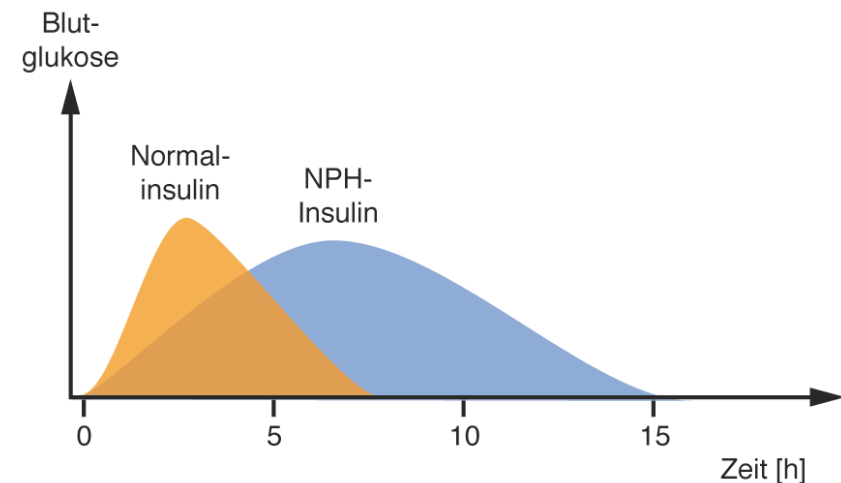
www.uni-frankfurt.de

Das Normalinsulin, das als kurzwirkendes Insulin für die Deckung des prandialen Insulinbedarfs bei der intensivierten Substitutionstherapie eingesetzt wird, verhält sich deutlich unterschiedlich von der physiologischen postprandialen Insulinsekretion.

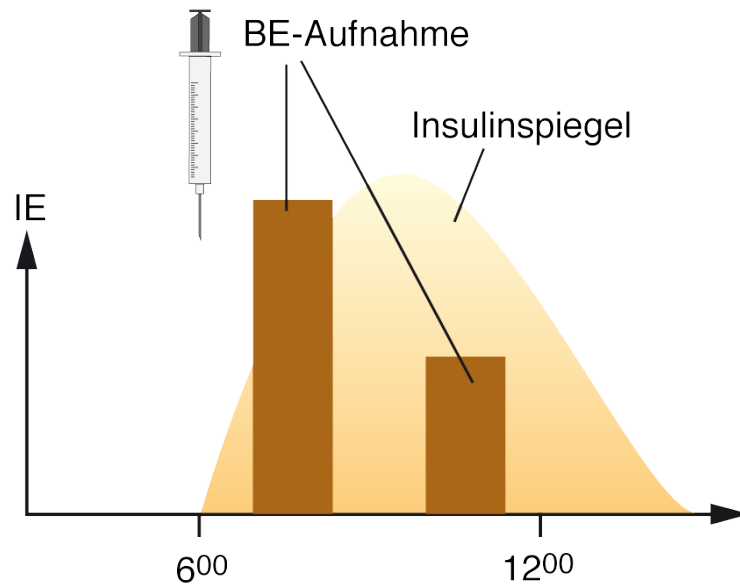
Es zeigt einen langsameren Wirkungseintritt (ca. 15-30 min nach der Injektion) und eine längeranhaltende Wirkungsdauer (6-8 h).

NPH-Insulin-Präparationen (Neutral-Protamin Hagedorn, Verzögerungsinsuline), die am häufigsten bei der intensivierten Therapie zur Deckung des basalen Insulinbedarfs verwendet werden, weisen eine für die basale Substitution relativ kurze Wirkungsdauer (ca. 17 h) und ein suboptimales Wirkungsprofil auf.

Dessen Verlauf ist nicht so flach und gleichmäßig, wie man es sich von einem idealen Insulinpräparat zur basalen Substitution wünschen würde. Zusätzlich treten eine hohe Variabilität der Wirkung und immunogene Nebenwirkungen des Protamins als weitere negative Faktoren auf.



