

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Štěpán Pokorný

Strategie a výsledky při vývoji derivátů insulinu pro léčbu diabetu

Strategies and results in the development of insulin derivatives for the treatment of diabetes

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha, 2023

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za odborné konzultace, věcné připomínky k práci a za trpělivost. Dále děkuji RNDr. Lence Žákové, Ph.D. za odborné konzultace.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a veškerou literaturu spolu s ostatními informačními zdroji řádně citoval. Tato závěrečná práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2.8.2023

Štěpán Pokorný

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je přiblížit analogy insulínu a analyzovat jakým směrem se vývoj těchto organických sloučenin vyvíjí. V textu práce jsou uvedeny základní informace týkající se této problematiky (např. historie onemocnění *Diabetes Mellitus*, první způsoby léčby, objevení insulínu (1921) a experimenty, které tomuto objevu předcházely...). Práce dále předkládá základní rozdíly v onemocnění *Diabetes Mellitus* 1. a 2. typu, a z toho plynoucí rozdíly v léčbě. Jsou zde především shrnuty konkrétní typy analogů, jejich chemické složení a podstata jejich působení. Hlavní přínos této práce spočívá v analýze analogů insulínu a přibližuje jakým směrem se vývoj analogů ubírá v této době, či jaké inovace můžeme v terapii diabetu očekávat v nadcházejících letech. Práce čerpá především z odborných vědeckých článků, časopisů či knih (starších, ale i novějších) a odborných poznatků z laboratoře ÚOCHB. Všechny zdroje jsou řádně uvedeny na konci práce.

Klíčová slova

Insulin, Diabetes Mellitus, analog, slinivka břišní, receptor, nativní struktura, genetika, environmentální faktor

Abstract

The aim of this bachelor's thesis is to present insulin analogs and to analyse the direction of development of these organic compounds. The text contains basic information on this subject (e.g. the history of *Diabetes Mellitus*, the first treatment, the discovery of insulin (1921) and the experiments that preceded this discovery...). The thesis also explains the basic differences between type 1 and type 2 *Diabetes Mellitus* and the resulting differences in treatment. It mainly summarizes, the specific types of analogs, their chemical composition and the nature of their action. The main contribution of this work lies in the analysis of insulin analogs and the overview of the course in which the development of these analogues is proceeding or what innovations we can expect in diabetes therapy in the upcoming years. The thesis draws primarily from peer-reviewed scientific papers, articles and books (older as well as more recent ones) and from the expertise of the IOCB laboratory. All sources are well cited at the end of the work.

Keywords

Insulin, Diabetes Mellitus, analogue, pancreas, receptor, native structure, genetics, environmental factor

Osnova:

Úvod	2
1. OBJEVENÍ INSULINU A PRVOTNÍ POKUSY O LÉČBU	3
2. PATOLOGIE DIABETU	3
3. DRUHY DIABETU	4
3.1 IDDM (DM1)	4
3.1.1 Etiologie nemoci	4
3.1.2 Genetika diabetu 1. typu	4
3.1.3 Environmentální faktory	5
3.2 NIDDM (DM2)	5
3.2.1 Etiologie nemoci	5
3.2.2 Genetika za DM2.....	7
3.3 Gestační a mitochondriální diabetes	9
3.3.1 Gestační diabetes (GDM).....	9
3.3.2 Mitochondriální diabetes.....	9
4. OD OBJEVENÍ INSULINU K DESIGNU ANALOGŮ V TERAPII	10
4.1 Nativní struktura insulinu	10
4.2 Vazba na receptor	12
5. PŘELOMOVÉ PŘÍSTUPY PRO TVORBU ANALOGŮ ZA POSLEDNÍ STOLETÍ	13
5.1 Rychle účinkující analogy	14
5.1.1 Aspart.....	15
5.1.2 Lispro	15
5.1.3 Glulisine	16
5.2 Bazální analogy	17
<u>Bazální analogy se změněným izoelektrickým bodem</u>	17
5.2.1 Glargin.....	18
<u>Bazální analogy s acylovanými mastnými kyselinami</u>	18
5.2.2 Detemir	19
5.2.3 Degludec	19
5.3 Orální analogy	22
6. INSULINOVÉ ANALOGY NOVÉ GENERACE	23
6.1 Hepatoselektivní analogy	23
6.1.1 PEGylované Lispro.....	23
6.2 “Chytré” insulinové analogy (Glucose-responsive “smart” insulin; GRI)	23
6.4 “Once-weekly” analogy	25
6.4.1 Icodec.....	25
7. ZÁVĚR	26
8. SEZNAM ZDROJŮ	27

