

## Nuevas insulinas. Insulinas inteligentes

Dr. Guillermo Dieuzeide

Especialista en Endocrinología, Jefe del Servicio Endocrinología y Diabetes, Hospital Ntra Sra del Carmen Chacabuco, Provincia de Buenos Aires, Argentina

La formidable intuición del Dr. Banting en 1921 llevó al descubrimiento y posterior cristalización de la insulina en la Universidad de Toronto. Su uso en el paciente Leonard Thompson marcó un hito histórico en la humanidad y determinó de manera inmediata un éxito científico que se tradujo en beneficios terapéuticos para millones de pacientes con diabetes (DM).

Pero aún la transformación de esta molécula en un fármaco seguro que atendiera la necesidad de un reemplazo fisiológico adecuado de la insulina endógena, fue un largo proceso que aún continúa.

En 1936 Hagerdon y Jensen descubrieron que el añadido de protamina, una proteína obtenida del semen de la trucha del río, podía prolongar la vida media de la insulina y en 1946 el laboratorio Novo Nordisk desarrolló una insulina de acción intermedia (NPH) con cristales de insulina y protamina. En 1959 Yalow y Salomon elaboraron la idea de que, dado el alto grado de reacciones alérgicas frente a las insulinas de origen bovino, debería utilizarse una insulina “humanizada”. A esto se sumó el problema de la insuficiente cantidad de provisión de páncreas bovino y porcino como materia prima. Hacia 1973 se obtuvieron las primeras insulinas animales purificadas “monocomponentes”.

Pero el gran salto lo produjo la empresa Genetech en 1980, tras la publicación de Goeddel y Riggs, al obtener la proteína insulina humana por técnica de DNA recombinante en cultivos de bacterias *Escherichia coli*. En 1982 el laboratorio Lilly fabricó la primera insulina humana obtenida con ADN recombinante a gran escala, lo que posteriormente logró Novo Nordisk con la utilización de cultivos de *Saccharomyces Cerviciae*<sup>1-2</sup>.

En 1996 Lilly desarrolló una insulina análoga de acción mas rápida con el cambio de posición de los aminoácidos lisina y prolina en la cadena B de la misma, y Novo Nordisk produjo una insulina rápida con la sustitución del aminoácido prolina por áspártico en posición B28. Tiempo después, el laboratorio Sanofi obtuvo un análogo rápido con el cambio de posición de aminoácidos en posición B3 de asparagina por lisina y la lisina de posición B29 por glutamina.

En relación a las insulinas análogas lentas, el laboratorio Sanofi logró un análogo de acción prolongada al sustituir la asparaginasa por glicina en la cadena alfa y añadir dos residuos de arginina en la cadena beta. Los aminoácidos arginina cambian el punto isoeléctrico de la molécula de un pH 5,4 a 6,7, lo que hace que la misma sea más soluble a pH ácido y menos a pH fisiológico. En 2005 apareció un análogo lento de Novo Nordisk, la insulina detemir, lográndose por el añadido de un ácido graso de 14 carbonos (ácido mirístico) en posición B29 y eliminando el aminoácido treonina en posición 30. Esto determinó que la insulina se une de manera reversible a la albumina<sup>1-2</sup>.

Al final de esta década aparecieron finalmente los análogos lentos de segunda generación como el caso de la insulina degludec, en la cual se remueve la treonina de posición B30 y se le adiciona un ácido graso de 16 carbonos unido a la lisina de posición B29 con un espaciador de ácido gutámico lo cual permite una prolongación de la acción de hasta casi 42 horas<sup>3</sup>. Posteriormente, Sanofi desarrolló la insulina Toujeo concentrada en 300 U lo que facilitó su proceso de difusión a un menor volumen de inyección y el año pasado se tuvo la oportunidad de contar con la insulina degludec concentrada en 200 U<sup>4</sup>.

A partir de 2017 comenzaron a disponerse los ensayos de nuevas alternativas de insulinas ultra rápidas: la insulina Fiasp<sup>5,6,7</sup> y la insulina ultra rápida lispro<sup>8</sup>. En el primer caso se agregó a la molécula de insulina niacynamida lo que modificó la velocidad de

absorción, y arginina que actúa como un estabilizador de la molécula. Con estas modificaciones se logró dos veces más exposición a la insulina en el área bajo la curva en los primeros 30 minutos en comparación a la insulina aspártica rápida. Algo similar ocurre con la insulina ultra rápida lispro (insulin lispro) utilizando tepronsintil (un vasodilatador) y citrato que aumenta la permeabilidad vascular adelantando la aparición de insulina en sangre en 8 minutos. En pacientes con DM1, la insulina lispro ultra rápida reduce la excursión de la glucemia posprandial en un 30-40% con respecto a la insulina lispro.