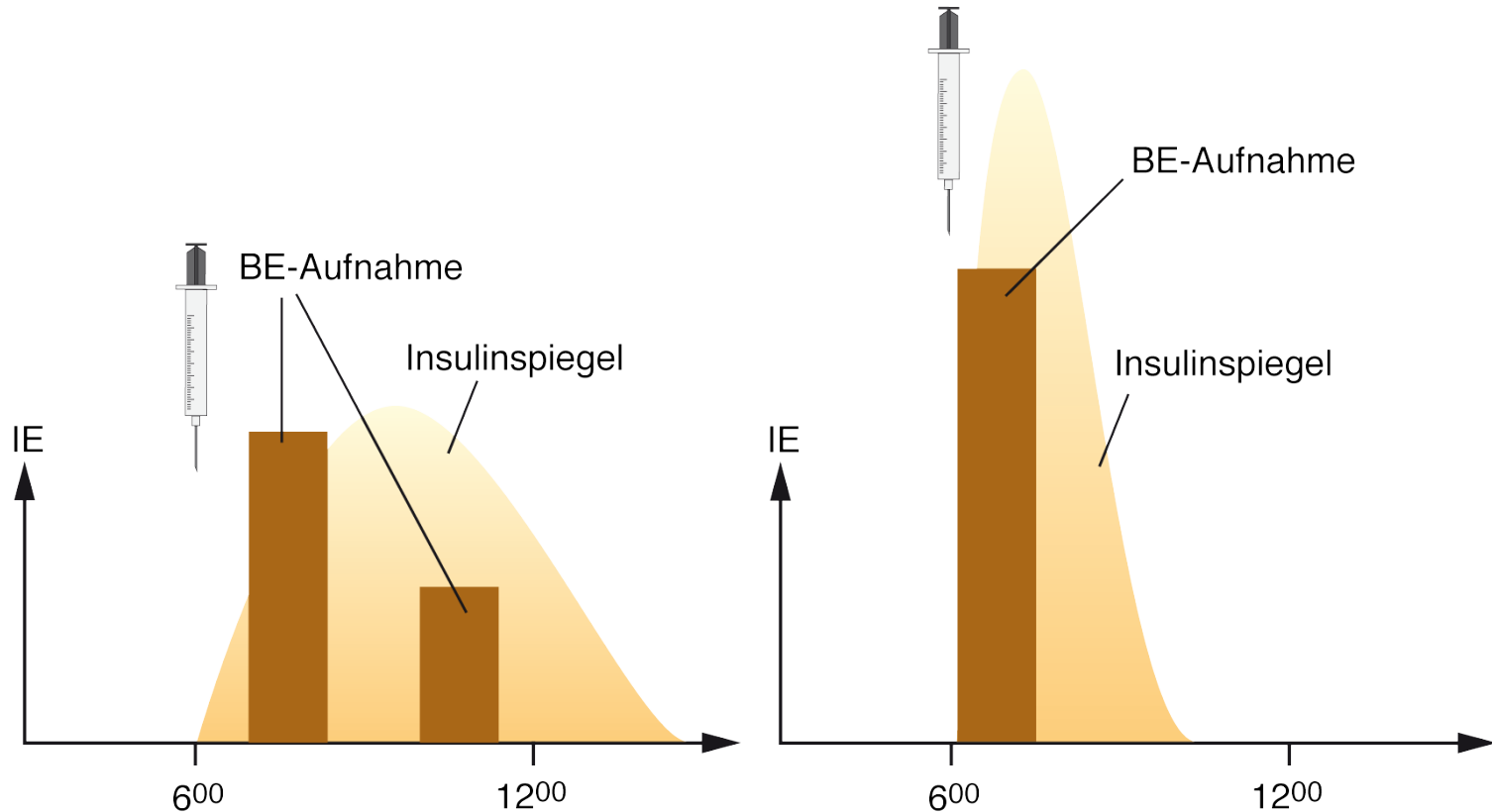
Wirkprofile im Vergleich



Normalinsulin:

Wirkungsverlauf erfordert Spritz-
Ess-Abstand und Zwischenmahlzeit

Wirkprofile im Vergleich



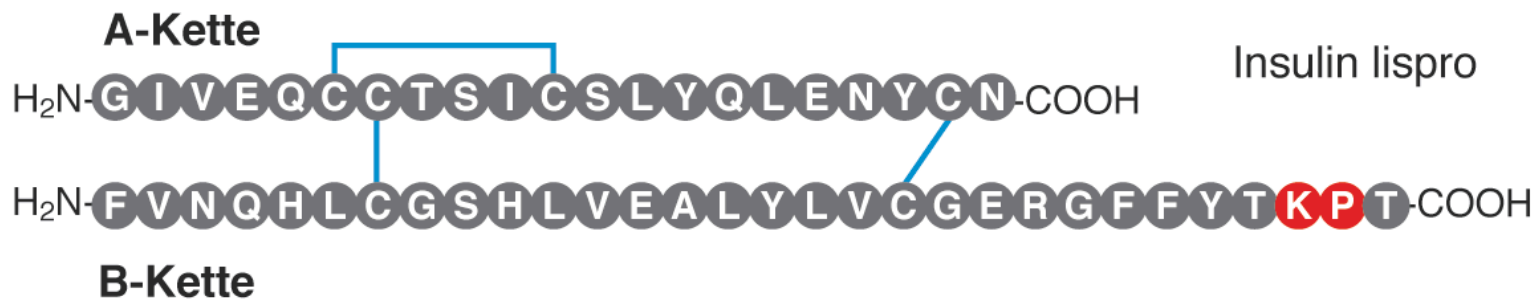
Normalinsulin:

Wirkungsverlauf erfordert Spritz-Ess-Abstand und Zwischenmahlzeit

Schnelle Analoga:

Durch kurze Wirkungsdauer entfällt Spritz-Ess-Abstand und die Aufteilung der BE

Liprolog[®]/Humalog[®] (Insulin Lispro)

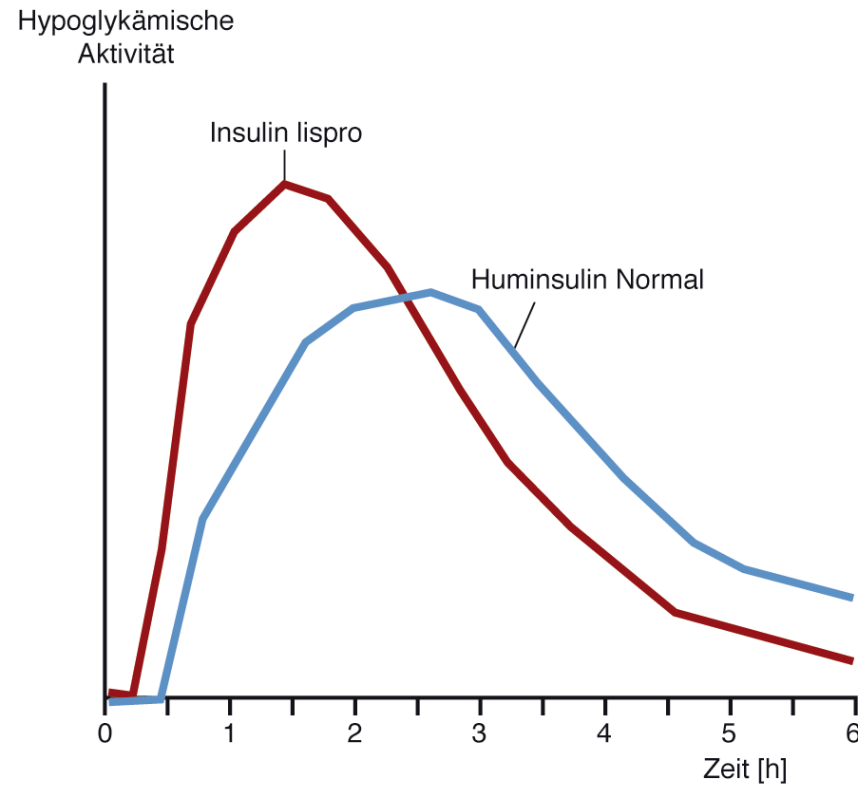


3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin lispro	Humalog [®] /Eli Lilly	<i>E. coli</i>
Insulin lispro	Liprolog [®] /Eli Lilly	

Ph.Eur.: 0,0347 mg Insulin lispro entspricht 1 Einheit Insulin.

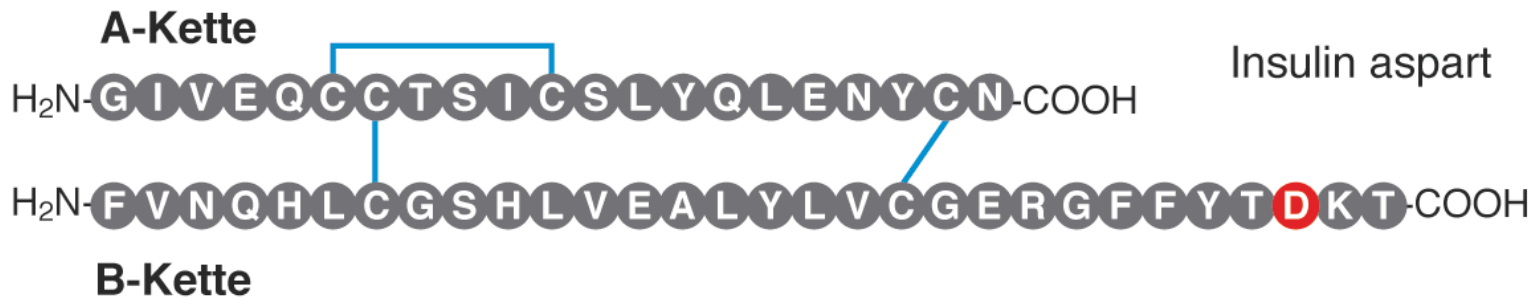
Liprolog[®]/Humalog[®] (Insulin Lispro)



3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin lispro	Humalog [®] /Eli Lilly	<i>E. coli</i>
Insulin lispro	Liprolog [®] /Eli Lilly	

NovoRapid® (Insulin aspart)