Úvod

Diabetes Mellitus, neboli cukrovka, je vážné metabolické onemocnění způsobené buď neschopností slinivky břišní produkovat insulin (diabetes prvního typu) nebo ztráty schopnosti organismu na insulin správně reagovat (diabetes druhého typu). Diabetes prvního typu je způsoben autoimunitní destrukcí insulin produkujících buněk ve slinivce a doprovází lidstvo od nepaměti. Tento typ diabetu je prozatím neléčitelný, ale podáním exogenního insulinu lze léčit projevy diabetu, tzn. neschopnost těla pojmout glukózu z krve do buněk a metabolizovat ji, a tak umožnit diabetikům vést víceméně plnohodnotný život. V roce 2022 uplynulo již sto let od prvního úspěšného podání insulinu diabetickému pacientovi. V současné době již není pro společnost problém zajistit dostatečné množství insulinu pro diabetiky. Nedořešeným problémem je ale způsob podání insulinu do organismu. Insulin je protein a jako takový nemůže být podáván (prozatím) orálním způsobem a je pacientům podáván podkožně injekčním způsobem. Tento způsob se ale zásadně liší od fyziologického působení insulinu, kdy je insulin v odpovědi na vyšší koncentraci glukózy v krvi sekretován z pankreatu nejprve do jater, kde inhibuje endogenní produkci glukózy a až poté se dostává do periférie organismu, kde zprostředkuje vstup glukózy z krve do svalových a tukových buněk. Při subkutánním podání insulinu se hormon z místa vpichu uvolňuje relativně pomalu, a tak dochází ke zpoždění jeho působení v játrech. V důsledku toho není hladina krevní glukózy adekvátně regulována, což může mít za následek zdravotní komplikace. Proto bylo a je vyvíjeno mimořádné úsilí o pozměnění insulinu tak, aby po podání do organismu lépe napodoboval mimořádně citlivou regulaci krevního cukru endogenním insulinem. V této práci jsem se zaměřil na historii výzkumu insulinu, klinické aspekty diabetu, a na popis vlastností klinicky dostupných derivátů insulinu a na nové trendy v jejich vývoji.

1. OBJEVENÍ INSULINU A PRVOTNÍ POKUSY O LÉČBU

Roku 1921 připravili Frederick Grant Banting a Charles Herbert Best několik experimentů, s cílem lépe pochopit úlohu pankreatu v metabolismu sacharidů v těle. Společně s Johnem Jamesem Rickardem Macleodem si dali za cíl ověřit již dříve navrženou tezi o krucální roli Langerhansových ostrůvků pankreatu v metabolismu cukrů, a to buď produkcí sekretu do krve nebo změnou povahy krve po průchodu pankreatem. Banting a Best začali experimentovat na psech. Po odebrání slinivky psi vykazovali znaky diabetu, zejména vyšší glykémii a obsah glukosy v moči. Po injikování pankreatického extraktu se stav psů zlepšoval, adekvátně podle koncentrace injikovaného roztoku. Pozorovali ale také, že pozitivní efekt extraktu z pankreatu šlo potlačit pankreatickou šťávou. Po injekci do lidí trpících diabetem nebyly výsledky dobré kvůli vysokému obsahu dalších proteinů a jiných příměsí rušících efekt extraktu. Do výzkumu byl přizván biochemik Bertram Collip za účelem lépe vypurifikovat insulin z extraktu. První úspěšné experimenty na lidech s diabetem byly provedeny ve Všeobecné torontské nemocnici na čtrnáctiletém Leonardu Thompsonovi. Podobně jako při prvních pokusech se psy se jeho stav začal záhy zlepšovat, nabíral na váze a hyperglymie klesala. Po dvoudenní pauze v remediaci se však symptomy vrátily. Banting to sám podotkl ve své řeči za obdržení Nobelovy ceny, kdy insulinoterapii označil za symptomatickou léčbu nikoli kauzální (Banting et al., 1922; de Leiva-Hidalgo & de Leiva-Pérez, 2020).