Pero uno de los cambios más promisorios de los últimos tiempos es la obtención de insulinas de larga duración que pueden utilizarse una vez por semana. Una de las empresas involucradas fue Lilly con la utilización de insulina unida a la fracción FC de inmunoglobulinas (IgF2 FC). Otros estudios involvieron a la insulina PEGyada y finalmente Novo Nordisk desarrolló la insulina icodec, con la remoción de una treonina terminal en posición 29 en la cadena B y la sustitución de 3 aminoácidos (A14E, B16H, y B25H), esto unido a través de un espaciador o *linker* hidrofílico a un diácido graso de 20 carbonos. Post inyección, los hexámeros de insulina se disocian en monómeros y se unen a la albumina para formar un depósito inactivo fuertemente ligado, lo que reduce la degradación enzimática y atenua la unión al receptor y el *clearance* de insulina. Posteriormente, la molécula comienza a liberar lentamente los monómeros y luego de 3 a 4 inyecciones semanales se alcanza un estado de equilibrio con una continua liberación de la insulina icodec de la albumina.

Para la insulina icodec se reportó una vida media de 196 horas (8,6 días); en general toma tres vidas medias alcanzar el estado de equilibrio y, a mayor longitud de la vida media, menores los picos y fluctuaciones de la concentración de insulina plasmática. En un estudio randomizado, doble ciego, en el que el objetivo primario fue el cambio de la HbA1c a las 26 semanas comparando insulina icodec semanal vs insulina glargina diaria en pacientes con DM2 no tratados previamente con insulina, se observó la no inferioridad de la primera con respecto a la segunda. El tratamiento con insulina icodec logró una reducción de la HbA1c a -1,33 vs -1,15 la insulina glargina, con una diferencia de 0,18% (95% IC : -0,38 a 0,02 p:0,08 seg). La frecuencia de episodios de hipoglucemia con nivel 2 (<54 mg/dl) o nivel 3 (deterioro cognitivo severo) fue similar entre ambos tratamientos. La glucemia media fue inferior en el grupo tratado con icodec vs glargina y 72% de los pacientes alcanzó una HbA1c de <7% con insulina icodec vs 68% con la insulina glargina diaria. La dosis necesaria de insulina al final del estudio fue inferior con insulina degludec (33U/día) vs insulina glargina (41u/día)<sup>9</sup>. Esta aproximación podría mejorar sustancialmente la adherencia de los pacientes al tratamiento.

En estudios presentados en la 86<sup>th</sup> Reunión de la *American Diabetes Association* (ADA) 2021, realizados con monitoreo de glucemia continua, se observó que los pacientes tratados con insulina icodec tenían un porcentaje de tiempo en rango (TIR) del 83% vs 75% en el caso de insulina glargina diaria, y se encontró que los lapsos de duración de los episodios de hipoglucemia fueron similares entre ambos tratamientos<sup>10</sup>.

El otro gran desafío fue el desarrollo de insulinas orales. Las ventajas de la ingestión oral son incuestionables ya que provee una insulina con mayor concentración en el lecho vascular portal que periférico actuando directamente sobre el tejido hepático, además de promover mayor adherencia de los pacientes al tratamiento. No obstante, su desarrollo no estuvo exento de dificultades. Los primeros intentos comenzaron en 1923 procurando el desarrollo de insulina de acción prandial, no obstante, la administración cercana a las comidas fue uno de los principales obstáculos dada la multiplicidad de variables interviniéntes (tipo de ingesta, velocidad de absorción, retardo en la evacuación gástrica etc.). Uno de los intentos más desarrollados fue el uso de insulina tregopil, un análogo que incorpora polietilenglicol en la cadena lateral B 29 y caprato de sodio como un facilitador de la absorción. Tiene una rápida absorción y debe administrarse 30 minutos antes de la ingesta. Sin embargo, algunos estudios recientes en pacientes DM2

muestran una menor eficacia y un deterioro en los niveles de HbA1c en comparación con insulina aspártica. Hay estudios en curso en pacientes DM1. Otra aproximación es la insulina ORMD -0801, pero si bien se iniciaron varios ensayos clínicos aún no hay publicaciones al respecto.

En general el problema es similar: la alta variabilidad de absorción impide determinar una clara relación dosis-respuesta combinado con una baja biodisponibilidad<sup>11</sup>.