3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

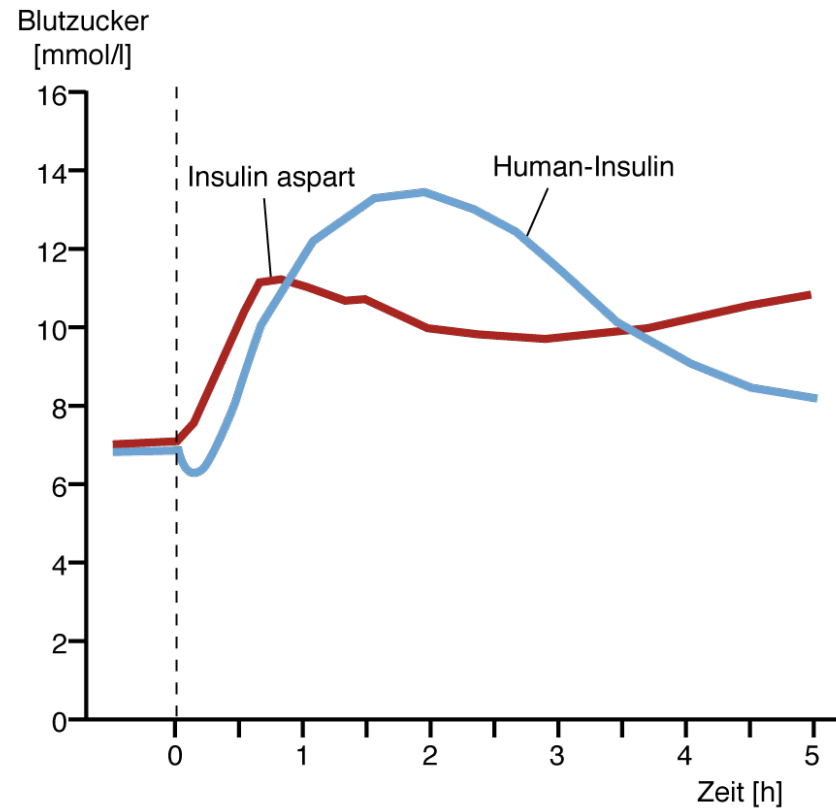
Insulin aspart

NovoRapid®/Novo Nordisk

S. cerevisiae

Ph.Eur.: 0,0350 mg Insulin aspart entspricht 1 Einheit Insulin.

NovoRapid® (Insulin aspart)



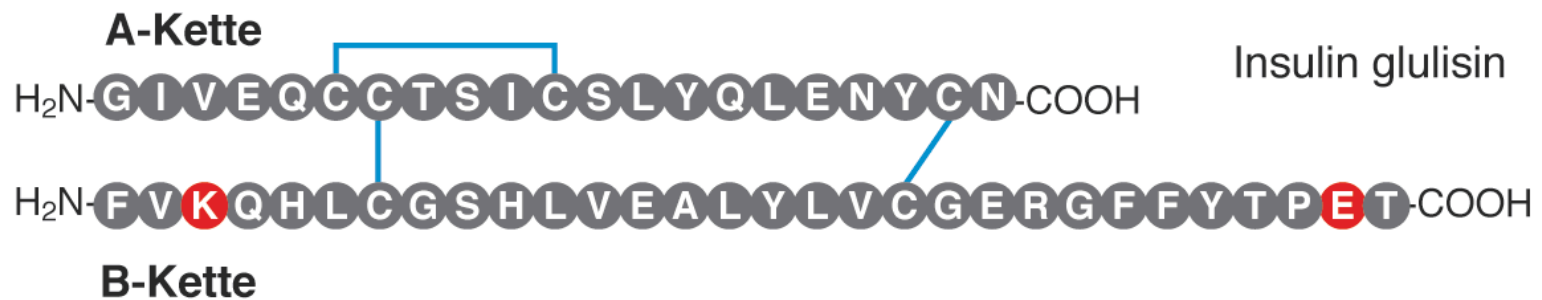
3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin aspart

NovoRapid®/Novo Nordisk

S. cerevisiae

Apidra[®] (Insulin glulisin)



