

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN
INGEGNERIA BIOMEDICA

**Studio delle farmacocinetiche di
analoghi dell'insulina a diversa durata
d'azione**

Relatore:

PROF. ROBERTO VISENTIN

Laureando:

LUIGI PAMPANIN

2001391

Anno Accademico 2022/2023

Data di Laurea 28/09/2023

Abstract

Il diabete mellito è una malattia che colpisce una vasta parte della popolazione mondiale. Tale malattia, che si divide in tipo 1 e tipo 2, è caratterizzata da un eccesso di glucosio del sangue, detta iperglicemia, dovuta ad un'alterata quantità o funzione dell'insulina e che causa diversi sintomi anche molto gravi. Oltre ad accorgimenti su dieta e stile di vita, che possono arginare il problema, è stato necessario sviluppare dei trattamenti che andassero ad ottenere un controllo del livello glicemico nel sangue in modo tale da potere mantenere una qualità di vita alta, senza poter rinunciare alle proprie abitudini. Uno delle terapie per controllare il livello di glucosio nel sangue è l'utilizzo dell'insulina esogena o dei suoi analoghi, ovvero versioni sintetiche dell'ormone insulina, sviluppati per migliorare il controllo glicemico, ridurre il rischio di ipoglicemia e offrire una maggiore flessibilità nella somministrazione. Questa tesi si propone di studiare i vari analoghi dell'insulina amministrati per via sottocutanea, in particolare le categorie prandiali e basali (classificazione per durata), andando a studiarne i modelli di assorbimento sottocutaneo (di alcuni) e la farmacocinetica, ed in particolare alcuni parametri descrittivi come picco di concentrazione, tempo di picco, emivita e costante di eliminazione. Lo scopo di questa tesi è fare un'analisi comparativa dei diversi analoghi dell'insulina al fine di capire quali siano le combinazioni di analoghi per replicare al meglio il profilo insulinico di una persona sana.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Il diabete mellito	1
1.2	Terapia insulinica	4
1.2.1	Analoghi dell'insulina	5
1.3	Farmacocinetica dell'insulina	6
1.4	Scopo della tesi	6
2	Insuline prandiali	9
2.1	Insulina Lispro	10
2.2	Insulina Aspart	13
2.3	Insulina Glulisina	17
3	Insuline basali	19
3.1	Insuline long-acting	20
3.1.1	Insulina Glargine U100	20
3.2	Insuline ultra long-acting	24
3.2.1	Insulina Glargine U300	24
3.2.2	Insulina Degludec	25
3.3	Insuline once-weekly	30
3.3.1	Insulina BIF	30
3.3.2	Insulina Icodec	31
4	Analisi comparativa	35
4.1	Dataset	35
4.2	Parametri di farmacocinetica	36
4.2.1	Concentrazione massima	36
4.2.2	Tempo di picco	38
4.2.3	Emivita	38
4.2.4	Area sotto la curva	39

4.2.5	Tempo di azione	40
4.2.6	Costante di eliminazione	41
5	Risultati	45
5.1	Insuline prandiali	45
5.2	Insuline basali	47
6	Conclusioni	51

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Il diabete mellito

Il diabete mellito è una patologia cronica che impatta milioni di individui in tutto il mondo. Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2021 si stima che circa 422 milioni di persone nel mondo fossero affette da diabete [1], e le proiezioni suggeriscono un ulteriore aumento (Figura 1.1).

Questa condizione patologica si caratterizza per la presenza di livelli elevati di glucosio nel sangue, nota come iperglicemia, che può condurre a una serie di gravi problemi di salute se non gestita in modo adeguato.

Il diabete mellito è una malattia complessa che può manifestarsi in diverse tipologie, ognuna con cause e sintomi specifici. Di seguito, si esplorano i principali tipi di diabete, le loro cause e i sintomi associati:

- **Diabete di tipo 1:** Il diabete di tipo 1 è una forma autoimmune della malattia in cui il sistema immunitario attacca erroneamente e distrugge le cellule beta, prodotte dal pancreas nelle isole di Langerhans. e responsabili della produzione di insulina. L'insulina è un ormone vitale che ha un effetto ipoglicemizzante, in quanto va a inibire la produzione di glucosio a livello epatico e ne promuove la sua utilizzazione da parte dei muscoli e tessuti adiposi. La mancanza di insulina nel diabete di tipo 1 comporta un'iperglicemia cronica grave. Le cause esatte del diabete di tipo 1 non sono completamente comprese, ma fattori genetici e ambientali sembrano svolgere un ruolo nello sviluppo di questa malattia. I sintomi includono sete eccessiva, minzione frequente, affaticamento, perdita di peso non spiegata, visione offuscata e aumento dell'appetito.

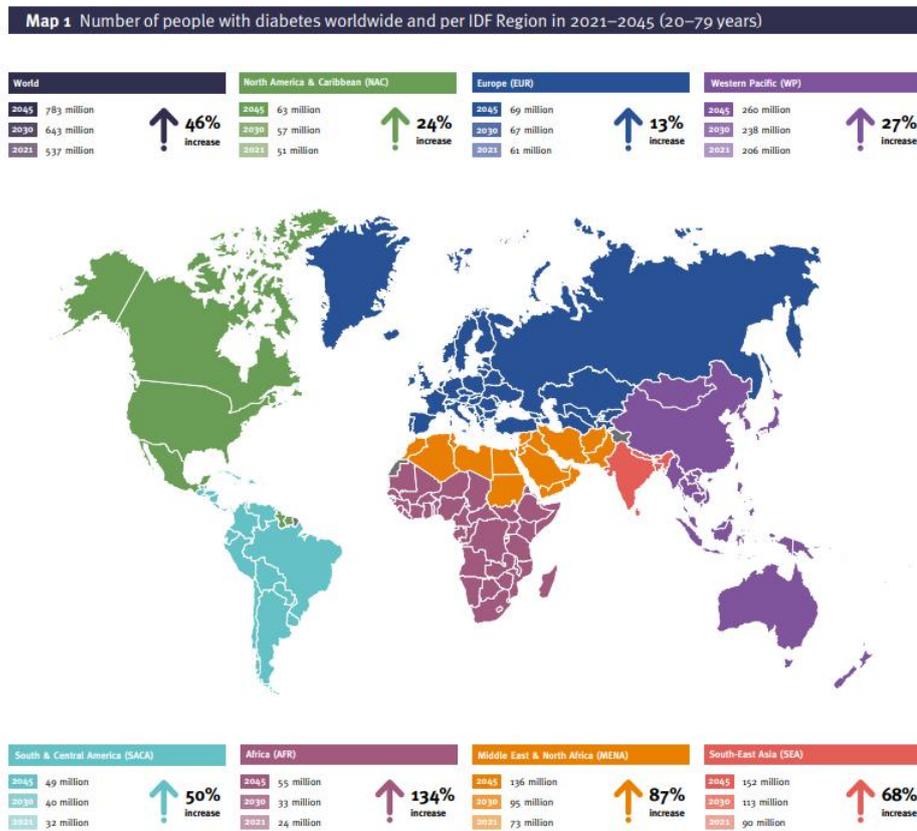


Figura 1.1: Proiezione dei casi di diabete nel mondo (2021-2045). [2]

- Diabete di tipo 2:** Il diabete di tipo 2 è il tipo più comune di diabete ed è spesso legato a fattori relativi allo stile di vita, come l'obesità, la sedentarietà e la scarsa attività fisica. Questa forma di diabete è caratterizzata da un'insulino-resistenza e una capacità ridotta da parte del pancreas nel produrre sufficiente insulina per compensare questa resistenza. I sintomi del diabete di tipo 2 possono includere sete eccessiva, minzione frequente, affaticamento, visione offuscata, ferite che guariscono lentamente e formicolio agli arti.
- Diabete gestazionale:** Il diabete gestazionale è una forma temporanea di diabete che si verifica durante la gravidanza. Le cause non sono del tutto chiare, ma si ritiene che le variazioni ormonali e i cambiamenti nella resistenza all'insulina siano coinvolti. Questo tipo di diabete può causare complicazioni durante la gravidanza e il parto, ma solitamente scompare dopo il parto. I sintomi possono includere sete eccessiva, minzione frequente e affaticamento.

- **Altri tipi di diabete:** Ci sono anche altre forme meno comuni di diabete, come il diabete monogenico, causato da mutazioni genetiche specifiche, e il diabete secondario, che può essere una conseguenza di altre condizioni come la pancreatite cronica o l'uso di farmaci. Le cause e i sintomi di questi tipi di diabete possono variare notevolmente in base alla condizione di base.

Per questa patologia non esiste tutt'ora una cura, dunque i soggetti malati devono ricorrere a trattamenti farmacologici al fine di ridurre il più possibile i sintomi legati alla patologia, soprattutto quelli più gravi.

Il trattamento del diabete mellito è vario e mira a mantenere i livelli di glucosio nel sangue in un range di normalità, per prevenire complicanze a lungo termine. I trattamenti per il diabete dipendono dal tipo specifico di diabete e dalle esigenze individuali del paziente. Le opzioni di trattamento più comuni sono le seguenti:

- **Terapia insulinica:** Questo trattamento è essenziale per le persone con diabete di tipo 1, in cui il pancreas non produce insulina. Tuttavia, alcune persone con diabete di tipo 2 possono ricorrere all'uso di insulina nel caso in cui gli altri trattamenti non riescano a fornire un adeguato controllo glicemico. Esistono diverse vie di somministrazione di insulina, tuttavia la più comune risulta l'iniezione sottocutanea tramite penne o microinfusori.
- **Farmaci orali:** Nel caso del diabete di tipo 2, i farmaci orali possono essere prescritti per migliorare la sensibilità insulinica o per stimolare il pancreas a produrre più insulina. Questi farmaci possono essere usati da soli o in combinazione tra loro o con l'insulina.
- **Terapia con iniezioni non insuliniche:** Alcuni farmaci, come i cosiddetti analoghi del GLP-1, possono essere somministrati tramite iniezioni per aiutare a controllare i livelli di glucosio nel sangue. Questi farmaci lavorano rallentando l'assorbimento del cibo nello stomaco e stimolando la produzione di insulina in modo più naturale.
- **Controllo della Dieta:** Una dieta equilibrata è fondamentale per il controllo del diabete. I pazienti spesso lavorano con dietisti per pianificare pasti che mantengano stabili i livelli di glucosio nel sangue. Questo può includere il monitoraggio delle porzioni di carboidrati, il controllo delle calorie e l'attenzione alla scelta degli alimenti.

- **Esercizio fisico:** L'attività fisica regolare può contribuire significativamente a migliorare la sensibilità all'insulina e a ridurre i livelli di zucchero nel sangue. Un programma di esercizi personalizzato dovrebbe essere parte integrante del piano di trattamento.
- **Monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue:** La misurazione regolare dei livelli di glucosio nel sangue è essenziale per adattare il trattamento in base alle esigenze individuali. Questo può essere fatto tramite dispositivi portatili di monitoraggio continuo dei livelli di glucosio.
- **Interventi chirurgici:** In alcuni casi gravi di obesità e diabete di tipo 2, il chirurgo può raccomandare interventi di chirurgia bariatrica, come il bypass gastrico, per aiutare a migliorare il controllo del diabete.

Questa tesi si concentra sulla terapia insulina, in particolare sull'uso degli analoghi dell'insulina, che si è dimostrato tra i trattamenti più efficaci e cruciali per il diabete mellito, soprattutto quello di tipo 1.

1.2 Terapia insulinica

Il trattamento insulinico è una componente chiave nella gestione del diabete. Come riportato precedentemente, nel diabete di tipo 1, il pancreas non produce sufficiente insulina, mentre nel diabete di tipo 2, le cellule diventano resistenti all'azione dell'insulina. Il trattamento insulinico prevede quindi l'impiego di insulina esogena, somministrata tramite iniezioni sottocutanee o pompe insuliniche. Questo aiuta a mantenere il controllo dei livelli di glucosio nel sangue, evitando sintomi gravi e complicanze a lungo termine, come danni ai vasi sanguigni, agli occhi, ai reni e ai nervi. L'obiettivo del trattamento insulinico è di mimare il più possibile la naturale secrezione di insulina, adattandola alle esigenze individuali del paziente in termini di dieta, esercizio fisico e livelli di glucosio nel sangue. Un adeguato monitoraggio e l'aderenza alle prescrizioni mediche sono fondamentali per un trattamento efficace e una vita sana per chi vive con il diabete. Negli ultimi anni, sono state sviluppate diverse varianti di insulina, tra cui quelle ad azione rapida, ritardata e intermedia, dette analoghi dell'insulina. Questa vasta gamma di opzioni ha permesso di pianificare terapie insuliniche altamente personalizzate che possono coprire le esigenze giornaliere dell'individuo senza la necessità di iniezioni notturne o programmate prima dei pasti.

1.2.1 Analoghi dell'insulina

Gli analoghi dell'insulina sono stati proposti come alternativa alla regular human insulin (RHI) nel trattamento del diabete sia di tipo 1 che di tipo 2, poiché più capaci di replicare il profilo insulinico fisiologico di una persona sana (Figura 1.2).

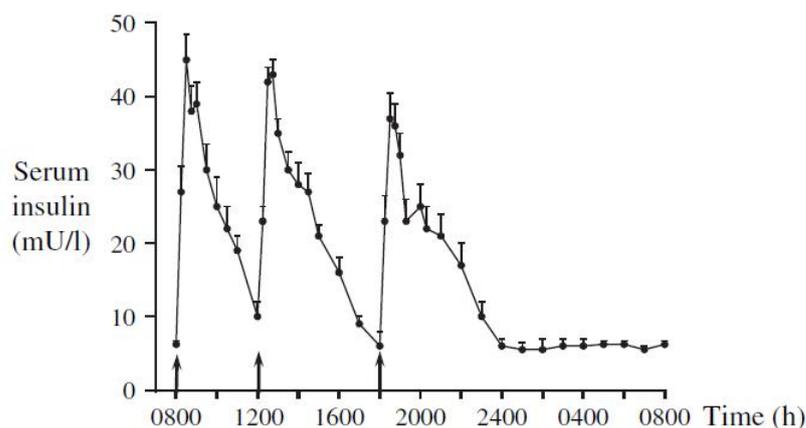


Figura 1.2: Profilo fisiologico della concentrazione dell'insulina in un soggetto sano. Le frecce indicano l'avvenimento del pasto. [24]

Grazie all'avvento della tecnologia del DNA ricombinante, che ha consentito dapprima di produrre insulina umana biosinteticamente, è stato possibile modificare la molecola del RHI al fine di avere un vantaggio a livello terapeutico e fisiologico. In particolare, ne è stata modificata la struttura, poiché, grazie alle scoperte della sequenza amminoacidica dell'insulina, della sua struttura tridimensionale e allo sviluppo della radioimmunoassay, è stato possibile intuire la forte relazione tra struttura dell'insulina e il suo profilo fisiologico d'azione. Inoltre, la scoperta dei recettori dell'insulina e della loro interazione con quest'ultima ha permesso di capire le possibili modifiche da apportare alla struttura per ottenere dei benefici terapeutici. Sono stati sviluppati diversi tipi di analoghi dell'insulina, che hanno conquistato sempre più quote di mercato dalla loro introduzione, essendo stati ed essendo tutt'ora la prima scelta sia dei pazienti che del personale medico per i regimi disegnati per il possibile miglior controllo glicemico con il minor numero di effetti controindicativi.

Gli analoghi creati possono essere divisi in più macrocategorie in base alla loro farmacocinetica e farmacodinamica, che ne determina la funzione all'interno del regime di controllo glicemico.

Gli analoghi rapidi, detti prandiali, sono stati sviluppati per ottenere una risposta glicemica simile a quella fisiologica dopo un pasto. Viceversa, gli analoghi lenti (o ultra-lenti come le insuline settimanali), detti basali, offrono una

concentrazione dell'insulina che replica il livello base e costante di concentrazione sempre presente nel corpo di una persona non affetta da diabete (Figura 1.3).

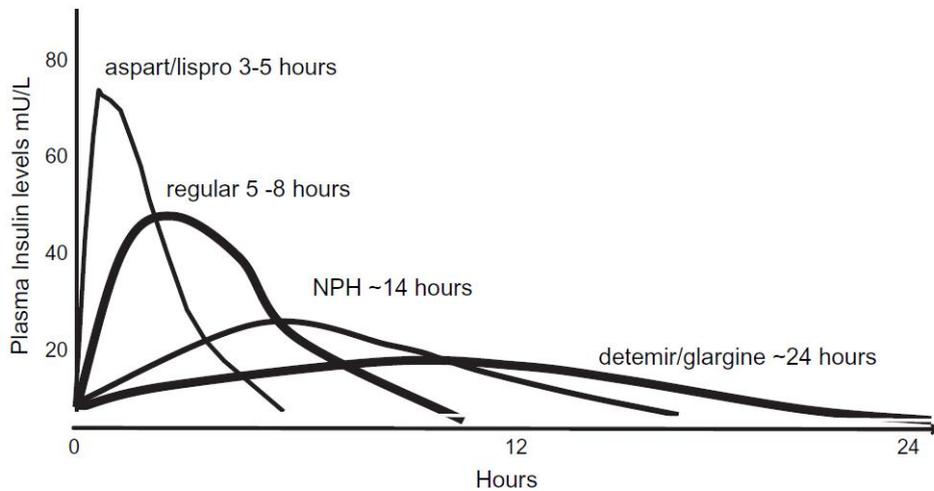


Figura 1.3: Profili farmacocinetici di insuline prandiali e basali. [11]

1.3 Farmacocinetica dell'insulina

La farmacocinetica dell'insulina si riferisce allo studio dei processi attraverso i quali questo importante ormone viene assorbito, distribuito, metabolizzato ed eliminato dall'organismo. Comprendere la farmacocinetica dell'insulina è cruciale poiché questa molecola è fondamentale per il controllo dei livelli di glucosio nel sangue nei pazienti con diabete mellito. Studiare la farmacocinetica dell'insulina attraverso l'analisi di indici fornisce informazioni preziose sulla sua biodisponibilità, la sua metabolizzazione e eliminazione. Inoltre, lo sviluppo di modelli matematici avanzati può aiutare a predire in modo più preciso come l'insulina si comporterà nell'organismo in diverse situazioni, consentendo una migliore gestione del diabete e una riduzione del rischio di complicazioni.

