

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
FARMACIA**

TESI DI LAUREA

**INSULINA ICODEC: UNA NUOVA
FORMULAZIONE DI INSULINA
SETTIMANALE NELLA TERAPIA DEL
DIABETE**

RELATORE: CHIAR.MO PROF. MICHELE
MORARI

LAUREANDO: PIETRO PERFETTI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Indice

Abstract	5
Introduzione	7
Capitolo 1. <i>L'insulina come ormone</i>	9
<i>Paragrafo 1.1. La storia e le prime scoperte</i>	10
<i>Paragrafo 1.2. La struttura dell'insulina</i>	12
<i>Paragrafo 1.3. Produzione, maturazione e rilascio dell'insulina</i>	15
<i>Paragrafo 1.4. Il meccanismo d'azione dell'insulina</i>	17
<i>Paragrafo 1.5. Gli effetti dell'insulina sull'organismo</i>	19
Capitolo 2. <i>L'insulina come farmaco</i>	23
<i>Paragrafo 2.1. La storia del farmaco e i suoi primi utilizzi</i>	23
<i>Paragrafo 2.2. Come si differenziano gli analoghi insulinici</i>	25
<i>Paragrafo 2.3. Le insuline rapide ed ultra-rapide</i>	26
<i>2.3.1. L'insulina regolare</i>	27
<i>2.3.2. Le insuline Lispro, Aspart e Glulisina</i>	28
<i>2.3.3. L'insulina Faster Insulin Aspart</i>	31
<i>Paragrafo 2.4. Le insuline lente</i>	32
<i>2.4.1. Le insuline NPH e NPL</i>	33
<i>2.4.2. Le insuline Glargine e Detemir</i>	33
<i>2.4.3. L'insulina Degludec</i>	36
<i>Paragrafo 2.5. Le insuline bifasiche</i>	37
Capitolo 3. <i>L'insulina Icodec</i>	39
<i>Paragrafo 3.1. L'insulina Icodec</i>	39
<i>3.1.1. Come la struttura influenza la sua attività</i>	40
<i>3.1.2. Il profilo farmacocinetico</i>	46
<i>Paragrafo 3.2. Indicazioni terapeutiche di Icodec</i>	51
<i>3.2.1. Utilizzo di Icodec nel DMTI</i>	52

3.2.2. <i>Utilizzo di Icodec nel DMT2</i>	54
Capitolo 4 <i>Cenni alle nuove tecnologie per il monitoraggio della glicemia e per il trattamento del diabete mellito</i>	61
<i>Paragrafo 4.1. Nuove tecnologie</i>	61
4.1.1. <i>Nuovi sistemi di monitoraggio della glicemia</i>	61
4.1.2. <i>Nuove formulazioni d'insulina</i>	63
4.1.3. <i>Trapianto di pancreas</i>	66
Bibliografia	69
Sitografia	75

Abstract

Il diabete mellito è una patologia che si contraddistingue per l'elevata concentrazione di glucosio all'interno del torrente ematico, ed è responsabile di severe patologie cardiovascolari.

Fino al 1922, data in cui è stata scoperta l'insulina, questa patologia risultava incurabile e mortale. L'evoluzione medico-farmacologica che inizia con la scoperta dell'ormone passa per modifiche formulative e l'innovazione tecnologica del DNA ricombinante che hanno permesso la sintesi di analoghi a breve o lunga durata d'azione. Da queste innovazioni è scaturita l'insulina Icodec, un analogo a lunga durata d'azione a somministrazione settimanale.

Questa tesi mira all'analisi delle proprietà farmacologiche dell'insulina, al confronto tra i diversi analoghi e alle diverse formulazioni insuliniche ed alla disamina delle proprietà dell'insulina Icodec alla luce dei recenti studi clinici preregistrativi. Infine, sarà fatto cenno ai più recenti approcci terapeutici al diabete e agli sviluppi nel campo dei device utilizzati nel monitoraggio della glicemia.

L'Icodec e i nuovi approcci terapeutici in fase di sperimentazione rappresentano la nuova frontiera della farmacologia e della medicina verso cui la comunità scientifica si sta orientando. Grazie a queste innovazioni sarà possibile ridurre ulteriormente il fardello rappresentato dalla patologia diabetica e offrire al paziente la possibilità di migliorare la propria qualità di vita e prevenire le temibili complicanze della malattia.

Introduzione

Alla base di questa ricerca bibliografica vi è l'analisi degli studi che hanno condotto alla recente approvazione da parte della Agenzia Europea del Farmaco (EMA) di un nuovo analogo dell'insulina, l'insulina Icodec. Questa nuova molecola verrà presentata nel contesto dell'attuale panorama della terapia del diabete mellito e confrontata con gli altri analoghi insulinici a breve o lunga durata d'azione.

Ho selezionato questo argomento per due aspetti principali: in primo luogo il diabete è una delle patologie più frequenti nella nostra società, in secondo luogo l'insulina è uno dei farmaci biotecnologici più frequentemente dispensati dalla farmacia aperta al pubblico e per questo motivo un approfondimento di questo argomento può costituire un importante bagaglio di conoscenza per la professione del Farmacista.

La scoperta dell'insulina e il suo utilizzo nella terapia sostitutiva del diabete mellito rappresentano un traguardo fondamentale per la medicina moderna. Il percorso ha raggiunto il suo apice con l'assegnazione del premio Nobel per la Medicina nel 1922. L'introduzione della tecnica del DNA ricombinante ha permesso di ottenere analoghi insulinici a diversa durata d'azione interferendo in maniera intelligente e mirata con i processi di aggregazione della molecola in soluzione. Modifiche formulative hanno ulteriormente permesso di variare la durata d'azione dei diversi analoghi e aumentare complessivamente il numero delle specialità insuliniche disponibili, allargando così l'armamentario a disposizione del medico internista e del diabetologo. Queste specialità permettono di rispondere al fabbisogno insulinico in condizioni basali e dopo i pasti, ottimizzando il controllo glicemico. L'insulina Icodec verrà analizzata sia dal punto di vista farmacodinamico che farmacocinetico, in particolar modo vagliando le diverse ragioni che ne caratterizzano la lunga emivita e permettono la somministrazione settimanale. La sua efficacia e sicurezza saranno analizzate attraverso gli studi clinici della fase pre-registrativa. Considerato che la terapia insulinica rappresenta in generale un fardello molto pesante per i pazienti, considerato l'elevato numero di somministrazioni giornaliere, l'approvazione di

un'insulina a somministrazione settimanale promette di migliorare l'aderenza terapeutica e ottimizzare il controllo glicemico, prevenendo ulteriormente le complicanze associate all'iperglicemia.

CAPITOLO 1

L'insulina come ormone

Il pancreas è un importante organo in grado di svolgere una funzione digestiva esocrina e una funzione endocrina. E' strutturato in due porzioni che hanno origini e funzioni diverse. Una porzione è costituita dagli acini pancreatici mentre l'altra porzione è costituita dalle isole di Langerhans. Gli acini pancreatici sono responsabili della produzione e della secrezione dei succhi pancreatici, ricchi di enzimi digestivi, rilasciati nel duodeno tramite il dotto pancreatico mentre le isole di Langerhans rappresentano la porzione endocrina del pancreas, a sua volta costituita da tre tipologie cellulari: le cellule α (alfa), le cellule β (beta) e le cellule δ (delta). Ogni tipo di cellula produce e rilascia tre diversi ormoni. Le cellule α secernono il glucagone, le cellule δ secernono la somatostatina le cellule β secernono l'insulina, oggetto della presente tesi.

Paragrafo 1.1. La storia e le prime scoperte

La storia della scoperta di uno degli ormoni più importanti del nostro organismo è un tassello importante per comprendere fino in fondo le innovazioni tecnologiche che hanno interessato e fatto crescere il settore farmaceutico fino ad oggi.

La scoperta dell'insulina è stato un importante traguardo raggiunto dalla medicina e rappresenta una delle più grandi scoperte di tutto il ventesimo secolo. L'elemento che rende ancor più importante tale scoperta è rappresentato dal fatto che l'insulina è stato il primo ormone ad essere sequenziato, purificato, modificato strutturalmente per migliorarne le caratteristiche farmacologiche a scopo terapeutico, e sintetizzato mediante la tecnologia del DNA ricombinante. Che l'insulina oggi rappresenti il caposaldo della terapia del diabete di tipo I (DMT1) è un fatto noto a tutti, e per i malati di DMT1 l'insulina fa parte della quotidianità. Non risulta perciò semplice andare indietro nel tempo e pensare agli approcci utilizzati dalla medicina per il trattamento di tale patologia un secolo fa.

Prima della scoperta di quest'ormone pancreatico e del suo funzionamento, il diabete rappresentava una patologia fortemente debilitante e, conseguentemente, la qualità della vita dei pazienti era molto bassa. Il trattamento più efficace in quello che è noto come il periodo "pre-insulina" ("the preinsulin era"), applicato dai medici americani Frederick Allen e Elliott Joslin, era principalmente il digiuno (Falcetta et al., 2021). I loro studi hanno dimostrato come il digiuno permettesse di prolungare la vita in molti dei loro pazienti a tal punto che il digiuno divenne il trattamento elettivo anche nei bambini affetti dalla patologia, dove effettivamente era in grado di ridurre l'incidenza di gravi complicazioni e, nei casi più gravi, la morte. Attraverso il digiuno e quindi la riduzione dell'assorbimento del glucosio prodotto dalla digestione dei carboidrati complessi, principalmente l'amido, si otteneva un rudimentale controllo della glicemia.

La scoperta dell'insulina si compone di tre tappe fondamentali: la prima è quella della identificazione della struttura anatomica che rilascia l'insulina, la seconda è la dimostrazione dell'attività ipoglicemizzante in seguito alla

somministrazione di un estratto pancreatico non purificato e la terza, probabilmente la più importante, è l'identificazione della molecola dell'insulina. Il primo passo fu compiuto da un giovane studente di medicina di nome Paul Langerhans. Un nome non del tutto sconosciuto se si parla di anatomia e fisiologia. Questo studente è stato il primo ad osservare come nel pancreas fossero presenti delle piccole strutture poligonali, da lui nominate isole di Langerhans, la cui funzione di produzione e rilascio di insulina, però, fu determinata solo successivamente. Il merito di tale scoperta è da attribuirsi agli scienziati Minkowski e Von Mering nel 1889. La loro scoperta permise di collegare l'insulina alla funzione endocrina del pancreas, riuscendo in questo modo a dimostrare come l'origine del diabete mellito fosse da collegarsi proprio a quest'organo.

Il biochimico statunitense Israel Kleiner, circa 10 anni dopo aver ottenuto la laurea in biochimica a Yale nel 1909, fu il primo a dimostrare che la somministrazione di un estratto pancreatico era in grado di produrre un effetto ipoglicemizzante. Questo ha permesso di ipotizzare la presenza nel sangue di una sostanza in grado di diminuire la concentrazione di glucosio. Il nome all'estratto, denominato Pancreine, fu fornito dallo scienziato rumeno Nicolai Paulescu nel 1921.

Tuttavia, la scoperta scientifica più importante, che è valsa il premio Nobel per la medicina nel 1922, avvenne a Toronto, in Canada, dove un gruppo di ricerca composto dal dottor Frederick Banting, dal professor John Macleod, dallo studente Charles Best e dal biochimico James Collip riuscì, grazie alla purificazione dell'estratto, ad individuare l'ormone responsabile dell'effetto ipoglicemizzante, appunto l'insulina.

Ad oggi, il farmaco insulina, della quale parleremo nel capitolo seguente, viene prodotto utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante e non è più ottenuto mediante estrazione dal pancreas. Tale progresso è stato reso possibile grazie alla individuazione della sequenza amminoacidica dell'insulina ad opera di Frederick Sanger, nel 1955 e alla mappatura del gene dell'insulina, avvenuta nel 1980 con l'utilizzo del metodo Maxam-Gilbert (Bell et al. 1980).

La scoperta dell'insulina ha permesso di curare milioni di pazienti affetti da diabete mellito diventando un farmaco salvavita per milioni di persone in tutto il mondo (Falcetta et al., 2021).

Paragrafo 1.2. La struttura dell'insulina

L'insulina umana nella sua forma matura (**Figura 1**) è costituita da due catene polipeptidiche. La prima catena, denominata "catena A", è formata da ventuno residui amminoacidici; la seconda catena, denominata "catena B", è formata da trenta residui amminoacidici. Le due catene sono c da due ponti disolfuro. Il primo collega il residuo di cisteina in posizione sette della catena B (CysB7) e il residuo di cisteina in posizione sette della catena A (CysA7). Il secondo ponte invece collega la cisteina in posizione diciannove della catena B (CysB19) con la cisteina in posizione ventuno della catena A (CysA21). A livello della catena A, è poi presente un ponte disolfuro intra-catena tra il residuo di cisteina in posizione sei (CysA6) e la cisteina in posizione undici (CysA11) (Lawrence et al., 2021). La struttura tridimensionale dell'insulina deriva attraverso la maturazione del trascritto del gene INS, la cosiddetta pre-proinsulina da cui, come vedremo nel paragrafo successivo, verrà generata l'insulina in forma attiva (Min Liu et al., 2018).

La differenza sostanziale tra la prepro-insulina e l'insulina è rappresentata dalla presenza nella forma immatura di un peptide segnale e di una catena polipeptidica che collega la porzione N-terminale della catena A con la porzione C-terminale della catena B, nota come peptide C.

Oltre alla sequenza amminoacidica, ciò che appare rilevante ai fini della funzione dell'insulina è la sua struttura tridimensionale.

Con l'utilizzo della cristallografia a raggi-X è stato possibile scoprire tre domini chiave all'interno della struttura insulinica. Il primo è un dominio ad α -elica posizionato al centro della catena B che spazia dal residuo numero nove al residuo numero diciannove (B9-B19). Gli altri due domini sono nella catena A, entrambi ad α -elica, che spaziano rispettivamente dal residuo numero uno al residuo numero otto (A1-A8) e dal residuo numero dodici al residuo numero

venti (A12-A20). Esiste un ultimo dominio a livello della catena B, un foglietto β -ripiegato di tipo II, il quale si estende dal residuo numero venti al residuo numero ventitré (B20-B23). Dal residuo ventiquattro al residuo numero trenta della catena B (B24-B30) si estende un dominio lineare con sviluppo anti-parallelo rispetto al dominio ad α -elica presente sulla stessa catena. Tale porzione strutturale risulta essere fondamentale per la creazione di strutture più complesse (Lawrence et al., 2021).

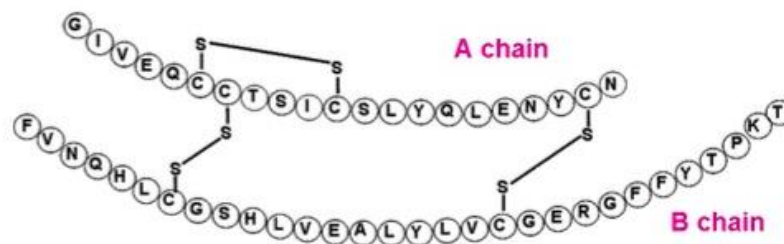


Figura 1: La struttura dell'insulina (da Mayer et al., 2007),

In soluzione, i monomeri di insulina si associano tra di loro formando inizialmente una struttura dimerica che diventa poi trimerica per l'aggiunta di un terzo monomero. La formazione della struttura trimerica è organizzata attorno ad un asse principale. Questo permette di assemblare la struttura esamerica, la quale viene stabilizzata dalla presenza di due ioni Zn^{2+} . I due ioni sono in grado di posizionarsi al centro della struttura, esattamente in prossimità dell'asse di simmetria. In questo specifico punto ciascun atomo viene coordinato dai tre residui di istidina in posizione dieci della catena B (HisB10) e, così facendo, i due ioni sono in grado di assemblare le strutture con formazione della struttura esamerica finale, come illustrato nella **Figura 2**. La struttura si compone di tre unità, ciascuna delle quali composta da due monomeri di insulina (Lawrence et al., 2021).

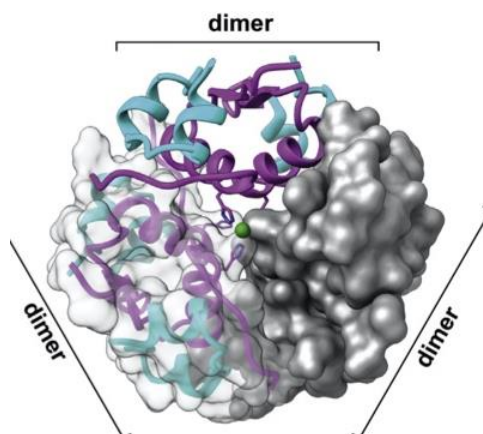


Figura 2: L'assemblaggio di tre dimeri di insulina nella struttura esamerica (da Lawrence, 2021)

L'assemblaggio della struttura "a cristallo" è adottata principalmente dall'ormone in condizioni di pH neutro e in presenza dello ione Zn^{2+} all'interno dell'apparato del Golgi delle cellule β . La forma dimerica risulta invece preferita in condizioni di aumentata diluizione. In qualsiasi caso, è possibile dedurre come l'insulina possieda un'elevata tendenza alla formazione della struttura quaternaria.

La struttura esamerica risulta essere stabile solo in presenza di Zn^{2+} e per questo motivo l'eventuale mancanza degli ioni comporta il disassemblaggio completo dell'esamero. Tale rottura è dovuta alla formazione di forze di repulsione dei sei residui centrali di acido glutammico in posizione tredici della catena B (GluB13). In questo caso un ruolo fondamentale è rappresentato dal punto isoelettrico dell'acido glutammico, che è pari a 3,15. Ciò significa che a pH neutro l'amminoacido risulta essere ionizzato con assunzione di carica negativa. Così facendo, senza la presenza degli ioni Zn^{2+} in grado di coordinare le cariche negative, è inevitabile l'instaurarsi di forze elettrostatiche così forti da rompere la struttura (Pounot et al., 2021).

La degradazione dell'esamero di insulina in dimeri e quindi in monomeri è prerequisito fondamentale per l'interazione della molecola con il recettore. Inoltre, la velocità di disgregazione dell'esamero determina le caratteristiche farmacocinetiche dei diversi analoghi e/o delle diverse formulazioni di insuline,

che è alla base della attuale classificazione in insuline ultrarapide, rapide, intermedie e a lunga durata d'azione.

Paragrafo 1.3. Produzione, maturazione e rilascio dell'insulina

Come già introdotto in precedenza, la produzione e la secrezione dell'insulina vengono catalizzate nella porzione endocrina del pancreas, più precisamente nelle cellule β delle isole di Langerhans.

L'insulina rilasciata nel torrente circolatorio non è strutturalmente identica a quella che viene prodotta inizialmente. Tra la forma iniziale (pre-pro-ormone) e la forma finale (attiva) intercorrono due modifiche strutturali che permettono di dotare l'ormone della sua specifica attività.

La pre-pro-insulina viene prodotta a livello del citoplasma in seguito all'espressione del gene INS, localizzato sul cromosoma undici. La pre-pro-insulina è costituita dalle due catene principali A e B, da una catena di interconnessione denominata Peptide C e da un'ulteriore sequenza amminoacidica N-terminale denominata Peptide segnale (**Figura 3**).