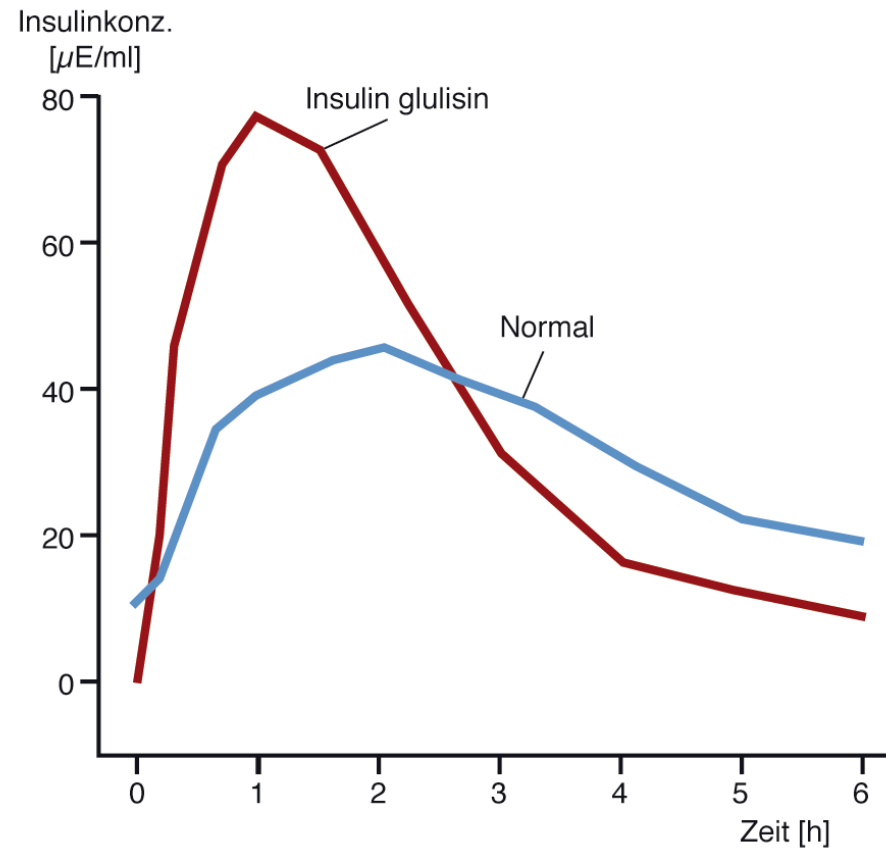
3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin glulisin

Apidra[®]/Sanofi-Aventis

E. coli

Apidra® (Insulin glulisin)



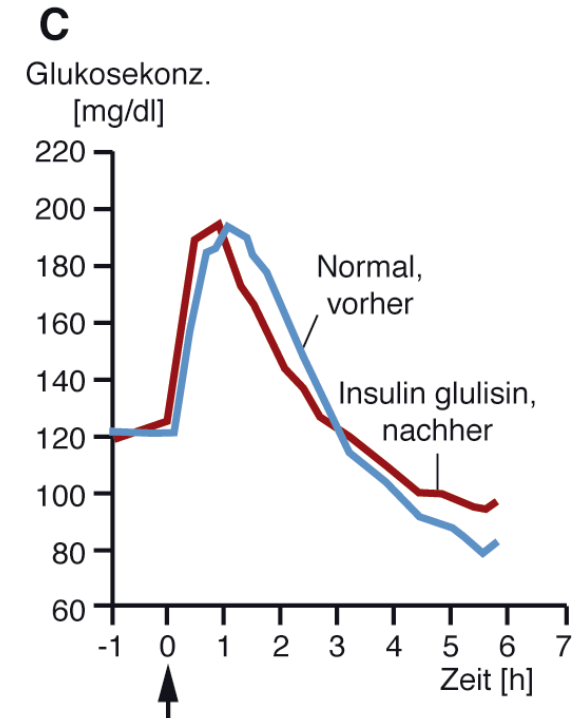
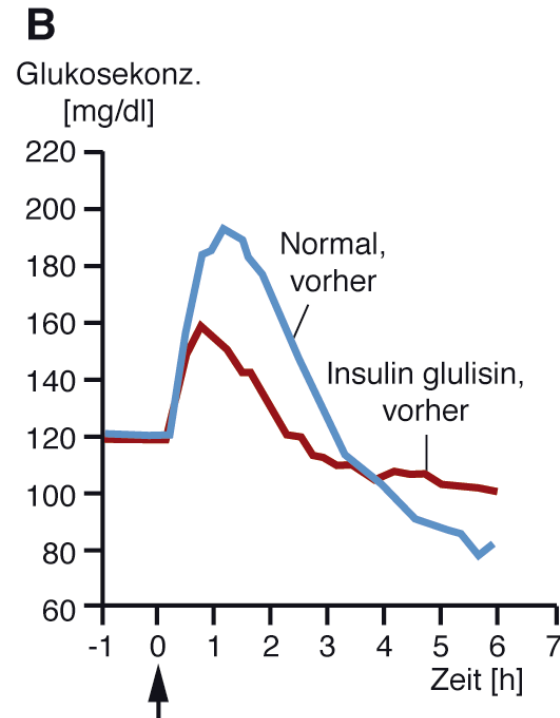
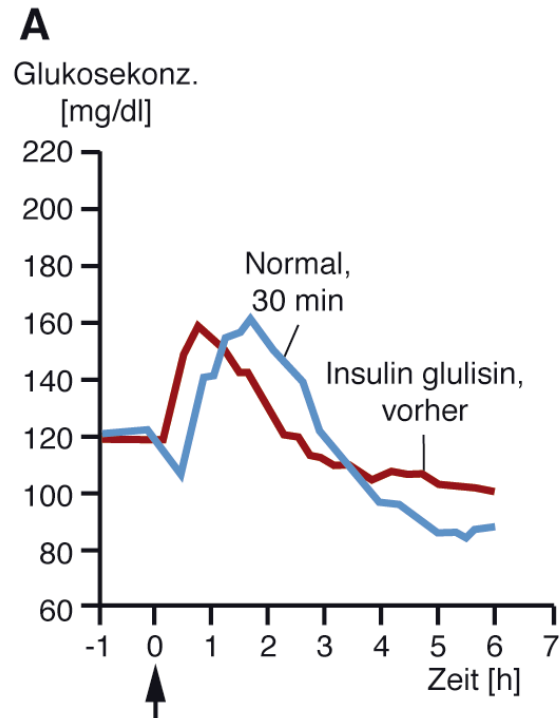
3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin glulisin