1.4 Scopo della tesi

Questa tesi mira a condurre un'analisi dettagliata e approfondita della farmacocinetica di una gamma diversificata di analoghi dell'insulina. L'analisi farmacocinetica, infatti, permette di studiare come un farmaco si distribuisce all'interno dell'organismo (e come quest'ultimo agisce sul farmaco stesso), permettendo di quantificare una serie di caratteristiche chiave, come il picco di concentrazione,

la durata d'azione e altre variabili fondamentali. L'obiettivo principale di questa ricerca è fornire una visione completa e informativa delle differenze sostanziali tra gli analoghi di insulina ad oggi maggiormente impiegati, in modo da poter ottimizzare, anche in una prospettiva puramente teorica, la terapia insulinica per i pazienti affetti da diabete, adattando il trattamento alle esigenze specifiche di ciascun soggetto. Tale approccio alla gestione del diabete potrebbe comportare benefici significativi in termini di benessere e qualità della vita per gli individui affetti da questa condizione cronica. Non solo consentirebbe di migliorare il controllo dei livelli di glucosio nel sangue, ma potrebbe anche ridurre al minimo il rischio di complicazioni associate al diabete, come le malattie cardiovascolari, le neuropatie e le nefropatie. Inoltre, l'analisi comparativa della farmacocinetica degli analoghi dell'insulina ha il potenziale per diventare uno strumento prezioso nella pratica clinica. Fornendo ai medici una comprensione più approfondita delle caratteristiche di ciascun analogo, può aiutarli a prendere decisioni terapeutiche più informate e personalizzate per i loro pazienti. Questo non solo migliora l'efficacia della terapia, ma anche la sicurezza, riducendo il rischio di episodi ipoglicemici o altre reazioni avverse legate all'insulina. I capitoli seguenti forniscono dapprima una panoramica dei principali analoghi di insulina prandiali (Capitolo 2) e basali (Capitolo 3), successivamente presentano la metodologia di analisi di farmacocinetica condotta (Capitolo 4) e i risultati ottenuti (Capitolo 5).

Capitolo 2

Insuline prandiali

I primi analoghi dell'insulina ad essere sintetizzati e commercializzati sono state le insuline prandiali, farmaci rapidi nel loro meccanismo di azione. Infatti, le insuline fino ad allora sviluppate, non riuscivano a consentire un efficace controllo glicemico: l'insulina regolare umana (regular human insulin, RHI) somministrata in modo sottocutaneo raggiungeva il picco massimo di concentrazione dopo circa 2 ore dall'iniezione e la sua azione, che durava diverse ore, poteva portare ad iperinsulinemia postprandiale con conseguenti episodi di ipoglicemia [24]. Il lento assorbimento della RHI è da attribuire al fatto che gli atomi di zinco aggiunti alla soluzione dei dimeri che compongono l'insulina regolare tendono a far aggregare le molecole formando i cosiddetti esameri. L'ingombro di queste strutture ne rende la diffusione nella circolazione molto lenta. Viceversa, strutture dimeriche e monomeriche dell'insulina vengono assorbite molto più velocemente (Figura 2.1).

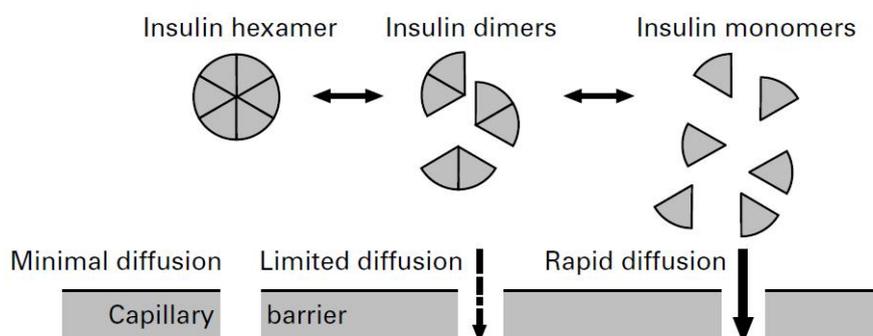


Figura 2.1: Schema di diffusione dell'insulina. Le molecole dell'insulina in forma di monomeri, dimeri ed esameri e la loro velocità di diffusione. [12]

L'obiettivo dello sviluppo di insuline rapide è stato quindi quello di modifi-

care parti della struttura insulinica in modo tale da promuovere la formazione di monomeri. In particolare, è stata modificata quella porzione della molecola dell'insulina che media la formazione dei dimeri e quindi degli esameri ma che non è critica per i legami con i recettori dell'insulina, ovvero la porzione B26-30 (Figura 2.2).

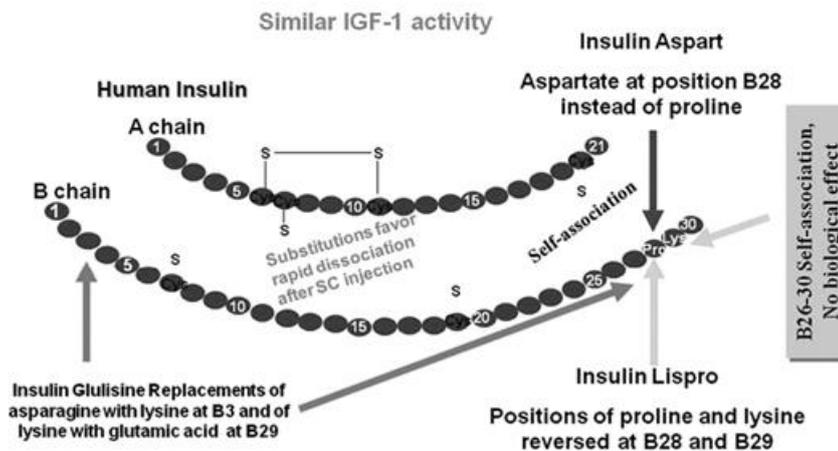


Figura 2.2: Modificazioni della struttura molecolare dell'insulina negli analoghi prandiali. [24]

Sono stati sviluppati diversi analoghi rapidi somministrati per via sottocutanea con diverse strutture ma con simile farmacocinetica e farmacodinamica. In questo capitolo, viene riportata una descrizione dettagliata delle insuline Lispro, Aspart e Glulisina.

2.1 Insulina Lispro

L'insulina lispro è un analogo di insulina sviluppato nel 1996, prodotto e commercializzato dalla Eli Lilly and Company (Indianapolis, US) con il nome commerciale di "Humalog". Il suo impiego come trattamento terapeutico è approvato sia negli Stati Uniti che in Europa.

L'analogo differisce dalla RHI poiché si dissocia velocemente in monomeri nel tessuto sottocutaneo. Questa sua capacità è data dalla sua struttura, che si basa su alcune sostituzioni della molecola dell'insulina umana: nell'insulina lispro (insulina umana Lys^{B28} , Pro^{B29}), la sequenza naturale di prolina nella posizione B28 e lisina nella posizione B29 viene invertita (Figura 2.3). Questa inversione porta a un cambiamento conformazionale nell'estremità C-terminale della catena B, che ostacola stericamente la capacità dei monomeri di insulina di

formare dimeri. Di conseguenza, la costante di associazione dei dimeri è ridotta di un fattore di 300 rispetto a quella dell'insulina regolare [12].

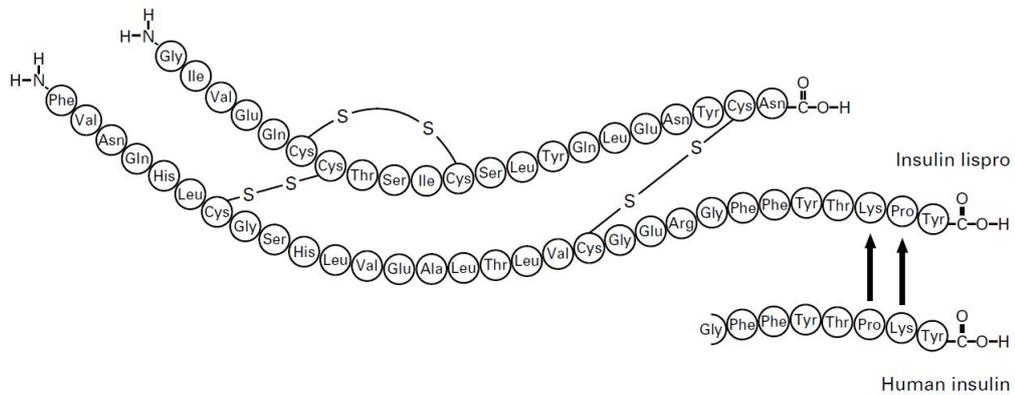


Figura 2.3: La sequenza amminoacidica dell'insulina lispro. [12]

L'affinità dell'insulina lispro per i recettori insulinici è simile a quella della RHI, in quanto lo scambio nella sequenza di prolina e lisina e il cambiamento conformazionale risultante non influenzano il receptor-binding domain. Inoltre, non sono state trovate differenze per quanto riguarda la propensione a reazioni allergiche, eventi avversi e valori di laboratorio anormali [12]. L'immunogenicità dell'insulina lispro è simile a quella dell'insulina regolare. Negli studi in cui è stata analizzata questa caratteristica, è stata osservata una frequenza leggermente più alta di induzione di anticorpi contro l'insulina nei pazienti che utilizzavano l'insulina lispro rispetto a quelli che usavano RHI. Tuttavia, questa differenza era significativa solo nei pazienti affetti da diabete mellito non insulino-trattato dopo sei mesi di trattamento; dopo un anno, la percentuale di pazienti con anticorpi era simile nei due gruppi [12]. Gli anticorpi specifici contro l'insulina lispro si sviluppano raramente, e la formazione di anticorpi non ha influenzato i requisiti di dose di insulina. Ci sono diversi casi riportati di pazienti nei quali la resistenza grave mediata dagli anticorpi contro l'insulina umana regolare è stata trattata con successo passando all'insulina lispro [12].

Modello matematico di assorbimento dell'insulina Lispro Un modello matematico capace di descrivere l'assorbimento sottocutaneo di insulina lispro, ovvero un processo complesso influenzato da molti fattori tra cui lo stato di associazione dell'insulina, risulta potenzialmente utile per ottimizzare la terapia al paziente in modo tale da migliorarne il controllo glicemico, e per sviluppare e testare nuove strategie open e closed-loop di trattamento insulinico.

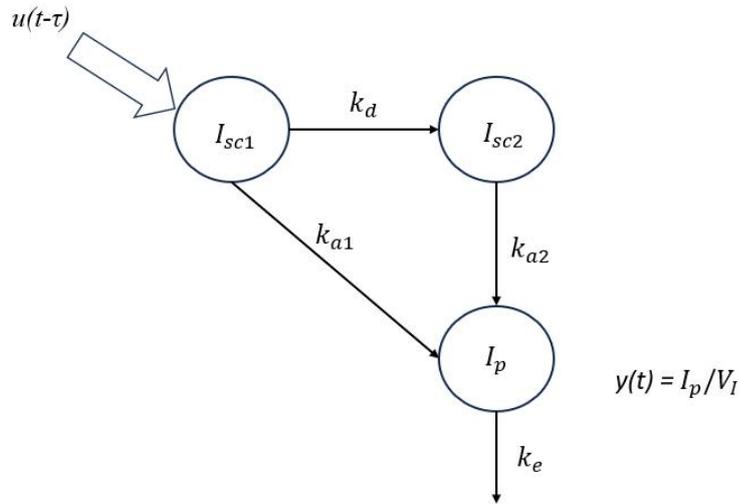


Figura 2.4: Modello di assorbimento sottocutaneo di insulina lispro [22]. I segnali u e y rappresentano rispettivamente l'amministrazione sottocutanea di insulina e la concentrazione plasmatica di insulina.

In questa tesi, viene presentato un modello matematico presente in letteratura [22]. Tale modello è caratterizzato da due vie di assorbimento sottocutaneo di insulina indipendenti (processi diffusivi) che passano attraverso rispettivamente uno e due compartimenti e una costante di degradazione locale al sito di iniezione (Figura 2.4).

Il modello include un ritardo soggetto-specifico (τ) di apparizione di insulina nel primo compartimento, che rappresenta l'insulina in uno stato non monomero. Il modello è a priori non univocamente identificabile, cioè esiste un numero finito di soluzioni. Dal primo compartimento, l'insulina è parzialmente assorbita nel plasma a una velocità costante k_{a1} mentre la restante porzione, che rappresenta l'insulina monomero, diffonde nel secondo compartimento ad un rate k_d e viene poi assorbita nel plasma ad una velocità k_{a2} . La cinetica dell'insulina plasmatica è poi descritta da un singolo compartimento lineare, un'approssimazione ragionevole in caso di insulina nei range fisiologici (sotto le $250 \mu\text{U}/\text{mL}$), dove i parametri descrittivi sono il volume di distribuzione V_I (L/kg) e la clearance k_e (min^{-1}), che rappresenta la velocità di eliminazione dell'insulina dal plasma.

Il modello è descritto dal seguente sistema di equazioni differenziali 2.1:

$$\begin{cases} \dot{I}_{sc1} = -(k_{a1} + k_d) I_{sc1} + u(t - \tau) \\ \dot{I}_{sc2} = -k_{a2} I_{sc2} + k_d I_{sc1} \\ \dot{I}_p = -k_e I_p + k_{a1} I_{sc1} + k_{a2} I_{sc2} \end{cases} \quad (2.1)$$

dove I_{sc1} e I_{sc2} rappresentano i due compartimenti sottocutanei, I_p il compartimento plasmatico e u la dose in ingresso. Tale modello è stato identificato su dati di concentrazione di insulina misurati in 38 soggetti sottoposti a iniezione sottocutanea di 0.2 U/kg .

Il modello è stato identificato a partire dai dati di concentrazione plasmatica di insulina tramite un estimatore Bayesian Maximum a Posteriori (MAP). Inoltre, tutti i campioni al di sotto del limite di quantificazione (BQL) sono stati impostati a zero e considerati con varianza infinita, quindi non considerati nella funzione obiettivo. La condizione iniziale dei compartimenti sottocutanei dell'insulina è stata impostata a zero poiché la somministrazione sottocutanea di insulina è stata interrotta da un giorno, per le insuline a lunga durata, fino a 6 ore prima dell'esperimento, per le insuline ad azione rapida. La condizione iniziale del compartimento plasmatico è stata impostata uguale alla concentrazione plasmatica di insulina misurata prima dell'iniezione sottocutanea, poiché l'insulina è stata somministrata per via endovenosa (insieme al glucosio, se necessario) per 4 ore prima dell'esperimento per raggiungere il livello desiderato di glucosio.

I parametri del modello sono stati stimati con precisione, come riportato in Tabella 2.1. In particolare, i parametri k_d e k_{a2} erano virtualmente identici nel 25% dei soggetti, il parametro k_d era virtualmente uguale alla somma di k_{a2} e k_{a1} nel 19% dei soggetti, i parametri k_{a1} e k_{a2} erano virtualmente zero nel 77% e nel 5% dei soggetti, rispettivamente. Solo in tre casi, su 116 soggetti, alcuni parametri sono stati stimati con $CV > 100\%$ (ma inferiori al 120%): un soggetto per k_{a1} , uno per k_d e uno per τ . Tutte le stime dei parametri rientrano nei limiti fisiologicamente plausibili: in mediana, è stato riportato un ritardo specifico del soggetto di 7,6 minuti, mentre un valore piccolo, pari a $0,0034 \text{ min}^{-1}$, è stato riportato per il parametro k_{a1} (stimato nel 23% dei soggetti), e una costante di velocità pari a $0,028 \text{ min}^{-1}$, $0,014 \text{ min}^{-1}$, è stata riportata per k_d e k_{a2} , rispettivamente.

V_I (L/kg)	k_e (min^{-1})	k_d (min^{-1})	k_{a1} (min^{-1})	k_{a2} (min^{-1})	τ (min)
0.126	0.124	0.028	0.0034	0.014	7.6

Tabella 2.1: Valori medi delle stime dei parametri del modello che descrive i dati (lispro).