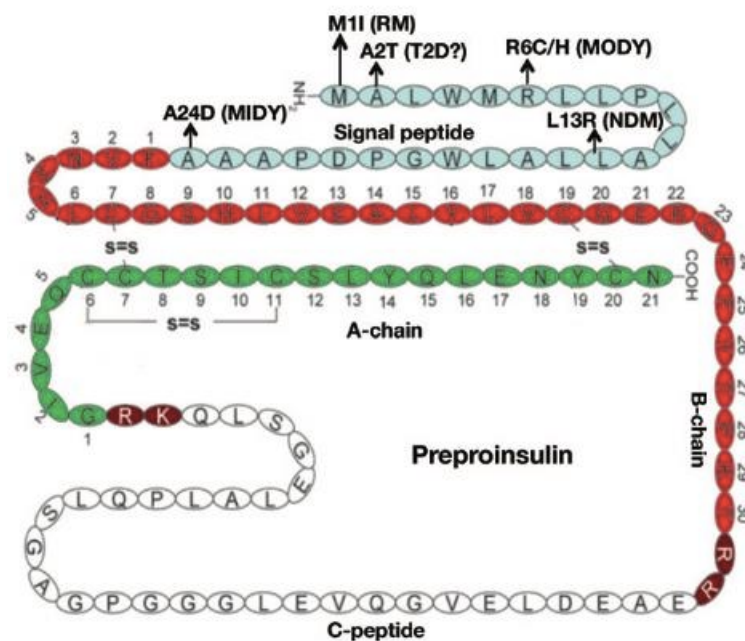


Figura 3: Struttura della pre-pro-insulina umana (da Liu et al., 2018)

Dal citoplasma, la pre-pro-insulina viene traslocata all'interno del reticolo endoplasmatico dove, attraverso un taglio proteolitico, viene privata del Peptide segnale generando la pro-insulina.

La pro-insulina passa quindi all'interno dell'apparato del Golgi, dove subisce un secondo step di maturazione. Il peptide C viene rimosso proteoliticamente e l'insulina convertita nella sua forma attiva, ovvero quella composta dalle catene A e B legate dai due ponti disolfuro.

In seguito al processo di maturazione, l'insulina tende a dimerizzare e formare esameri raggiungendo la sua struttura quaternaria che ne permette l'immagazzinamento sotto forma di granuli oppure il rilascio direttamente nel torrente circolatorio (Liu et al., 2018).

Sia l'espressione del gene INS che il rilascio dell'ormone maturo sono regolati da un fattore fondamentale, ossia la concentrazione di glucosio nel sangue. L'incremento della glicemia nella circolazione sistemica, e quindi pancreatica, causa la traslocazione dei trasportatori del glucosio GLUT 2 sulla superficie della cellula β e la captazione del glucosio. Il metabolismo intracellulare del glucosio causa un incremento del rapporto ATP/ADP con relativa chiusura dei canali potassio K^+ ATP-dipendenti e depolarizzazione di membrana. La depolarizzazione di membrana, a sua volta, induce l'apertura dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti con influsso di Ca^{2+} e rilascio esocitotico di insulina all'interno della vena porta, e da qui al fegato e a tutti i tessuti periferici (Tokarz et al., 2018).

Oltre che dal glucosio, il rilascio di insulina può essere stimolato anche dall'ormone GLP-1 (glucagone-like peptide 1), una incretina rilasciata in seguito all'assunzione di carboidrati con la dieta, che svolge anche altre funzioni, tra cui l'inibizione del rilascio di glucagone, il rallentamento dello svuotamento gastrico e l'inibizione dell'appetito. Queste funzioni sono cruciali ai fini del controllo glicemico tanto che due importanti categorie di farmaci antidiabetici, direttamente o indirettamente, mimano l'azione di questo peptide.

Paragrafo 1.4. Il meccanismo d'azione dell'insulina

Una volta raggiunto il tessuto bersaglio, l'insulina interagisce con il proprio recettore IR, la cui attivazione è responsabile della traslocazione dei trasportatori del glucosio GLUT4 sulla superficie cellulare. Il recettore IR possiede una struttura tetramericata formata da due subunità α e da due subunità β (Taha et al., 1999). Le subunità α sono interamente localizzate nella porzione della membrana rivolta verso l'ambiente extra-cellulare e contengono il sito di legame con l'insulina mentre le subunità β sono possiedono domini trans-membrana. Una volta traslocati sulla membrana cellulare i GLUT trasportano il glucosio all'interno della cellula.

Il recettore esiste in due isoforme: un recettore di tipo A e un recettore di tipo B. La forma recettoriale di tipo B è maggiormente espressa a livello epatico, muscolare e nel tessuto adiposo.

Il legame fra il recettore e l'insulina induce l'auto-fosforilazione sui residui di tirosina e attiva la tirosin-chinasi intrinseca alla molecola recettoriale con la conseguente fosforilazione della proteina IRS-1 (**Figura 4**).

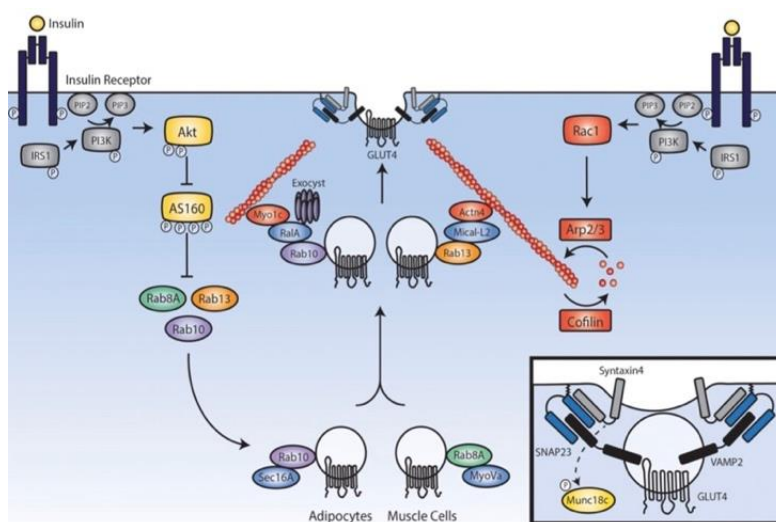


Figura 4: Schema del meccanismo di reclutamento dei GLUT 4 sulla membrana plasmatica delle cellule dei tessuti insulino-sensibili (da Tokarz et al., 2018).

In seguito, la proteina PIK3, composta da un dominio regolatorio e da un dominio catalitico, si lega alla proteina IRS-1 attraverso la subunità regolatoria. Il legame con IRS-1 determina l'attivazione del dominio catalitico della proteina PI3K. La sua attività catalitica porta all'aggiunta di un gruppo fosfato al 4,5-fosfaditilinositolo-difosfato con conversione in 3,4,5-fosfaditilinositolo-trifosfato (PIP3). A sua volta il PIP3 attiva la protein kinasi B (PKB, ovvero Akt) con fosforilazione ed attivazione di una cascata fosforilativa di altri substrati che risulta nella mobilizzazione delle vescicole contenenti il trasportatore GLUT4 che viene traslocato sulla membrana cellulare. La proteina più importante durante il processo di traslocazione e che favorisce l'attivazione del processo di fusione è AS160 (Giorgino, 2008). Questo processo di fusione (docking) avviene grazie all'avvicinamento e al contatto delle vescicole con la membrana. Il docking consiste nell'assemblaggio del complesso SNARE che è in grado di agganciare e "tirare" le vescicole avvicinandole alla membrana e, in seguito al contatto tra le due entità, catalizzare la fusione e il rilascio del GLUT4 con la sua traslocazione sulla membrana cellulare (Tokarz et al., 2018).

A questo punto, il trasportatore sarà in grado di legare il glucosio e trasportarlo all'interno della cellula.

In alcune tipologie cellulari l'insulina è in grado di stimolare e regolare la proliferazione cellulare (effetto mitogeno) mediante l'attivazione di un pathway differente rispetto a quello descritto in precedenza. L'insulina agisce come un growth factor, sebbene la sua attività sia considerata più debole rispetto a quella di IGF-1 (Chung Le et al., 2023). L'azione procede mediante l'attivazione della proteina Ras e la stimolazione della via delle MAP chinasi (**Figura 5**). La fosforilazione delle MAP chinasi è il fattore chiave in grado di promuovere la crescita e la divisione cellulare, e in grado di mediare l'attività migratoria e apoptotica delle cellule (Chung Le et al., 2023). Questo effetto potrebbe essere correlato ad alcuni effetti collaterali a lungo termine della terapia insulinica.

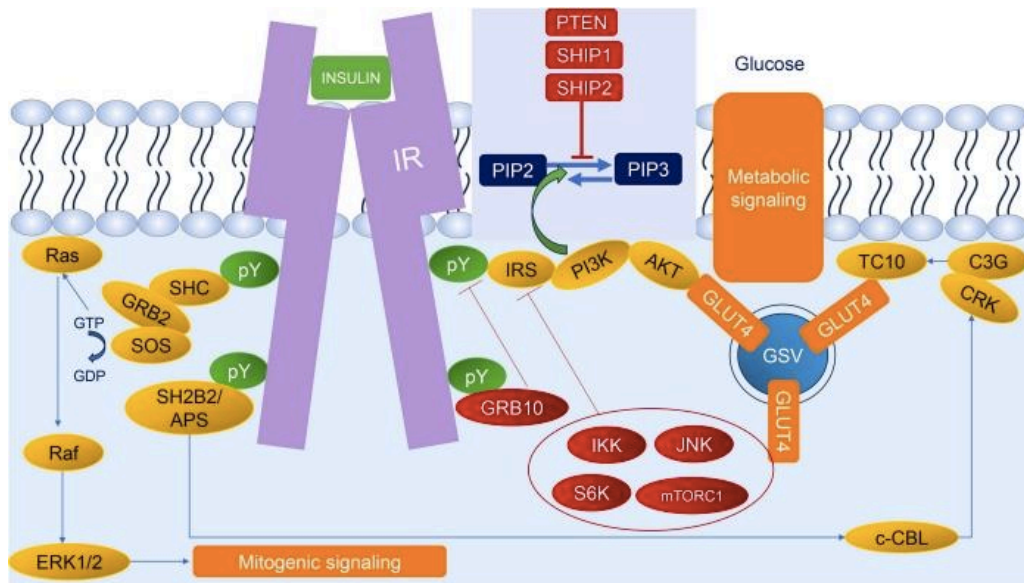


Figura 5: Attivazione della via delle MAP chinasi con effetto mitogeno (da Chung Le et al., 2023)

Paragrafo 1.5. Gli effetti dell'insulina sull'organismo

Una volta che l'insulina attiva il suo recettore IR e catalizza la traslocazione dei trasportatori GLUT4 inizia la vera e propria attività ipoglicemizzante. Gli elevati valori di glucosio nel torrente circolatorio scendono abbastanza rapidamente grazie al trasporto intracellulare del monosaccaride. I GLUT4, presenti in tutti i tessuti insulino-sensibili, trasportano il glucosio all'interno della cellula diminuendone così la concentrazione nel torrente ematico. Una volta all'interno della cellula esso potrà prendere parte ad una serie di vie metaboliche che saranno diverse in base al tipo di tessuto in cui l'insulina agirà.

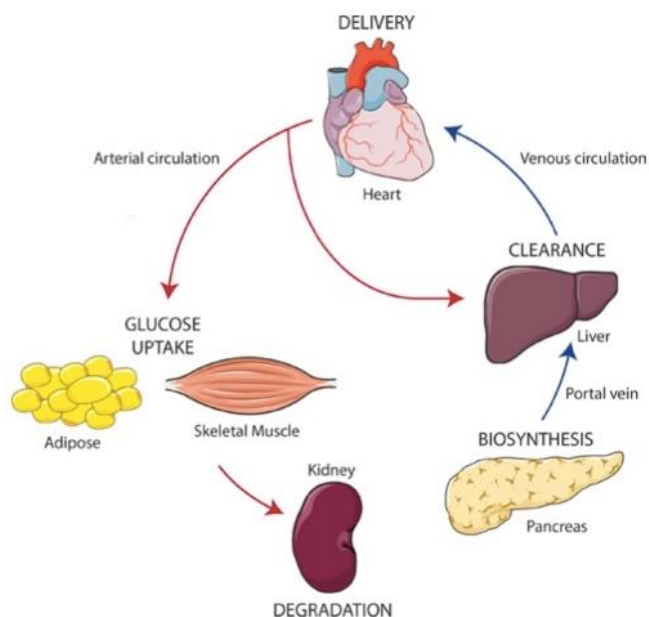


Figura 6: La distribuzione dell'insulina all'interno dell'organismo (Tokarz et al., 2018)

Come è possibile osservare nella **Figura 6**, l'insulina è in grado di stimolare l'assorbimento di glucosio all'interno delle cellule del tessuto adiposo, muscolare ed epatico. Inoltre come riportato in numerosi studi, l'insulina promuove un'importante attività vasodilatatoria (Norton et al., 2022).

In seguito alla stimolazione da parte dell'insulina, l'assorbimento di glucosio nel tessuto muscolare aumenta di circa dieci volte rispetto ai valori normali. È possibile stimare che, in seguito ad un pasto, la muscolatura scheletrica contribuisca all'uptake di circa il 60-70% del glucosio assorbito a livello intestinale (Norton et al., 2022). Una volta all'interno delle fibre muscolari il glucosio potrà intraprendere due vie metaboliche: una via anabolica e una via catabolica.

La via catabolica della glicolisi permette di degradare il glucosio a piruvato. Il piruvato entra nel ciclo di Krebs e contribuisce alla produzione di ATP mediante la respirazione cellulare e la fosforilazione ossidativa.

La via anabolica invece permette al glucosio di essere immagazzinato all'interno della cellula sotto forma di un polisaccaride di riserva, il glicogeno, grazie all'attività della glicogeno-sintetasi. L'attività della glicogeno-sintetasi è inibita dalla proteina GSK-3 che a sua volta è regolata dalla proteina Akt. In condizioni

di iperglicemia, l'insulina attiva Akt che andrà a fosforilare, inattivandola, GSK-3. La glicogeno-sintetasi verrà quindi sollevata dal controllo inibitorio mediato da GSK3 permettendole di sintetizzare il glicogeno. In condizioni di digiuno e di bassi livelli glicemici nel sangue sarà invece indotta l'attività opposta. (Norton et al., 2022).

Nel tessuto adiposo l'attività principale dell'insulina consiste nella stimolazione della lipogenesi. In condizioni di iperglicemia, l'insulina promuove l'internalizzazione del glucosio all'interno degli adipociti grazie all'esposizione dei GLUT 4 e attiva la produzione di acidi grassi e trigliceridi. Un elemento molto importante riguarda la cinetica di trasporto che influenza poi il fenomeno di lipogenesi a livello del tessuto adiposo. Esiste una differenza nella velocità di trasporto tra gli adipociti precursori viscerali e gli adipociti sottocutanei. Gli adipociti viscerali mostrano una risposta all'insulina più marcata e transitoria rispetto a quella degli adipociti sottocutanei (Giorgino, 2008).

Un'ulteriore importante attività dell'insulina è esercitata a livello epatico. Gli epatociti vengono coinvolti nel metabolismo del glucosio grazie alla loro sensibilità all'azione dell'insulina. In seguito all'attivazione del recettore IR e della via PI3K/Akt viene inibita la via catabolica del glicogeno, quindi la glicogenolisi, e viene attivata la glicogeno-sintesi. L'insulina è in grado di bloccare la gluconeogenesi, ovvero la sintesi di glucosio de novo, stimolando inoltre la traslocazione dei GLUT 4 con aumento della sua captazione dal torrente ematico (Norton et al., 2022). L'attività di lipogenesi risulta stimolata, oltre che nel tessuto adiposo, anche a livello epatico.

In molti studi è descritto come l'insulina sia in grado di agire a livello della muscolatura liscia vascolare (Tokarz et al., 2018). La presenza dei recettori IR per l'insulina a livello vasale attiva il pathway PI3K/Akt che è associato a produzione e rilascio dell'ossido nitrico. L'ossido nitrico è un importante neuromodulatore e un regolatore chiave dell'attività endoteliale e vasale. La sua attività a livello della guanilato ciclastasi solubile determina un aumento di cGMP con attivazione di una proteina chinasi GMP-dipendente (PKG) che, fosforilando e inattivando la chinasi della catena leggera della miosina, induce vasodilatazione e più in generale rilasciamento delle cellule della muscolatura

liscia (Norton et al., 2022). Questa attività vasodilatante è funzionale ad un aumento dell'afflusso (e dell'uptake) di glucosio alla muscolatura scheletrica.

CAPITOLO 2

L'insulina come farmaco

Storicamente, il primo farmaco antidiabetico è stato l'insulina. Inizialmente, la terapia si basava sulla somministrazione di estratti pancreatici. Solo dal 1980 è stato possibile somministrare l'insulina ottenuta con la tecnologia del DNA ricombinante. L'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare ha quindi permesso di ottenere insuline strutturalmente diverse, utilizzabili secondo diversi protocolli e timing terapeutici, fino ad arrivare all'ultimo analogo dell'insulina autorizzato al commercio, la cosiddetta insulina "settimanale" ovvero l'insulina Icodec, oggetto della presente tesi.

Paragrafo 2.1. La storia del farmaco e i suoi primi utilizzi

Questo primo secolo di terapia insulinica è stato contraddistinto da una costante ricerca volta al miglioramento delle caratteristiche farmacocinetiche della molecola ed è stato costellato da una serie di importanti traguardi.

In seguito alla scoperta dell'ormone nel 1922, il primo passo importante fu compiuto dalla casa farmaceutica Eli Lilly, la quale sempre nello stesso anno ottenne il brevetto per la produzione e la distribuzione ospedaliera del farmaco. A causa delle inevitabili fluttuazioni della glicemia dovute alla somministrazione di questo tipo di insulina regolare, che ha una durata d'azione di circa sei ore, venne introdotto nel 1980 un nuovo protocollo terapeutico, definito bolo-basale, per mimare più fedelmente il pattern di secrezione endogena. Questo protocollo, infatti, consiste nella somministrazione dell'insulina regolare dopo i pasti e di un'insulina lenta per stabilizzare i livelli ematici di glucosio in condizioni basali (Falcetta et al., 2021).

Da questo momento in poi la ricerca di nuovi analoghi dell'insulina e di formulazioni innovative è diventata incalzante.

Grazie alla scoperta della sequenza amminoacidica nel 1955, è stato identificato il gene dell'insulina e grazie a questo, produrre la molecola mediante la tecnologia del DNA ricombinante.

Nel 1996, la Lilly introduce la prima insulina rapida da somministrare in concomitanza dei pasti, la Lispro, e successivamente un altro analogo ad azione rapida, la Glulisina.

Parallelamente alla ricerca di nuovi analoghi a breve durata d'azione, progredisce anche quella delle insuline lente. In seguito all'introduzione sul mercato dell'insulina NPH (regolare protaminata) nel 1950, nel 2001 viene introdotta l'insulina Glargine, nel 2005 la Detemir e nel 2015 la Degludec.