Más éxito tuvieron los análogos lentos basales orales. La insulina basal oral 338 (I338) se creó a través de la tecnología de potenciación de la permeabilidad gastrointestinal (GIPET I) con la administración simultánea de caprato de sodio (un conservante presente en los lácteos que fuera aprobado por la FDA). La acilación de la molécula con un 18C diácido graso a través de un conector a la I338 permite una unión reversible a la albumina demostrando una rápida absorción y una vida media de casi 70 horas. En un estudio randomizado, doble ciego, comparando la eficacia de la insulina I338 vs insulina glargina se demostró que la glucemia basal al final del tratamiento fue similar entre ambas ramas y los perfiles de 10 puntos de monitoreo glucémico fueron prácticamente similares. Asimismo, la HbA1c, fructosamina y péptido C fueron casi similares al final del tratamiento con una diferencia de 0,3% en favor de insulina glargina. El coeficiente de variabilidad glucémica fue ligeramente superior en la insulina I338 vs la insulina glargina (23,25% vs 17,5%). Los episodios de hipoglucemias fueron escasos y se presentaron de manera similar en ambas ramas<sup>12</sup>.

Sin embargo, el obstáculo fundamental parecía ser nuevamente la baja biodisponibilidad, ya que la dosis final requerida de I338 fue 58 veces superior a la de la insulina glargina, lo que la hace comercialmente inviable en términos de producción a gran escala.

A pesar de todos estos avances, sin embargo, el gran desafío está aún pendiente: fabricar una insulina con capacidad de liberarse e interactuar con el receptor solo en presencia de hiperglucemia y permanecer inactiva en situaciones de normo e hipoglucemias. Allí surge el concepto de desarrollar análogos de insulinas que responden a glucosa (*intrinsic glucose responsive analogues*, GRI). En forma general, los GRI pueden clasificarse en tres sistemas:

- Mecánicos: basados en algoritmos computarizados con un sistema de monitoreo continuo (GCM) acoplado al infusor de insulina (*closed loop delivery systems*) como un páncreas artificial.
- Sistemas basados en polímeros: donde la insulina es encapsulada dentro de una matriz vesicular o hidrogel que modifica su estructura en presencia de glucosa.
- Modificaciones moleculares intrínsecas en la misma molécula de insulina que le confieran a la misma la propiedad de autoactivarse en presencia de glucosa.

En el caso de las tecnologías basadas en polímeros, se desarrollaron tres tipos de modelos:

- Proteínas unidas a glucosa que incluyen lecitina, como la concavalina A, desarrolladas tempranamente por el profesor Brownlee.
- Unión a enzimas como la glucosa oxidasa, que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico con liberación de protones modificando el pH local.
- Utilización del ácido borónico (fenilboronato) que forma esteres reversibles con moléculas que contengan dioles (con dos grupos hidroxilos).

El uso de la concavalina A debió abandonarse por su riesgo mitogénico e inmunogénico. La glucosa oxidasa se ha encapsulado en matrices que son sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a la hipoxia y/o al descenso del pH aprovechando la propiedad catalítica de esta enzima para incrementar la permeabilidad al agua y regular la liberación de la hormona. Algunas matrices poliméricas en la que está incorporada la molécula de insulina incluyen *polietilenglycol* y *succinil aminofenil glucopyranoside* (llamadas globalmente

polymerosomas) son impermeables durante situaciones de normo e hipoglucemia, pero al aumentar la concentración de glucosa aumentan la permeabilidad al agua determinando cambios conformacionales que permiten la liberación de insulina. No obstante, la tecnología basada en polímeros tiene la limitación de la estabilidad de las partículas, el tiempo de retraso (*lag time*) en la liberación oportuna de la molécula de insulina con riesgos de liberación subóptima de insulina y por lo tanto excursiones de hiper o hipoglucemia, asimismo existe el problema de la degradación de la matriz en el largo plazo<sup>13,14,15,16</sup>.

Más promisorias parecen las técnicas que propenden a una modificación intrínseca de la molécula de insulina. La tecnología llamada “switch based concept” pretende un cambio conformacional de la molécula de insulina desde su forma cerrada (incapaz de unirse al receptor) a su forma abierta en la que logra su actividad biológica. En tal sentido se han utilizado las propiedades del ácido fenilborónico (PBA). Este compuesto es capaz de captar la presencia de dioles y sentir la presencia de carbohidratos. Un derivado de insulina modificado por PBA fue desarrollado por HoegJensen. En ese estudio se demostró que el añadido de PBA a la insulina en el aminoácido Lysin B29 no afecta su actividad biológica y, por otra parte, permite al análogo sentir y unirse a agentes portadores de dioles como los carbohidratos<sup>16,17,18</sup>.