2.2 Insulina Aspart

Il secondo analogo prandiale presentato è l'insulina Aspart (IAsp). Questa forma modificata di insulina è stata realizzata da un team di ricercatori della Novo

Nordisk (luogo della sede) nel corso degli anni '90 con l'obiettivo di migliorare l'efficacia dell'insulina e la sua capacità di controllare i livelli di glucosio nel sangue in modo più preciso.

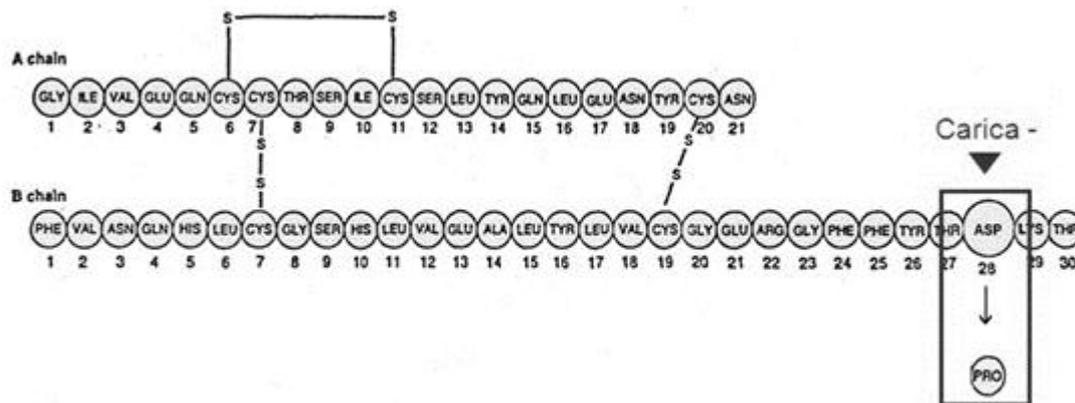


Figura 2.5: La sequenza amminoacidica dell'insulina Aspart. [13]

Le modifiche apportate sulla RHI, ossia la sostituzione dell'amminoacido prolina nella catena B con aspartato (Figura 2.5), hanno come effetto quello di ridurre la tendenza delle molecole di insulina ad auto-associarsi per formare degli esameri. Non intaccando il receptor-binding domain, e come dimostrato da test preclinici, le proprietà chimiche e biologiche dell'insulina Aspart sono simili in termini di caratteristiche di legame insulina/IGF-1 receptor [18]. Anche in termini di potenza del glucose-lowering effect è stata dimostrata la loro similarità. L'insulina IAsp differisce quindi solo nel tempo di onset, molto minore rispetto a quello della RHI, e nel suo picco massimo che risulta essere molto maggiore (Figura 2.6).

Anche l'immunogenicità risulta essere simile. In uno studio riguardante l'immunogenicità è risultato che il legame specifico degli anticorpi con IAsp e HI regolari è rimasto relativamente basso (<1,5% di legame dell'anticorpo specifico) in media durante l'intero studio [18]. Aumenti nel legame degli anticorpi a reattività incrociata sono stati osservati in precedenza nei pazienti trattati con IAsp e HI in uno studio controllato di 12 mesi su soggetti affetti da diabete di tipo 1. Tuttavia, l'aumento del legame degli anticorpi a reattività incrociata a 3 mesi è stato transitorio e ha raggiunto valori prossimi alla normalità entro i 12 mesi. Nonostante la ragione dell'aumento degli anticorpi specifici sia sconosciuta, l'aumento degli anticorpi non è stato accompagnato da un peggioramento del controllo glicemico e non ha richiesto un aumento della dose di insulina per mantenere il controllo glicemico per questi soggetti [18].

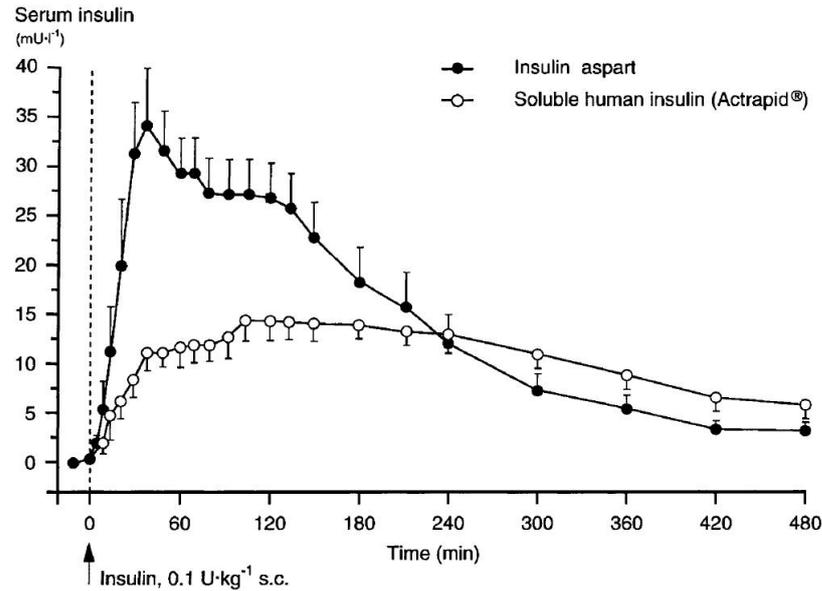


Figura 2.6: Confronto profili di insulina IAsp e RHI. [13]

Modello matematico di assorbimento dell'insulina Aspart Una modellizzazione matematica efficace della farmacocinetica dell'infusione sottocutanea dovrebbe aiutare la comprensione e il controllo nella terapia insulinica.

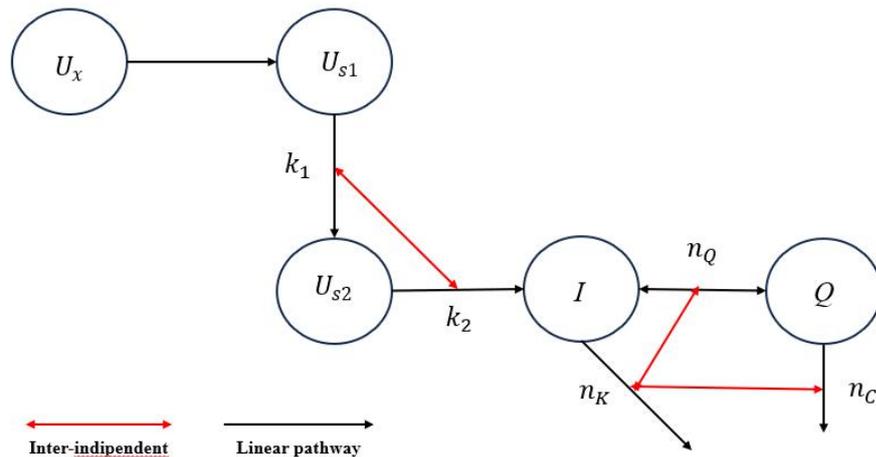


Figura 2.7: Modello di assorbimento sottocutaneo di insulina Aspart [16].

Il modello [16] presenta due compartimenti sottocutanei (U_{s1} , U_{s2}) attraverso cui passa l'insulina, iniettata dal compartimento U_x (pompa insulinica) con stesso rate (k_{12}), un singolo compartimento plasmatico (I) e viene inoltre introdotto un compartimento interstiziale (Q). L'insulina è eliminata a livello epatico e renale

dal plasma (n_L) e anche nell'interstizio (n_C) (Figura 2.7). Diverse funzioni correlano i rate di trasporto e di clearance tra interstizio e plasma e solo la clearance interstiziale è identificata insieme ai parametri dei rate SC. I due compartimenti sottocutanei sono così modellizzati (2.2):

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{U}_{sc1}(t) = U_x(t) - k_1 \cdot U_{s1} - \frac{k_2 \cdot U_{s1}(t)}{1 + \alpha_U \cdot U_{s1}(t)} \\ \dot{U}_{sc2}(t) = -k_2 \cdot U_{s2} - \frac{k_2 \cdot U_{s1}(t)}{1 + \alpha_U \cdot U_{s1}(t)} \\ \dot{U}_{ST} = k_1 \cdot U_{s1}(t) + k_2 \cdot U_{s2}(t) \end{array} \right. \quad (2.2)$$

dove k sono i termini per indicare i rates di trasferimento (min^{-1}), α_U satura il rate di trasferimento tra U_{s1} e U_{s2} (mU^{-1}) e \dot{U}_{ST} è il rate di trasporto di tutti gli stati insulinici dalla sottocute al plasma ($mU^{-1}min^{-1}$).

L'insulina passata nel plasma diffonde poi tra questo compartimento e l'interstizio; in entrambi avviene l'eliminazione dell'insulina. Le dinamiche del plasma e dell'interstizio sono descritte dalle seguenti equazioni (2.3):

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{I}(t) = \frac{\dot{U}_{ST}(t)}{V_I} - (n_K + n_Q + \frac{n_L}{1 + \alpha_I \cdot I(t)}) \cdot I(t) \\ \dot{Q}(t) = n_Q \cdot \frac{V_I}{V_Q} \cdot (I(t) - Q(t)) - n_C \cdot Q(t) \end{array} \right. \quad (2.3)$$

dove n_K è il coefficiente di clearance renale (min^{-1}), n_L il coefficiente di clearance epatica (min^{-1}) che è saturato da α_I ($L \cdot mU^{-1}$), n_C è la clearance interstiziale (min^{-1}), n_Q indica il rate di trasporto plasma-interstizio (min^{-1}), V_I e V_Q rispettivamente volume di distribuzione del plasma e dell'interstizio.

La stima dei parametri è stata risolta come non-linear least squares problem usando il metodo Levenberg–Marquardt e la mediana dei risultati è stata 24.7 per n_C e 16.3 per k_{12} (Tabella 2.2). R^2 è risultato essere 0.85 (min=0.53 max=0.92 negli altri modelli) dimostrando quindi un'elevata bontà del fit e l'AIC, che valuta il trade-off tra capacità di fitting e complessità è stato calcolato essere 101 (mediana, min=91.8 max=122). Anche la visualizzazione dei residui ha dimostrato una elevata bontà del fit, così come la media degli errori residui assoluti (2.07, min=2.07 max=5). Infine, anche la simulazione bootstarp ha rivelato la robustezza del modello tramite il calcolo dei coefficienti di variazione dei parametri: 0.6 e 1.7 rispettivamente.

n_c (min^{-1})	k_{12} (min^{-1})
24.7	16.3

Tabella 2.2: Valori medi delle stime dei parametri del modello proposto che descrive i dati di aspart.

2.3 Insulina Glulisina

L'insulina glulisina è il più recente analogo di insulina rapida ad aver ricevuto l'approvazione dalla Food and Drug Administration e dall'European Agency for Evaluation of Medicine Products per il trattamento del diabete.

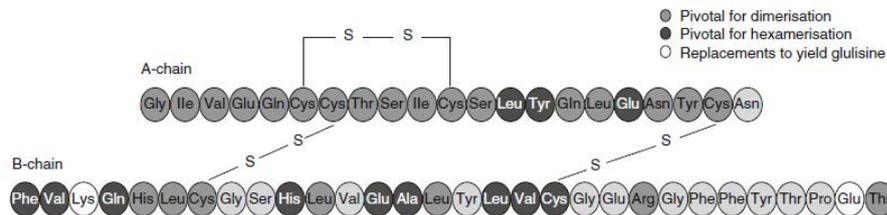


Figura 2.8: La sequenza amminoacidica dell'insulina glulisina. [4]

L'insulina glulisina differisce dalla RHI per la sostituzione degli amminoacidi alla posizione 3 e 29 della catena B (3B-Asp \rightarrow 3B-Lys and 29B-Lys \rightarrow 29B-Glu). Lo scambio di 29B-Lys con 29B-Glu indebolisce l'auto-associazione dei monomeri consentendo comunque la formazione di dimeri, rendendo così la sua azione più rapida di quella della RHI, e simultaneamente limita la flessibilità del tratto terminale C a foglietto β legandosi all'1-Gly (Figura 2.8). Insieme, queste caratteristiche rendono l'insulina glulisina in soluzione meno sensibile alla denaturazione, che si verifica quando i monomeri di insulina si dispiegano [4]. Come altre analoghe dell'insulina ad azione rapida, l'insulina glulisina forma aggregati di ordine superiore fino a esameri T6 in presenza di zinco, ma non mostra ulteriori cambiamenti conformazionali verso gli esameri più compatti R6 indotti dagli eccipienti fenolici (fenolo, m-cresolo) a causa della sostituzione di 3B-Asp con 3B-Lys. Inoltre, il punto isoelettrico (pI) è ridotto a 5.1, aumentando la solubilità a un pH fisiologico. Ancora, la tendenza ad esistere come dimeri più stabili a concentrazioni farmaceutiche e quindi come monomeri più stabili permette all'insulina glulisina di soddisfare i requisiti farmaceutici senza l'aggiunta di zinco ottenendo così una pratica shelf-life [4].

Le modifiche apportate alla struttura amminoacidica non comporta alcuna differenza nell'associazione insulina-recettore, come stato osservato in molti studi [4]. Inoltre, comparato alla RHI, l'insulina glulisina promuove un'attività mito-

genica simile in quanto il legame dell'analogo con il recettore IGF-1, responsabile di questa attività, risulta essere simile a quello dell'insulina umana. Infine, per quanto concerne la tollerabilità, nei paziente diabetici di tipo 1 e 2 l'insulina glulisina è ben tollerata come l'RHI e l'insulina lispro così come l'incidenza di seri eventi avversi non differisce tra i diversi trattamenti: il 14.9% nei pazienti trattati con la glulisine rispetto al 14.8% nei pazienti trattati con RHI (dati studio FDA) [21].

Capitolo 3

Insuline basali

Le insuline basali sono un tipo di insulina a lunga durata d'azione utilizzate nel trattamento del diabete mellito. Queste insuline sono progettate per fornire una copertura costante e stabile dei livelli di glucosio nel sangue durante tutto il giorno, in particolare nelle fasi distanti dai pasti e durante la notte. Idealmente le insuline basali dovrebbero replicare la secrezione di insulina di un pancreas sano durante la giornata, che durante una fase di digiuno produce circa 0.5/1 unità di insulina all'ora [5]. Infatti, a differenza delle insuline prandiali, che agiscono rapidamente ma per un breve periodo di tempo, le insuline basali hanno una durata d'azione prolungata che può andare da un minimo di 12-24 ore fino a diversi giorni, a seconda del tipo di insulina e della persona. Queste insuline aiutano a mantenere i livelli di glucosio nel sangue in un range di normalità e a ridurre periodi prolungati di iperglicemia. Sono un elemento cruciale nel regime terapeutico dei pazienti con diabete, poiché contribuiscono a controllare efficacemente la malattia e a prevenire complicazioni a lungo termine associate al diabete.

Così come per le insuline prandiali, le insuline basali sono ottenute partendo dalla RHI e modificandone la struttura amminoacidica (Figura 3.1) in diverse modalità al fine di ricreare una cinetica insulinica il più possibile costante, priva di picchi e duratura.

Negli ultimi decenni, sono stati fatti significativi progressi nello sviluppo delle insuline basali: partendo dalle insuline a durata intermedia come la NPH (Protamina Neutra Hagedorn), con una durata di 12-16 ore, si è passati a insuline a lunga durata d'azione come Glargine 100 U/mL (Gla-100, Lantus, Sanofi) e Detemir (Levemir, Novo Nordisk), con una durata di circa 20-24 ore, insuline ultra-lunghe, come Glargine 300 U/mL (Gla-300, Toujeo, Sanofi) e Degludec (Tresiba, Novo

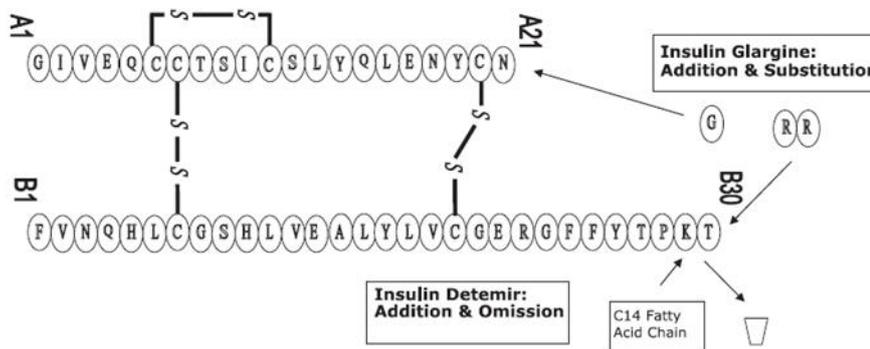


Figura 3.1: Alcune insuline basali: modificazioni struttura. [11]

Nordisk), con una durata superiore alle 24 ore e, più recentemente, alle insuline ad azione settimanale (once weekly) attualmente prodotte da Novo Nordisk e Lilly. Di seguito vengono analizzate tre diverse macrocategorie di insuline basali, classificate in base alla loro durata d'azione: insuline lente, ultra-lente e once weekly insulin (OWI).

3.1 Insuline long-acting

3.1.1 Insulina Glargine U100

L'introduzione dell'insulina Glargine (nome commerciale Lantus), è un analogo dell'insulina ricombinante con durata di azione fino a 24 ore e assenza di picco pronunciato. Grazie alla sua approvazione da parte della FDA nell'Aprile del 2000, essa ha rappresentato all'inizio del secolo un'alternativa più conveniente all'insulina umana NPH.