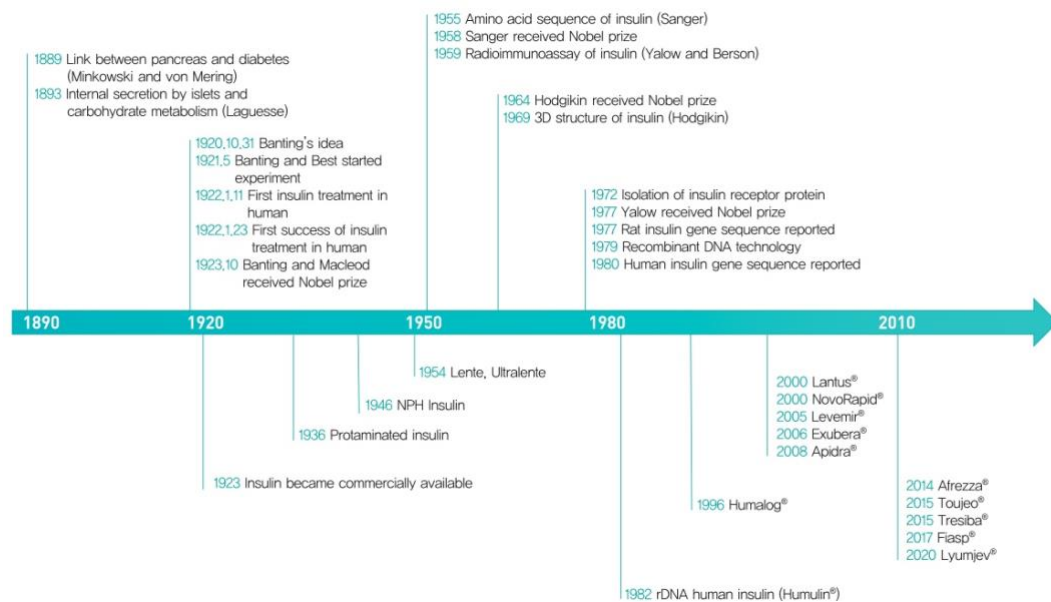


Figura 7: Timeline degli eventi più importanti (da Lee et al., 2021)

Paragrafo 2.2. Come si differenziano gli analoghi insulinici

Come accennato in precedenza e come sarà descritto nel capitolo successivo, l'approccio terapeutico al diabete si fonda sulla somministrazione di insuline che agiscono rapidamente e che hanno breve durata d'azione (insuline rapide o ultrarapide) ed insuline che agiscono lentamente e hanno durata d'azione prolungata (insuline lente o ultralente).

Come è stato possibile ottenere insuline con diversa durata d'azione?

Premesso che tutte le insuline agiscono attraverso lo stesso meccanismo e non mostrano diverse cinetiche di interazione con il recettore, appare chiaro che la principale differenza tra le diverse insuline sta nella loro farmacocinetica, principalmente nella fase di assorbimento e di distribuzione. Il comportamento dei diversi analoghi dell'insulina nei parenchimi è in funzione della struttura amminoacidica opportunamente modificata e della formulazione. In soluzione, l'insulina è in grado di formare degli aggregati creando degli esameri stabilizzati dalla presenza dello ione Zn^{2+} .

Grazie all'aggiunta di composti fenolici o di protamina alla formulazione è stato quindi possibile ottenere insuline con durata d'azione prolungata. Anche le modifiche strutturali che determinano sostituzione o aggiunta di residui amminoacidici alla struttura primaria del peptide sono state pensate per alterare la velocità di disaggregazione dell'esamero.

In seguito alla somministrazione sottocutanea, l'insulina diffonde nel parenchima e attraversa i capillari per raggiungere il torrente circolatorio. La velocità di diffusione, che dipende dalla formulazione e dalla struttura, rappresenta quindi la variabile in grado di influenzare la durata d'azione.

Grazie alla tendenza delle strutture insuliniche ad auto-aggregarsi è possibile creare dei farmaci con diverse durate d'azione. Le insuline rapide possiedono una capacità di aggregazione inferiore, quindi una maggiore velocità di diffusione attraverso i tessuti. Al contrario, le insuline modificate o formulate in modo da stabilizzare la struttura esamerica, avranno un comportamento opposto.

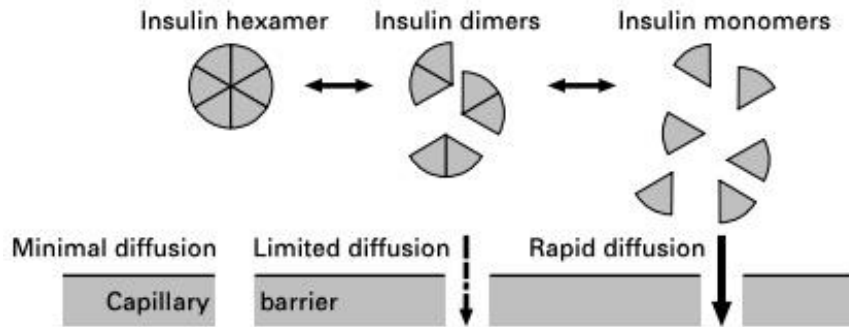


Figura 8: La diffusione dell'insulina (da Holleman et al., 1997)

Le insuline sono dunque classificate sulla base della durata d'azione : le insuline rapide, tra le quali si annovera l'insulina regolare, ed ultra-rapide, le insuline lente e ultra-lente, tra cui l'insulina a somministrazione settimanale ovvero Icodec.

Paragrafo 2.3. Le insuline rapide e ultra-rapide

Le insuline rapide e ultra-rapide sono utilizzate nel controllo della glicemia postprandiale. Sono analoghi dell'insulina endogena ottenuti per introduzione di varianti strutturali che sfavoriscono la cosiddetta auto-associazione, ovvero favoriscono la dissoluzione dell'insulina velocizzandone così l'assorbimento. Sono farmaci che si contraddistinguono per la loro rapida insorgenza e breve durata d'azione.

Le insuline rapide possono essere ulteriormente classificate in relazione alla loro durata d'azione: l'insulina regolare, classificata come rapida, e le insuline Lispro, Aspart, Glulisina e Fiasp® (Faster Insulin Aspart), classificate come ultra-rapide.

2.3.1. *L'insulina regolare*

L'insulina regolare ha la stessa struttura dell'insulina endogena umana ed è formulata in soluzione acquosa e a pH neutro, per favorirne la dimerizzazione. In presenza di ioni Zn^{2+} , tre dimeri si aggregano per formare la struttura ad esamero rallentando in questo modo la velocità di dissoluzione, di diffusione ai tessuti e, conseguentemente, l'insorgenza degli effetti biologici. La struttura è ulteriormente stabilizzata dalla aggiunta di fenolo (normalmente 3-metil-fenolo o m-cresolo), accomodato in una tasca idrofobica creata nell'interfaccia tra due monomeri all'interno dell'esamero.

Questo farmaco viene prodotto e commercializzato come specialità medicinale con il nome di Actrapid® dalla casa farmaceutica Novo Nordisk, e con il nome di Humulin R® dalla casa farmaceutica Eli Lilly.

Per quanto riguarda la somministrazione, si utilizzano delle penne con aghi ipodermici per iniezione sottocutanea. L'insulina regolare è l'unica insulina somministrabile anche per via endovenosa e inalatoria (specialità non disponibile in Italia).

In seguito alla somministrazione sottocutanea, l'insulina regolare presenta un tempo d'insorgenza d'azione che si aggira intorno ai trenta-sessanta minuti, un picco d'azione dopo due-tre ore e una durata d'azione che va dalle cinque alle otto ore.

Deve essere pertanto somministrata mezz'ora prima del pasto, e proprio per questa ragione non è sempre possibile regolarne il dosaggio sulla base dell'effettivo introito calorico. Parimenti, il prolungamento dell'effetto oltre la durata del pasto e del picco glicemico può favorire la comparsa di ipoglicemia. Pertanto, l'insulina regolare che per molti anni è stato l'unico farmaco a disposizione per il DMT1, non permette un controllo ottimale della glicemia soprattutto se si considerano le variazioni di emoglobina glicata (HbA_{1C}) come parametro.

Per migliorare il controllo glicemico postprandiale sono stati sviluppati quindi analoghi insulinici a più breve durata d'azione.

2.3.2. Le insuline Lispro, Aspart e Glulisina

Il primo analogo dell'insulina è stato approvato nel 1996. Si tratta dell'insulina Lispro, commercializzata da Eli Lilly come Humalog®.

La caratteristica peculiare di quest'insulina rapida, oltre ad essere stato il primo analogo insulinico modificato approvato dalle agenzie internazionali, è quello di essere stata ottenuta attraverso una semplice modifica della catena B, ovvero l'inversione dei due residui in posizione 28 e 29. Nella catena B dell'insulina fisiologica sono presenti un residuo amminoacidico di Prolina in posizione 28 (ProB28) e un residuo amminoacidico di Lisina in posizione 29 (LysB29). Questi due aminoacidi hanno una posizione invertita nella struttura dell'insulina Lispro (**Figura 9**).

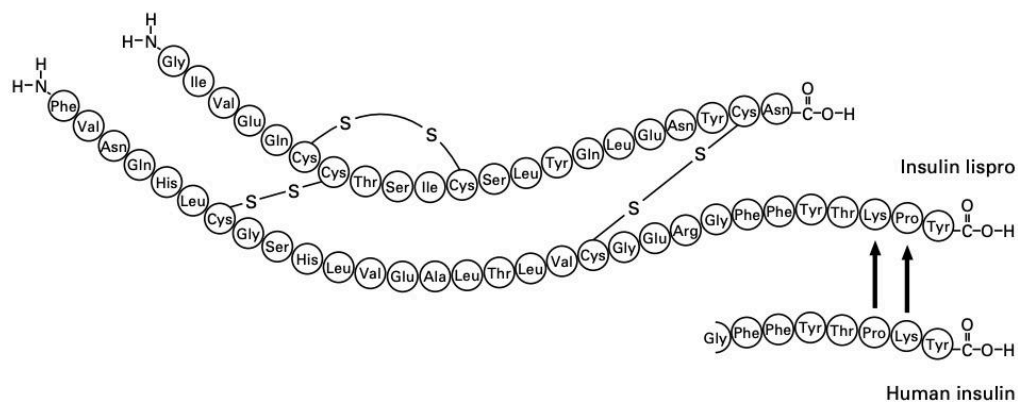


Figura 9: La struttura dell'insulina Lispro (da Holleman et al., 1997)

Questo scambio nella porzione terminale della catena B ostacola stericamente la capacità dell'insulina di aggregarsi, bloccando così il fenomeno di auto-associazione.

Rispetto all'insulina regolare, la Lispro mostra una diminuzione all'aggregazione di circa trecento volte (Holleman et al., 1997). Questo si traduce in una variazione delle proprietà farmacocinetiche (**Figura 10**), in particolare un inizio d'azione in quindici-trenta minuti, un picco a sessanta minuti e una durata dalle due alle quattro ore.

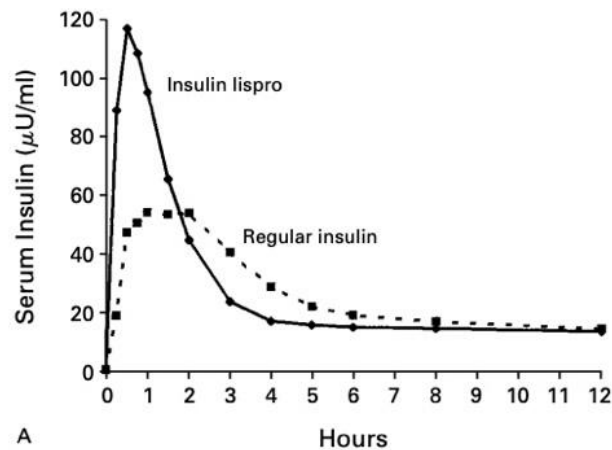


Figura 10: Confronto delle concentrazioni di insulina Lispro e regolare nel tempo in seguito a somministrazione sottocutanea (da Holleman et al., 1997)

L'insulina Aspart è un altro analogo ricombinante dell'insulina umana commercializzata da Novo Nordisk come Novorapid® o Novolog®. Anch'essa è stata ottenuta per una modifica del residuo amminoacidico in posizione 28 della catena B. Al posto della Prolina (ProB28) viene inserito un residuo di Acido Aspartico (AspB28) donando così una carica negativa (**Figura 11**). La presenza delle cariche negative determina, in fase di auto-associazione, la formazione di forze repulsive di natura elettrostatica tali da impedire l'avvicinamento tra i monomeri. Conseguentemente, aumenta la velocità di diffusione attraverso i tessuti e di assorbimento in seguito alla sua somministrazione.

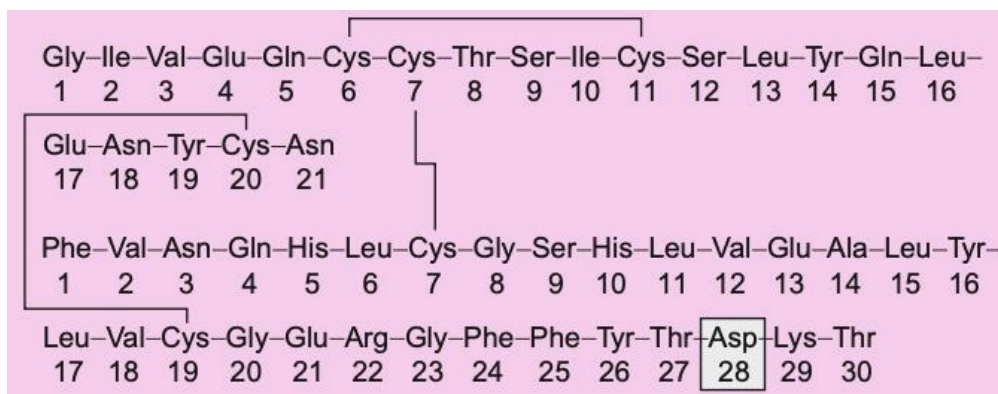


Figura 11: La struttura dell'insulina Aspart (da Simpson et al., 1999)

Sebbene possieda un meccanismo di inibizione dell'auto-associazione differente rispetto alla Lispro, l'insulina Aspart mostra un profilo farmacocinetico pressochè sovrapponibile (Simpson et al., 1999).

L'ultimo analogo ultra-rapido disponibile è l'insulina Glulisina commercializzata da Sanofi come Apidra®.

La Glulisina è stata ottenuta grazie all'introduzione di due modifiche nella catena B dell'insulina umana. In posizione B3 il residuo amminoacidico di Asparagina (AsnB3) presente nell'insulina regolare è stato sostituito con un residuo di Lisina (LysB3). Allo stesso modo in posizione B29 il residuo amminoacidico di Lisina (LysB29) è stato sostituito con un residuo di Acido Glutammico (GluB29) (**Figura 12**) (Garnock-Jones et al., 2009).

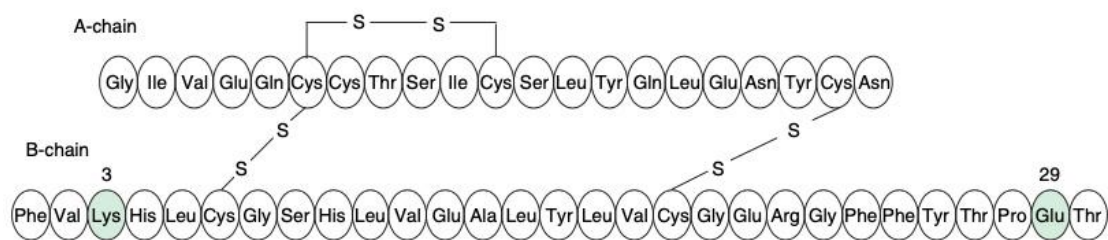


Figura 12: La struttura dell'insulina Glulisina (da Garnock-Jones et al., 2009)

Ciò che permette di differenziare l'insulina Glulisina dalle altre due insuline ultra-rapide è la formulazione in assenza di ioni Zn^{2+} , che dovrebbe prevenire qualsiasi associazione in esameri. A differenza di queste due insuline, la Glulisina presenta il polisorbato 20 come eccipiente.

2.3.3. L'insulina *Faster Insulin Aspart*

Questo tipo di insulina ultra-rapida rappresenta una nuova formulazione dell'insulina Aspart, nel tentativo di mimare o avvicinarsi alle cinetiche del rilascio fisiologico di insulina endogena, grazie al suo rapido assorbimento dopo somministrazione sottocutanea. Questa insulina denominata FIASP® (acronimo

di Faster Insulin Aspart) da Novo Nordisk è stata commercializzata per la prima volta negli Stati Uniti nel 2017.

La peculiarità principale di quest'insulina è la sua formulazione. Si tratta infatti di un'insulina Aspart standard formulata con arginina e nicotinammide. L'arginina consente di stabilizzare la formulazione impedendo la formazione di aggregati. La nicotinammide promuove il trasporto trans-epiteliale e stimola la vasodilatazione. La vasodilatazione consente l'aumento del flusso ematico in corrispondenza del sito d'iniezione con aumento dell'assorbimento dei monomeri nel torrente circolatorio (Davis et al., 2018).

La FIASP® permette di abbassare a cinque minuti il tempo di insorgenza dell'effetto e di ottenere un picco d'attività entro i sessanta minuti dalla somministrazione.

Come è possibile notare dal grafico in **Figura 13**, la FIASP® presenta un picco d'attività che si avvicina temporalmente a quello dell'insulina endogena secreta fisiologicamente dal pancreas. L'insulina regolare raggiunge il picco della sua attività più tardivamente rispetto alla FIASP®.

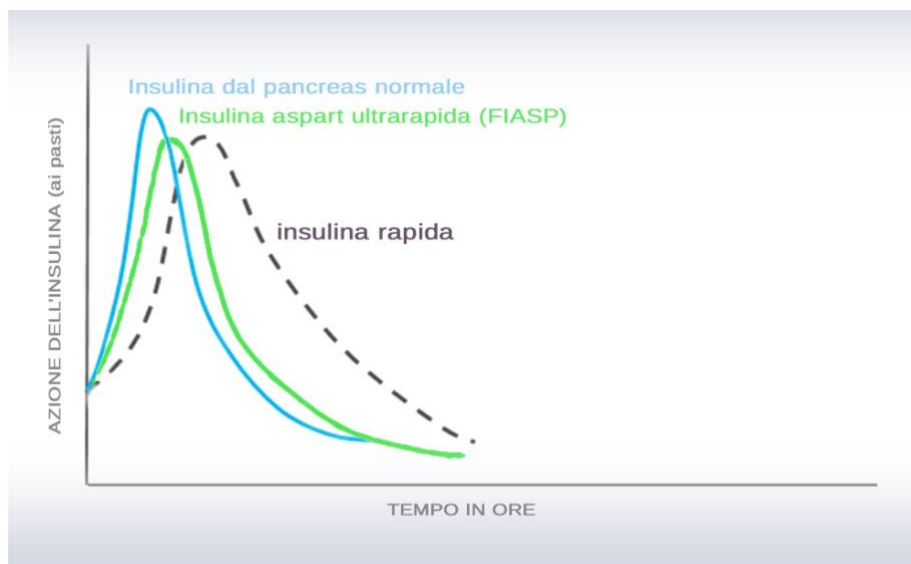


Figura 13: Confronto delle curve d'azione dell'insulina rapida, ultra-rapida (FIASP®) ed endogena, in funzione del tempo (da Tomassetti et al, 2017)

Paragrafo 2.4. Le insuline lente

Le insuline lente sono farmaci biotecnologici somministrati allo scopo di mimare il rilascio endogeno basale di insulina da parte del pancreas.