Los recientes estudios de cristalografía y de microscopía electrónica cryogénica (Cryo GEN) demostraron que para la unión de la insulina a su receptor, ésta debe desprenderse de su porción terminal C de la cadena beta (residuos B20 B23) lo que permite un contacto estrecho entre la porción N terminal de la cadena alfa y el complejo receptor<sup>19</sup>. La idea detrás de este concepto es explotar este mecanismo de unión de la insulina a su receptor diseñando un cambio conformacional de la molécula dependiente de glucosa, que solo se activaría en presencia de hiperglucemia y permanecería cerrado en presencia de normo e hipoglucemia. Estudios con insulinas químicas utilizaron puentes en los que se incorpora metilfluoroboroato (metilPBA) añadido a la porción N terminal de la cadena A, y un grupo aromático diol añadido al grupo amino de Lys 28 de la cadena B a fin de proveer una ligación entre ambas cadenas. Esta insulina responde a la fructosa como monosacárido (*fructose responsive insulin*), ya que esta molécula tiene un equilibrio conformacional entre isómeros apropiado para una unión covalente y reversible con el ácido fenilborónico; el mismo se une a la subpoblación de isómeros en posición cis-1,2 diols de la fructosa que tienen una orientación polar adecuada para facilitar esta unión. En células derivadas de la línea hepatocelular (HepG2) se demostró que la actividad del receptor se activa en concentraciones de fructosa de 50 mmol/l permaneciendo inactivas en bajas concentraciones de este compuesto o en el caso de la glucosa<sup>13-20</sup>.

Existen en la actualidad estudios a fin de extender esta prueba de principio obtenida con la fructosa a insulinas respondedoras a glucosa (GRI: *glucose responsive insulin*), y se están evaluando sensores de glucosa basados en boronato y otras moléculas no basadas en boronatos. Otros puentes disulfuros entre las dos cadenas de insulina se están ensayando, de los cuales el A0 B26 parecería el más estable<sup>13-21</sup>.

Palabras clave: insulinas; historia; tratamientos.

## Bibliografía

1. Luis DA, Romero E. Análogos de insulina modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. Revista de Medicina Familiar Semergen 2010; Vol 36,8.
2. Insulin at its 100 Birthay Historical Overview. Conferencia dictada por el profesor David Harlan en la 81<sup>th</sup> Scientific Session of the American Diabetes Association. 2021 3. Haar H, Fita EG, Heise T. A review of insulin degludec/insulin aspart pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and their implications in clinical use. Clin

- Pharmacokinet 2017; 56(4):339-354. DOI: 10.1007/s40262-016-0455-7.
4. Gough SC, Bhargava A, Jain R, Mersebach H, Rasmussen S, Bergenthal R. Low volume insulin degludec 200 U/ml once daily improves glucemic control similarly to insulin glargine with a low risk of hypoglycemia in insulin naive patients with type 2 diabetes :a 26 week randomized, controled multinational treat to target trial. The low begin low volume trial. Diabetes Care 2013; 36:2536-2542.
5. Heise T, Stender-Petersen K, Hovelman U, Jacoben JB, Nosek L, Zilstra E, Haar H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of faster acting insulin aspart vs insulin aspart across a clinically relevant dose range in subjects with type 1 diabetes mellitus. Clin Pharmacokinet 2017; 56(6):649-660. 6. Kazda, et al. Diabetes 2017,66 (supl 1 ) A 247-8
7. Ishimura et al. ADA 2020 236OR
8. Linnemann H, Zhang Q, La Bell E, Dellva MA, Coutant D, Hovelman U, Plum Morschel L, Herbrand T, Leohr J. Pharmacokinetic and glucodinamyc of ultrarapid insulin lispro (URLI) vs insulin lispro in younger adults and elderly patients with type 1 diabetes mellitus a randomized controled clinical trial. Clin Pharmacokinet 2020; 59(12):15891599.
9. Rosenstock J, et al. Once week insulin for type 2 diabetes without previous insulin treatment. The New England J of Med 2020; 383:2107-16.
10. Silver R, Asong M, Begtrup K, Heller S, Liu L, Rosentok J. Similar hypoglycemia duration with once weekly insulin icodex vs insulin glargine u-100 in insulin naive or insulin experienced patients with type T2D. Oral presentation Insulins Symposium 81th ADA meeting 2021.
11. Heise T. The future of insulin therapy. Diabetes Research and Clinical Practice 2021; 75:10 8820
12. Hallberg I, Lyby K, Wasserman K, Heise T, Zijlstra E, Plum Morschel L. Efficacy and safety of oral basal insulins vs subcutáneous insulin glargine in type 2 diabetes: a randomized doublé bind, phase 2 trial. Lancet Diabetes & Endocrinology 2019; 7:17988. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30372-3.
13. Jarosinski M, Dhayalan B, Rege N, Chatterjee D, Weiss M. Smart insulins delivery technologies and intrinsic glucose responsive insulin analogues. Diabetologia 2021; 64:1016-1029.
14. Development of glucose responsive smart insulin system. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2017; 24:267-278.
15. Rege N, Phillips N, Weiss M. Insulin therapy: future perspectives Cernea S, Raz I American Journal of therapeutics 2019; 0:1-2.
16. Wang J, Wan Z, Yu J, Kahkoska A, Buse J, Gu Zhen. Glucose responsive insulins and delivery systems: innovation and traslation. Adv Mather 2020; 32(13).
17. Hoeg-Jensen T. Glucose responsive insulins. Molecular Metabolism 2021; 46:101107.
18. Bakh N, Cortinas A, Weiss M, Langer R, Anderson D, Gu Z, Sanjoy D, Strano D. Glucose responsive insulins by molecular and physical designs. Nature Chemistry 2017; 9:93-944. DOI: 10.1038/NCHEM.2857.
19. Scapin G, Dandey V, Zhang Z, Prosise W, Hruza A, Kelly Th, Mayhood T, Strickland C, Potter C, Carragat B. Structure of the insulin receptor complex by a single particle CryoEm analysis. Nature 2018; 556 (7699):122-125.
20. Bakh N, Cortinas A, Weiss M, Langer R, Anderson D, Gu Z, Sanjoy D, Strano D. Glucose responsive insulins by molecular and physical designs. Nature Chemistry 2017;9:93-944. DOI: 10.1038/NCHEM.2857.
21. The future of insulins as therapy. Conferencia dictada por el profesor Michael Weiss en la 81<sup>th</sup> sesión de la American Diabetes Association 2021.