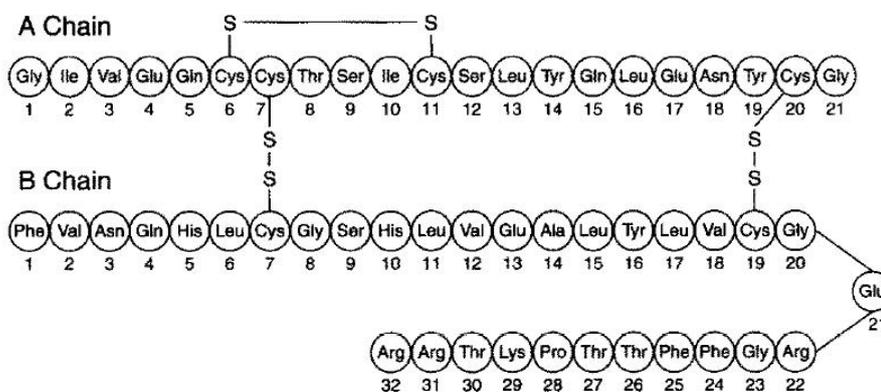


Figura 3.2: Struttura dell'insulina Glargina. [5]

Le sue caratteristiche farmacocinetiche sono ottenute attraverso la modificazione della struttura amminoacidica della RHI. Differisce dall'insulina umana per la sostituzione dell'aminoacido glicina con l'asparagina nella posizione A21 e l'aggiunta di 2 arginine alla terminazione carbossilica (posizione B30) della catena B (Figura 3.2). L'insulina Glargine è sintetizzata mediante tecnologia del DNA ricombinante utilizzando un ceppo di laboratorio non patogeno di *Escherichia coli* (K12) DNA plasmidio e viene commercializzata dissolta in una soluzione trasparente alla concentrazione di 100 U/mL (da cui la nomenclatura Glargine U100). Queste modifiche alla molecola di insulina spostano il punto isoelettrico da un pH di 5.4 a un pH quasi neutro di 6.8, rendendo la molecola di insulina Glargine più solubile a pH leggermente acido e meno solubile a pH fisiologico rispetto alla molecola di insulina nativa [5]. Quando l'insulina Glargine viene iniettata nello spazio sottocutaneo fisiologicamente neutro (pH 7.4) come soluzione trasparente (pH 4.0), la soluzione viene neutralizzata e l'insulina Glargine precipita nei tessuti sottocutanei. La formazione di microprecipitati ritarda l'assorbimento dell'insulina Glargine dal sito di iniezione e ne prolunga la durata d'azione. L'aggiunta di zinco come agente esamero-stabilizzante (e al fine di migliorare la conservazione del farmaco) ritarda ulteriormente l'inizio dell'azione e aumenta la durata dell'azione in modo dipendente dalla concentrazione fino a 24 ore. Il risultato è un profilo di azione relativamente piatto nel corso di 24 ore, senza picco pronunciato, consentendo la somministrazione una volta al giorno come insulina basale [5]. Riguardo al legame con il recettore dell'insulina e all'attività, nonché alla segnalazione mediata dal recettore del fattore di crescita simile all'insulina 1 (IGF-1), l'insulina Glargine si comporta come l'insulina umana regolare. Come l'analogo dell'insulina AspB10, che ha un'alta attività mitogenica, l'insulina Glargine ha un'affinità 6-8 volte maggiore per i recettori IGF-1 rispetto all'insulina umana²⁴ [5]; tuttavia, test in vitro hanno dimostrato che il legame dell'insulina Glargine al recettore dell'insulina è più simile a quello dell'insulina umana regolare che a quello di AspB10. Infine, l'insulina Glargine sembra essere paragonabile all'insulina umana NPH in termini di tossicità, effetti avversi, immunogenicità e potenziale per interazioni farmacologiche [5].

Modello matematico di assorbimento dell'insulina Glargine U100 Il modello meccanicistico e quantitativo riportato [23] è stato sviluppato per descrivere al meglio la farmacocinetica dell'insulina Glargine (sia U100 che U300), in particolare la rapida comparsa e un lento decadimento dell'insulina nel plasma, di un

vasto database di pazienti diabetici che ricevevano una singola o ripetute dosi di questa insulina: nello specifico, il primo studio [25] consiste di 42 soggetti sottoposti a 0.4 U/kg di Gla-100 e 0.4, 0.6 e 0.9 U/kg di Gla-300; nel secondo studio [3], invece, 30 partecipanti hanno ricevuto 0.4 U/kg di Gla-100 e 0.4 e 0.6 U/kg di Gla-300. A tal fine, è stato sviluppato un modello lineare (Figura 3.3) descritto da due compartimenti, il primo (Q_1) rappresentante l'insulina in precipitato, mentre il secondo compartimento (Q_2) che descrive lo stato solubile, con un parametro k (adimensionale) che rappresenta la frazione precipitata di insulina dopo l'amministrazione sottocutanea, k_{sp} (min^{-1}) che rappresenta la costante di dissoluzione dallo stato precipitato a quello solubile, k_a (min^{-1}) che rappresenta la costante di assorbimento dell'insulina nel plasma, Ra_1 che rappresenta rate di apparizione di insulina nel plasma e F , ovvero la biodisponibilità, definita come: $F = \frac{\int_0^{t_{end}} Ra_1(u) du}{Dose}$.

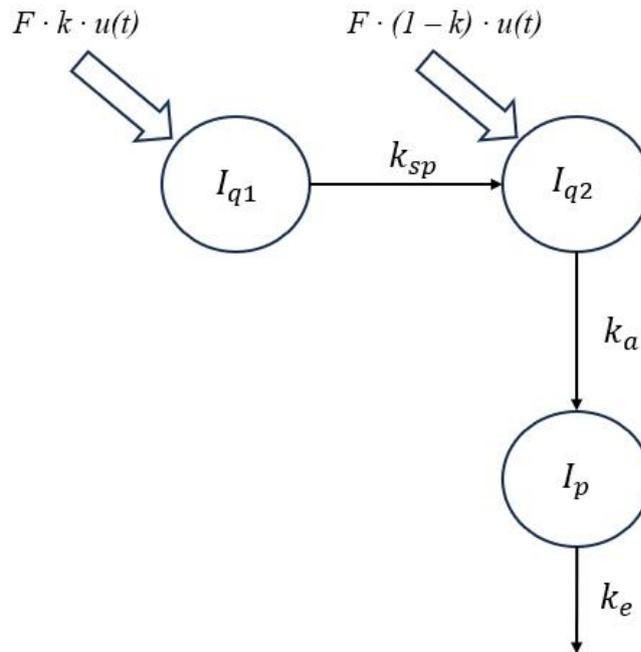


Figura 3.3: Modello di assorbimento sottocutaneo dell'insulina Glargina [23]. Il segnale u rappresenta la somministrazione di insulina.

Il modello di assorbimento sottocutaneo di insulina nel plasma è descritto dalle seguenti equazioni (3.1):

$$\begin{cases} \dot{I}_{q1} = -k_{sp} \cdot I_{q1}(t) + k \cdot F \cdot u(t) \\ \dot{I}_{q2} = -k_a \cdot I_{q2}(t) + k_{sp} \cdot I_{q1}(t) + (1 - k) \cdot F \cdot u(t) \\ Ra_1(t) = k_a \cdot I_{q2}(t) \end{cases} \quad (3.1)$$

La cinetica dell'insulina plasmatica è invece descritta attraverso un modello lineare (3.2) mono-compartimentale:

$$\begin{cases} \dot{I}_p = -k_e \cdot I_p(t) + Ra_1(t) \\ I(t) = \frac{I_p(t)}{V_I} \end{cases} \quad (3.2)$$

Dove V_I (L/kg) e k_e (min^{-1}) rappresentano rispettivamente il volume di distribuzione dell'insulina e il tasso di clearance frazionale. Il modello è a priori non univocamente identificabile, cioè esistono un numero finito di soluzioni se si assume il volume di distribuzione dell'insulina noto e fisso a un valore di popolazione ($V_I = 0,13$ L/kg). La ragione è che, dai dati, è identificabile solo il rapporto F/V_I con F che è una funzione della clearance dell'insulina plasmatica.

Il modello è stato identificati utilizzando la stima Bayesian Maximum a Posteriori (MAP) sui dati di concentrazione plasmatica di insulina. In particolare, è stata aggiunta un'informazione a priori sul tasso di clearance frazionaria k_e per aiutare l'identificabilità numerica di tutti i modelli. Contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare, date le scarse frequenze di campionamento, k_e non è stato fissato ai valori di popolazione, poiché ciò avrebbe significato fissare il tasso di clearance dell'insulina plasmatica (CL) a 0,014 L/min/kg, un valore troppo elevato per adattarsi bene ai dati in alcuni soggetti. È stato presupposto un errore di misurazione sui dati di insulina plasmatica indipendente, gaussiano, con media zero e varianza nota. Tutti i campioni al di sotto del livello più basso di misurazione dell'insulina considerato accurato dal laboratorio di analisi biochimiche sono stati impostati a zero e si è supposta una varianza infinita; quindi, non sono stati considerati nella funzione obiettivo. Un totale di 5 parametri è stato calcolato: F , k , k_{sp} , k_a e k_e . I parametri, riportati nella Tabella 3.1, sono stati calcolati utilizzando i dati di concentrazione insulinica di pazienti a cui è stata somministrata una dose di 0.4 U/kg.

Il modello di equazioni (3.1) è stato selezionato tra tre candidati sulla base delle migliori predizioni dei dati, la parsimoniosità del modello e la precisione di stima, quantificati in termini di minori weighed residual sum of squares (WRSS), criterio di informazione di Akaike (AIC) e coefficienti di variazione dei parametri stimati (CV) .

F	k	k_{sp} (min^{-1})	k_a (min^{-1})	k_e (min^{-1})
0.89 [0.69 - 1.00] (23%)	0.78 [0.53 - 0.95] (4%)	0.0013 [0.0005 - 0.018] (7%)	0.0015 [0.0001 - 0.0048] (7%)	0.11 [0.09 - 0.11] (23%)
0.84 [0.52 - 1.00] (23%)	0.90 [0.75 - 0.98] (5%)	0.0013 [0.0006 - 0.0022] (9%)	0.0026 [0.0013 - 0.0133] (43%)	0.001 [0.09 - 0.11] (23%)

Tabella 3.1: 1 La distribuzione dei parametri del modello stimati (per Gla100) tra i database di studio (studio 1, prima riga, con 42 partecipanti e studio 2, seconda riga, con 30 partecipanti). I valori sono riportati come mediana [5° - 95° percentile], con la precisione espressa come coefficiente di variazione (CV) percentuale.

3.2 Insuline ultra long-acting

Le insuline ultra-long acting sono caratterizzate da una più lenta farmacocinetica rispetto alle insuline long-acting avendo un tempo di onset ritardato, quasi completa assenza di picco e meno variabilità intra-persona. Per questo tali insuline stanno sempre più entrando a far parte dei trattamenti insulinici al fine di sostituire efficacemente la presenza costante di insulina prodotta dal pancreas durante il lasso temporale intra-pasti.

3.2.1 Insulina Glargine U300

A partire dal 2016 sono state sviluppate e messe a disposizione per il trattamento del diabete nuovi analoghi di insulina concentrata. In particolare, per quel che riguarda le glargine, è stata sviluppata l'insulina Glargine U300 (Toujeo), una forma concentrata di insulina a 300 U/mL. Questa forma concentrata di insulina ha una bassa variabilità intra-giornaliera e un'alta riproducibilità giorno per giorno, consentendo una durata d'azione più costante e prolungata rispetto all'insulina Glargine U100 (100 U/mL), con cui condivide la struttura amminoacidica. La concentrazione più elevata risulta, però, in una più elevata frazione precipitata di insulina dopo l'amministrazione sottocutanea, ritardando quindi maggiormente l'assorbimento dell'insulina [6]. Confrontata con l'insulina Glargine U100, la U300 è altrettanto efficace nel controllo glicemico in pazienti diabetici di tipo 1 e 2. Ha un profilo di efficacia simile per il controllo glicemico, ma con tassi inferiori di ipoglicemia notturna e severa. L'insulina Glargine U300 è impiegata come insulina basale per i pazienti con diabete di tipo 1 e 2, e può essere impiegata direttamente in pazienti che iniziano la terapia insulinica e necessitano di seguire una fase di titolazione. La titolazione dell'insulina Glargine U300 comporterebbe

un volume inferiore e un rischio ridotto di ipoglicemia rispetto all'insulina Glargine U100. Anche l'attività mitogenica risulta essere molto simile all'insulina Glargine U100 così come la sua immunogenicità [6].

Modello matematico di assorbimento dell'insulina Glargine U300 Il modello per descrivere l'assorbimento dell'insulina Glargine U300 [23] impiega la stessa struttura del modello di insulina Glargine U100, chiaramente con valori di parametri differenti (Tabella 3.2). Nello specifico, si notano differenze nel parametro k che risulta essere maggiore nella Gla-300, dimostrando quindi la maggior precipitazione di quest'ultima.

F	k	k_{sp} (min^{-1})	k_a (min^{-1})	k_e (min^{-1})
0.68 [0.46 - 1.00] (24%)	0.89 [0.74 - 0.97] (3%)	0.0008 [0.0002 - 0.0011] (11%)	0.0010 [0.00006 - 0.0039] (11%)	0.11 [0.09 - 0.11] (23%)
0.83 [0.49 - 1.00] (23%)	0,94 [0.53 - 0.98] (6%)	0.0009 [0.0003 - 0.0018] (11%)	0.0018 [0.0009 - 0.0082] (28%)	0.001 [0.09 - 0.11] (23%)

Tabella 3.2: 1 La distribuzione dei parametri del modello stimati (per Gla300) tra i database di studio (studio 1, prima riga, con 16 partecipanti e studio 2, seconda riga, con 23 partecipanti). I valori sono riportati come mediana [5° - 95° percentile], con la precisione espressa come coefficiente di variazione (CV) percentuale.

3.2.2 Insulina Degludec

L'insulina Degludec (IDeg) è un'insulina basale di nuova generazione con una durata di azione ultra-long sviluppata per la somministrazione singola giornaliera. Questo analogo, infatti, è stato sintetizzato al fine di migliorare gli aspetti dei precedenti analoghi basali (glargine U100 e detemir) che presentano un picco più pronunciato e una durata d'azione troppo corta per emulare correttamente l'andamento dell'insulina endogena. Al contrario, IDeg mostra una quasi totale assenza di picco e un'azione che si protrae molto rispetto agli altri analoghi basali [8]. Migliorando queste caratteristiche farmacocinetiche, l'insulina Degludec ha permesso di realizzare una terapia che evita il più possibile episodi gravi di ipoglicemia e iperglicemia [8].

Tale meccanismo di protrazione di IDeg è dovuto alla sua struttura. La sequenza proteica di IDeg è stata basata sull'insulina umana, modificata mediante acilazione di DesB30 al gruppo e-amino di LysB29 con acido esadecandioico tramite un legante di c-L-glutammino (Figura 3.4). Fino ad oggi, IDeg è l'unico

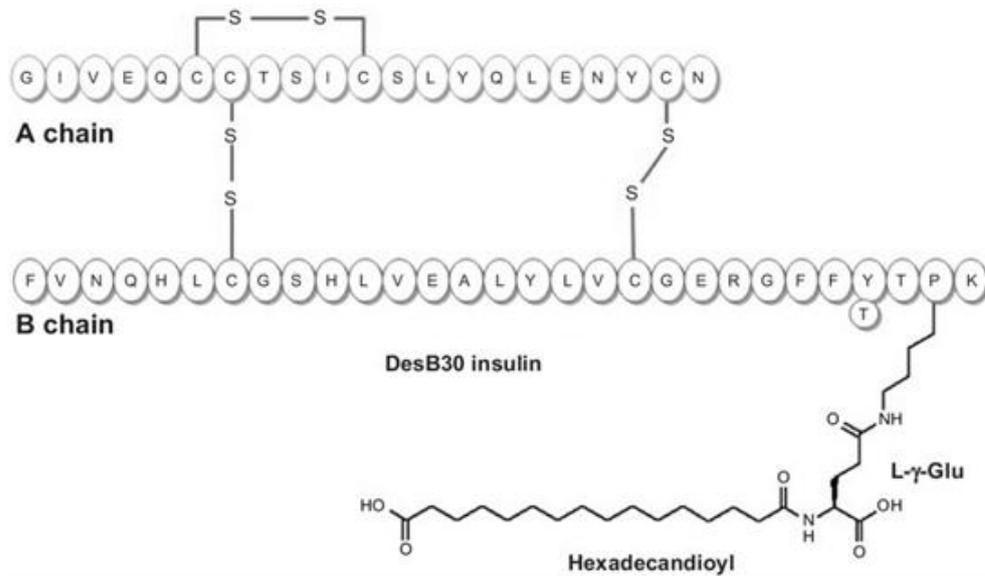


Figura 3.4: Struttura dell'insulina Degludec. [7]

analogo dell'insulina in grado di auto-associarsi in multi-esameri dopo l'iniezione sottocutanea (SC), dando luogo a un deposito solubile da cui IDeg viene assorbito lentamente e in modo continuo nella circolazione. Nella formulazione farmaceutica, ovvero in presenza di fenolo e zinco, gli esameri di IDeg assumono una conformazione in cui solo una delle estremità è disponibile per interagire con la catena laterale di un altro esamero di IDeg, formando così di-esameri stabili. Con la diffusione graduale del fenolo dopo l'iniezione, i di-esameri di IDeg si aprono su entrambe le estremità e portano alla formazione di multi-esameri. Con la graduale diffusione dello zinco dalle estremità dei multi-esameri, i monomeri terminali di IDeg si dissociano lentamente e costantemente, risultando in un rilascio lento e graduale di IDeg dal sito di iniezione SC nella circolazione (Figura 3.5).