Sono analoghi dell'insulina ottenuti attraverso modifiche strutturali e formulative che conferiscono un'aumentata capacità di auto-associazione, ovvero favoriscono l'aggregazione dei monomeri di insulina con la formazione di strutture esameriche stabili. Un aumento della stabilità dell'aggregato comporta una diminuzione della velocità di dissociazione con rallentamento dell'assorbimento e successivamente della distribuzione agli organi bersaglio.

Sono farmaci che si contraddistinguono per il loro lento rilascio, per la loro lenta attività e per la lunga durata d'azione.

Le insuline lente possono essere ulteriormente classificate in relazione alla durata d'azione in insuline intermedie, lente, ultra-lente e settimanali.

2.4.1. Le insuline NPH e NPL

Nel 1950, in Canada e negli Stati Uniti è stata commercializzata una nuova preparazione a base di insulina chiamata "insulina NPH" (Neutral Protamine Hagedorn). Si tratta dell'insulina regolare formulata con Zn^{2+} e protamina in tampone fosfato che è in grado di mantenere la sua attività farmacologica per un tempo significativamente superiore a quello dell'insulina regolare.

Quest'insulina si presenta come una sospensione lattiginosa. Lo Zn^{2+} consente l'aggregazione dei monomeri insulinici in esameri e la protamina è in grado di farli precipitare con la formazione di cristalli, rallentando in questo modo disgregazione, diffusione e assorbimento (Jamieson et al., 1951).

La sua durata d'azione varia dalle 10 alle 16 ore, quindi è di norma somministrata due volte al giorno, anche in combinazione ad un'insulina rapida.

La stessa strategia formulativa è stata recentemente applicata alla Lispro, portando alla produzione di un altro tipo di insulina protaminata, ovvero la NPL

(Neutral Protamine LisPro). L'insulina Lispro, un'insulina a breve durata d'azione, in formulazione con la protamina ha una durata d'azione intermedia molto simile a quella dell'insulina NPH, ovvero 15-16 ore.

Questo tipo di insuline possiedono due svantaggi: il primo è rappresentato dalla durata intermedia, che molte volte obbliga ad una doppia somministrazione giornaliera per mimare il controllo basale della glicemia, il secondo è invece rappresentato dalla forma farmaceutica, una sospensione, che può avere un assorbimento variabile. Il vantaggio è la loro compatibilità fisica con le insuline rapide, che ne permette la combinazione come insuline pre-miscelate.

2.4.2. Le insuline Glargine e Determir

L'insulina Glargine è un analogo dell'insulina a lunga durata d'azione ed è commercializzata da Sanofi come Lantus® alla concentrazione di 100U/ml e come Toujeo® alla concentrazione di 300U/ml.

La sua durata d'azione si aggira intorno alle ventiquattro ore grazie alle modifiche strutturali apportate alla catena amminoacidica. Nell'insulina Glargine il residuo di asparagina in posizione 21 della catena A (AsnA21) è stato sostituito da un residuo di glicina, e alla treonina in posizione 30 della catena B sono stati aggiunti due residui di arginina (ArgB31, ArgB32) (Figura 14).

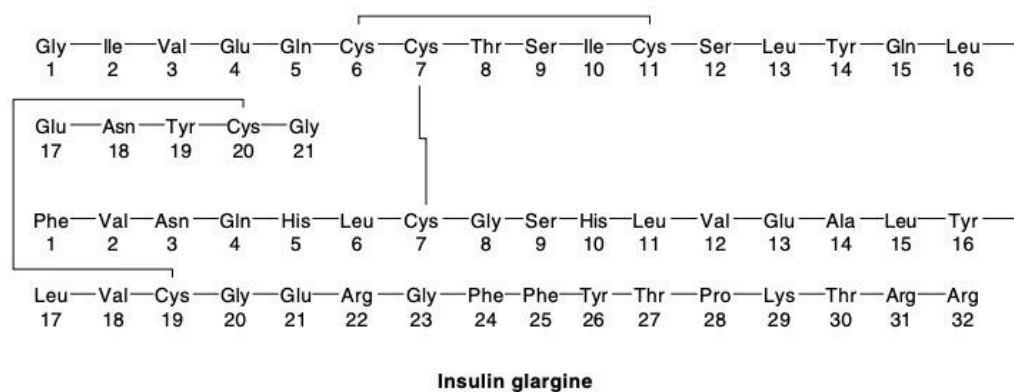


Figura 14: La struttura dell'insulina Glargine (da Dunn et al., 2003)

Queste modifiche hanno permesso di ottenere un valore di punto isoelettrico che si avvicina a sette (6.7), più alto di quello dell'insulina umana nativa (5.4). Glargine si solubilizza meglio in condizioni acide e pertanto è formulata a pH 4. Ad ogni millilitro di insulina a pH 4 vengono addizionati circa 30 mg di Zn^{2+} , fondamentale per la formazione della struttura esamerica. Una volta somministrata, l'insulina incontra un ambiente neutro a livello dei tessuti sottocutanei, andando così incontro a precipitazione e, grazie alla presenza dello ione, formando dei micro-cristalli amorfi. Questi cristalli sono in grado di cedere i monomeri di insulina abbastanza lentamente, fungendo in questo modo da riserva per le ventiquattro ore successive (Dunn et al., 2003).

Il suo lento rilascio e la sua lunga durata d'azione permettono di simulare il rilascio basale dell'insulina endogena minimizzando i rischi di ipoglicemia. Glargine deve essere somministrata una volta al giorno, e sempre alla stessa ora. In vitro, l'insulina Glargine ha mostrato una maggiore capacità di stimolare il recettore dell'insulin growth factor 1 (IGF-1) rispetto all'insulina nativa, inducendo un effetto mitogeno potenzialmente associato ad una attività tumorigena. Gli studi di coorte in vivo, comunque, non sembrano confermare questa ipotesi (Dunn et al., 2003).

L'insulina Detemir è un altro analogo insulinico a lunga durata d'azione prodotto e commercializzato da Novo Nordisk con il nome Levemir®. Strutturalmente, l'insulina Detemir differisce dall'insulina endogena per la rimozione del residuo di treonina in posizione 30 della catena B (ThrB30) e per l'attacco di una catena di acido miristico, un acido grasso a quattordici atomi di carbonio (C14), alla lisina in posizione 29 (LysB29) (**Figura 15**). Queste modifiche hanno un doppio effetto: innanzitutto facilitano l'associazione in di-esameri ritardando la dissociazione e l'assorbimento a livello tissutale. Inoltre, e cosa più importante, la catena di acido miristico aumenta l'affinità dei monomeri, dimeri ed esameri dell'insulina nei confronti dell'albumina plasmatica e tissutale, dai quali viene lentamente rilasciata (Soran et al., 2006).

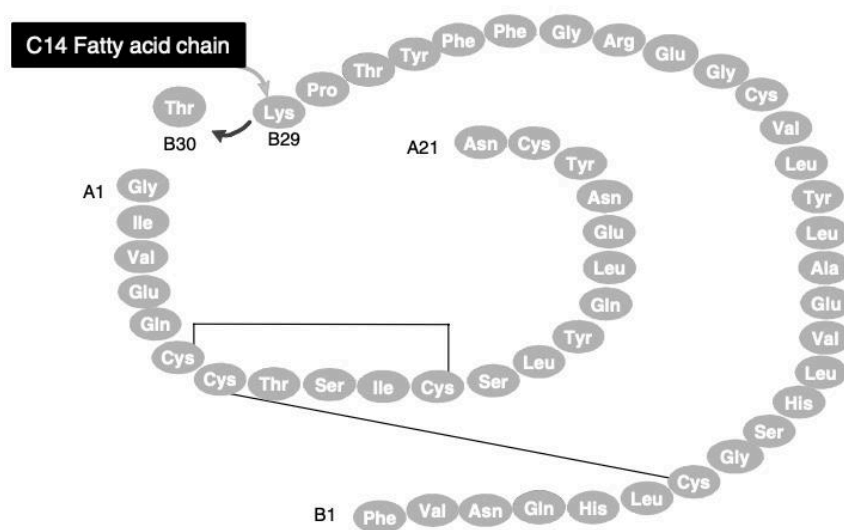


Figura 15: La struttura dell'insulina Detemir (da Soran et al., 2006)

L'insulina Detemir ha una durata d'azione variabile tra le otto e le ventiquattro ore, anche in relazione alla dose somministrata. Per questo motivo, può essere somministrata una o due volte a giorno.

2.4.3. L'insulina Degludec

L'insulina Degludec rappresenta un'evoluzione dell'insulina Detemir ed è commercializzata da Sanofi come specialità medicinale Tresiba®. Come per l'insulina Detemir, nella Degludec è stata rimossa la ThrB30 ed è stata acilata la LysB29. Tuttavia, la catena laterale aggiunta è molto più voluminosa, essendo costituita dall'acido esadecandioico (C16) e da un linker di γ -L-acido glutammico.

La formulazione avviene in presenza di fenolo e di Zn^{2+} , la cui attività è fondamentale per consentire l'associazione iniziale in strutture di-esameriche. Come rappresentato in **Figura 16**, una volta iniettata nel tessuto sottocutaneo, il fenolo dissocia dalla struttura di-esamerica e gli esameri iniziano ad aggregarsi in strutture multi-esameriche che fungono da riserva per il farmaco. La diffusione successiva dello ione Zn^{2+} porta infine alla lenta dissociazione degli esameri in dimeri e monomeri che diffondono nei tessuti e vengono assorbiti nel torrente circolatorio (Vora et al., 2015).

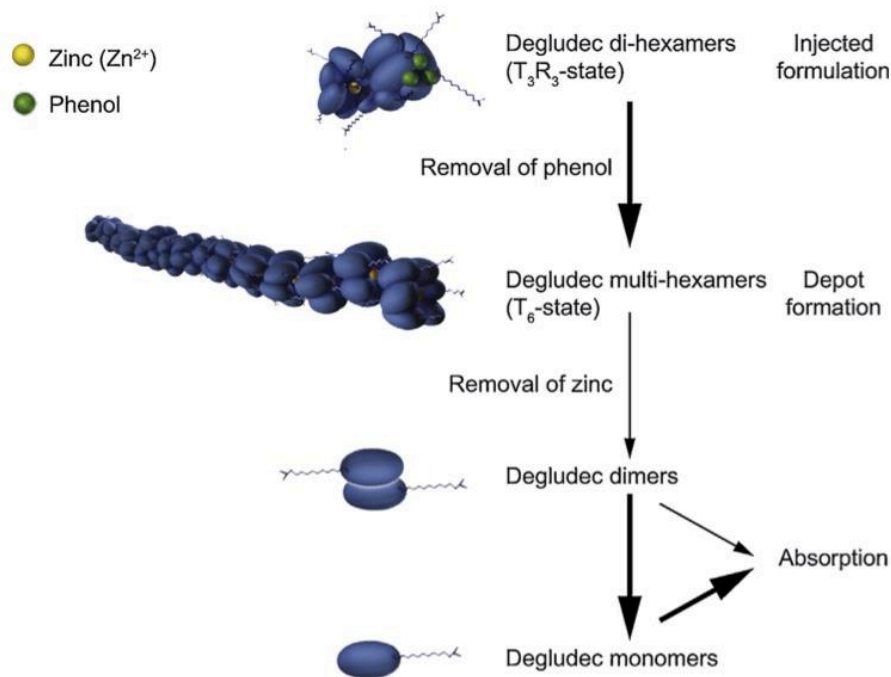


Figura 16: Rappresentazione schematica della modalità di assorbimento dell'insulina Degludec (da Vora et al., 2015)

Inoltre, grazie alla catena alifatica da sedici atomi di carbonio, l'analogo Degludec possiede la capacità di legare in maniera reversibile l'albumina plasmatica per quasi il novantanove percento della sua concentrazione plasmatica.

Attraverso queste modifiche, è stata ottenuta una preparazione che rilascia il farmaco in maniera costante, senza picchi, con una durata d'azione fin oltre le quarantadue ore. Attraverso la mono-somministrazione giornaliera, lo steady state viene raggiunto in due o tre giorni dalla prima somministrazione.

I vantaggi di questa insulina sono diversi. Innanzitutto, la flessibilità di somministrazione in quanto, vista la lunga durata d'azione, non è necessaria la somministrazione alla stessa ora del giorno come per l'insulina Glargine ma la somministrazione può essere ritardata fino ad otto ore. Poi, grazie al rilascio costante e all'assenza di picco plasmatico, è stata riportata una minore incidenza di ipoglicemia notturna.

Paragrafo 2.6. Le insuline bifasiche

Le insuline bifasiche vengono denominate anche formulazioni miste o pre-miscelate data la loro composizione, a dosaggi fissi, di un'insulina rapida o ultra-rapida e di un'insulina intermedia o lenta. Questa combinazione consente di coprire con un'unica somministrazione i bisogni immediati (insulina prandiale) e quelli basali. La somministrazione delle insuline premiscelate avviene due volte al giorno circa un quarto d'ora prima dei pasti.

In commercio, esistono tre tipologie diverse di insuline bifasiche: Humulin Miscele[®] prodotta da Eli Lilly, Novolog Mix[®] prodotta da Novo Nordisk e Humalog Mix[®] prodotta anch'essa da Eli Lilly.

La Humulin Miscele[®] è composta per il settanta per cento dall'insulina NPH e per il trenta per cento dall'insulina regolare.

La Novolog Mix[®] è formata dal settanta per cento di insulina Aspart protaminata, con un meccanismo di cessione dei monomeri di insulina simile a quello dell'insulina NPH, e dal trenta per cento dall'insulina Aspart ultra-rapida.

La miscela Humalog Mix[®] è composta per il settanta per cento dall'insulina NPL, ovvero dall'insulina LisPro formulata con la protamina, e per il trenta per cento dall'insulina LisPro ultra-rapida.

È stata studiata anche una quarta formulazione bifasica, a base di insulina Degludec addizionata all'insulina Aspart ultra-rapida in rapporto 70:30. Nonostante ottimi risultati e un profilo farmacocinetico molto soddisfacente non risulta però ancora presente in commercio.

CAPITOLO 3

L'insulina Icodec

Paragrafo 3.1. L'insulina Icodec

L'introduzione sul mercato farmaceutico della nuova insulina Icodec promette di rivoluzionare gli approcci terapeutici al diabete mellito.

L'Icodec è un nuovo analogo insulinico, prodotto da Novo Nordisk e approvato per la prima volta in Svizzera il 7 marzo 2024 con il nome commerciale Awiqli[®], che ha la maggior durata d'azione tra tutte le insuline e che proprio grazie al suo elevato tempo di emivita viene somministrata settimanalmente.

La mono-somministrazione settimanale garantisce comunque tutti i benefici nel controllo glicemico precedentemente illustrati per le insuline a lunga durata d'azione.

Come affermato precedentemente, Icodec è stata approvata per il trattamento del DMT1 e DMT2 il 7 marzo 2024 in Svizzera. A questa prima approvazione sono seguite quelle del Canada (12 marzo 2024), dell'Unione Europea (17 maggio 2024), dell'Australia (17 maggio 2024) e del Giappone (24 giugno 2024). In tutti questi stati Icodec è approvata per il trattamento del DMT1 e del DMT2. Sulla base di alcuni trials clinici che analizzeremo dopo, la richiesta di approvazione alla commercializzazione dell'insulina Icodec negli Stati Uniti è stata rifiutata dalla FDA nella convinzione che i rischi di ipoglicemia nei pazienti DMT1 superino i benefici della somministrazione settimanale. La ragione è da attribuire all'insufficienza dei dati presenti per effettuare una valutazione completa sul rapporto rischio-beneficio (Aboutpharma, 2024).

In Cina, Awiqli[®] è stato approvato il 24 giugno 2024 esclusivamente per il trattamento del DMT2.

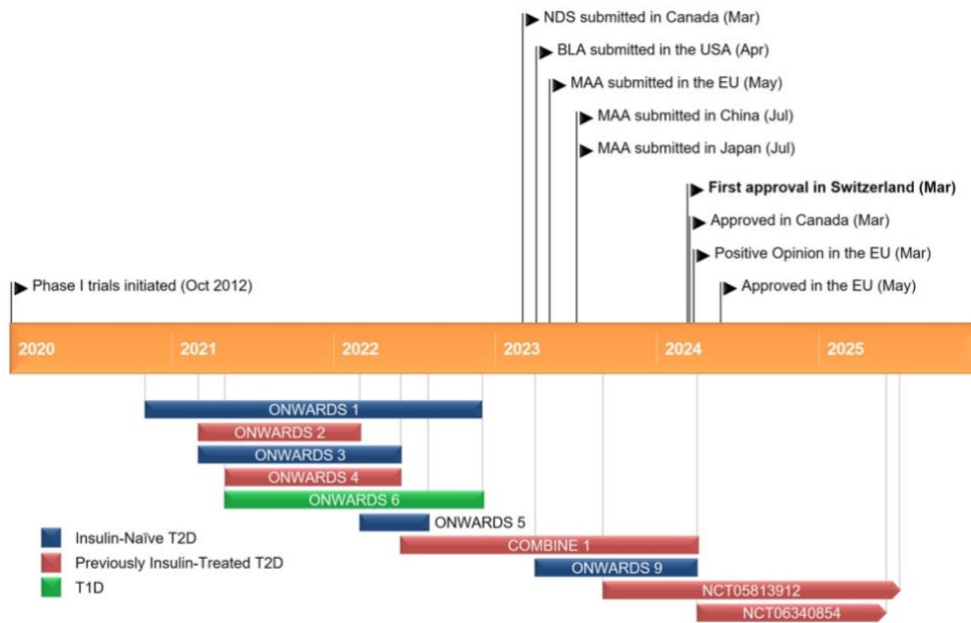


Figura 17: I traguardi chiave nello sviluppo dell'insulina Icodec (da Blair, 2024)

3.1.1. Come la struttura influenza la sua attività

L'ingegnerizzazione della molecola di insulina nativa che ha portato all'insulina Icodec è stata resa possibile mediante l'inserimento della sequenza genica del precursore all'interno del *Saccharomyces cerevisiae* (Nishimura et al., 2021).