## New insulins. Smart insulin

Dr. Guillermo Dieuzeide

Endocrinology Specialist, Head of the Endocrinology and Diabetes Service, Hospital Ntra Sra del Carmen Chacabuco, Province of Buenos Aires, Argentina

In 1921, Dr. Banting's impressive intuition led to discovery and subsequent crystallization of insulin in Toronto University. Its administration to the patient Leonard Thompson marked a historic milestone in humanity and immediately determined a scientific success which translated into therapeutic benefits for millions of patients diagnosed with diabetes.

However, transformation of this molecule into a safe drug that would solve the need for an adequate physiological replacement for endogenous insulin is still a long ongoing process.

In 1936, Hagerdon and Jensen discovered that adding protamine, a protein obtained from river trout semen, could extend insulin median lifespan. In 1946, an intermediate acting insulin (NPH), which includes insulin and protamine crystals, was developed at Novo Nordisk Lab. In 1959, due to a high level of allergic reactions to bovine derived insulin, Yalow and Salomon thought "humanized" insulin should be used. Moreover, there was an issue with the amount of bovine and porcine pancreas supply as raw material not being enough. Towards 1973, early "monocomponent" purified animal insulins were manufactured.

In 1980, a big leap forward was given by Genentech company, after Goeddel's and Riggs' publication, while obtaining human insulin protein via recombinant DNA in Escherichia Coli culture technology. In 1982, the first insulin human obtained from recombinant DNA at a big scale was produced by Lilly Lab. Subsequently, Novo Nordisk achieved the same result by using *Saccharomyces Cerevisiae* cultures. (1-2)

In 1996, faster acting analog insulin with a L-lysine and L-proline switched position in its B chain was developed by Lilly. Also, fast-acting insulin with L-proline replaced by aspart at position B 28 was developed by Novo Nordisk. Later, Sanofi Lab obtained a fast analog with a switched position of amino-acids at position B 3 of L-asparagine for lysine and lysine at position B 29 for glutamine.

As regards long-acting analog insulins, Sanofi Lab achieved a long-acting analog by replacing asparaginase for glycine on the α chain and adding arginine residues on the β chain. L-arginine changes the isoelectric point of a molecule, going from a 5,4 pH to 6,7, making it more soluble at acid pH and less at physiological ph. In 2005, a longactinganalog was developed by Novo Nordisk, which is called insulin Detemir. It was created by adding a 14-carbon fatty acid (myristic acid) at position B 29 and suppressing Lthreonine at position 30. This determines insulin bonding to albumin in a reversible manner<sup>1-2</sup>.

By the end of this decade, long-acting insulin analogs of a second generation finally appeared, such as insulin Degludec, in which threonine at position B 30 was removed and a 16-carbon fatty acid was added to lysine at position B 29 via a spacer glutamic acid, which allowed a prolonged action up to almost 42 h<sup>3</sup>. Subsequently, Sanofi developed concentrated insulin Toujeo in 300 U, which facilitated its diffusion process at a lower injection volume. Last year, concentrated insulin Degludec in 200 U was manufactured<sup>4</sup>.