Apidra®/Sanofi-Aventis

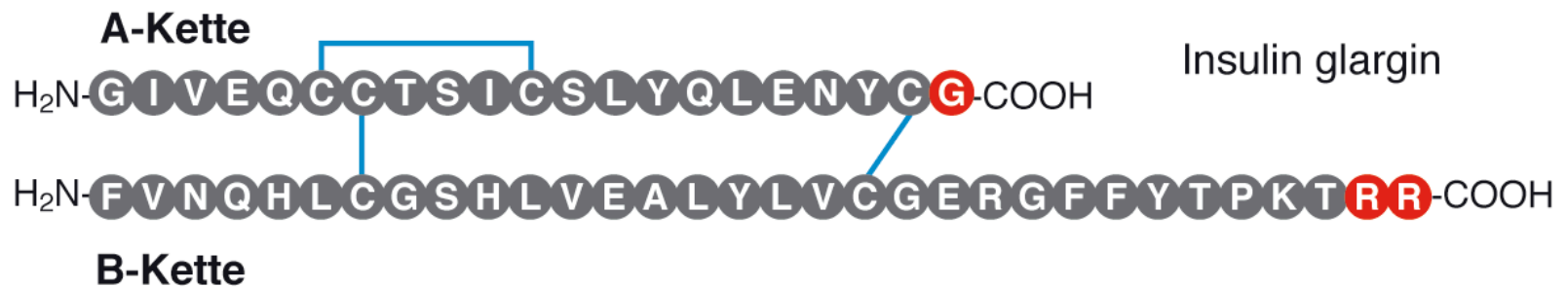
E. coli

Apidra® (Insulin glulisin)



- A. Gabe von Insulin glulisin 2 Minuten vor der Mahlzeit; Gabe von Normal-Insulin 30 Minuten vor der Mahlzeit.
- B. Gabe von Insulin glulisin 2 Minuten vor der Mahlzeit; Gabe von Normal-Insulin 2 Minuten vor der Mahlzeit.
- C. Gabe von Insulin glulisin 15 Minuten nach der Mahlzeit; Gabe von Normal-Insulin 2 Minuten vor der Mahlzeit.

Lantus[®]/Optisulin[®] (Insulin glargin)