A differenza delle altre insuline acilate, Detemir e Degludec, che in soluzione formano, rispettivamente, complessi di-esamERICI o multiesamERICI che fungono da depositi sottocutanei di farmaco, l'insulina Icodec è stata formulata in modo da evitare la formazione di depositi sottocutanei in quanto ciò avrebbe aumentato il rischio di immunogenicità o reazioni locali, considerata la somministrazione settimanale e quindi la lunga permanenza degli aggregati nella sede di iniezione. Invece Icodec è stata formulata in modo da assumere in soluzione una tipica struttura esamerica con limitata permanenza nel tessuto sottocutaneo. Strutturalmente, le modifiche presenti nell'insulina Icodec sono simili a quelle apportate nella Detemir e la Degludec. E' stata eliminata la treonina in posizione 30 della catena B (ThrB30) e la lisina in posizione 29 (LysB29) è stata coniugata ad una catena laterale dall'acido icosanedioico (20 C) attraverso una molecola di acido γ -glutammino e un piccolo linker di polietilenglicole (PEG) di natura idrofila. La presenza di questa catena laterale ha permesso di aumentare l'affinità

nei confronti dell'albumina plasmatica, una strategia adottata in natura per prolungare l'emivita di alcuni ormoni endogeni come TSH e GH

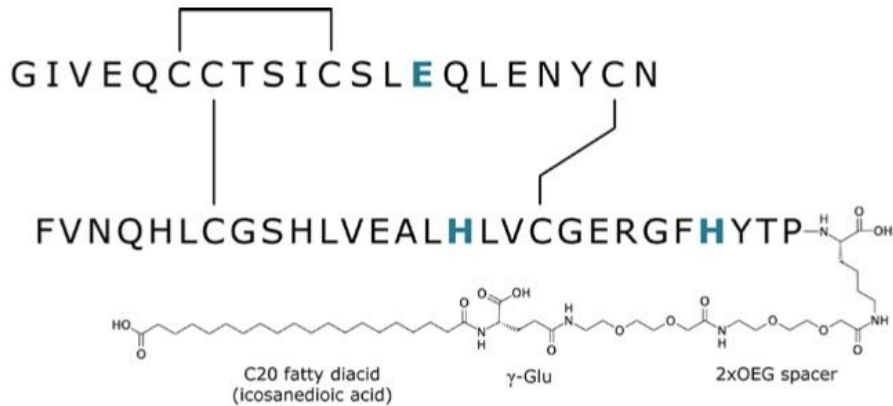


Figura 18: La struttura dell'insulina Icodec (da Nishimura et al., 2021)

In uno studio di comparazione con l'insulina Detemir è stato stimato che l'insulina Icodec possiede un'affinità circa dieci volte maggiore per il legame con l'albumina. Il legame ad alta affinità della Icodec all'albumina permette di ottenere una riserva di insulina circolante, riducendo così il numero di molecole disponibili per il legame con il recettore IR.

Il solo aumento dell'affinità di legame nei confronti dell'albumina non giustifica un tempo di emivita così elevato. Infatti, oltre alla presenza della catena laterale a venti atomi di carbonio, l'insulina Icodec presenta ulteriori modifiche a livello della sequenza amminoacidica. Come è osservabile nella **Figura 18**, il residuo di tirosina in posizione 14 della catena A (TyrA14) è stato sostituito con un residuo di acido glutammico (GluA14). Inoltre, il residuo di tirosina in posizione 16 della catena B (TyrB16) è stato sostituito con un residuo di istidina (HisB16/). Infine, il residuo di fenilalanina in posizione 25 della catena B (PheB25) è stato sostituito con un residuo di istidina (HisB25) (Blair, 2024). Queste modifiche alla struttura primaria della proteina hanno ridotto di circa 100 volte l'affinità della molecola nei confronti del recettore IR, specificatamente da 2.75×10^{-11} M (insulina umana) a 5.47×10^{-9} M (insulina icodec) (Nishimura et al., 2021). Ciascuna delle già menzionate sostituzioni contribuisce in maniera differente a questa riduzione di affinità: 80% la prima, 22% la seconda e del 30% terza

sostituzione rispetto all'insulina umana. La ridotta affinità per IR si traduce anche in una riduzione della clearance del peptide mediata proprio dal recettore IR, quindi in un aumento del tempo di emivita. Il fenomeno di clearance recettoriale, infatti, porta all'internalizzazione del recettore e del suo ligando, quindi alla sua degradazione citoplasmatica. Una ridotta affinità recettoriale non implica in nessun modo una ridotta potenza complessiva del farmaco, bensì permette al monomero di insulina di interagire più lentamente con la struttura recettoriale senza che venga rapidamente internalizzato e degradato.

All'aumento dell'emivita contribuisce infine anche la maggiore stabilità nei confronti della degradazione enzimatica non mediata da recettore causata dalle diverse modifiche strutturali.

Un aspetto da non sottovalutare è sicuramente quello relativo al volume di farmaco da somministrare per garantire un'attività costante nell'arco di sette giorni. Grazie alla sua struttura, l'insulina Icodec presenta un'elevata solubilità, tale da consentire a parità di volume con le altre insuline di raggiungere una maggiore concentrazione in soluzione (Nishimura et al., 2024). Quindi, mettendo a confronto l'insulina giornaliera Glargine 100U (Lantus) o l'insulina giornaliera Glargine 300U (Toujeo), a parità di volume iniettabile Icodec risulta essere più concentrata (700U).

Per quanto riguarda l'attività farmacodinamica, gli studi in vitro e in vivo hanno dimostrato come l'insulina Icodec possieda le stesse proprietà biologiche e farmacologiche dell'insulina nativa umana, a fronte però di una diversa affinità nei confronti del recettore e dell'albumina sierica (Nishimura et al., 2021).

Come ben visibile all'interno della **Tabella 1**, il rapporto del legame (IC_{50}) tra insulina Icodec e insulina umana in presenza dell'1,5% di albumina sierica umana (HSA) nel legame con IR (sia tipo A che tipo B) è approssimativamente dello 0,03%. Ciò sta ad indicare una minor affinità dell'insulina umana per HSA rispetto all'insulina Icodec, sottolineando ancora una volta l'elevata propensione dell'analogo settimanale di legare l'albumina plasmatica rispetto all'insulina endogena.

		IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	
Assay type	HSA (%)	Insulin Icodec	Human insulin	IC ₅₀ (%) Insulin Icodec relative to human insulin
Human IR-A binding	0	5.47 x 10 ⁻⁹	2.75 x 10 ⁻¹¹	0.50
	1.5	6.95 x 10 ⁻⁸	2.38 x 10 ⁻¹¹	0.03
Human IR-B binding	0	3.13 x 10 ⁻⁹	2.39 x 10 ⁻¹¹	0.78
	1.5	9.71 x 10 ⁻⁸	2.55 x 10 ⁻¹¹	0.03
Human IGF-1R binding	0	1.52 x 10 ⁻⁶	2.05 x 10 ⁻⁹	0.14

Tabella 1: Affinità di legame dell'insulina Icodec e dell'insulina umana per i due sottotipi del recettore dell'insulina (modificata da Nishimura et al., 2021)

		EC ₅₀ (M)	EC ₅₀ (M)	
Assay type	HSA (%)	Insulin Icodec	Human Insulin	EC ₅₀ (%) Insulin Icodec relative to human insulin
IR phosphorylation in CHO-hIR cells	0.1	1419	3.00	0.21
Pospho-ERK in CHO-hIR cells	0.1	271	1.02	0.39
Phospho-AKT in CHO-hIR cells	0.1	245	0.15	0.62

Tabella 2: Potenza dell'insulina Icodec e dell'insulina umana (modificata da Nishimura et al., 2021)

Osservando invece la **Figura 19**, è possibile osservare come l'efficacia agonista dell'insulina Icodec sia preservata rispetto a quella umana. Infatti, confrontando le curve di stimolazione della fosforilazione di Akt, marker dell'attività insulinica, è possibile osservare come entrambi i peptidi producano un effetto massimale. Tuttavia, la curva dell'insulina Icodec risulta traslata verso destra, indicando una evidente riduzione di potenza, specificatamente di 500 volte (**Tabella 2**). Ciò conferma le differenze in termini di affinità recettoriale dei due analoghi. Inoltre, bisogna tenere conto di come il legame con l'albumina, presente allo 0,1%, possa influenzare l'attività complessiva della Icodec modulando la quantità di insulina Icodec disponibile al legame con il recettore.

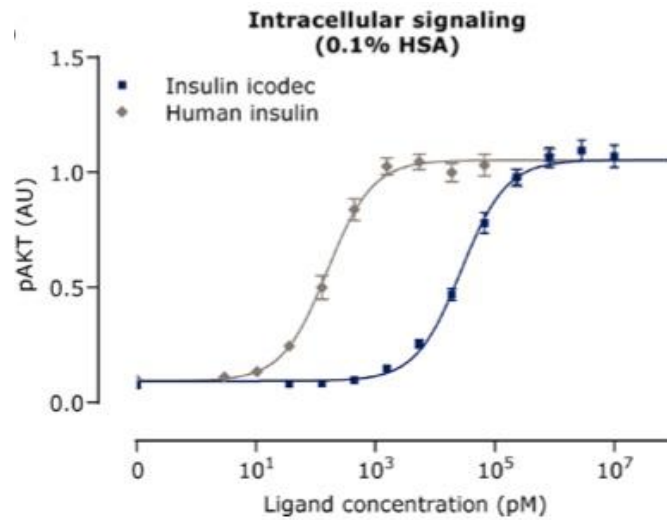


Figura 19: Intensità del segnale intracellulare, espresso come grado di fosforilazione di Akt, dopo stimolazione del recettore IR da parte di Icodec e insulina nativa umana (da Nishimura et al., 2021)

Gli studi in vitro e in vivo hanno interessato anche gli effetti metabolici e mitogeni dell'insulina Icodec.

L'analogo settimanale ha dimostrato, come ben visibile in **Figura 20**, di possedere lo stesso profilo e la stessa efficacia di regolazione dell'attività metabolica dell'insulina umana.

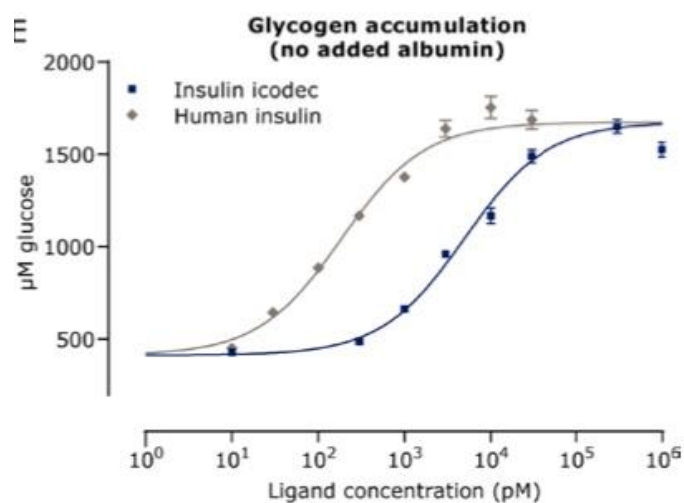


Figura 20: Effetti dell'insulina icodec e umana sull'accumulo di glicogeno (da Nishimura et al., 2021)

Dalle curve rappresentate in **Figura 20**, ottenute senza l'aggiunta di albumina, è possibile riscontrare come vi sia bisogno di una maggior concentrazione di insulina Icodec per raggiungere la stessa quantità di glicogeno accumulato all'interno della cellula. Questo ancora una volta a dimostrazione della minore affinità recettore.

Fin dai primi studi riguardanti l'insulina endogena si è visto come, oltre al già ben noto effetto metabolico, fosse presente un'importante regolazione della proliferazione cellulare (effetto mitogeno) dovuto alla stimolazione del recettore IR e di quello dell'IGF-1. Proprio per questo motivo durante l'introduzione di un nuovo analogo insulinico è importante studiare entrambi gli effetti e valutarne il rapporto di forza. La risposta mitogena dell'insulina Icodec è stata esaminata in vari tipi cellulari in grado di esprimere il recettore IR (cellule di tessuti insulino-sensibili).

		EC₅₀ (nM)	EC₅₀ (nM)	
	HSA (%)	Insulin Icodec	Human Insulin	EC₅₀ (%) Insulin Icodec relative to human insulin
Metabolic effects				
Glycogen synthesis in human MCF-7 cells	0	4863	12.2	0.26
Mitogenic effects				
DNA synthesis in human MCF-7 cells	0	625	2.8	0.5
DNA synthesis in human COLO-205 cells	0	73	1.4	2.0
DNA synthesis in human HMEC cells	0	1879	3.7	0.2

Tabella 3: EC₅₀ degli effetti metabolici e mitogeni relative all'insulina Icodec e all'insulina umana (modificata da Nishimura et al., 2021)

Osservando i valori di EC₅₀ relativi agli effetti metabolici e mitogeni delle due insuline presentati nella **Tabella 3** è possibile osservare come nonostante l'attesa

ed evidente riduzione di potenza, vi sia un equilibrio tra attività metabolica ed attività mitogena per l'analogo settimanale, con un rapporto tra le due sovrapponibile a quello dell'insulina umana.

3.1.2. Il profilo farmacocinetico

Il profilo farmacocinetico dell'insulina Icodec è il risultato di un importante lavoro di ingegnerizzazione della proteina che ha prodotto modifiche strutturali che allungano in maniera sostanziale la sua attività farmacologica, estendendola ad una settimana. L'elevata affinità per l'albumina plasmatica e la ridotta clearance recettoriale creano un effetto "a goccia" permettendo di ottenere un equilibrio tra una piccola quota di farmaco libero nel torrente circolatorio e una grande riserva di farmaco legato all'albumina.

L'effetto a goccia sopracitato si traduce in un lento e prolungato effetto di riduzione dei livelli di glucosio plasmatico.

Il raggiungimento dello stato stazionario avviene all'incirca dopo tre o quattro settimane dall'inizio della somministrazione settimanale di insulina (Blair, 2024), come mostrato in **Figura 21**.

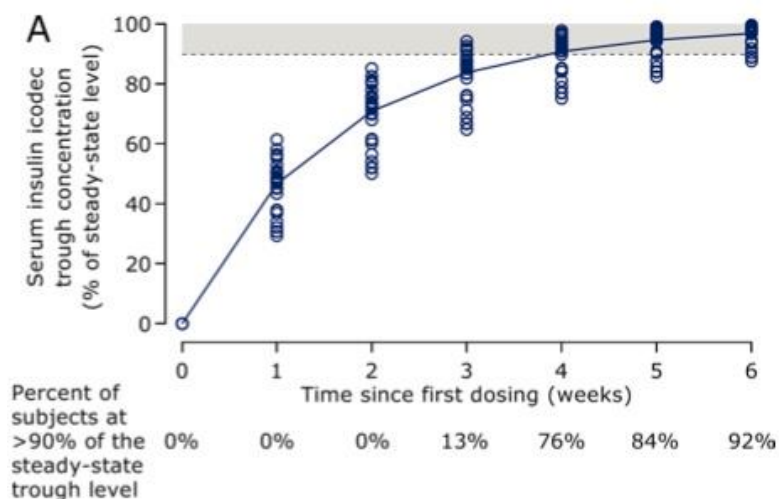


Figura 21: Modello della concentrazione sierica di insulina Icodec negli individui durante le prime 6 settimane dopo la prima somministrazione. La linea orizzontale al 90% indica il valore minimo di concentrazione necessario per il raggiungimento dello steady state. L'area in grigio rappresenta lo steady state (da Nishimura et al., 2021)

Come visibile nel grafico, lo stato stazionario è raggiunto quando le concentrazioni immediatamente antecedenti la somministrazione (trough concentrations) raggiungono il 90% dei loro livelli allo stato stazionario. Si può notare come, dopo tre settimane, solo il 13% degli individui ha raggiunto lo steady state, mentre dopo sei settimane la quasi la totalità degli individui ha raggiunto l'equilibrio. Allo stato stazionario, l'effetto ipoglicemizzante si mantiene costante per tutta la settimana di terapia, come è possibile evincere dalla **Figura 22** dove è mostrata la distribuzione giornaliera dell'effetto ipoglicemizzante espresso come percentuale dell'effetto totale settimanale (dati ricavati dal modello previsionale) per i tre livelli di dose utilizzati nello studio clinico (Nishimura et al., 2021).

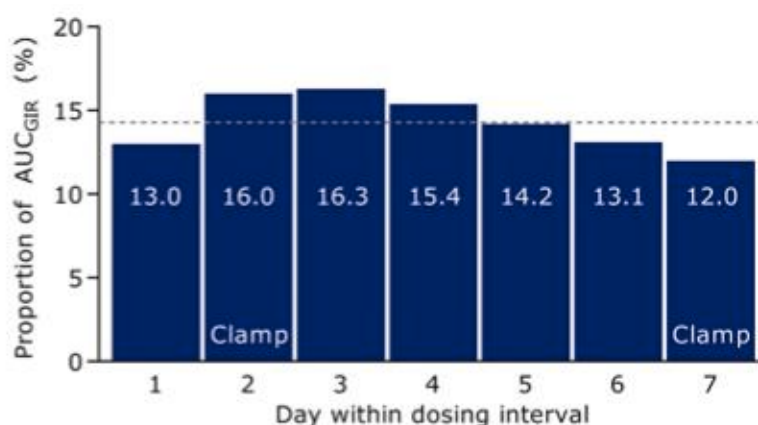


Figura 22: Modello previsionale della distribuzione dell'attività ipoglicemizzante di Icodec nell'arco della settimana successiva alla somministrazione dopo il raggiungimento dello steady state (da Nishimura et al., 2021)

E' quindi possibile tracciare il profilo farmacocinetico dell'insulina Icodec ripercorrendo le diverse fasi, dalla somministrazione all'assorbimento.

Dopo la prima somministrazione, (**Figura 23**), gli esameri presenti nella formulazione iniziano a dissociare in monomeri che sono assorbiti abbastanza rapidamente dal torrente circolatorio, iniziandosi a legare all'albumina plasmatica.

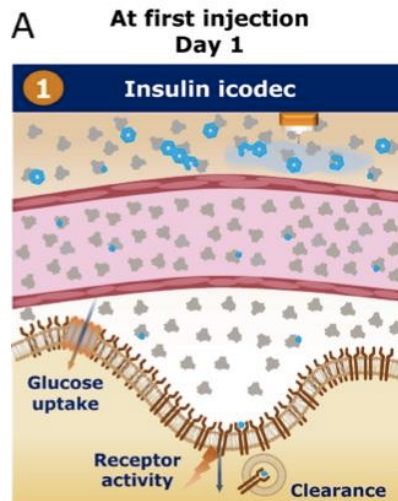


Figura 23: Distribuzione dell'insulina (in blu) legata all'albumina plasmatica (in grigio) dopo la prima iniezione (da Nishimura et al., 2021)

La scarsa interazione dei monomeri di insulina nei confronti dei recettori presenti nel tessuto bersaglio consente di ottenere una lenta riduzione dei livelli glicemici, senza quindi bruschi cali.

Sette giorni dopo, prima della seconda iniezione, come mostrato in **Figura 24**, c'è stato un importante aumento della quantità di monomeri legati all'albumina plasmatica con la formazione di una riserva di farmaco circolante.