Un'altra preoccupazione clinica legata a IDeg riguarda il potenziale per l'immunogenicità. Tuttavia, la concentrazione di anticorpi specifici per IDeg e gli anticorpi che reagiscono in modo incrociato con IDeg e insulina umana è risultata essere bassa in studi condotti su pazienti con diabete di tipo 1 o diabete di tipo 2, indicando che il rischio di immunogenicità con IDeg è minimo [8]. Inoltre, gli studi hanno dimostrato che non c'era un'apparente associazione tra lo sviluppo di anticorpi che reagiscono in modo incrociato e l'ipoglicemia, l'HbA1c o la dose di insulina. A causa della durata ultra-lunga dell'azione di IDeg, potrebbe anche essere necessario comprendere meglio come i pazienti si adattano all'uso di insulina prandiale in combinazione con IDeg nella pratica clinica.

Infine, un altro aspetto importante della farmacologia molecolare di IDeg, da-

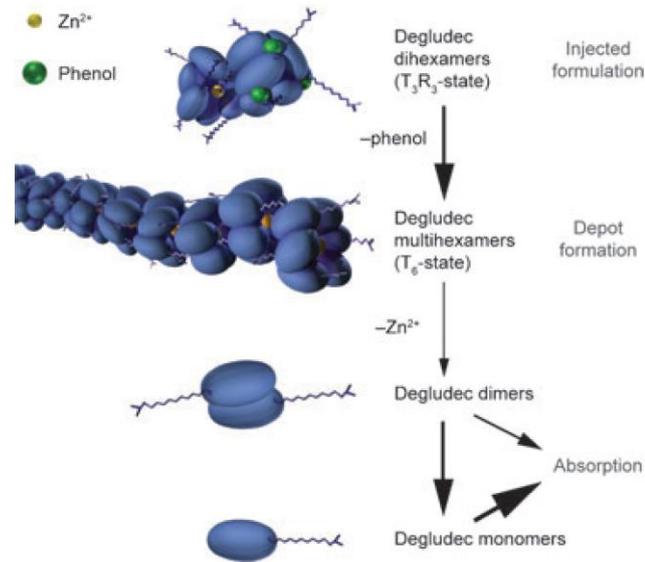


Figura 3.5: Rappresentazione schematica del meccanismo di prolungamento dell'insulina Degludec. I di-esameri nella formulazione farmaceutica si assemblano in catene multi-esameriche immediatamente dopo l'iniezione sottocutanea. Questi si disassemblano lentamente con la diffusione dello zinco per rilasciare una fornitura costante di monomeri di Degludec nella circolazione. [7]

to il recente interesse per il potenziale mitogenico di alcuni analoghi dell'insulina, è quello del suo profilo di interazione con i recettori. Uno studio sulle affinità di legame, coinvolgendo i recettori del fattore di crescita insulin-simile 1 (IGF-1) e i recettori dell'insulina umana ricombinante (entrambe le isoforme, hIR-A e hIR-B), ha mostrato che IDeg ha affinità simili per i recettori dell'insulina hIR-A e hIR-B (rispettivamente il 13% e il 15% rispetto all'insulina umana) con una bassa affinità per il recettore IGF-1 (il 2% rispetto all'insulina umana) [7]. Le cinetiche di legame di IDeg al recettore dell'insulina non differivano da quelle dell'insulina umana. La mitogenicità di IDeg è stata determinata misurando l'incorporazione di 3H-timidina in mioblasti L6 che esprimono recettori hIR (L6-hIR), cellule epiteliali mammarie umane primarie e linee cellulari da adenocarcinomi umani del colon e della mammella. Gli effetti metabolici di IDeg sono stati determinati dalla lipogenesi in adipociti di ratto, dall'accumulo di glicogeno in epatociti di ratto e dalla sintesi di glicogeno in cellule muscolari scheletriche di ratto, L6-hIR e cellule di adenocarcinoma mammario. Questi esperimenti hanno mostrato che IDeg induce le stesse risposte metaboliche (con effetti massimali equivalenti) dell'insulina umana, ma con una mitogenicità ridotta, variabile dal 4% al 14% rispetto all'insulina umana [7]. Pertanto, si è scoperto che l'insulina IDeg è un agonista completo del recettore dell'insulina, mantenendo le risposte metaboliche dell'insulina umana, ma con una bassa affinità di legame al recettore IGF-1 e

quindi un basso rapporto potenza mitogenica/metabolica. L'equipotenza di IDeg e insulina umana per quanto riguarda le risposte metaboliche ha suggerito che IDeg presenta un'equipotenza molare all'insulina umana nell'uso clinico, nonostante una minore affinità di legame al recettore dell'insulina. Questa aspettativa è stata confermata in studi successivi di clamp e studi clinici [7].

Modello matematico di assorbimento dell'insulina Degludec Il modello di assorbimento sottocutaneo (Figura 3.6) [23] che descrive l'insulina IDeg attiva libera (che rappresenta circa il 97% del totale contro il 3% circa di insulina legata ad albumina e quindi inattiva) consta di una struttura a tre compartimenti, descritti dalle seguenti equazioni (3.3):

$$\begin{cases} \dot{I}_{q1} = -k_{d1} \cdot I_{q1}(t) + F \cdot D \\ \dot{I}_{q2} = -k_{d2} \cdot I_{q2}(t) + k_{d1} \cdot I_{q1}(t) \\ \dot{I}_{q3} = -k_a \cdot I_{q3}(t) + k_{d2} \cdot I_{q2}(t) \\ Ra_I = -k_a \cdot I_{q3}(t) \end{cases} \quad (3.3)$$

dove D (mU/kg/min) è la dose di insulina somministrata nel tessuto sottocutaneo, F (adimensionale) è la biodisponibilità, k_{d1} e k_{d2} (min^{-1}) sono le costanti di velocità di conversione del complesso molecolare, k_a (min^{-1}) è la costante di velocità di assorbimento dell'insulina nel plasma e Ra_I è il tasso di comparsa dell'insulina nel plasma.

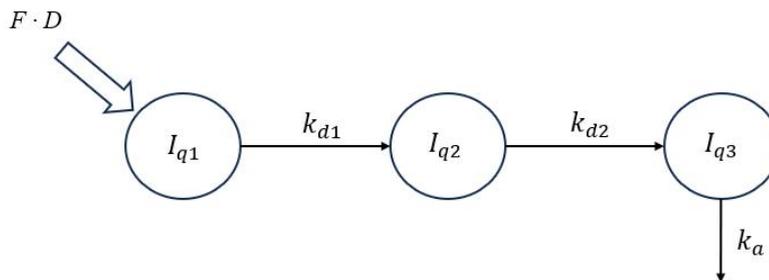


Figura 3.6: Modello di assorbimento sottocutaneo tricompartmentale dell'insulina Degludec [23].

Per comprendere poi la cinetica dell'insulina nel plasma è stato sviluppato poi un modello bicompartimentale (Figura 3.7) descritto dalle seguenti equazioni (3.4):

$$\begin{cases} \dot{I}_l(t) = -(m_1 + m_3) \cdot I_l(t) + m_2 \cdot I_p(t) \\ \dot{I}_p(t) = -(m_2 + m_4) \cdot I_p(t) + m_1 \cdot I_l(t) + Ra_1(t) \\ I(t) = \frac{I_p(t)}{V_I} \end{cases} \quad (3.4)$$

dove I_p e I_l (mU/kg) sono la massa di insulina Deg-100 libera nel plasma e nel fegato, rispettivamente, I ($\mu\text{U}/\text{mL}$) è la concentrazione di insulina nel plasma, m_1 , m_2 , m_3 e m_4 (min^{-1}) sono i parametri di velocità e V_I (L/kg) è il volume di distribuzione dell'insulina.

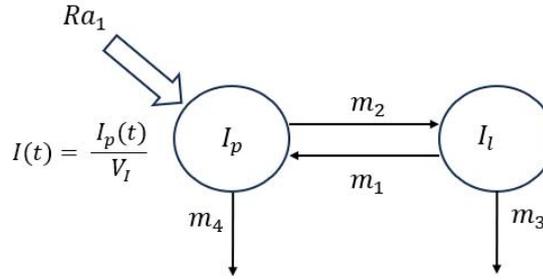


Figura 3.7: Modello bicompartimentale della cinetica dell'insulina del plasma [23].

Essendo il modello non identificabile a priori serve fare delle assunzioni su alcuni parametri. In particolare, inizialmente è stato assunto che il volume di distribuzione dell'insulina (V_I) fosse fissato a valori di popolazione ($V_I = 0,048$ L/kg) ed è stato poi riparametrizzato il modello in modo che m_2 , m_3 e m_4 diventassero funzioni di m_1 , la clearance plasmatica dell'insulina (CL , L/min), e V_I . Inoltre, a causa delle condizioni sperimentali, durante il processo di identificazione, le due costanti di velocità k_{d1} e k_{d2} erano virtualmente identiche in tutti i soggetti. Pertanto, per migliorare l'identificabilità numerica, sono state vincolate a essere uguali ($k_d = k_{d1} = k_{d2}$).

Di conseguenza, sono stati stimati cinque parametri (F , k_d , k_a , m_1 , CL) dal dataset scelto utilizzando uno stimatore Bayesiano a massima a posteriori.

F	k_d (min^{-1})	k_a (min^{-1})	m_1 (min^{-1})	CL (L/min)
69	0.0056	0.00007	0.176	1.10
[58 - 85] (34%)	[0.0041 - 0.0072] (22%)	[0.0006 - 0.0009] (20%)	[0.176 - 0.177] (50%)	[1.09 - 1.11] (34%)

Tabella 3.3: La distribuzione dei parametri del modello stimati (per Degludec). I valori sono riportati come mediana [5° - 95° percentile], con la precisione espressa come coefficiente di variazione (CV) percentuale.

I risultati, ottenuti fittando i dati di pazienti a cui è stato somministrato una dose di 0.4 o 0.6 U/kg, sono i seguenti: in media, il modello ha previsto bene i dati dell'insulina Degludec libera nel plasma, come confermato dai residui pesati, che erano sufficientemente casuali e rientravano nell'intervallo ± 1 . I parametri del

modello, che sono stati stimati con buona precisione, sono riportati nella Tabella 3.3.

3.3 Insuline once-weekly

Le insuline a somministrazione settimanale (once-weekly insulin, OWI) rappresentano un'innovativa frontiera nella terapia del diabete, offrendo potenziali vantaggi rispetto alle tradizionali opzioni di trattamento giornaliere. Questa nuova classe di insuline mira a migliorare l'aderenza al trattamento, ridurre l'inerzia clinica e ottimizzare il controllo glicemico nei pazienti affetti da diabete mellito. A differenza delle insuline basali a lunga durata d'azione attualmente disponibili, che richiedono somministrazioni quotidiane o più frequenti, le insuline settimanali promettono di semplificare la gestione terapeutica attraverso una frequenza di somministrazione notevolmente ridotta [15]. Questo approccio potrebbe aprire nuove opportunità per migliorare la qualità della vita dei pazienti diabetici, ridurre le complicanze legate alla terapia e ottimizzare il controllo glicemico, fornendo al contempo una risposta alle sfide dell'aderenza e dell'inerzia clinica spesso incontrate nella gestione a lungo termine della malattia. Di seguito si presentano le caratteristiche molecolari, farmacocinetiche e farmacodinamiche di due insuline settimanali in fase di sviluppo, in particolare BIF e Icodec, fornendo un'analisi critica del loro potenziale impatto nella pratica clinica. Si noti che, trattandosi di farmaci in via di sviluppo, non sono presenti in letteratura modelli che ne descrivano la farmacocinetica.

3.3.1 Insulina BIF

L'insulina basale Fc (BIF) è una nuova proteina di fusione sviluppata dalla Eli Lilly and Company (Indianapolis, US) per il trattamento dei pazienti con diabete di tipo 2 (T2D) o diabete di tipo 1 (T1D). Tale molecola è progettata per la somministrazione sottocutanea settimanale. BIF è composta da un agonista del recettore dell'insulina umana fuso a un dominio frammentario cristallizzabile (Fc) di immunoglobulina G2 umana (IgG2) e ha un peso molecolare di 64,1 kDa. Ciascun monomero dell'omodimero è composto da una variante a catena singola dell'insulina, un legante interdominio e il dominio Fc da IgG2 (Figura 3.8). La variante a catena singola dell'insulina ha le seguenti modifiche rispetto all'insulina umana: TyrB16Glu, PheB25His, ThrB27Gly, ProB28Gly, LysB29Gly, ThrB30Gly, IleA10Thr, TyrA14Asp e AsnA21Gly. Il legante 1 è composto da un

legante flessibile di sette aminoacidi, Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly. La sequenza è stata progettata per minimizzare l'autoassociazione dell'insulina in presenza di concentrazioni localmente elevate generate dallo stato omodimero della BIF e contribuisce alle proprietà di lavorabilità (ad esempio, espressione, stabilità chimica, stabilità fisica) e al debole agonismo della molecola. Studi in vitro hanno mostrato una ridotta affinità di legame con IR (insulin receptor), ma con agonismo completo, con selettività contro il recettore del fattore di crescita simile all'insulina-1 e proprietà funzionali simili all'insulina umana nativa [17]. Come per altre molecole coniugate a Fc, si prevede che la presenza del dominio Fc, in combinazione con l'eliminazione mediata da IR controllata a causa della ridotta affinità di IR, porterà a un'emivita prolungata, con durata d'azione in grado di protrarsi fino a 10 giorni [9].

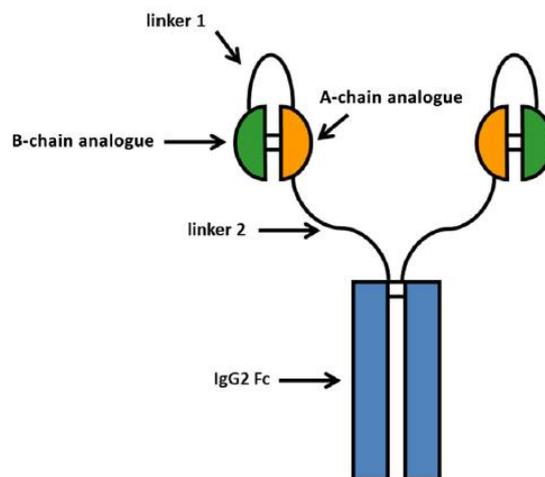


Figura 3.8: Schema della struttura dell'insulina basale settimanale BIF. [17]

In termini di immunogenicità e sicurezza gli studi su BIF hanno mostrato risultati paragonabili a quelli ottenuti con le più comuni insuline basali ad azione giornaliera. Non sono stati segnalati eventi di immunogenicità o reazioni al sito di iniezione. Non si è osservato, negli studi fatti, alcuna comparsa di anticorpi antifarmaco (antidrug antibodies, ADAs) legati al trattamento. Tuttavia, sono necessari studi a lungo termine per confermare questi risultati, in quanto i test sono ancora in una fase primordiale.

3.3.2 Insulina Icodec

L'insulina Icodec è una delle OWI sviluppate recentemente da Novo Nordisk, caratterizzata da un'elevata emivita e un effetto di riduzione glicemica distribuito

omogeneamente durante tutta la sua durata di azione.

Per ottenere questo risultato, l'insulina Icodec è stata progettata per introdurre quattro caratteristiche chiave: alta affinità per l'albumina, maggiore stabilità, bassa affinità di legame con il recettore dell'insulina (IR) e elevata solubilità. Al fine di realizzare un forte e reversibile legame con l'albumina, che assicura che l'insulina Icodec formi un deposito circolante legato all'albumina, che è essenzialmente inattivo, da cui l'insulina Icodec può attivare in modo lento e costante i recettori dell'insulina, è stato introdotto un acido grasso diacido a catena lunga di 20 atomi di carbonio (acido icosanedioico) nella parte C-terminale della catena B della sequenza amminoacidica dell'insulina umana. L'acido icosanedioico è connesso tramite un legante idrofilico (acido γ -glutammico e un piccolo legante simile a PEG) alla lisina in posizione B29. La parte di acido diacido grasso dell'insulina Icodec si lega saldamente ai siti di legame degli acidi grassi sull'albumina, e l'affinità dell'insulina icodec per l'albumina è stata stimata essere $9,5 \pm 0,6$ volte maggiore (media \pm SEM, $n=3$) rispetto a quella dell'insulina Detemir, che è stata utilizzata come riferimento [19]. Tuttavia, l'acido diacido grasso C20 non è sufficiente per prolungare la emivita nella misura necessaria per la somministrazione settimanale. Pertanto, sono state introdotte tre sostituzioni di aminoacidi, TyrA14Glu (A14E), TyrB16His (B16H) e PheB25His (B25H) (Figura 3.9), al fine di abbassare l'affinità di legame con l'IR e successivamente la clearance mediata dall'IR per conferire un'emivita più lunga.