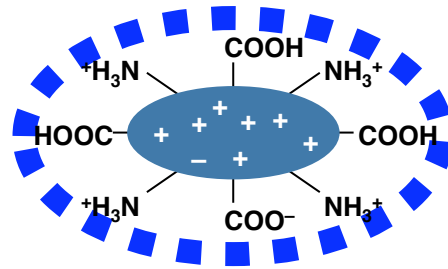


3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

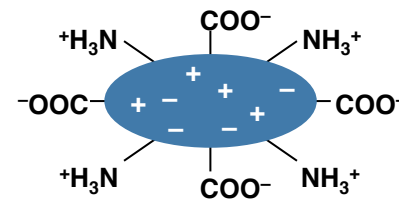
Insulin glargin

Apidra[®]/Sanofi-Aventis

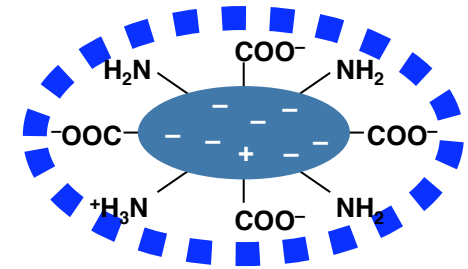
E. coli



Insulin-Kation

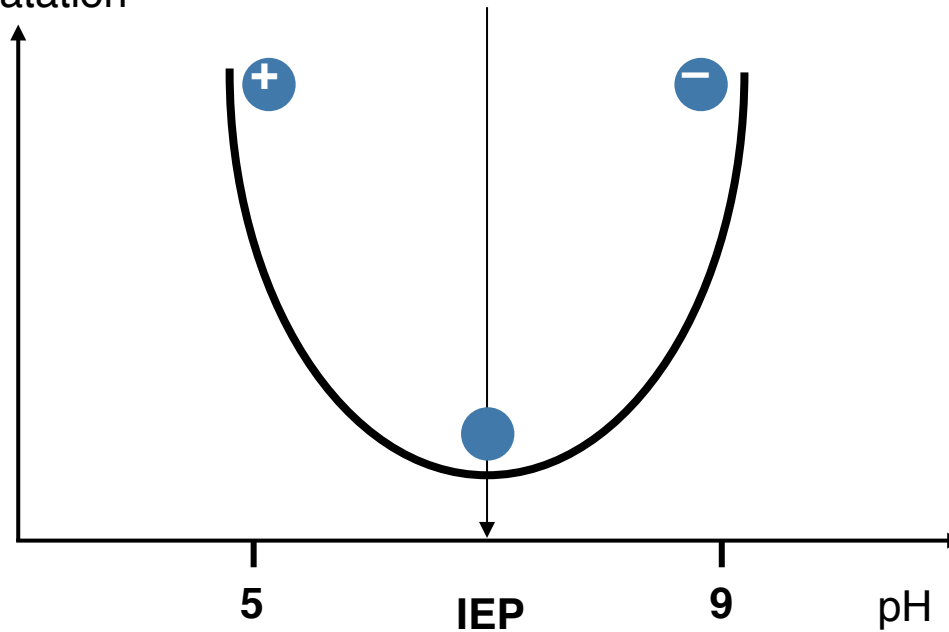


Insulin-Zwitterion

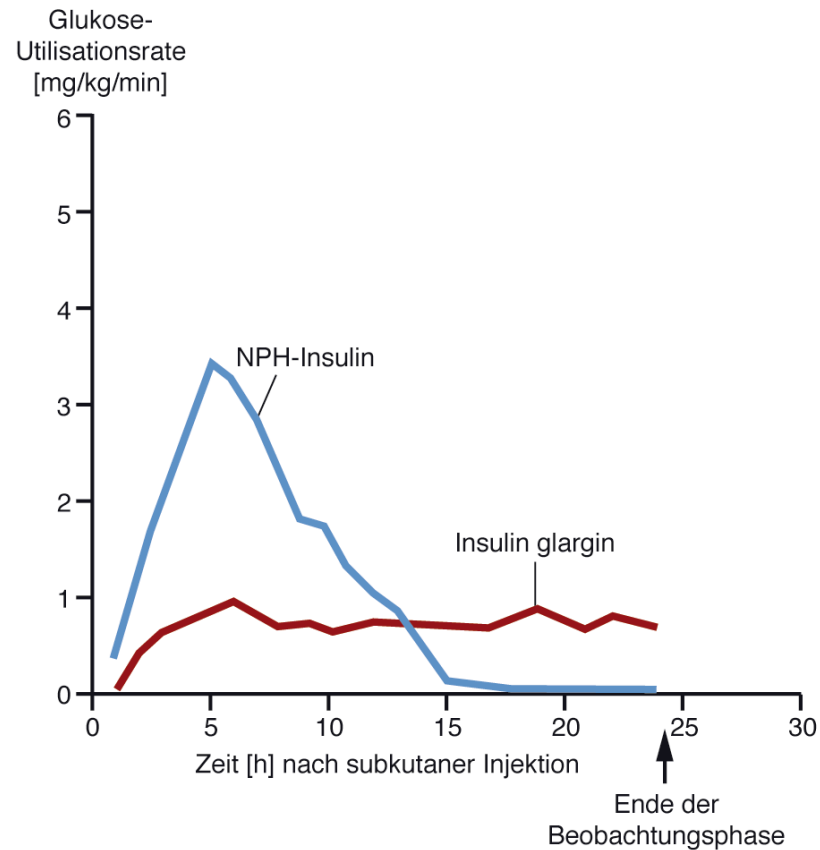


Insulin-Anion

Löslichkeit
Überschussladung
Hydratation



Lantus[®]/Optisulin[®] (Insulin glargin)