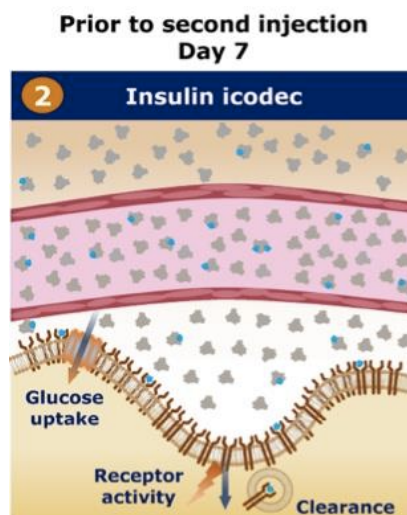


Figura 24: Distribuzione dell'insulina (in blu) legata all'albumina plasmatica (in grigio) dopo sette giorni, prima della seconda iniezione (da Nishimura et al., 2021)

Dopo la quinta iniezione, all'incirca passati trenta giorni dalla prima somministrazione, si raggiunge lo stato stazionario con l'ottenimento dell'equivalenza tra la costante di cessione del farmaco da parte dell'albumina e la costante di eliminazione del farmaco: $K_c = K_e$ (**Figura 25**).

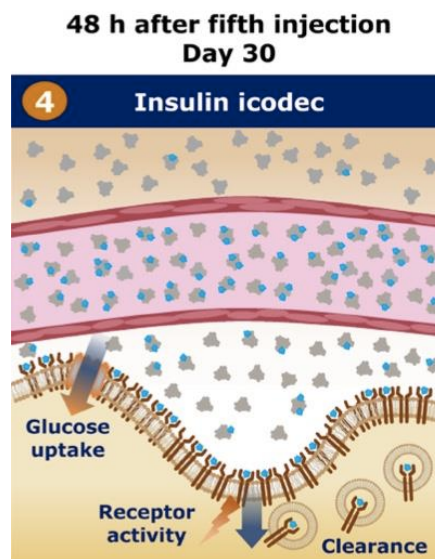


Figura 25: Cessione dell'insulina (in blu) legata all'albumina plasmatica (in grigio) che eguaglia l'eliminazione del farmaco, con mantenimento dello steady state (da Nishimura et al., 2021)

In uno studio di fase 2 (Nishimura et al., 2021), è stato confrontato l'effetto di Icodec con quello di Glargine 100U (Lantus®) osservando come Icodec abbia prodotto gli stessi effetti ipoglicemizzanti dell'insulina Glargine a fronte di un numero nettamente inferiore di somministrazioni (**Figura 26**) (Nishimura et al., 2021).

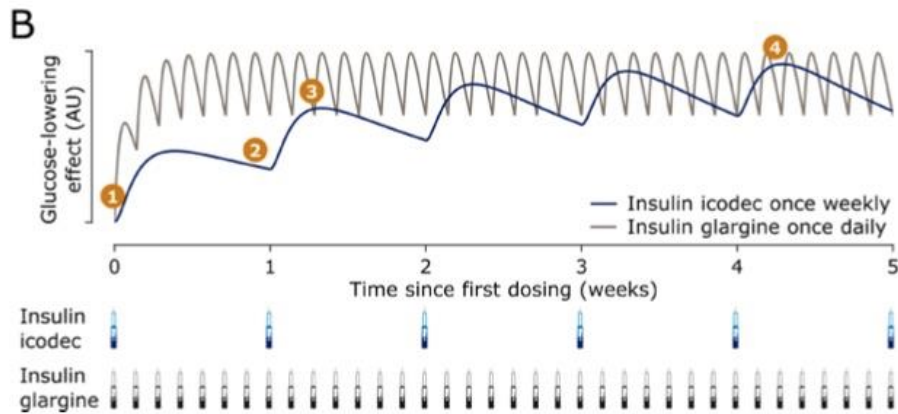


Figura 26: Attività dell'insulina Icodec confrontata con l'attività dell'insulina Glargine in relazione al tempo (in settimane) e al numero di somministrazioni (da Nishimura et al., 2021)

Osservando la crescita dell'attività farmacologica in funzione del tempo (**Figura 26**) si nota in maniera netta la differenza del tempo d'azione tra i due analoghi. Il picco della Icodec risulta molto meno marcato con una durata dell'effetto pari ad una settimana. L'insulina Glargine raggiunge il massimo dell'attività dopo tre o quattro somministrazioni, quindi tre o quattro giorni, mentre l'insulina Icodec impiega tre o quattro settimane per pareggiare l'attività dell'analogo giornaliero. La massima concentrazione plasmatica di insulina Icodec (<500 nm/L) è molto inferiore alla concentrazione plasmatica totale dell'albumina (circa 600000 nmol/L). Considerando che l'albumina possiede quattro siti di legame ad elevata affinità per gli acidi grassi ed altri siti ad affinità intermedia è possibile affermare che la capacità di legame dell'albumina sia superiore alle 2000 U di insulina. Pertanto, variazioni dei livelli sierici di albumina dovute, ad esempio a albuminuria associata ad insufficienza renale, a ridotta sintesi proteica per insufficienza epatica o a fenomeni di spiazzamento competitivo, difficilmente risulteranno clinicamente rilevanti.

Per ciò che riguarda le interazioni farmacologiche, l'associazione a progestinici, glucocorticoidi, ormoni tiroidei e ormone della crescita potrebbe alterarne la capacità ipoglicemizzante di Icodec, data la loro attività iperglicemizzante. Al contrario, un potenziamento della risposta ipoglicemizzante, con il rischio di crisi ipoglicemiche, è atteso dall'associazione con farmaci antidiabetici orali o

agonisti incretinici. L'utilizzo di beta-bloccanti potrebbe mascherare i sintomi dell'ipoglicemia, attenuando i segni dell'attivazione simpatica compensatoria (Blair, 2024).

Per quanto riguarda gli effetti avversi, sono simili a quelli già osservati con l'impiego delle altre insuline. Reazioni locali al sito di iniezione possono manifestarsi sotto forma di lividi, sanguinamenti, dolore o lipo-ipertrofia. Il pH neutro dell'analogo settimanale è associato ad una minore sintomatologia dolorosa e, soprattutto, grazie alla ridotta frequenza di somministrazione, minori effetti locali (Nishimura et al., 2021).

Il rischio di ipoglicemia in seguito alla somministrazione di Icodec è relativamente basso. Il legame all'albumina non solo consente di estendere la durata d'azione ad una settimana ma anche di regolare il rilascio di farmaco minimizzando eventuali brusche cadute dei livelli di glucosio. L'incidenza di ipoglicemia è stata stimata <1/anno per individuo. Nel prossimo paragrafo, sarà analizzato il confronto dell'analogo settimanale con gli altri analoghi insulinici a lunga durata d'azione anche per quanto riguarda gli eventi avversi.

Casi di ipoglicemia si sono verificati in pazienti con DMT2 trattati con Icodec in combinazione ad altri farmaci ipoglicemizzanti come sulfaniluree o le gliflozine. Di conseguenza il dosaggio e la frequenza di somministrazione di questi farmaci dovranno essere modificati per normalizzare i livelli di glucosio nel sangue.

Paragrafo 3.2. Indicazioni terapeutiche di Icodec

Il diabete rappresenta un importante fardello personale e per il sistema sanitario di tanti paesi in tutto il Mondo. Nel 2021, il diabete ha mostrato una prevalenza globale del 6,1% con una spesa stimata negli Stati Uniti di circa 966 miliardi di dollari. Queste cifre sono destinate a salire a 1054 miliardi di dollari entro il 2045 (Argano et al., 2024). Questi numeri sono rappresentativi di quanto il diabete sia ormai una patologia ampiamente diffusa all'interno della nostra società tanto da essere considerata una vera e propria malattia epidemica.

Come approfondiremo meglio successivamente, il diabete mellito si suddivide in due grandi tipologie, DMT1 e DMT2, con eziologia e approcci terapeutici molto diversi tra loro.

Tuttavia, l'insulina è impiegata nella terapia di entrambe le forme di diabete. Negli Stati Uniti circa il 5,7% (1,7 milioni di persone con almeno 20 anni o più) dei pazienti affetti da diabete mellito sono in trattamento con l'insulina (Argano et al., 2024). Nonostante la presenza sul mercato di nuovi analoghi insulinici con una maggior efficacia e un ridotto rischio di ipoglicemia, l'introduzione dell'insulina nella vita di tutti i giorni non risulta un'operazione molto semplice. Per questo motivo sarà interessante valutare i benefici a livello terapeutico che l'insulina Icodec può apportare.

3.2.1. Utilizzo di Icodec nel DMT1

Il diabete mellito è una patologia metabolica che si manifesta sotto forma di iperglicemia. La diagnosi è basata sulla misura puntuale della glicemia e dei livelli di emoglobina glicata, un indicatore dell'andamento dei livelli glicemici nell'arco dei 3-5 mesi precedenti.

Il diabete mellito si divide in due grandi tipologie sulla base della patogenesi: DMT1 e DMT2. Il DMT1 viene solitamente diagnosticato in giovane età. Le cellule β pancreatiche degenerano, in genere per cause di natura autoimmunitaria, impedendo alla ghiandola endocrina la produzione e il rilascio dell'ormone.

Fisiologicamente, il rilascio di insulina dal pancreas avviene attraverso due modalità: tonica, inter-prandiale (circa il 50% della produzione giornaliera) e fasica, ai pasti. La somministrazione di insulina ai pazienti DMT1 è quindi da configurarsi come terapia sostitutiva. L'utilizzo di analoghi a diversa durata d'azione consente di applicare la strategia terapeutica detta "bolo-basale". Essa consiste nella somministrazione di un'insulina lenta per mimare il controllo basale dei livelli sierici di glucosio e di un'insulina rapida o ultrarapida poco prima o durante i pasti, per regolare i livelli post-prandiali di glucosio. L'insulina

Icodec è impiegata quindi nel controllo dei livelli basali di glucosio con una singola somministrazione settimanale.

Lo studio di fase 3, ONWARDS 6, ha analizzato l'efficacia dell'analogo settimanale contro un analogo a lunga durata d'azione e somministrazione giornaliera come l'insulina Degludec, entrambe associate all'insulina rapida Aspart nel protocollo bolo-basale.

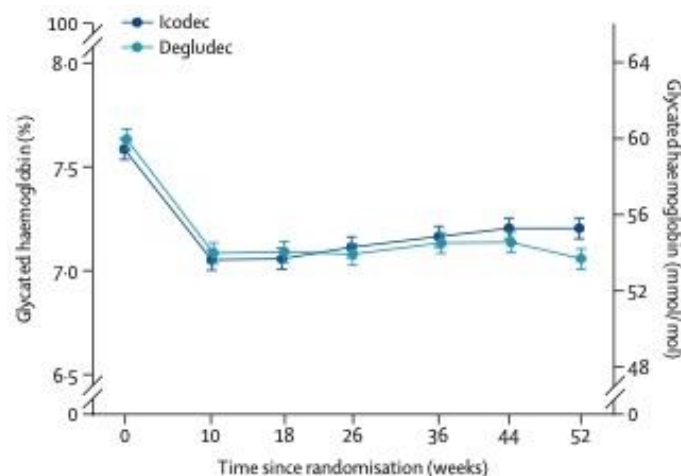


Figura 27: Concentrazione media di emoglobina glicata nel tempo tra i pazienti in trattamento con Icodec e Degludec (da Russel-Jones et al., 2023)

Attraverso la misura dei livelli di emoglobina glicata dopo 26 settimane (endpoint primario), è stato possibile verificare come l'efficacia di insulina Icodec e Degludec sia sovrapponibile (Russel-Jones et al., 2023). Come mostrato in **Figura 27**, con insulina Icodec si è passati da un valore medio di HBA_{1C} di 7,59% alla baseline ad uno di 7,15% al termine dello studio (26 settimane) mentre con insulina Degludec da 7,63% alla baseline a 7,10% al termine. Il decremento dei livelli di emoglobina glicata dalla baseline non è risultato statisticamente diverso per i due analoghi (-0,47% per Icodec vs -0,51% per Degludec).

Nello studio ONWARDS 6, è stato però osservato un maggior numero di eventi ipoglicemici nel gruppo di pazienti trattato con Icodec rispetto ai pazienti trattati con Degludec, anche se in questo studio l'incidenza degli eventi con Degludec è

risultata inferiore rispetto ai numerosi studi effettuati in precedenza. In ogni caso, in termini assoluti, l'incidenza è risultata relativamente bassa in entrambi i gruppi e tutti i casi di ipoglicemia si sono risolti con la somministrazione orale di carboidrati.

Il terzo elemento che è stato analizzato all'interno di questo studio è la compliance dei pazienti. Attraverso il questionario DTSQ è stato possibile osservare una differenza di score significativa tra l'analogo Icodec e l'analogo Degludec, a favore di quest'ultimo, tra la 26esima e 52esima settimana, facendo risaltare come sia difficile per pazienti abituati ad una somministrazione giornaliera passare ad una somministrazione settimanale. Se quindi da un lato è possibile riscontrare un vantaggio in favore di Icodec dovuto alla riduzione netta della frequenza di somministrazione, dall'altro lato quest'insulina appare associata ad una minore aderenza alla terapia. Proprio per questo motivo, con l'avanzare degli studi, si è visto come l'introduzione di Icodec all'interno di uno schema terapeutico risulta più difficoltosa per i pazienti DMT1 rispetto a quelli DMT2.

Nonostante questo, Icodec rappresenta un'importante alternativa per i pazienti affetti da DMT1 instabili, specie se tale instabilità è legata ad una scarsa aderenza terapeutica, come ad esempio per i teenagers (Russel-Jones et al., 2023).

3.2.2. Utilizzo di Icodec nel DMT2

Il DMT2 è una patologia caratterizzata da iperglicemia come DMT1, tuttavia con profonde differenze nella patogenesi. Nel DMT2, infatti, la secrezione di insulina risulta normale o ridotta ma mai assente. Viceversa, è ridotta la sensibilità all'insulina da parte dei tessuti o degli organi bersaglio. Questa riduzione della risposta nei confronti dell'insulina molto spesso è riconducibile ad un'alterata attività del recettore IR a causa della presenza di auto-anticorpi, down-regulation recettoriale o dell'aumento del turn-over recettoriale. Nella sindrome da resistenza all'insulina di tipo B, le IgG attaccano il recettore IR alterando l'attività dell'insulina (Willard et.al, 2016). Nel secondo caso subentra

il cosiddetto fenomeno della tolleranza: in seguito ad un'elevata esposizione costante ad una determinata sostanza (in questo caso l'insulina, prodotta in risposta ad un elevato assorbimento di zuccheri) diminuisce il numero di recettori presenti negli specifici tessuti, riducendo in questo modo la capacità di legare l'insulina e come conseguenza la sensibilità nei confronti dell'ormone endogeno. Nel terzo caso, il legame tra insulina e IR comporta una dimerizzazione e internalizzazione del complesso all'interno degli endosomi, il quale viene poi degradato dalle proteasi. Aumentando la frequenza di turn-over recettoriale diminuisce la capacità da parte della cellula di interagire con l'insulina riducendo così l'attività ipoglicemizzante.

Dati i diversi meccanismi patogenetici coinvolti, le strategie terapeutiche sono diverse. Nel DMT2 si utilizzano diverse classi di ipoglicemizzanti o anti-iperipoglicemizzanti orali tra cui metformina, analoghi del GLP-1 o inibitori delle DDP4, o infine inibitori del trasportatore del glucosio (SGLT2).

Nonostante l'utilizzo di questi nuovi farmaci, tuttavia, alcuni pazienti necessitano di essere trattati anche con l'insulina per controllare in maniera ottimale la glicemia. Secondo le linee guida, la terapia con insulina basale viene applicata se i livelli di glucosio sono maggiori di 300 mg/dL (iperipoglicemia severa) o l'emoglobina glicata supera il 10% (Argano et al., 2024).

In pazienti cui viene diagnosticato DMT2 in età avanzata risulta molto difficile introdurre nella vita quotidiana una terapia farmacologica della portata di quella insulinica, soprattutto per la elevata frequenza delle somministrazioni. Ed è proprio qui che subentra l'aderenza terapeutica come elemento chiave. Più "comoda" è la somministrazione di insulina e migliore sarà il controllo dei livelli di glucosio per i pazienti. Proprio per questo motivo l'utilizzo di un analogo settimanale come Icodec potrebbe risultare vincente nei pazienti DMT2.

Gli studi ONWARDS 1, ONWARDS 3 e ONWARDS 5 sono gli unici studi clinici effettuati su pazienti naive per l'insulina e proprio la loro analisi è interessante per valutare il comportamento dell'analogo settimanale Icodec.

Nello studio ONWARDS 1 (Rosenstock et al., 2023) è stata investigata l'efficacia e la sicurezza dell'insulina Icodec in comparazione con l'insulina giornaliera Glargine 100U in uno studio randomizzato della durata di 85

settimane. Lo studio ha compreso adulti di età superiore ai 18 anni con DMT2, naive per l'insulina, con livelli di emoglobina glicata compresi tra il 7% e l'11%. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: il primo sottoposto a somministrazione settimanale di Icodec 700U e il secondo a somministrazione giornaliera di Glargine 100U, in combinazione ad altri farmaci per il trattamento del DMT2. Come nello studio ONWARDS 6, l'end-point primario è rappresentato dai livelli di emoglobina glicata misurata nei pazienti dalla baseline alla settimana 52. Alla baseline, entrambi i gruppi presentavano valori di emoglobina glicata simili, 8,50% il gruppo Icodec e 8,44% il gruppo Glargine. Dopo 52 settimane ("Main Phase", **Figura 28**) la media dei livelli di emoglobina glicata per il gruppo Icodec è stata del 6,93% e per il gruppo Glargine del 7,12%. La variazione non è risultata statisticamente significativa.

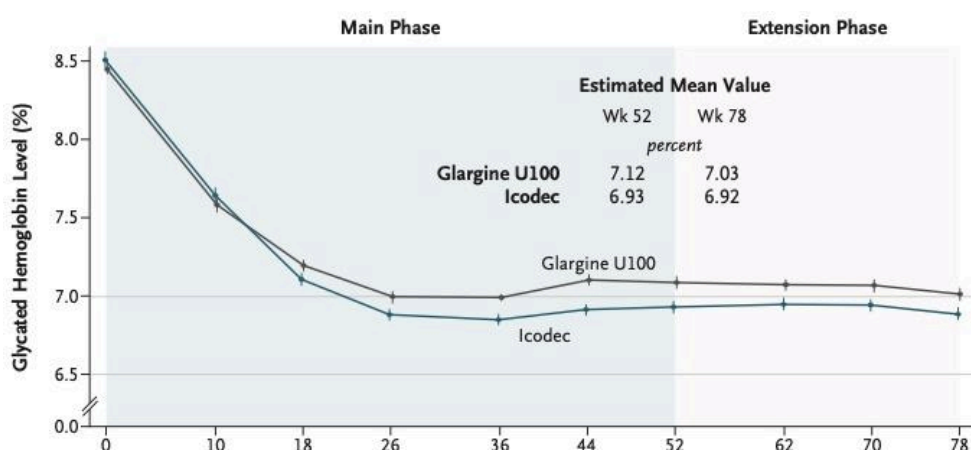


Figura 28: Valori medi dell'emoglobina glicata dalla baseline alla settimana 78 dei pazienti trattati con Icodec o Glargine (da Rosenstock et al., 2023)

E' stata confermata quindi la non superiorità e la non inferiorità dell'analogo Icodec nei confronti dell'analogo Glargine 100U.