Figura 3.9: Schema della struttura dell'insulina basale settimanale icodec. [15]

Ciascuna delle singole sostituzioni di aminoacidi contribuisce a ridurre l'affinità con l'IR (A14E: all'80%, B16H: al 22%, B25H: al 30% rispetto all'insulina umana) in modo tale che l'affinità dell'insulina Icodec senza la modifica chimica sia del 5,5% rispetto all'insulina umana. L'alta affinità di legame con l'albumina

dell'acido diacido grasso limita il numero di molecole di insulina Icodec disponibili per legarsi all'IR, riducendo ulteriormente l'affinità relativa dal 5,5% allo 0,03% in presenza del 1,5% di HSA (albumina sierica umana). Inoltre, le modifiche degli aminoacidi conferiscono stabilità molecolare minimizzando il degrado enzimatico. Infine, la treonina in posizione B30 dell'insulina umana è stata eliminata; tuttavia, la mancanza di B30 non influisce sull'affinità con l'IR. Nel complesso, questi cambiamenti molecolari sono stati dimostrati conferire una lunga emivita, come evidenziato dal profilo farmacocinetico dell'insulina Icodec nei cani a seguito di un'iniezione sottocutanea singola (Figura 3.10).

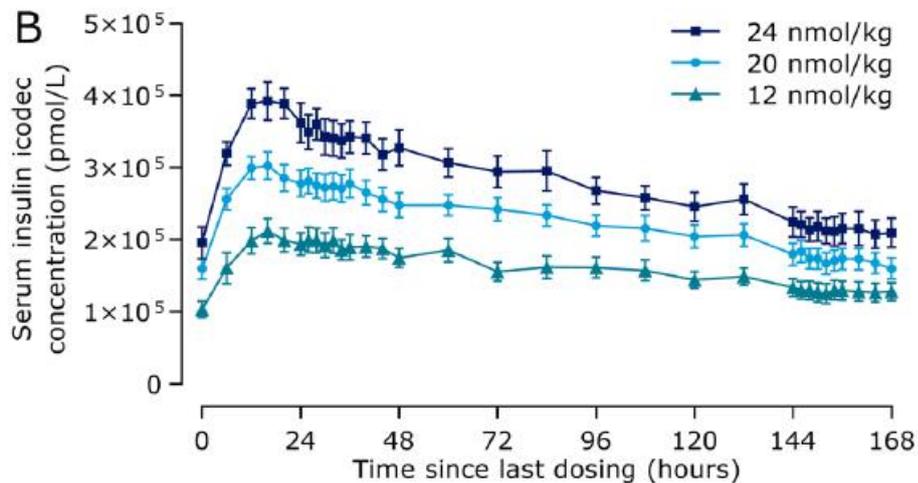


Figura 3.10: Concentrazione plasmatica di insulina icodec in cani. [19]

Inoltre, l'insulina Icodec è stata dimostrata avere lo stesso profilo metabolico cellulare dell'Insulina Umana (HI), stimolando l'assorbimento del glucosio e la lipogenesi negli adipociti dei ratti e l'accumulo di glicogeno negli epatociti dei ratti. Poiché l'insulina umana nativa ha effetti di proliferazione cellulare oltre alle sue azioni metaboliche, è importante determinare sia gli effetti metabolici che mitogenici dei nuovi analoghi dell'insulina e il bilanciamento relativo tra questi due effetti. La risposta mitogenica dell'Insulina Icodec è stata esaminata in vari tipi di cellule che esprimono il recettore dell'insulina (IR) e il recettore dell'IGF-1 (IGF-1R) in diverse misure, inclusi L6-hIR, MCF-7, COLO-205 e cellule HMEC. Le potenze mitogeniche rientrano nello stesso intervallo delle potenze metaboliche. Tenendo conto di ciò, i dati complessivi indicano che l'insulina Icodec ha mantenuto un rapporto equilibrato tra potenza mitogenica e metabolica [15].

Capitolo 4

Analisi comparativa

Al fine di confrontare la cinetica degli analoghi di insulina analizzati nei capitoli 3 e 4, è stata condotta un'analisi comparativa di diversi parametri farmacodinamici significativi: concentrazione massima, tempo di picco, tempo di emivita, area sotto la curva, tempo di azione e costante di eliminazione. Tali parametri sono stati estrapolati dai dati medi disponibili in letteratura, selezionati in modo tale da omogeneizzare i dati stessi per avere una analisi comparativa il più significativa possibile. Di seguito viene spiegata la metodologia di calcolo di ognuno di questi parametri, partendo però dalla descrizione generale dei dataset utilizzati. Le elaborazioni utili al calcolo dei vari parametri di farmacocinetica sono state sviluppate mediante il software MATLAB R2022a .

4.1 Dataset

I dati presi in considerazione provengono da studi fatti su pazienti sani a cui è stato somministrato l'analogo dell'insulina oggetto dello studio, in alcuni casi preceduto da somministrazioni di insulina (sono stati presi in considerazione i dovuti accorgimenti per standardizzare i risultati riportati in seguito). All'inizio dell'esperimento, tutti i pazienti si trovavano in uno stato di euglicemia (concentrazione stabile di glucosio nel sangue), raggiunto tramite clamp euglicemico insulinemico. I dati di concentrazioni sono stati ottenuti da prelievi di sangue venoso. Infine, si è scelto di uniformare tutte le concentrazioni riportandole in $\mu\text{U}/\text{mL}$.

Dataset Lispro In questo studio [14], a 10 uomini è stato somministrato 0.2 U/kg di insulina Lispro. I partecipanti, in buona salute, erano simili per età ($35,2 \pm 5,3$ anni), altezza ($1,77 \pm 0,04$ m), peso ($70,9 \pm 5,9$ kg) e indice di massa

corporea ($22,6 \pm 1,5 \text{ kg}/m^2$). I dati sono presentati come medie \pm deviazione standard. Ciascun partecipante doveva mantenere il proprio peso corporeo entro 2,5 kg rispetto al peso determinato il giorno prima del primo trattamento per l'intero studio di 6 settimane.

Dataset Aspart Lo studio utilizzato per analizzare la farmacocinetica dell'insulina Aspart [13], 25 soggetti sani tra i 19 e 50 anni, di cui solo 19 hanno completato lo studio, hanno ricevuto 0.1 U/kg di insulina Aspart.

Dataset Glulisina In questo studio [4] randomizzato, con clamp glicemico euglicemico, sono stati inclusi 18 pazienti maschi con diabete di tipo 1 (età media di $35,0 \pm 9,2$ anni, BMI di $24,5 \pm 2,7 \text{ kg}/m^2$) che hanno ricevuto 0.2 U/kg.

Dataset Glargine U100 e Glargine U300 Nello studio 2 del paper di riferimento [23] 17 soggetti maschi con diabete di tipo 1 (età = 45 ± 7 anni; BMI = $25,9 \pm 2,1 \text{ kg}/m^2$) hanno ricevuto somministrazioni sottocutanee una volta al giorno di Gla-300 a dosi di 0,4 U/kg per 8 giorni in un periodo di trattamento e Gla-100 a dosi di 0,4 U/kg per 8 giorni nell'altro periodo.

Dataset Degludec In questo studio [10] 49 soggetti diabetici di tipo 1 0.4 U/kg di insulina Degludec una volta al giorno per due periodi di 6 giorni ciascuno, separati da un intervallo di 13-21 giorni.

Dataset BIF In questo studio [17] a 23 soggetti sani è stata somministrata per via sottocutanea una dose di 10 nmol/kg di insulina BIF.

Dataset Icodec In questo studio [20] 25 individui (sia maschi che femmine) con diabete di tipo 1 hanno ricevuto singole iniezioni sottocutanee di icodec (5,6 U/kg). Il campionamento farmacocinetico del sangue è avvenuto frequentemente fino a 35 giorni dopo la somministrazione.

4.2 Parametri di farmacocinetica

4.2.1 Concentrazione massima

La concentrazione massima (C_{max}) di un analogo dell'insulina costituisce un elemento cruciale nell'ambito della terapia diabetica. Questo indice rappresenta il

valore massimo di concentrazione nel plasma a seguito dell'iniezione, riflettendo l'assorbimento e la distribuzione nell'organismo (si veda Figura 4.1 come esempio). Comprendere la massima concentrazione di un analogo dell'insulina è essenziale poiché influisce direttamente sull'inizio dell'azione dell'insulina e sulla sua capacità di regolare il livello di glucosio nel sangue. Nelle insuline prandiali difatti si ricerca un picco di concentrazione alto in modo tale da avere un effetto ipoglicemizzante elevato in modo da contrastare un aumento post-prandiale repentino di glucosio nel sangue. Al contrario, nelle insuline basali si ricerca un totale assenza di picco in modo tale da poter simulare al meglio la costante produzione di insulina del pancreas, evitando così episodi di ipoglicemia post-prandiali.

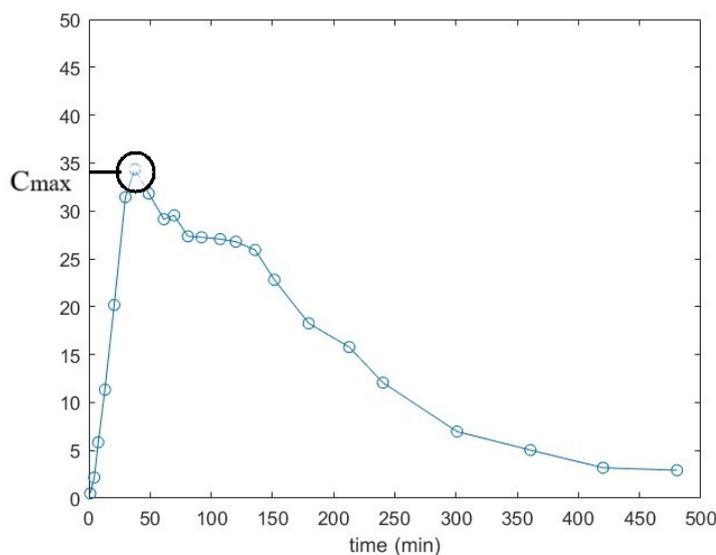


Figura 4.1: Esempio di determinazione della concentrazione massima (C_{max}).

Nei casi in cui era stata somministrata insulina basale ai pazienti, per calcolare la concentrazione massima è stato considerato il picco di concentrazione overbasal (C_{maxOB}), ossia il picco di concentrazione a cui è stato sottratto la concentrazione di insulina al tempo 0 (C_0):

$$C_{maxOB} = C_{max} - C_0$$

Inoltre, le concentrazioni massime sono state normalizzate rispetto alla dose somministrata, rendendo così possibile una comparazione più efficace tra i picchi delle diverse insuline:

$$C_{max \text{ normalizzata}}[kg/L] = C_{max}[mU/L]/dose \text{ somministrata}[U/kg]$$

4.2.2 Tempo di picco

Il tempo di picco si riferisce all'istante temporale in cui l'insulina raggiunge la sua concentrazione massima nel plasma dopo l'iniezione (si veda Figura 4.2 come esempio). Questo parametro è fondamentale poiché determina quando l'insulina inizia a esercitare il suo effetto ipoglicemizzante. Un tempo di picco ravvicinato rispetto all'istante di somministrazione (t_0) può comportare un abbassamento tempestivo dei livelli di glucosio nel sangue, essenziale per controllare i picchi glicemici postprandiali. La personalizzazione del tempo di picco dell'insulina è cruciale per adattare la terapia alle abitudini alimentari e allo stile di vita del paziente, garantendo un controllo ottimale della glicemia. Tuttavia, è importante considerare l'equilibrio tra un inizio d'azione efficace e il rischio di ipoglicemia. In definitiva, il tempo di picco di un analogo dell'insulina gioca un ruolo centrale nel garantire un controllo glicemico stabile e bilanciato, migliorando la qualità di vita dei pazienti affetti da diabete.

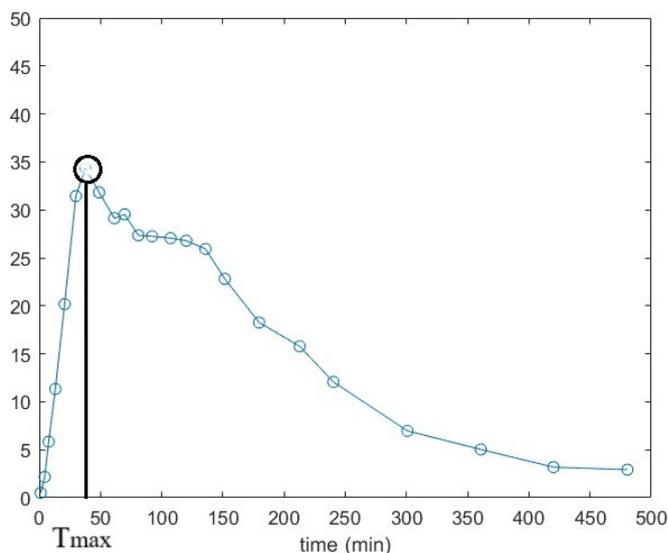


Figura 4.2: Esempio di determinazione tempo di picco (t_{max}).

4.2.3 Emivita

L'emivita ($t_{1/2}$) di un analogo dell'insulina è il tempo necessario affinché la metà della dose di tale farmaco venga eliminata dall'organismo, o alternativamente il tempo tale per cui la concentrazione plasmatica in fase discendente raggiunge metà del valore di picco (si veda Figura 4.3 come esempio). Gli analoghi dell'insulina sono sviluppati per fornire un controllo più preciso sulla glicemia nei

pazienti affetti da diabete mellito. La loro emivita può variare notevolmente a seconda della formulazione e del tipo di analogo. Una breve emivita significa che il farmaco viene rapidamente assorbito e ha un'azione rapida nel ridurre i livelli di glucosio nel sangue, risultando particolarmente utile dopo i pasti, emivita ideale dunque per le insuline prandiali. D'altro canto, un analogo con un'emivita più lunga offre un controllo prolungato sulla glicemia, poiché viene rilasciato gradualmente nel corso del tempo, ideale quindi per le insuline basali. Questa caratteristica può ridurre la frequenza delle iniezioni e migliorare la qualità di vita dei pazienti. L'emivita è dunque un parametro utile per compiere un'analisi comparativa degli analoghi, in particolare riguardante alla loro velocità di assorbimento.

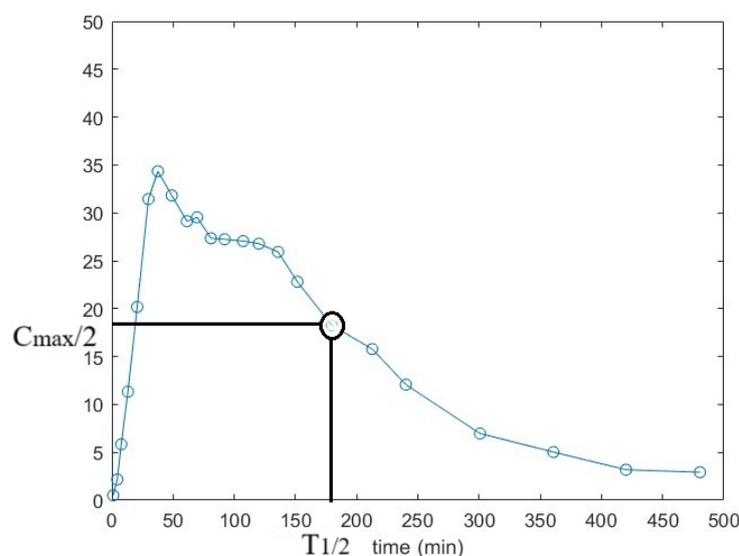


Figura 4.3: Esempio di determinazione dell'emivita ($t_{1/2}$).

4.2.4 Area sotto la curva

L'area sotto la curva (Area Under the Curve, AUC) di un analogo dell'insulina rappresenta l'area sottesa al grafico che descrive la concentrazione di insulina nel sangue nel corso del tempo dopo l'assunzione del farmaco (si veda Figura 4.4 come esempio).

$$AUC = \int_0^{t_{end}} C(\tau) d\tau$$

Questo parametro è indicativo dell'esposizione complessiva dell'organismo all'insulina e fornisce informazioni preziose sulla durata e sull'intensità dell'effetto ipoglicemizzante dell'analogo. Una AUC più ampia suggerisce una maggiore esposizione all'insulina nel corso del tempo, il che può essere desiderabile per garantire un controllo glicemico prolungato e stabile. D'altro canto, un' AUC più limitata potrebbe indicare un'azione più rapida e intensa dell'insulina, spesso auspicata dopo i pasti per ridurre rapidamente i picchi glicemici. La considerazione dell' AUC è fondamentale nella scelta del tipo di analogo dell'insulina e nel determinare il dosaggio ottimale, in modo da adattare il trattamento alle esigenze individuali del paziente e garantire un controllo glicemico efficace senza causare episodi di ipoglicemia.