Since 2017, new ultra-rapid-acting insulin alternative trials started to be available: insulin Fiasp<sup>5,6,7</sup> and ultra-rapid-acting insulin lispro<sup>8</sup>. In the first case, niacinamide was added to the insulin molecule, modifying absorption rate and also arginine was added, acting like a molecule stabilizer. By performing these modifications, more exposure to insulin in the area under the curve in the first 30 minutes, as compared to faster insulin aspart, was achieved twice. A similar situation occurred with ultra-rapid-acting insulin lispro (insulin lispro –aabc), using Treprostinil (a vasodilator) and citrate, which increases

vascular permeability accelerating the apparition of insulin in blood by 8 minutes. In patients diagnosed with T1D, ultra-rapid-acting insulin lispro reduces postprandial glycemic excursion by 30-40% compared to insulin lispro.

However, one of the most promising changes lately was obtaining long-duration insulins that can be used weekly. One of the companies involved was Lilly by using insulin joined to an immunoglobulin Fc fragment (IgF2 FC). Other studies involved insulin PEGylated and finally, insulin icodex was developed by Novo Nordisk. It featured a threonine terminal remotion at position 29 in chain B and replacement of 3 amino acids (A14E,B16H,yB25H), joined via a spacer or hydrophilic linker to a 20-carbon fatty diacid. After injection, insulin hexamers dissociate in monomers and join albumin to create an inactive deposit strongly tied, reducing enzymatic degradation and mitigating a bond to receptor and insulin clearance. Afterwards, the molecule begins to slowly release monomers and after 3 to 4 weekly injections, equilibrium is achieved by a frequent release of insulin icodex of albumin.

Insulin icodex was reported to have a median lifespan of 196 h (8,6 days). Generally, it takes 3 median lifespans to achieve equilibrium and the more length the median lifespan, the less peaks and fluctuations of plasma insulin concentration. In a randomized double-blind study in which the main goal was switching HbA1c at 26 weeks, comparing weekly insulin icodex vs daily insulin glargine in patients diagnosed with T2D, not previously treated with insulin, no inferiority of the first compared to the second one was observed. Insulin icodex treatment achieved a reduction of HbA1c at -1,33 vs -1,15 in insulin glargine, with a difference of 0,18% ( 95% IC :-0,38 a 0,02 p:0,08 seg). Frequency of level 2 hypoglycemia (< 54 mg/dl) or level 3 (severe cognitive impairment) was similar in both treatments. Medium glycemic was inferior in such group treated with icodex vs glargine and 72% of the patients reached HbA1c of < 7% with insulin icodex vs 68% with daily insulin glargine. Needed dose of insulin at the end of the study was less as regards insulin Degludec (33U /day) vs insulin glargine (41u/day)<sup>9</sup>. This approximation could substantially improve patients' adherence to such treatment.

In studies presented at the 86th Reunion of ADA 2021, performed with constant glycemic monitoring, it was observed that patients treated with insulin icodex had an 83% time in range (TIR) vs 75% in the case of the ones treated with daily insulin glargine and similar duration intervals of hypoglycemic episode in both treatments was found<sup>10</sup>.

Another great challenge was developing oral insulin: there is no doubt about the advantages of oral administration due to providing a higher concentration in the portal vascular bed and being peripheral, acts directly on liver tissue. It also promotes increasing patients' adherence to treatment. However, oral insulin development had obstacles on its way. Early attempts started in 1923, ensuring prandial insulin development. Nonetheless, administration near meals was one of the main obstacles given the multiple intervening variables (drug administration type, absorption rate, gastric evacuation delay, etc.). One of the most developed attempts was insulin tregopil, an analog that incorporates polyethylene glycol in B 29 side chain and sodium caprate as an absorption facilitator. Absorption is rapid and drugs should be administered 30' before intake. Yet, some recent studies in T2D patients show less effectiveness and a decline in HbA1c levels, compared to insulin aspart. Currently, there are ongoing studies about T1D patients. Another approximation is insulin ORMD -0801 but although several clinical trials have been started, there are still no publications about this insulin.

Generally, there is a similar issue: high absorption variability prevents from determining a clear dose-response relation combined with low bioavailability<sup>11</sup>.