Grazie ad un continuo monitoraggio dei livelli di glucosio, si è riusciti a calcolare la media del tempo (in percentuale) trascorso dai partecipanti in determinati range di livelli di glucosio. Osservando l'istogramma in **Figura 29**, si vede come dalla settimana 48 alla 52 e dalla 74 alla 78, i pazienti in terapia con Icodec hanno trascorso un tempo superiore nel range ottimale rispetto ai pazienti in terapia con

Glargine, quantificabile rispettivamente in 1 ora e 1 minuto al giorno (settimane 48-52) e 1 ora e 4 minuti al giorno (settimane 74-78).

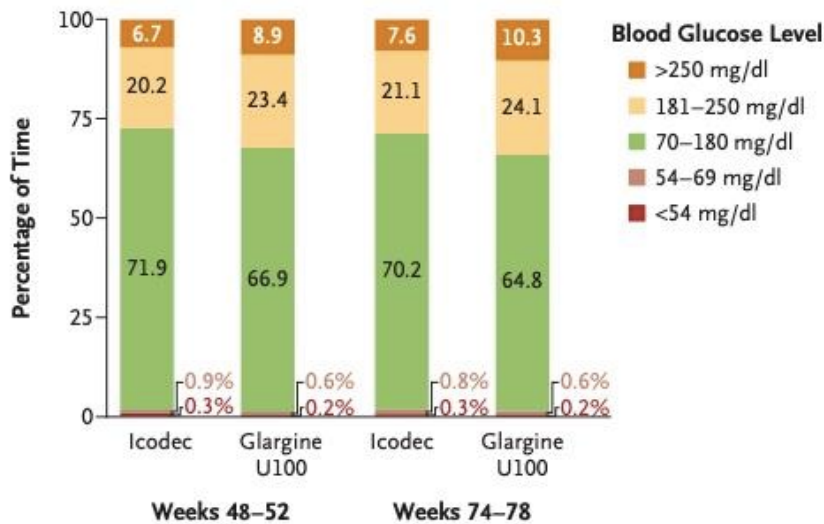


Figura 29: Percentuale del tempo speso nei diversi range di glucosio nelle settimane 48-52 e nelle settimane 74-78, ricavato grazie ad un monitoraggio continuo (da Rosenstock et al., 2023)

Il secondo end-point dello studio da tenere in considerazione è sicuramente quello rappresentato dalla sicurezza del farmaco. Nell'istogramma è possibile verificare come non vi siano state differenze significative del tempo speso a livelli di glucosio ematici <54 mg/dL. Allo stesso tempo, però, è visibile anche come il gruppo trattato con insulina Glargine abbia trascorso un tempo superiore alle concentrazioni >180 mg/dL. Questo a dimostrazione della miglior capacità di Icodec nel mantenimento della condizione euglicemica.

Durante lo studio, ci sono stati 226 casi di ipoglicemia occorsi in 61 pazienti trattati con insulina Icodec e 114 casi di ipoglicemia occorsi in 66 pazienti trattati con insulina Glargine. Nonostante vi sia una maggior incidenza di casi di ipoglicemia nel gruppo con Icodec (0,30 eventi per persona l'anno) rispetto al gruppo Glargine (0,15 eventi per persona l'anno), la differenza non appare significativa. Rimangono comunque al di sotto di 1 caso di ipoglicemia per

persona l'anno, un'incidenza molto bassa. Secondo lo studio ONWARDS 1, quindi, i due profili di efficacia di Icodec e Glargine sono molto simili.

E' stata quindi pubblicata una metanalisi (Shetty et al., 2024) in cui sono stati analizzati tutti gli studi ONWARDS in cui l'analogo Icodec è stato messo a confronto con l'analogo Degludec e l'analogo Glargine 100U in pazienti con DMT2. Gli endpoint considerati sono molti tuttavia, per semplicità, terremo conto degli stessi parametri già citati in precedenza: i livelli di emoglobina glicata, il tempo medio trascorso alle diverse concentrazioni di glucosio, i rischi di eventi ipoglicemici ed eventuali eventi avversi.

Questa metanalisi include 3763 pazienti, di cui 1880 pazienti nel gruppo Icodec e 1883 nel gruppo comparatore.

Se si considerano i valori di emoglobina glicata (**Figura 30**), non si osserva una differenza significativa tra l'insulina Icodec e l'insulina Glargine 100U, mentre la differenza compare quando si confronta Icodec con Degludec. In quest'ultimo caso l'efficacia dell'analogo settimanale appare significativamente superiore rispetto all'analogo giornaliero.

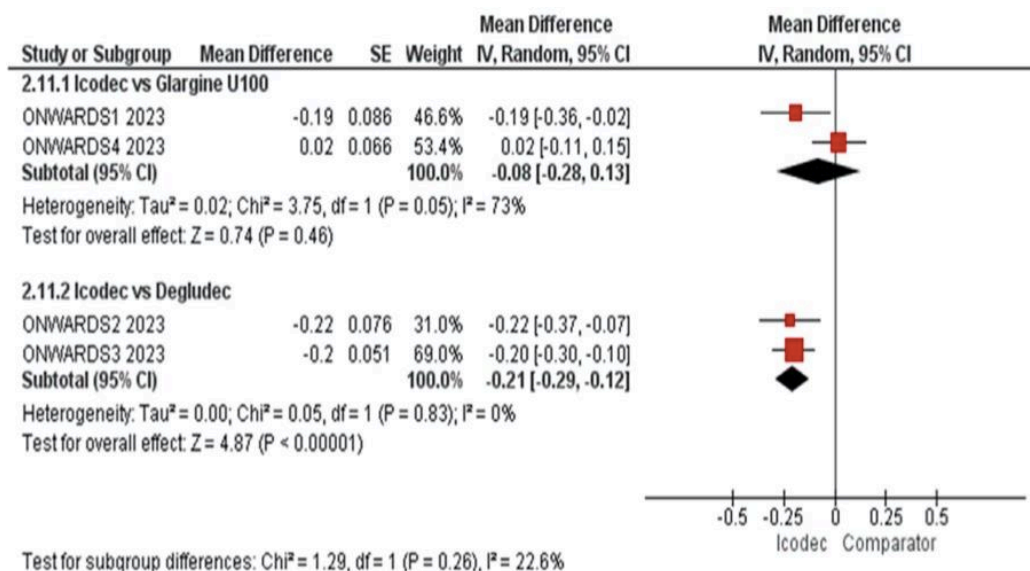


Figura 30: Forest plot raffigurante le variazioni medie di emoglobina glicata in percentuale nel trattamento con Icodec contro Glargine 100U e Degludec (da Shetty et al., 2024)

Il tempo trascorso nel range di glucosio 70-180 mg/dL è molto simile tra Icodec e i suoi comparatori mentre il tempo trascorso a basse concentrazioni di glucosio (<54 mg/dL) è maggiore nel gruppo Icodec. Questo a dimostrare come vi sia una tendenza di questo tipo di insulina ad abbassare i livelli di glucosio allo steady state.

L'incidenza di ipoglicemia con lieve sintomatologia (sudorazione, nervosismo, tremori, palpitazioni, fame) (livello I), appare superiore nei pazienti trattati con Icodec rispetto agli altri analoghi a mono-somministrazione giornaliera. Al contrario, non si osservano differenze nell'incidenza di ipoglicemia di grado moderato o severo tra i gruppi (Shetty et.al, 2024).

In conclusione, l'insulina Icodec non solo non si è dimostrata inferiore rispetto agli altri analoghi a lunga durata d'azione ma addirittura superiore rispetto all'analogo Degludec nella riduzione dei valori di emoglobina glicata in pazienti DMT2.

Il profilo di sicurezza, di Icodec, molto simile agli altri analoghi a lunga durata d'azione (anche se probabilmente dovrà essere approfondita la maggiore frequenza di ipoglicemia lieve), associato all'elevata efficacia conferma il raggiungimento dell'obiettivo perseguito dai ricercatori in fase di progettazione del farmaco, ovvero l'ottimale controllo glicemico attraverso la singola somministrazione settimanale. Si può così facilmente ipotizzare che nel futuro a breve, medio e lungo termine, Icodec potrà diventare la migliore alternativa alle insuline giornaliere per migliorare l'aderenza terapeutica nei nuovi pazienti che necessitano di una insulina basale.

CAPITOLO 4

Cenni alle nuove tecnologie per il monitoraggio della glicemia e per il trattamento del diabete mellito

Dalla scoperta dell'insulina più di un secolo fa sono stati compiuti costanti progressi nella terapia del diabete mellito e nella gestione del paziente diabetico che non solo hanno migliorato il decorso clinico della malattia ma anche la qualità della vita dei pazienti.

In questo capitolo, ho voluto approfondire alcuni tra i più rilevanti progressi tecnologici in grado di personalizzare la terapia sulle esigenze e sullo stile di vita del paziente.

Paragrafo 4.1. Nuove tecnologie

4.1.1. Nuovi sistemi di monitoraggio della glicemia

Nonostante le più recenti scoperte nell'ambito del trattamento farmacologico, una grossa porzione di persone affette da DMT1 e DMT2 fatica a controllare in maniera ottimale la glicemia e a raggiungere il target glicemico.

Fortunatamente, le innovazioni tecnologiche non hanno interessato solo il settore farmacologico o terapeutico ma ha anche quello dei sistemi di monitoraggio della glicemia. Ad oggi in molte parti del mondo la misurazione statica (istantanea) dei livelli di glucosio nel sangue (BGM) è stata rimpiazzata dalla misurazione dinamica, ovvero il monitoraggio continuo dei livelli di glucosio (CGM), introdotto per la prima volta nel 2006 (Subramanian et al., 2024). Questi apparecchi si basano sulla presenza di un algoritmo di calibrazione in grado di

convertire il segnale chimico rilevato da un sensore in funzione della concentrazione del glucosio ematico in segnale elettrico, visibile poi su uno schermo. In una metanalisi che ha analizzato ventuno studi clinici (Subramanian et al., 2024) è stato dimostrato come nei pazienti affetti da DMT1 che sfruttano il monitoraggio dinamico (CGM) si è riusciti ad ottenere una diminuzione superiore della concentrazione dell'emoglobina glicata rispetto a quella ottenuta mediante utilizzo del metodo diagnostico BGM. Inoltre, aiuta il mantenimento dei livelli di glucosio all'interno del range ottimale, ovvero quello compreso tra i 70 e i 180 mg/dL (**Figura 31**). All'interno del profilo glicemico sottostante è possibile osservare come, grazie a questo sistema di monitoraggio continuo, siano rilevabili dalla paziente due variazioni di concentrazione dal livello mediano: il primo picco verso il basso e il secondo picco verso l'alto dopo pranzo. In questo modo il paziente è in grado di autogestirsi in relativa semplicità. Questo sta a dimostrare la superiorità in termini di comodità rispetto al sistema BGM.

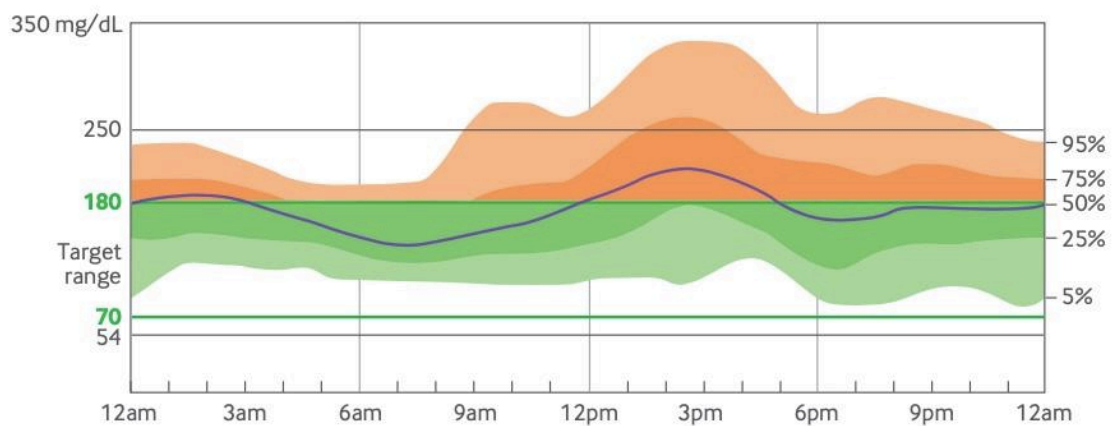


Figura 31: Esempio di un profilo glicemico di una donna di 52 anni con DMT1 ottenuto con l'utilizzo di un sistema di monitoraggio CGM (da Subramanian et al., 2024)

Il funzionamento di questo sistema di monitoraggio sfrutta la rilevazione della concentrazione di glucosio dei liquidi interstiziali. Sul mercato esistono due tipologie diverse di dispositivo CGM. Il primo tipo, chiamato “real time CGM”,

provvede a misurare il livello glicemico e inviare costantemente i dati ad un sistema ricevente, il quale può essere lo smartphone, lo smartwatch oppure una pompa (4.1.2). Il secondo tipo, chiamato “intermittently scanned CGM”, necessita invece di essere scannerizzato e letto da un dispositivo di decodifica o dallo smartphone. Come riportato dall’articolo citato in precedenza, questi dispositivi permettono di raggiungere un elevato grado di personalizzazione e sicurezza, riuscendo ad avvisare in caso di ipoglicemia o iperglicemia. Il monitoraggio costante dei livelli glicemici permette di adeguare istantaneamente l’attività fisica e la dieta al paziente, diminuendo le pericolose fluttuazioni di concentrazione plasmatica.

In Europa e negli Stati Uniti è disponibile un nuovo tipo di dispositivo CGM impiantabile, con autonomia di 180 giorni (Subramanian et al., 2024).

Uno degli svantaggi del dispositivo CGM è l’invasività che il sensore comporta, segnalato da molti pazienti che preferiscono ancora l’utilizzo del sistema di misurazione precedente.

4.1.2. Nuove formulazioni d’insulina

L’insulina può essere utilizzata nel trattamento del DMT1 e DMT2 non solo nella sua forma iniettabile ma anche inalatoria. Nel 2014 è stata approvata da FDA una formulazione di insulina adsorbita a tecnosfere per somministrazione inalatoria (Technosphere inhaled Insulin, Afrezza®). Si tratta di un’insulina a rapida insorgenza d’azione, all’incirca dodici minuti, e durata d’azione che è compresa tra l’ora e mezza e le tre ore. Il suo impiego è ovviamente limitato al controllo dei livelli glicemici post-prandiali. L’assorbimento sistemico è rapido e la caduta della glicemia transitoria. Il farmaco è gravato da effetti collaterali a carico dell’albero respiratorio, quali una lieve riduzione della funzione polmonare (FEV1), tosse e un aumento dell’incidenza di CA polmonare. Il farmaco non ha riscosso molto successo tra i pazienti ed è pertanto stato ritirato dalla ditta produttrice per evidenti ragioni economiche.

I sistemi CGM collegati ai microinfusori hanno permesso di migliorare il controllo dei livelli ematici di glucosio riuscendo soprattutto a diminuire il rischio di crisi ipoglicemiche severe.

La tecnologia alla base di questi sistemi permette, attraverso un algoritmo, di regolare il dosaggio di insulina da rilasciare in funzione dei livelli glicemici puntuali. Come rappresentato nell'immagine sottostante (**Figura 32**), il sistema "Automated Insulin Delivery" (AID, chiamato anche "Pancreas artificiale" o "Closed Loop") è composto da tre elementi: il primo è il dispositivo di monitoraggio CGM (vedi 4.1.1), il secondo è un algoritmo di controllo e il terzo è la pompa in grado di rilasciare l'insulina. La logica che sta alla base del sistema è appunto quello di un circuito chiuso. Il sistema CGM misura istantaneamente i livelli glicemici dei fluidi interstiziali e invia i dati all'algoritmo presente nel dispositivo della pompa. Attraverso i dati di input l'algoritmo elabora i dati e aggiusta il dosaggio di insulina in funzione dei livelli glicemici (Subramanian et al., 2024).

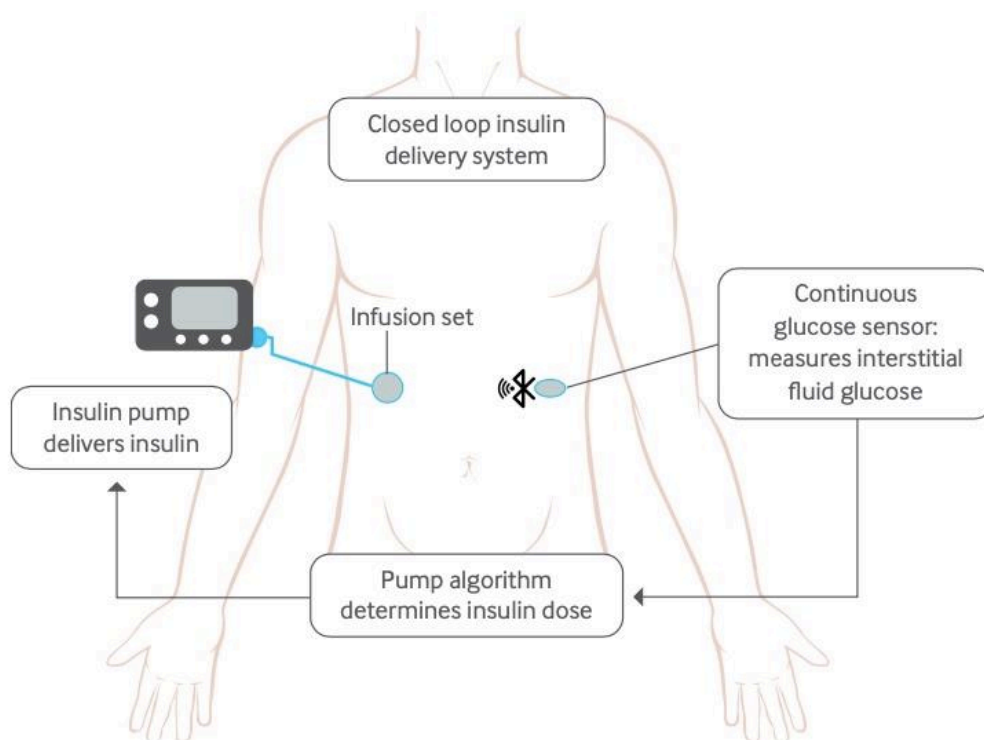


Figura 32: Schema del sistema Closed Loop (da Subramanian et al., 2024)

Il pancreas artificiale di più recente approvazione è il sistema iLet Bionic[®], approvato nel maggio del 2023 negli Stati Uniti. I limiti più grandi di questa tecnologia sono rappresentati dalla invasività e dalla scarsa accuratezza dei sensori CGM in situazioni di livelli glicemici estremi.

Le nuovissime tecnologie in questo campo si stanno orientando verso la personalizzazione terapeutica e verso i “Do It Yourself” (DIY) Closed Loop. Sono pancreas artificiali in cui è possibile modificare e programmare il software in funzione della persona. Lo sviluppo può avvenire direttamente da parte del paziente, riuscendo a modulare il controllo e il rilascio di insulina in base al proprio stile di vita e alle proprie esigenze sfruttando un codice a sorgente aperta. Sono sistemi che non hanno ancora ricevuto autorizzazione da parte delle agenzie regolatorie mondiali e il cui utilizzo è sotto la completa responsabilità da parte dei pazienti. Nonostante questo, però, gli studi sui pazienti che utilizzano questi dispositivi hanno dimostrato come la personalizzazione della terapia permetta un migliore controllo glicemico. E’ stato infatti osservato un netto miglioramento dei livelli dell’emoglobina glicata, un maggior tempo trascorso all’interno del range 70-180 mg/dL e una diminuzione del rischio di crisi ipoglicemiche (Subramanian et al., 2024). Sebbene non vi sia una prescrizione o una raccomandazione specifica all’uso di questi dispositivi, questi pazienti sono costantemente supportati da un team di esperti.