Inoltre, così come le concentrazioni massime, anche le AUC sono state normalizzate per la dose somministrata per la stessa motivazione:

$$AUC_{normalizzata}[kg \text{ min}/L] = AUC[mU \text{ min}/L]/dose \text{ somministrata}[U/kg]$$

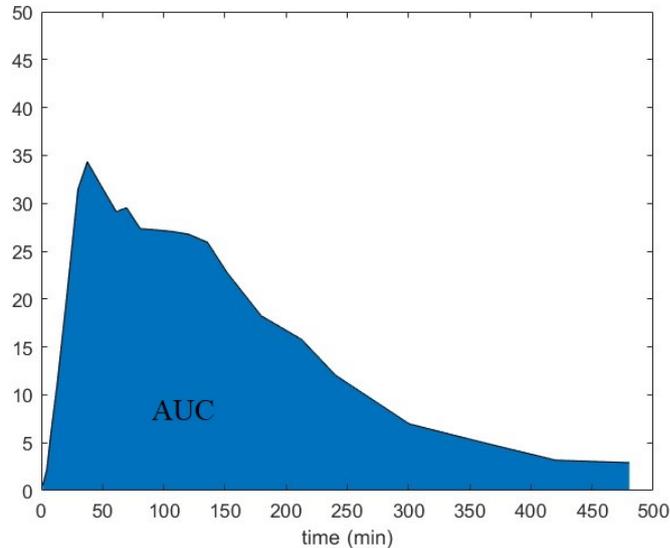


Figura 4.4: Esempio di determinazione dell'area sotto la curva (AUC).

4.2.5 Tempo di azione

Il tempo di azione (t_{action}) di un analogo dell'insulina è il periodo durante il quale il farmaco è in grado di esercitare il suo effetto sulla riduzione dei livelli di glucosio nel sangue (si veda Figura 4.5 come esempio). Questo parametro è cruciale nel

determinare quando e quanto frequentemente il paziente dovrà assumere l'insulina per mantenere un controllo adeguato della glicemia. Gli analoghi dell'insulina sono progettati per imitare in modo più preciso il normale profilo di secrezione dell'insulina nel corpo umano. Quindi, il tempo di azione di un analogo può variare, con alcuni che agiscono in modo rapido per controllare rapidamente i picchi glicemici post-prandiali, mentre altri hanno un tempo di azione più prolungato per mantenere stabili i livelli di glucosio nel sangue nel corso delle ore successive. Questa personalizzazione del tempo di azione aiuta a ottimizzare il trattamento e a evitare episodi di iperglicemia o ipoglicemia, migliorando la gestione complessiva del diabete da parte dei pazienti.

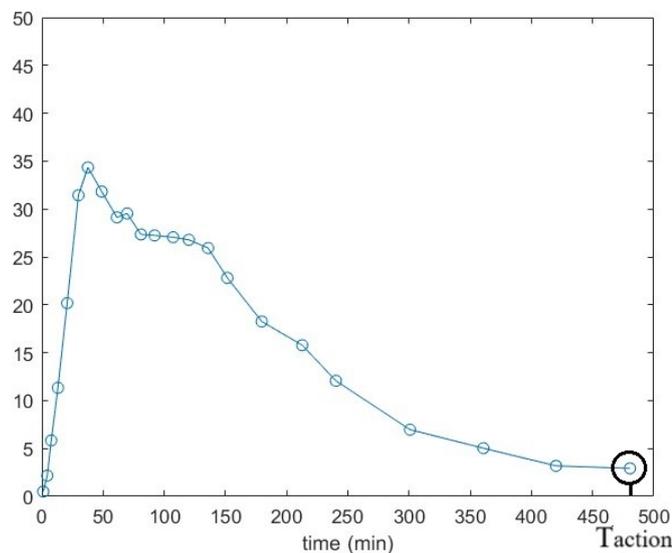


Figura 4.5: Esempio di determinazione del tempo di azione (t_{action}).

4.2.6 Costante di eliminazione

La costante di eliminazione (k o K) di un analogo dell'insulina rappresenta la velocità con cui il farmaco viene rimosso dal corpo. Essa è un parametro chiave che indica quanto rapidamente l'insulina o il suo analogo viene metabolizzato e eliminato dal sistema. Una costante di eliminazione più alta indica che il farmaco sarà eliminato più velocemente dal corpo, mentre una costante più bassa suggerisce un processo di eliminazione più lento. Questo parametro è importante per determinare l'intervallo di dosaggio e la frequenza di somministrazione dell'analogo dell'insulina. Ad esempio, un analogo con una costante di eliminazione più alta potrebbe richiedere dosi più frequenti per mantenere un controllo glicemico

adeguato, mentre un analogo con una costante più bassa potrebbe richiedere dosi meno frequenti. Inoltre, una costante di eliminazione elevata è ideale per le insuline prandiali, la cui azione desiderata dovrebbe essere sia intensa che breve in modo da evitare episodi di ipoglicemia. Allo stesso modo si ricerca una costante di eliminazione bassa per le insuline basali in modo tale da avere un'azione prolungata nel tempo e che non si esaurisca in tempi brevi, così da poter simulare al meglio la costante produzione di insulina del pancreas a digiuno.

Questo parametro, assente negli studi presi in considerazione, è stato calcolato considerando le porzioni dei dati di concentrazione di insulina (successivamente al picco di concentrazione) estratti dalle figure dei relativi articoli scientifici tramite la funzione *GrabIt* di MATLAB, e convertendoli in scala logaritmica, ottenendo la cosiddetta *terminalslope* dell'analogo:

$$C(t) = B_0 e^{-Kt} \rightarrow \log(C(t)) = \log(B_0) - Kt$$

dove C è la concentrazione nel tempo, B_0 la concentrazione iniziale e K la costante di eliminazione.

La costante viene dunque calcolata tramite la porzione terminale della curva dei dati (in questo esempio C_1 e C_2), come si può osservare dalla Figura 4.6:

$$\text{terminal slope} = -K = \frac{\log(C_1) - \log(C_2)}{t_1 - t_2}$$

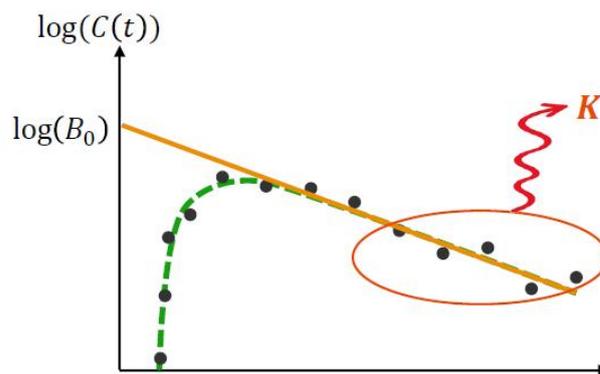


Figura 4.6: Stima della terminal slope per la determinazione della costante di eliminazione (k).

Questa terminal slope è stata poi fittata tramite stimatore a massima verosimiglianza (si veda Figura 4.7 come esempio), ottenendo così i due parametri distintivi di una retta: la pendenza, ovvero la costante di eliminazione k , e l'intercetta, non utilizzata in questa analisi.

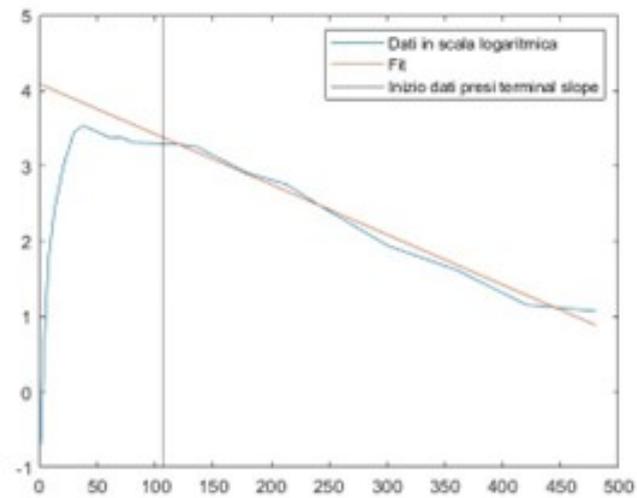


Figura 4.7: Determinazione della costante di eliminazione (k): esempio di fit sui dati di concentrazione dell'insulina aspart in scala logaritmica.

La funzione utilizzata per calcolare la costante di eliminazione è la seguente:

```
function [k] = k_of_elimination(dati,n)
C = dati(:,2);
log_C = log(C);
t = dati(:,1);
% ----- stima di K -----
% uso gli ultimi n punti per fare la regressione lineare
G(:,1) = t(end-n:end);
G(:,2) = 1;
p = inv(G'*G)*G'*log_C(end-n:end);
k = -p(1);
q = p(2);

end
```


Capitolo 5

Risultati

5.1 Insuline prandiali

Le insuline prandiali prese in considerazione in questa analisi hanno riportato simili parametri di farmacocinetica (Tabella 5.1), come prevedibile, in quanto sviluppate per lo stesso scopo, ovvero l'aumento repentino di insulina nel sangue al fine di evitare un aumento eccessivo della glicemia.

	t_{max} (min)	C_{max} (kg/L)	$t_{1/2}$ (min)	AUC (kg · min/L)	t_{action} (h)	$k_{elimination}$ (min ⁻¹)
<i>Lispro</i>	58	0.50	149	6.78	8	0.014461
<i>Aspart</i>	37	0.34	179	4.16	8	0.006926
<i>Glulisina</i>	93	0.39	246	6.61	7	0.01038

Tabella 5.1: Parametri di farmacocinetica delle insuline prandiali.

Il tempo di picco è simile in tutte le insuline di questo genere, attestandosi attorno all'ora, intervallo di tempo necessario al fine di abbassare la glicemia post-prandiale e evitare episodi di iperglicemia. Le concentrazioni massime normalizzate rispetto alla dose somministrata indicano un'elevata concentrazione, avendo dunque un effetto ipoglicemizzante elevato in modo da contrastare un aumento post-prandiale repentino di glucosio nel sangue.

Le emivite, che si attestano intorno alle 2-3 ore (maggiore per la Glulisina), hanno un valore adatto alla funzione delle insuline prandiali. Il loro effetto è infatti breve, vengono assorbite con grande rapidità ed agiscono in modo veloce nel diminuire i livelli di glucosio nel sangue, dimostrandosi estremamente vantaggiose dopo i pasti. La loro emivita risulta quindi essere ottimale per le insuline prandiali.

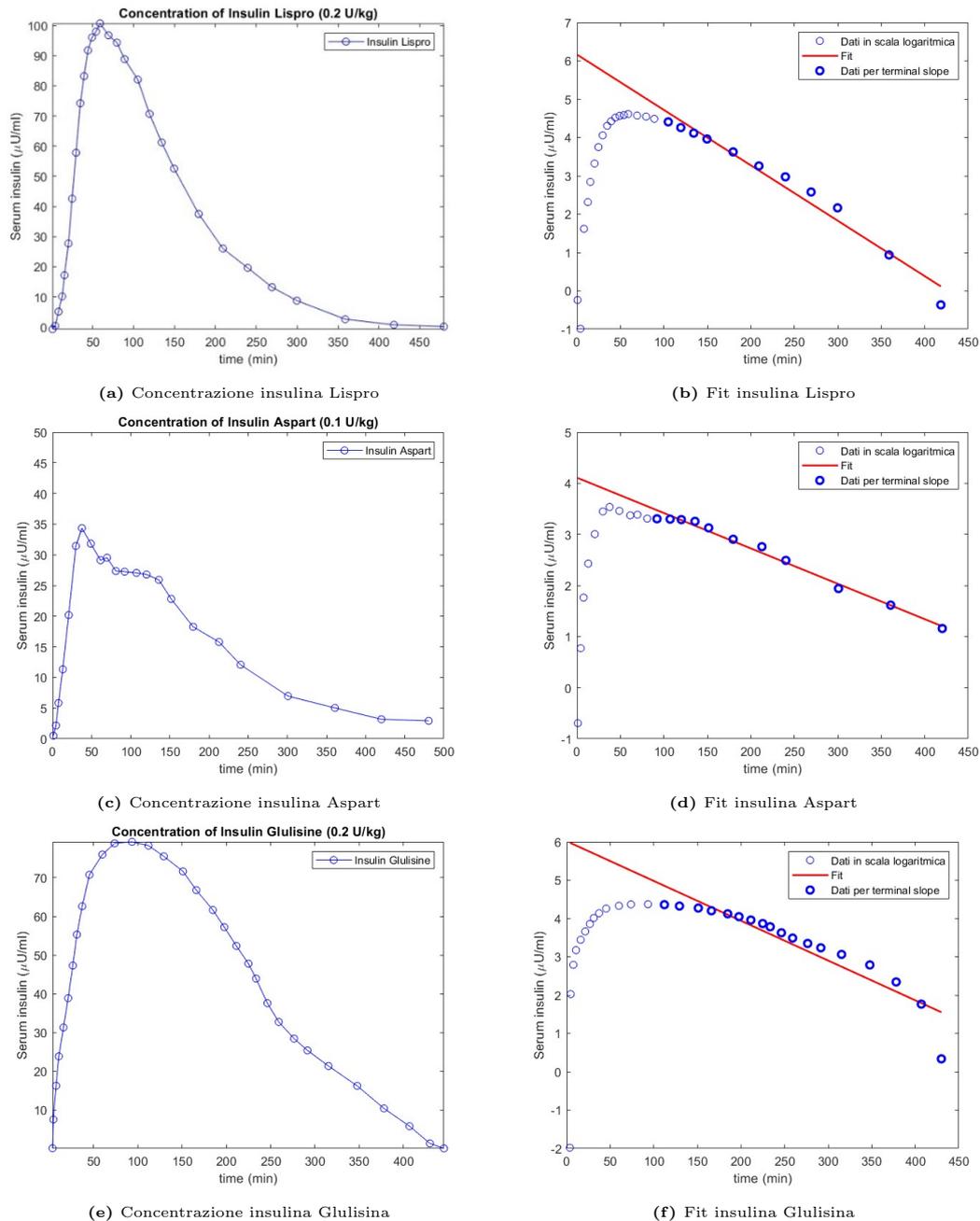


Figura 5.1: Profili di concentrazione e fit del modello sui dati di insulina Lispro (a,b), Aspart (c,d) e Glulisina (e,f).

Anche l' AUC normalizzata rispetto alla dose somministrata delle diverse insuline prandiali prese in considerazione, che va da 4.16 a 6.78 kg min/mL , risulta essere adatta allo scopo delle insuline prandiali, in quanto indica un'azione piú rapida e intensa dell'insulina, auspicata dopo i pasti per ridurre rapidamente i picchi glicemici.

I tempi di azione, che si attestano tra le 7 e 8 ore, sono adatti allo scopo

delle insuline prandiali, poiché tali analoghi esauriscono velocemente evitando di causare episodi di ipoglicemia dovuta alla presenza residua di insulina nel sangue.

Infine, anche le costanti di eliminazioni (Figura 5.1) calcolate riflettono il comportamento voluto dalle insuline prandiali. Se vengono infatti paragonate alle costanti di eliminazione degli analoghi di insulina basale, questi parametri sono di un ordine di grandezza maggiore, indicando così una più veloce scomparsa del farmaco dal flusso sanguigno.

In conclusione, le insuline prandiali prese in considerazione non differiscono tra di loro a livello farmacocinetico, risultando così molto simili nel loro effetto ipoglicemizzante richiesto nei pazienti diabetici dopo la consumazione di un pasto.

5.2 Insuline basali

Le insuline basali analizzate in questa tesi comprendono analoghi long-acting, ultra long-acting e once weekly. Si può notare infatti (Tabella 5.2) che i parametri farmacocinetici spaziano in un range più ampio rispetto alle insuline prandiali, avendo infatti diverse funzioni e scopi.

	t_{max} (min)	C_{max} (kg/L)	$t_{1/2}$ (min)	AUC (kg · min/L)	t_{action} (h)	$k_{elimination}$ (min ⁻¹)
<i>Glargina U100</i>	240	0.055	1140	31.61	28	0.0010215
<i>Galrgina U300</i>	361	0.043	1673	28.65	31	0.00054804
<i>Degludec</i>	478	0.578	1380	432.9	42	0.000413
<i>BIF</i>	2880	4.81 (mg/L)	6240	48480 (mg · min/L)	240	0.000022318
<i>Icodec</i>	1440	9.92	9360	182.259	169	0.000080041

Tabella 5.2: Parametri di farmacocinetica delle insuline basali.

Il tempo di picco, così come l'emivita e il tempo di azione rispecchiano le diverse categorie di appartenenza sopra citate. Infatti, l'insulina long-acting (Glargine U100), sebbene abbia una farmacocinetica molto simile alla Glargine U300 (ne differisce solo per concertazione) ha un tempo di picco che è la metà di quello della Degludec (240 minuti contro i 480), ed ha sia un'emivita che un tempo di azione molto più breve rispetto all'IDeg (rispettivamente 840 contro 1380 minuti e 28 contro 42 ore), tempo che risulta essere comunque molto più breve di quello delle once-weekly insulin, i cui parametri farmacocinetici risultano essere adatti ad un'insulina la cui somministrazione è richiesta una sola volta a settimana. Allo stesso modo le concentrazioni massime e le AUC normalizzate mostrano la

differente azione delle varie categorie di insuline basali: le insuline OWI hanno un'area under the curve più elevata rispetto alle long-acting, suggerendo una maggiore esposizione all'insulina nel corso del tempo, desiderabile per garantire un controllo glicemico prolungato e stabile.