Oral long-acting basal insulin analogs were more successful. Oral basal insulin from oral 338 (I338) was made with technology that potentiates gastrointestinal permeability (GIPET I) by a sodium caprate simultaneous administration (a FDA approved food preservative contained in dairy). Acylation of the 18C fatty diacid molecule

via a connector to I338 allows a reversible bond to albumin, showing rapid absorption and a median lifespan of almost 70 hours. Comparing the effectiveness of insulin I338 vsinsulin glargine, a randomized, double-blind study showed basal glycemic at the end of treatment as being similar among both branches and glycemic monitoring 10 points profiles being almost the same. Moreover, HbA1c, fructosamine and C peptide were almost the same at the end of treatment, with a difference of 0,3% in favor of insulin glargine. Coefficient of glycemic variability was slightly higher in insulin I338 vs insulin glargine (23,25% vs 17,5%). Glycemic episodes were rare, and they occurred in a similar way in both branches<sup>12</sup>.

However, the main obstacle seems to be once again low bioavailability since the final required dose of I338 was 58 times greater than that of insulin glargine, which makes it commercially unfeasible in terms of large-scale production.

Despite all this progress, a great challenge is still pending: manufacturing a type of insulin capable of releasing and interacting with a receptor, in the presence of hyperglycemia only in normo and hypoglycemia events. That's the point in which the concept of developing glucose responsive insulin analogs arises (GRI: intrinsic glucose responsive analogs).

Generally, GRI can be classified into 3 systems.

- Mechanical: Based on computerized algorithms with a constant monitoring system (GCM) connected to an insulin pump (closed loop delivery systems) as an artificial pancreas. This topic will be discussed in another conference
- Polymer-Based Systems: In which insulin is encapsulated inside a matrix vesicle or hydrogel that modifies its structure in the presence of glucose
- Intrinsic Molecular Changes: In the same insulin molecule that is granted the property of self-activation in the presence of glucose

As regards Polymer-Based Technology, 3 types of models were developed:

- Proteins joined to glucose including lecithin, such as concanavalin A, early developed by Professor Brownlee
- Bond to enzymes such as glucose oxidase, which catalyzes glucose oxidation to gluconic acid along with protons releasing changing local pH
- Use of boronic acid (phenylboronate) which creates reversible esters with molecules containing diols (with two hydroxyl groups)

Use of concanavalin A had to be suspended due to mitogenic and immunogenic risk. Glucose oxidase has been encapsulated in matrices sensitive to H2O2, hypoxia and/or decreasing pH, taking advantage of the catalytic characteristic of this enzyme to increase permeability to water and regulate hormone release. Some polymeric matrices in which the insulin molecule is integrated, include polyethylene glycol and succinic amido phenyl glucopyranoside (called polymersomes overall). They are impermeable during events of normo and hypoglycemia but when glucose concentration rises, permeability to water increases, generating conformational changes that allow insulin release. Nonetheless, Polymer-Based Technology has limitations as regards particle stability, lag time in the insulin molecule timely release along with a risk of insulin suboptimal release hence hyper or hypoglycemia excursions are created. Additionally, a matrix degradation issue in the long run is at play<sup>13,14,15,16</sup>.

Techniques that tend to perform an intrinsic change of the insulin molecule are more promising. Technologies called “switch-based concept” try to create a conformational change of such molecule, from a closed form (unable to join the receptor) to an open form, in which biological activity is achieved.

In that sense, phenylboronic acid (PBA) properties have been used. This compound is able to perceive any existing diol and sense any existing carbohydrate. A PBA modified insulin by-product was developed by Hoeg-Jensen. That study showed

how adding PBA to insulin in L-lysine at position B 29 does not affect its biological activity and, on the other hand, allows the analog to sense and join the agent carrying diols such as carbohydrates<sup>16,17,18</sup>.

Recent studies on crystallography and cryo-electron microscopy (Cryo GEN) have shown that for insulin to join its receptor, insulin should detach from its terminal C section of  $\beta$  chain (B20 B 23 residues), allowing close contact between terminal N section of  $\alpha$  chain and the complex receptor. (19) This concept is based on exploding this bonding mechanism of insulin to its receptor, designing a conformational change in the glucosedependent molecule. This would only be activated in case of hyperglycemia and would remain closed in case of normo and hypoglycemia. Studies on chimeric insulins have used bridges in which methyl fluoroborate is added and it has been previously added to terminal N section of A chain and an aromatic diol group added to an amine group of Lys 28 of B chain to join both chains. This insulin responds to fructose as a monosaccharide (fructose responsive insulin) since this molecule has a conformational equilibrium between isomers ideal for a covalent and reversible bond with phenylboronic acid. This acid joins the isomers overpopulation at position cis- 1,2 diols from the fructose that has a polar orientation ideal for this bond. In cells derived from some hepatocellular line (HepG2), activity from the receptor is activated in 50 mmol/l fructose concentrations, remaining inactive in low concentrations of this compound or in glucose<sup>13-20</sup>.