3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulin glargin

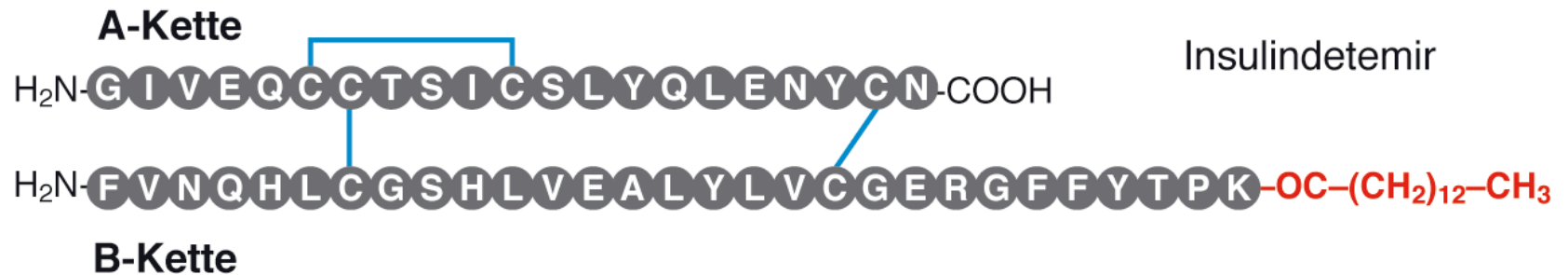
Apidra[®]/Sanofi-Aventis

E. coli

Das “Lantus[®]-Problem“

Analogon	Insulin-Rezeptor-affinität (%)	Insulin-Rezeptor off-Rate (%)	Metabolische Potenz (Lipogenese) (%)	IGF-1-Rezeptor-affinität (%)	Mitogenme Potenz (%)
Human insulin	100	100	100	100	100
B10Asp	205 ± 20	14 ± 1	207 ± 14	587 ± 50	975 ± 173
Aspart	92 ± 6	81 ± 8	101 ± 2	81 ± 9	58 ± 22
Lispro	84 ± 6	100 ± 11	82 ± 3	156 ± 16	66 ± 10
Glargine	86 ± 3	152 ± 13	60 ± 3	641 ± 51	783 ± 132
A21Gly	78 ± 10	162 ± 11	88 ± 3	42 ± 11	34 ± 12
B31B32diArg	120 ± 4	75 ± 8	75 ± 5	2,049 ± 202	2,180 ± 390
Detemir	46 ± 5	204 ± 9	ca 27	16 ± 1	ca 11

Levemir[®] (Insulindetemir)



3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

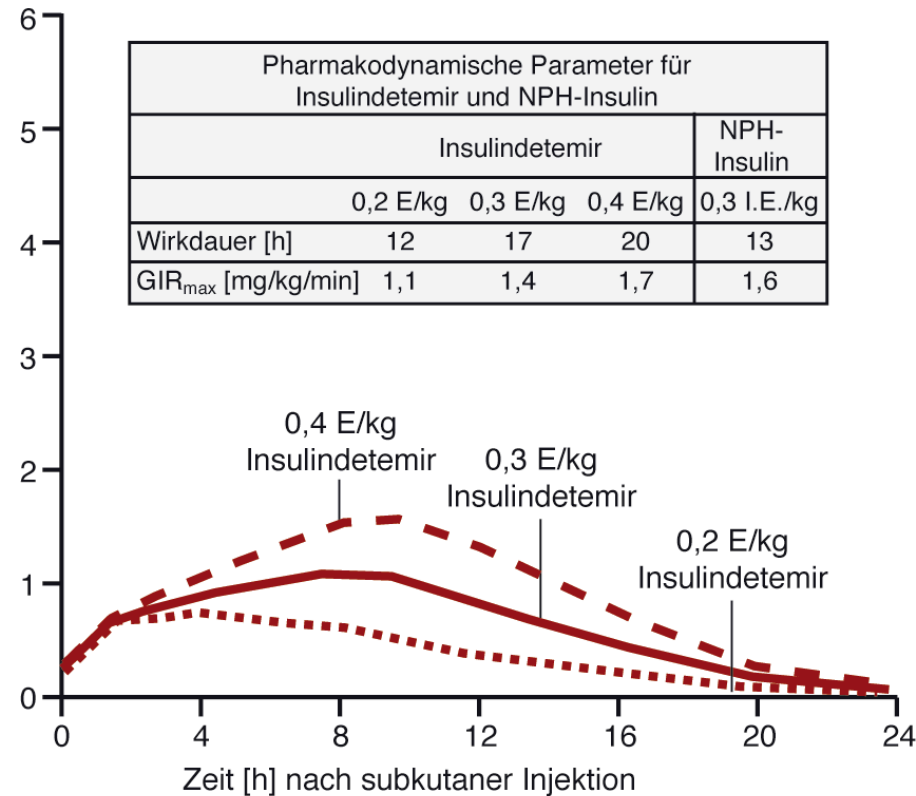
Insulindetemir

Levemir[®]/Novo Nordisk

S. cerevisiae

Levemir® (Insulindetemir)

Glukose-
Infusionsrate
[mg/kg/min]



3. Antidiabetika (Modifizierte Insuline)

Insulindetemir

Levemir®/Novo Nordisk

S. cerevisiae