Infine, anche la costante di eliminazione (Figura 5.2 e 5.3) rispecchia i precedenti risultati: questo parametro dell'insulina long-acting differisce di un ordine di grandezza rispetto a quelli degli analoghi ultra-long acting che a loro volta differiscono di un ordine di grandezza rispetto a quelli delle OWI.

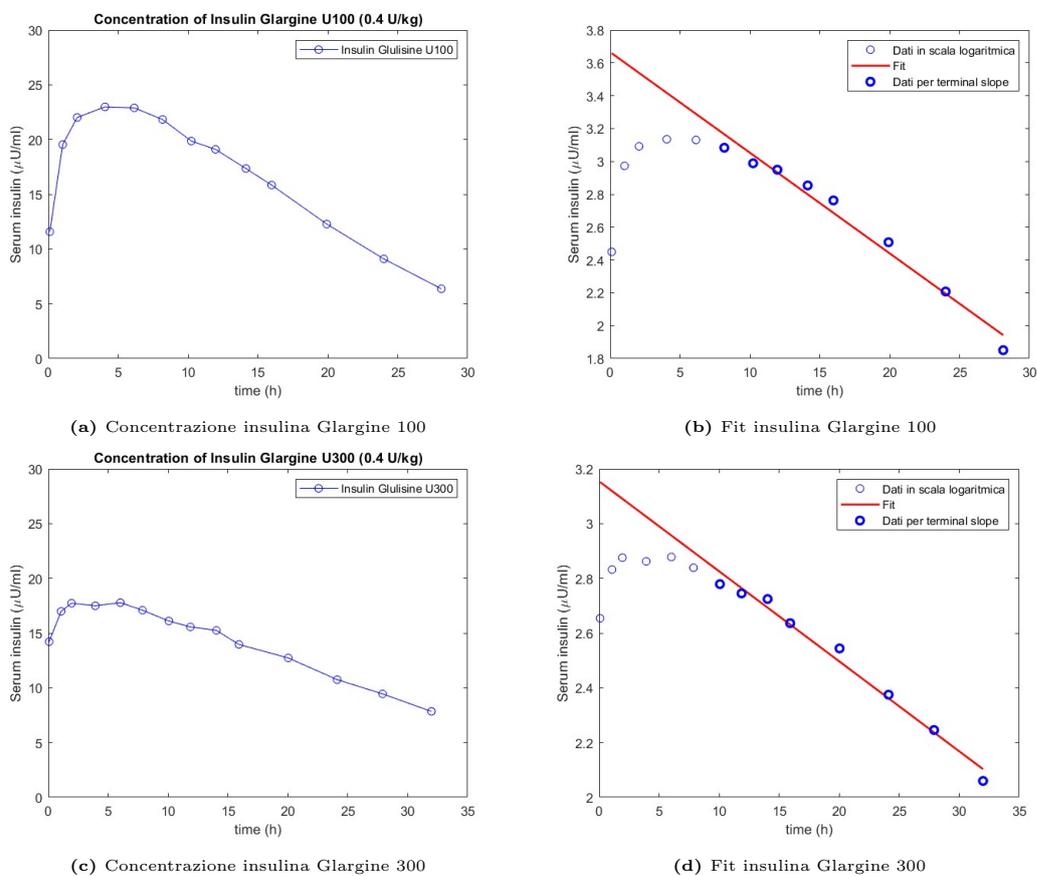


Figura 5.2: Profili di concentrazione e fit sul modello dei dati di insulina Glargine 100 (a,b), Glargine 300 (c,d).

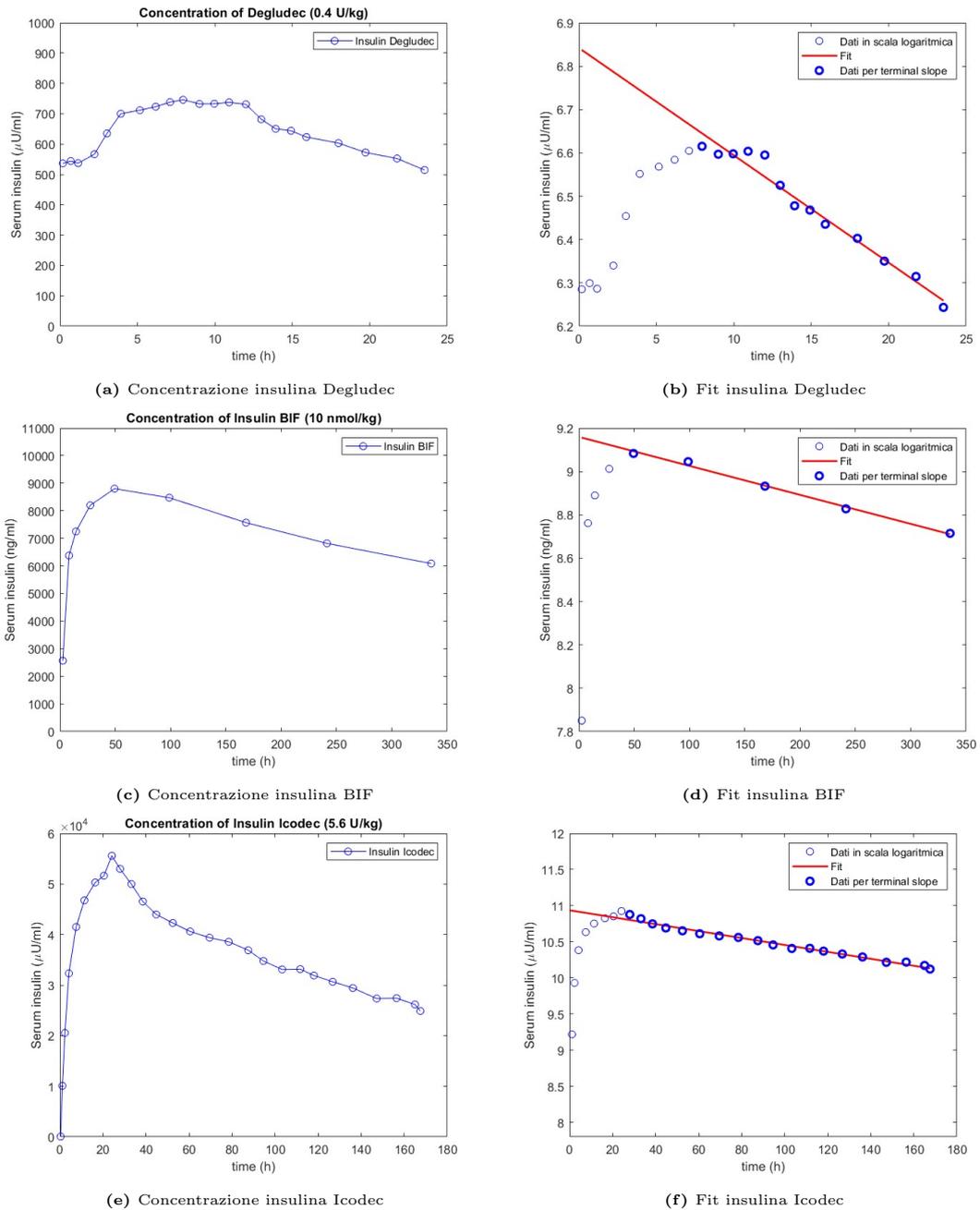


Figura 5.3: Profili di concentrazione e fit sul modello dei dati di insulina Degludec (a,b), BIF (c,d) e Icodec (e,f).

Capitolo 6

Conclusioni

L'analisi comparativa della farmacocinetica degli analoghi di insulina rappresenta un argomento di supporto allo studio e alla gestione del diabete, una malattia cronica che affligge milioni di persone in tutto il mondo. Questa tesi ha dedicato ampio spazio all'esame approfondito di questa tematica, cercando di evidenziare le diverse caratteristiche farmacocinetiche dei vari analoghi di insulina disponibili sul mercato e sulle implicazioni cliniche che ne derivano.

Uno degli aspetti fondamentali che emerge dall'analisi comparativa fatta è l'importanza di comprendere le peculiarità farmacocinetiche di ciascun analogo di insulina. La farmacocinetica si riferisce alla distribuzione del farmaco nel corpo, includendo fenomeni di assorbimento, distribuzione, metabolismo e degradazione. Nel contesto degli analoghi di insulina, queste caratteristiche sono fondamentali perché influenzano direttamente l'efficacia e la sicurezza del trattamento. Ad esempio, alcuni analoghi di insulina sono progettati per avere un inizio d'azione più rapido, consentendo un controllo più immediato dei livelli di glucosio dopo i pasti, mentre altri hanno una durata d'azione prolungata, garantendo una copertura costante per un periodo più lungo.

La personalizzazione della terapia insulinica è un obiettivo fondamentale nella gestione del diabete mellito. Non esiste una soluzione universale che sia adatta a tutti i pazienti, poiché le esigenze di controllo glicemico possono variare notevolmente da individuo a individuo. Pertanto, l'analisi comparativa della farmacocinetica degli analoghi di insulina fornisce agli operatori sanitari e ai pazienti informazioni chiave per supportare decisioni sul trattamento più adatto.

Un aspetto importante da considerare è anche la comodità di somministrazione degli analoghi di insulina. Alcuni vengono somministrati tramite iniezione sottocutanea attraverso siringa da personale sanitario, mentre altri sono disponibili

in formulazioni che consentono l'uso di dispositivi di somministrazione più pratici, come penne o pompe. Questo può influenzare significativamente l'aderenza del paziente al trattamento e la sua qualità di vita.

Ovviamente, quella sottocutanea non è l'unica via di somministrazione possibile: la somministrazione per via orale e inalatoria rappresentano un'alternativa e sono un'area di ricerca in costante evoluzione nell'ambito della gestione del diabete mellito. Mentre l'insulina iniettata è il metodo tradizionalmente utilizzato per controllare la glicemia nei pazienti diabetici, le alternative orali e inalatorie stanno emergendo come possibili soluzioni per rendere più agevole e meno invasiva la terapia insulinica. La somministrazione orale mira a sviluppare una forma di insulina che può essere ingerita per via orale, ma che rimane efficace nel raggiungere la circolazione sanguigna e regolare i livelli di glucosio. D'altra parte, la somministrazione inalatoria prevede l'uso di dispositivi che consentono ai pazienti di inalare l'insulina, consentendo un assorbimento più rapido attraverso i polmoni. Entrambi questi approcci permettono potenzialmente di migliorare la qualità della vita dei pazienti diabetici, riducendo la necessità di iniezioni quotidiane. Tuttavia, è importante sottolineare che queste modalità di somministrazione sono ancora in fase di sviluppo e sottoposte a rigorosi studi clinici per valutarne l'efficacia e la sicurezza a lungo termine.

In conclusione, questa tesi ha approfondito gli aspetti relativi alla farmacocinetica degli analoghi di insulina sottocutanea, mettendo in luce le differenze esistenti tra le diverse formulazioni disponibili sul mercato. Attraverso un'analisi comparativa dettagliata, si è giunti a comprendere come le caratteristiche farmacocinetiche di ciascun analogo si prestino alla gestione del diabete mellito in base alle diverse necessità e fattori esterni che possono presentarsi in diversi momenti della giornata.

Bibliografia

- [1] "diabetes". world health organization (who). https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1. Consultato il 4 settembre 2023.
- [2] "idf diabetes atlas 2021, idf diabetes atlas". idf diabetes atlas, tenth edition. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Consultato l'8 settembre 2023.
- [3] R. H. Becker, R. Dahmen, K. Bergmann, A. Lehmann, T. Jax, and T. Heise. New insulin glargine 300 units·ml¹ provides a more even activity profile and prolonged glycemic control at steady state compared with insulin glargine 100 units·ml¹. *Diabetes Care*, 38:637–643, 4 2015.
- [4] R. H. A. Becker and A. D. Frick. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glulisine. *Clinical Pharmacokinetics*, 47:7–20, 2008.
- [5] R. Campbell, J. R. White, T. Levien, and D. Baker. Insulin glargine. *Clinical Therapeutics*, 23:1938–1957, 12 2001.
- [6] J. N. Clements, T. Threatt, E. Ward, and K. M. Shealy. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glargine 300 u/ml. *Clinical Pharmacokinetics*, 56:449–458, 5 2017.
- [7] S. C. L. Gough, S. Harris, V. Woo, and M. Davies. Insulin degludec: overview of a novel ultra long-acting basal insulin. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15:301–309, 4 2013.
- [8] H. Haahr and T. Heise. A review of the pharmacological properties of insulin degludec and their clinical relevance. *Clinical Pharmacokinetics*, 53:787–800, 9 2014.

- [9] T. Heise, J. Chien, J. M. Beals, C. Benson, O. Klein, J. S. Moyers, A. Haupt, and E. J. Pratt. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the novel basal insulin fc (insulin efsitora alfa), an insulin fusion protein in development for once-weekly dosing for the treatment of patients with diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 25:1080–1090, 4 2023.
- [10] T. Heise, L. Nosek, S. G. Böttcher, H. Hastrup, and H. Haahr. Ultra-long-acting insulin degludec has a flat and stable glucose-lowering effect in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14:944–950, 10 2012.
- [11] I. B. Hirsch. Insulin analogues. *New England Journal of Medicine*, 352:174–183, 1 2005.
- [12] F. Holleman and J. B. Hoekstra. Insulin lispro. *New England Journal of Medicine*, 337:176–183, 7 1997.
- [13] P. D. Home, L. Barriocanal, and A. Lindholm. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel rapid-acting insulin analogue, insulin aspart, in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55:199–203, 5 1999.
- [14] D. C. Howey, R. R. Bowsher, R. L. Brunelle, and J. R. Woodworth. [lys(b28), pro(b29)]-human insulin: A rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes*, 43:396–402, 3 1994.
- [15] T. B. Kjeldsen, F. Hubálek, C. U. Hjørringgaard, T. M. Tagmose, E. Nishimura, C. E. Stidsen, T. Porsgaard, C. Fledelius, H. H. F. Refsgaard, S. Gram-Nielsen, H. Naver, L. Pridal, T. Hoeg-Jensen, C. B. Jeppesen, V. Manfè, S. Ludvigsen, I. Lautrup-Larsen, and P. Madsen. Molecular engineering of insulin icodec, the first acylated insulin analog for once-weekly administration in humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64:8942–8950, 7 2021.
- [16] E. J. Mansell, S. Schmidt, P. D. Docherty, K. Nørgaard, J. B. Jørgensen, and H. Madsen. Evaluation of pharmacokinetic model designs for subcutaneous infusion of insulin aspart. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 44:477–489, 10 2017.
- [17] J. S. Moyers, R. J. Hansen, J. W. Day, C. D. Dickinson, C. Zhang, X. Ruan, L. Ding, R. M. Brown, H. E. Baker, and J. M. Beals. Preclinical characteri-

- zation of ly3209590, a novel weekly basal insulin fc-fusion protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 382:346–355, 9 2022.
- [18] S. R. Mudaliar, F. A. Lindberg, M. Joyce, P. Beerdsen, P. Strange, A. Lin, and R. R. Henry. Insulin aspart (b28 asp-insulin): a fast-acting analog of human insulin: absorption kinetics and action profile compared with regular human insulin in healthy nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, 22:1501–1506, 9 1999.
- [19] E. Nishimura, L. Pridal, T. Glendorf, B. F. Hansen, F. Hubálek, T. Kjeldsen, N. R. Kristensen, A. Lützen, K. Lyby, P. Madsen, T. Åskov Pedersen, R. Ribel-Madsen, C. E. Stidsen, and H. Haahr. Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal insulin analog designed for once-weekly dosing. *BMJ Open Diabetes Research Care*, 9:e002301, 8 2021.
- [20] L. Plum-Mörschel, L. R. Andersen, S. Hansen, U. Hövelmann, P. Krawietz, N. R. Kristensen, L. L. Lehrskov, and H. Haahr. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of insulin icodec after subcutaneous administration in the thigh, abdomen or upper arm in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Drug Investigation*, 43:119–127, 2 2023.
- [21] D. M. Robinson and K. Wellington. Insulin glulisine. *Drugs*, 66:861–869, 2006.
- [22] M. Schiavon, C. D. Man, and C. Cobelli. Modeling subcutaneous absorption of fast-acting insulin in type 1 diabetes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 65:2079–2086, 9 2018.
- [23] M. Schiavon, R. Visentin, C. Giegerich, T. Klabunde, C. Cobelli, and C. D. Man. Modeling subcutaneous absorption of long-acting insulin glargine in type 1 diabetes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 67:624–631, 2 2020.
- [24] B. Sheldon, D. Russell-Jones, and J. Wright. Insulin analogues: an example of applied medical science. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11:5–19, 1 2009.
- [25] M. Shiramoto, T. Eto, S. Irie, A. Fukuzaki, L. Teichert, J. Tillner, Y. Takahashi, M. Koyama, R. Dahmen, T. Heise, and R. H. A. Becker. Single-dose

new insulin glargine 300 $\mu\text{u/ml}$ provides prolonged, stable glycaemic control in Japanese and European people with type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 17:254–260, 3 2015.