Infine, grazie all’utilizzo delle nanotecnologie, la difficoltà di somministrare l’insulina per via orale potrebbe essere superata. L’insulina, essendo una proteina, molto difficilmente riesce ad arrivare all’intestino intatta per poi essere assorbita. Per evitare la degradazione enzimatica da parte degli enzimi gastrici e quindi facilitarne il trasferimento a livello intestinale, l’insulina è stata veicolata in liposomi (Asaad et al., 2024).

Tra i liposomi, quello contenente sodio glicolato appare il più efficace nel proteggere l’insulina dall’azione degradativa della pepsina, della tripsina e della α -chimotripsina (Asaad et al., 2024).

In uno studio effettuato nel 2023 (Chelleathurai et al.) è stato dimostrato come l’utilizzo di nanoparticelle di insulina a base di chitosano abbia consentito di

ottenere un'attività farmacologica paragonabile a quella dell'insulina somministrata per via sottocutanea.

L'ultima formulazione di particolare rilievo è quella che si basa sulla veicolazione di insulina mediante nanoparticelle a base di alginato. La loro produzione avviene per formazione di un complesso gelificato, grazie alla presenza di una sostanza colloidale naturale come appunto l'alginato e all'interazione con delle molecole di chitosano. Il tutto è stato poi cross-linkato con il cloruro di calcio (**Figura 33**).

L'azione farmacologica è stata studiata nei ratti, con un abbassamento dei livelli di glucosio di oltre il 40% e un'attività durata fino alle 18 ore dopo la somministrazione (Asaad et al., 2024). Grazie alla formazione di questo polimero si è riusciti a proteggere l'insulina dall'attività degradativa a livello gastrico.

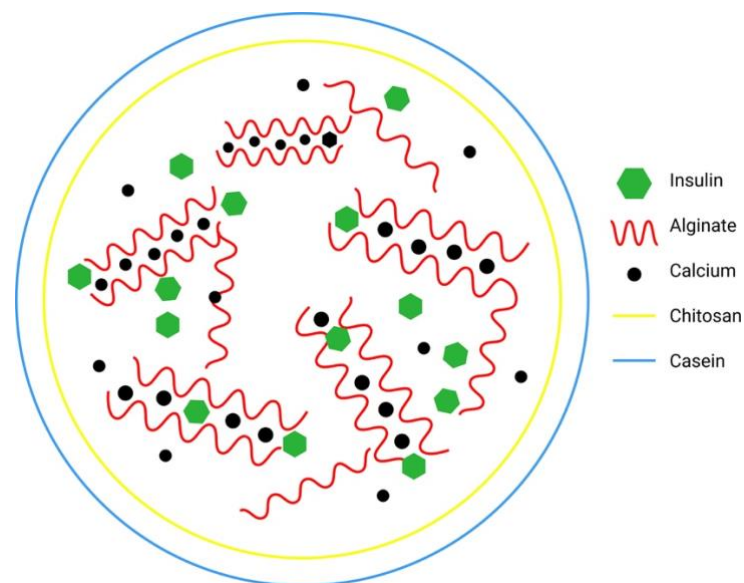


Figura 33: Schema rappresentativo della struttura della nano-particella composta da polimeri di alginato linkati da cloruro di calcio, con al loro interno l'insulina (da Xu et al., 2021)

4.1.3. Trapianto di pancreas

La sostituzione delle cellule β pancreatiche può essere una soluzione da considerare per i pazienti affetti da DMT1 che rispettano dei determinati criteri

di selezione. Il primo metodo per la sostituzione delle cellule è rappresentato dal trapianto dell'intero organo. Come riportato (Subramanian et al., 2024), il trapianto di pancreas nella maggior parte dei casi avviene in simultanea con il trapianto del rene, entrambi dallo stesso donatore, a causa della nefropatia diabetica con insufficienza renale allo stadio terminale (Subramanian et al., 2024). A cinque anni di distanza dal trapianto, il tasso di sopravvivenza per chi ha eseguito il doppio trapianto è dell'80% e risulta superiore rispetto al 62% dei trapiantati di solo pancreas. Nonostante questo, però, il numero dei trapianti di pancreas sta diminuendo nel corso degli anni. Il progresso nel trapianto e nella sostituzione delle cellule β pancreatiche sta coinvolgendo anche la chirurgia di precisione. Per aiutare a ripristinare la risposta del pancreas si è deciso di perseguire la strada del trapianto delle isole di Langerhans. Il donatore dona le cellule endocrine pancreatiche che verranno poi isolate, purificate, coltivate e inserite nell'organo del paziente malato. Questo tipo di trattamento è ancora sperimentale e viene offerto in alcuni centri specializzati nel Nord America, in Australia e in alcuni stati Europei.

Tra le nuove tecniche in grado di consentire la rigenerazione delle cellule β pancreatiche si possono annoverare le terapie a base di cellule staminali che hanno dimostrato un ottimo potenziale proprio nella capacità di rigenerazione cellulare (Asaad et al., 2024). Tutte le terapie a base di cellule staminali si focalizzano principalmente sulle cellule staminali mesenchimali (MSC) e sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).

Bibliografia

1. Argano C, Priola L, Manno F, Corrao S. *What Is the Role of Basal Weekly Insulin in Clinical Practice? The State of the Art*. *Biomedicines*. 2024 Apr 18;12(4):900. doi: 10.3390/biomedicines12040900. PMID: 38672255; PMCID: PMC11048618.
2. Asaad GF, Doghish AS, Rashad AA, El-Dakroury WA. *Exploring cutting-edge approaches in diabetes care: from nanotechnology to personalized therapeutics*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2024 Oct 25. doi: 10.1007/s00210-024-03532-7. Epub ahead of print. PMID: 39453501.
3. Ayes H, Suhail S, Ayes S, Niswender K. *Comparative efficacy and safety of weekly dulaglutide versus weekly insulin in type 2 diabetes: A network meta-analysis of randomized clinical trials*. *Metabol Open*. 2024 Apr 23;22:100284. doi: 10.1016/j.metop.2024.100284. PMID: 38699397; PMCID: PMC11064603.
4. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez MV. *Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation*. *Domest Anim Endocrinol*. 2016 Jan;54:76-84. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.07.001. Epub 2015 Jul 18. PMID: 26521203.
5. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. *Sequence of the human insulin gene*. *Nature*. 1980 Mar 6;284(5751):26-32. doi: 10.1038/284026a0. PMID: 6243748.
6. Blair HA. *Insulin Icodec: First Approval*. *BioDrugs*. 2024 Sep;38(5):717-724. doi: 10.1007/s40259-024-00670-5. PMID: 39031321.
7. Chatzianagnostou K, Gaggini M, Suman Florentin A, Simonini L, Vassalle C. *New Molecules in Type 2 Diabetes: Advancements, Challenges and Future Directions*. *Int J Mol Sci*. 2024 Jun 5;25(11):6218. doi: 10.3390/ijms25116218. PMID: 38892417; PMCID: PMC11173177.

8. Chong K, Chang JK, Chuang LM. *Recent advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus using new drug therapies*. Kaohsiung J Med Sci. 2024 Mar;40(3):212-220. doi: 10.1002/kjm2.12800. Epub 2024 Jan 6. PMID: 38183334.
9. Le TKC, Dao XD, Nguyen DV, Luu DH, Bui TMH, Le TH, Nguyen HT, Le TN, Hosaka T, Nguyen TTT. *Insulin signaling and its application*. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 17;14:1226655. doi: 10.3389/fendo.2023.1226655. PMID: 37664840; PMCID: PMC10469844.
10. Davis A, Kuriakose J, Clements JN. *Faster Insulin Aspart: A New Bolus Option for Diabetes Mellitus*. Clin Pharmacokinet. 2019 Apr;58(4):421-430. doi: 10.1007/s40262-018-0696-8. PMID: 29978361.
11. Dodson G, Steiner D. *The role of assembly in insulin's biosynthesis*. Curr Opin Struct Biol. 1998 Apr;8(2):189-94. doi: 10.1016/s0959-440x(98)80037-7. PMID: 9631292.
12. Draznin B. *Mitogenic action of insulin: friend, foe or 'frenemy'?* Diabetologia. 2010 Feb;53(2):229-33. doi: 10.1007/s00125-009-1558-6. Epub 2009 Oct 23. PMID: 19851749.
13. Dunn CJ, Plosker GL, Keating GM, McKeage K, Scott LJ. *Insulin glargine: an updated review of its use in the management of diabetes mellitus*. Drugs. 2003;63(16):1743-78. doi: 10.2165/00003495-200363160-00007. PMID: 12904090.
14. Falcetta P, Aragona M, Bertolotto A, Bianchi C, Campi F, Garofolo M, Del Prato S. *Insulin discovery: A pivotal point in medical history*. Metabolism. 2022 Feb;127:154941. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154941. Epub 2021 Nov 25. PMID: 34838778.
15. France NL, Syed YY. *Tirzepatide: A Review in Type 2 Diabetes*. Drugs. 2024 Feb;84(2):227-238. doi: 10.1007/s40265-023-01992-4. Epub 2024 Feb 23. PMID: 38388874.

16. Garnock-Jones KP, Plosker GL. *Insulin glulisine: a review of its use in the management of diabetes mellitus*. *Drugs*. 2009 May 29;69(8):1035-57. doi: 10.2165/00003495-200969080-00006. PMID: 19496630.
17. Hirsch IB, Beck RW, Marak MC, Calhoun P, Mottalib A, Salhin A, Manassis A, Coviello AD, Bhargava A, Thorsell A, Atakov Castillo A, Bode BW, Levister C, Levy CJ, Donahue C et al.; INHALE-3 Study Group. *A Randomized Comparison of Postprandial Glucose Excursion Using Inhaled Insulin Versus Rapid-Acting Analog Insulin in Adults With Type 1 Diabetes Using Multiple Daily Injections of Insulin or Automated Insulin Delivery*. *Diabetes Care*. 2024 Sep 1;47(9):1682-1687. doi: 10.2337/dc24-0838. PMID: 39042575; PMCID: PMC11362108.
18. Giorgino F., *Il segnale intracellulare dell'insulina: complessità e interferenze nella trasmissione del messaggio*, *il Diabete* vol.20 n.3, 2008, 20 (3):111-125
19. Holleman F, Hoekstra JB. *Insulin lispro*. *N Engl J Med*. 1997 Jul 17;337(3):176-83. doi: 10.1056/NEJM199707173370307. Erratum in: *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349(15):1487. PMID: 9219705.
20. Home P. *Making sense of weekly insulins*. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2023 Mar;11(3):140-141. doi: 10.1016/S2213-8587(23)00002-5. Epub 2023 Feb 6. PMID: 36758573.
21. JAMIESON M, LACEY AH, FISHER AM. *NPH insulin*. *Can Med Assoc J*. 1951 Jul;65(1):20-3. PMID: 14848784; PMCID: PMC1821979.
22. Kalra S, Bhattacharya S, Kapoor N. *Counseling for Insulin Icodec: A Proposed Practitioner's Guide*. *Diabetes Ther*. 2024 Jul;15(7):1491-1499. doi: 10.1007/s13300-024-01600-y. Epub 2024 May 14. PMID: 38743307; PMCID: PMC11211307.
23. Karas JA, Wade JD, Hossain MA. *The Chemical Synthesis of Insulin: An Enduring Challenge*. *Chem Rev*. 2021 Apr 28;121(8):4531-4560. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01251. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33689304.

24. Kaur M, Misra S. A review of an investigational drug retatrutide, a novel triple agonist agent for the treatment of obesity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2024 May;80(5):669-676. doi: 10.1007/s00228-024-03646-0. Epub 2024 Feb 17. PMID: 38367045.
25. Lawrence MC. *Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures*. *Mol Metab*. 2021 Oct;52:101255. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101255. Epub 2021 May 13. PMID: 33992784; PMCID: PMC8513149.
26. Lee SH, Yoon KH. *A Century of Progress in Diabetes Care with Insulin: A History of Innovations and Foundation for the Future*. *Diabetes Metab J*. 2021 Sep;45(5):629-640. doi: 10.4093/dmj.2021.0163. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34610718; PMCID: PMC8497924.
27. Liu M, Weiss MA, Arunagiri A, Yong J, Rege N, Sun J, Haataja L, Kaufman RJ, Arvan P. *Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein*. *Diabetes Obes Metab*. 2018 Sep;20 Suppl 2(Suppl 2):28-50. doi: 10.1111/dom.13378. PMID: 30230185; PMCID: PMC6463291.
28. Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD. *Insulin structure and function*. *Biopolymers*. 2007;88(5):687-713. doi: 10.1002/bip.20734. PMID: 17410596.
29. Nielsen J. *Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering*. *Bioengineered*. 2013 Jul-Aug;4(4):207-11. doi: 10.4161/bioe.22856. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23147168; PMCID: PMC3728191.
30. Nishimura E, Pridal L, Glendorf T, Hansen BF, Hubálek F, Kjeldsen T, Kristensen NR, Lützen A, Lyby K, Madsen P, Pedersen TÅ, Ribøl-Madsen R, Stidsen CE, Haahr H. *Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal insulin analog designed for once-weekly dosing*. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021 Aug;9(1):e002301. doi: 10.1136/bmjdr-2021-002301. PMID: 34413118; PMCID: PMC8378355.

31. Norton L, Shannon C, Gastaldelli A, DeFronzo RA. *Insulin: The master regulator of glucose metabolism*. *Metabolism*. 2022 Apr;129:155142. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155142. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35066003.
32. Pounot K, Grime GW, Longo A, Zamponi M, Noferini D, Cristiglio V, Seydel T, Garman EF, Weik M, Foderà V, Schirò G. *Zinc determines dynamical properties and aggregation kinetics of human insulin*. *Biophys J*. 2021 Mar 2;120(5):886-898. doi: 10.1016/j.bpj.2020.11.2280. Epub 2021 Feb 3. PMID: 33545104; PMCID: PMC8008261.
33. Rosenstock J, Bain SC, Gowda A, Jódar E, Liang B, Lingvay I, Nishida T, Trevisan R, Mosenzon O; ONWARDS 1 Trial Investigators. *Weekly Icodec versus Daily Glargine U100 in Type 2 Diabetes without Previous Insulin*. *N Engl J Med*. 2023 Jul 27;389(4):297-308. doi: 10.1056/NEJMoa2303208. Epub 2023 Jun 24. PMID: 37356066.
34. Russell-Jones D, Babazono T, Cailleateau R, Engberg S, Irace C, Kjaersgaard MIS, Mathieu C, Rosenstock J, Woo V, Klonoff DC. *Once-weekly insulin icodec versus once-daily insulin degludec as part of a basal-bolus regimen in individuals with type 1 diabetes (ONWARDS 6): a phase 3a, randomised, open-label, treat-to-target trial*. *Lancet*. 2023 Nov 4;402(10413):1636-1647. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02179-7. Epub 2023 Oct 17. PMID: 37863084.
35. Simpson KL, Spencer CM. *Insulin aspart*. *Drugs*. 1999 May;57(5):759-65; discussion 766-7. doi: 10.2165/00003495-199957050-00013. PMID: 10353301.
36. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X. PMID: 15823385.
37. Shetty S, Suvarna R. *Efficacy and safety of once-weekly insulin icodec in type 2 diabetes: A meta-analysis of ONWARDS phase 3 randomized*

- controlled trials*. *Diabetes Obes Metab*. 2024 Mar;26(3):1069-1081. doi: 10.1111/dom.15408. Epub 2024 Jan 8. PMID: 38192022.
38. Soran H, Younis N. *Insulin detemir: a new basal insulin analogue*. *Diabetes Obes Metab*. 2006 Jan;8(1):26-30. doi: 10.1111/j.1463-1326.2005.00487.x. PMID: 16367879.
39. Subramanian S, Khan F, Hirsch IB. *New advances in type 1 diabetes*. *BMJ*. 2024 Jan 26;384:e075681. doi: 10.1136/bmj-2023-075681. Erratum in: *BMJ*. 2024 Jun 3;385:q1224. doi: 10.1136/bmj.q1224. PMID: 38278529.
40. Taha C, Klip A. *The insulin signaling pathway*. *J Membr Biol*. 1999 May 1;169(1):1-12. doi: 10.1007/pl00005896. PMID: 10227847.
41. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. *The cell biology of systemic insulin function*. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273-2289. doi: 10.1083/jcb.201802095. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29622564; PMCID: PMC6028526.
42. Vora J, Cariou B, Evans M, Gross JL, Harris S, Landstedt-Hallin L, Mithal A, Rodriguez MR, Meneghini L. *Clinical use of insulin degludec*. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Jul;109(1):19-31. doi: 10.1016/j.diabres.2015.04.002. Epub 2015 Apr 14. PMID: 25963320.
43. Willard DL, Stevenson M, Steenkamp D. *Type B insulin resistance syndrome*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2016 Aug;23(4):318-23. doi: 10.1097/MED.000000000000263. PMID: 27254267.
44. Wang Y, Hua S, Tian W, Zhang L, Zhao J, Zhang H, Zhang W, Xue F. *Mitogenic and anti-apoptotic effects of insulin in endometrial cancer are phosphatidylinositol 3-kinase/Akt dependent*. *Gynecol Oncol*. 2012 Jun;125(3):734-41. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.03.012. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22426488.

Sitografia

1. <https://www.siditalia.it/divulgazione/farmaci-oral>
2. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2013/20130121124986/anx_124986_it.pdf
3. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdiabete.arduanet.it%2Farea-scientifica%2F45-la-nuova-insulina-aspart-ultraveloce&psig=AOvVaw2F0f2Qe2uTfnyY6qjmzP-K&ust=1730972403669000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAMQjB1qFwoTCMCPuey0x4kDFQAAAAAdAAAAABAE>
4. <https://www.msmanuals.com/it/professionale>
5. <https://www.aifa.gov.it/>
6. <https://aemmedi.it/>
7. <https://www.iss.it/>
8. <https://www.focus.it/>
9. <https://www.portalediabete.org/>
10. <https://www.aboutpharma.com/>
11. <https://www.alamy.com/>
12. <https://diabete.arduanet.it/>
13. <https://pubmed.com>

14. <https://historyofinformation.com/detail.php?id=937>
15. <https://www.tga.gov.au/resources/auspmd/awiqli-insulin-icodec>
16. <https://pj.jiho.jp/article/250993>
17. <https://www.reuters.com/business/healthcare-pharmaceuticals/china-oks-novo-nordisks-type-2-diabetes-treatment-enter-its-market-2024-06-24/>
18. <https://www.siditalia.it/divulgazione/storia-del-diabete#:~:text=1936,di%20insulina%20ad%20azione%20intermedia>