Nowadays, there are studies performed for extending the PoC obtained with fructose to glucose responsive insulin (GRI). Boronic acid-based glucose devices and other molecules non boronic acid-based are being assessed. Other disulfide bridges between both insulin chains are on trial, and A0 B26 seems to be the most stable<sup>13-21</sup>.

Palabras clave: insulins; history; treatments.

### Bibliography

1. Luis DA, Romero E. Análogos de insulina modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. Revista de Medicina Familiar Semergen 2010; Vol 36,8.
2. Insulin at its 100 Birthday Historical Overview. Conferencia dictada por el profesor David Harlan en la 81<sup>th</sup> Scientific Session of the American Diabetes Association. 2021 3. Haar H, Fita EG, Heise T. A review of insulin degludec/insulin aspart pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and their implications in clinical use. Clin Pharmacokinet 2017; 56(4):339-354. DOI: 10.1007/s40262-016-0455-7.
4. Gough SC, Bhargava A, Jain R, Mersebach H, Rasmussen S, Bergenthal R. Low volume insulin degludec 200 U/ml once daily improves glucemic control similarly to insulin glargine with a low risk of hypoglycemia in insulin naive patients with type 2 diabetes :a 26 week randomized,controled multinational treat to target trial. The low begin low volume trial. Diabetes Care 2013; 36:2536-2542.
5. Heise T, Stender-Petersen K, Hovelman U, Jacoben JB, Nosek L, Zilstra E, Haar H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of faster acting insulin aspart vs insulin aspart across a clinically relevant dose range in subjects with type 1 diabetes mellitus. Clin Pharmacokinet 2017; 56(6):649-660. 6. Kazda, et al. Diabetes 2017,66 (supl 1 ) A 247-8
7. Ishimura et al. ADA 2020 236OR
8. Linnennberg H, Zhang Q, La Bell E, Dellva MA, Coutant D, Hovelman U, Plum Morsel L, Herbrand T, Leohr J. Pharmacokinetic and glucodinamyc of ultrarapid insulin lispro (URLI) vs insulin lispro in younger adults and elderly patients with type 1 diabetes mellitus a randomized controled clinical trial. Clin Pharmacokinet 2020; 59(12):15891599.
9. Rosenstock J, et al. Once week insulin for type 2 diabetes without previous insulin

- treatment. *The New England J of Med* 2020; 383:2107-16.
10. Silver R, Asong M, Begtrup K, Heller S, Liu L, Rosentok J. Similar hypoglycemia duration with once weekly insulin icodex vs insulin glargine u-100 in insulin naive or insulin experienced patients with type T2D. Oral presentation Insulins Symposium 81th ADA meeting 2021.
11. Heise T. The future of insulin therapy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2021; 75:10 8820
12. Hallberg I, Lyby K, Wasserman K, Heise T, Zijlstra E, Plum Morschel L. Efficacy and safety of oral basal insulins vs subcutáneous insulin glargin in type 2 diabetes: a randomized doublé bind, phase 2 trial. *Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019; 7:17988. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30372-3.
13. Jarosinski M, Dhayalan B, Rege N, Chatterjee D, Weiss M. Smart insulins delivery technologies and intrinsic glucose responsive insulin analogues. *Diabetologia* 2021; 64:1016-1029.
14. Development of glucose responsive smart insulin system. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017; 24:267-278
15. Rege N, Phillips N, Weiss M. Insulin therapy: future perspectives Cernea S, Raz I *American Journal of therapeutics* 2019; 0:1-2.
16. Wang J, Wan Z, Yu J, Kahkoska A, Buse J, Gu Zhen. Glucose responsive insulins and delivery systems: innovation and traslation. *Adv Mather* 2020; 32(13).
17. Hoeg-Jensen T. Glucose responsive insulins. *Molecular Metabolism* 2021; 46:101107.
18. Bakh N, Cortinas A, Weiss M, Langer R, Anderson D, Gu Z, Sanjoy D, Strano D. Glucose responsive insulins by molecular and physical designs. *Nature Chemistry* 2017; 9:93-944. DOI: 10.1038/NCHEM.2857.
19. Scapin G, Dandey V, Zhang Z, Prosise W, Hruza A, Kelly Th, Mayhood T, Strickland C, Potter C, Carragat B. Structure of the insulin receptor complex by a single particle CryoEm analysis. *Nature* 2018; 556 (7699):122-125.
20. Bakh N, Cortinas A, Weiss M, Langer R, Anderson D, Gu Z, Sanjoy D, Strano D. Glucose responsive insulins by molecular and physical designs. *Nature Chemistry* 2017;9:93-944. DOI: 10.1038/NCHEM.2857
21. The future of insulins as therapy. Conferencia dictada por el profesor Michael Weiss en la 81<sup>th</sup> sesión de la American Diabetes Association 2021.