2. PATOLOGIE DIABETU

Dlouho po objevení insulinu a jeho úspěšném použití stále nebylo jasné, co stojí za podstatou nefunkčnosti tkáně sekretující insulin a proč u pacientů s vysokou glykemií pozorujeme různý vývoj nemoci. Akutní formu s úmrtím v rámci půlroku od diagnózy a chronickou formu, kterou pacienti trpěli déle než jeden rok. Až histologické preparáty ukázaly různý stav buněk pankreatu pro každou z forem. Pacienti s akutní formou, dnes známou jako Diabetes mellitus 1. typu (DM1), vykazovali oproti zdravému člověku počet β -buněk nižší než 10 %, avšak se značnou hyperaktivitou. Přítomnost zánětlivého infiltrátu v rámci některých z ostrůvků pankreatu a zároveň přítomnost zcela zdravých, respektive kompletně odumřelých β -buněk, naznačovala, že probíhá aktivní ničení β -buněk. Na druhé straně byli pacienti s chronickou formou, diabetem 2. typu (DM2), kteří měli zničené β -buňky jen mírně, 40-50 % oproti normálu. Hlubší vhled do podstaty DM1 přinesly až autopsie zemřelých dětí s DM1 v letech 1984-1985. Byl zjištěn vysoký obsah cytotoxických a regulačních T-buněk v infiltrátu a vysoká exprese HLA molekul první třídy buňkami postižených ostrůvků. Tyto poznatky vedly k ideji, že DM1 je autoimunitním onemocněním. Patologie DM2 byla značně odlišná, charakterizovaná insulinovou rezistencí tkání společně se zvýšenou sekrecí insulinu. K poškození β -buněk u DM2 dochází postupně jejich hyperaktivitou a nadměrnou produkcí insulinu v důsledku rezistence organismu vůči insulinu (Gepts, 1965; Okur et al., 2017; Östenson, 2001).

3. DRUHY DIABETU

3.1 IDDM (DM1)

3.1.1 Etiologie nemoci

Podstatou diabetu 1. typu je autoimunitní destrukce β -buněk Langerhansových ostrůvků. Původ tohoto onemocnění však není příliš jasný, neboť se v patogenezi kombinují jak genetické, tak negenetické vlivy. Poměr mezi těmito vlivy je těžko definovatelný a liší se případ od případu. Autoprotilátky proti β -buněkám Langerhansových ostrůvků nestojí za podstatou vzniku nemoci. Bylo-li by tomu tak, matky trpící diabetem by vždy rodily děti s insulinoidou, neboť ty by byly vystavovány relativně velkým titrům těchto protilátek *in utero*. Ničení β -buněk Langerhansových ostrůvků probíhá jinak, a to kontaktní indukci apoptózy pomocí perforinů a granzymů přímo vylitých z T-lymfocytů. Za vznikem autoreaktivních T-lymfocytů může stát hned několik rozličných autoimunitních stavů. Může se jednat o mutaci v AIRE genech, ale i jiné faktory, ku příkladu jako níže zmíněné virové infekce napadající thymus a ovlivňující diferenciaci T-buněk (Nobuko et al., 2002). Dále pak více recentní studie poukazují na obecně nižší počet regulatorních T lymfocytů, působících tlumivě na imunitní reakce, u pacientů s DM1 (SA Paschou et al., 2008). I když se u diabetem nemocných dá detekovat celá paleta autoprotilátek, jen 4 z nich mají význam pro predikování možného rozvinutí DM1. V dětství jde konkrétně o autoprotilátky proti insulinu a GAD65 (dekarboxyláze kyseliny glutamové). V návaznosti na ně pak hraje roli i pozitivita na anti-IA-2 (antigen odvozený z tyrozin fosfatázy ostrůvků) a anti-ZnT8 (protilátky proti zinkovému transportéru), ať už na jeden z nich nebo v kombinaci obou. Díky tomuto je možné odhalit DM1 již ve fázi asymptomatické, kdy však již dochází k ničení buněk slinivky (Cinek & Šumník, 2019). Přítomnost těchto protilátek se však v čase mění a také závisí na věku diagnostikované osoby. Některé jsou přítomné například jen pokud nemoc propukne v dětství a jiné, když propukne až v dospělosti. Existují ale i případy, kdy nejsou žádné zjevně související autoprotilátky přítomné v krvi, i když pacient insulinoidou trpí (Jaroslav, 2007).

3.1.2 Genetika diabetu 1. typu

Na základě pozorování rizik byl určen hlavní lokus pro rozvoj diabetu a další s menším významem, působící epistaticky. Hlavním lokusem byl ten pro hlavní histokompatibilní komplex (MHC, u lidí Human Leukocyte Antigens - HLA). Podíl MHC na genetickém riziku diabetu se odhaduje na polovinu. Zbytek genetického rizika je rozdroben mezi geny menšího významu, z nichž mnohé byly objeveny díky asociačním studiím zahrnujícím celý genom během poslední dekády (Cinek & Šumník, 2019).

Hlavní rizikové haplotypy HLA II. třídy jsou DR3/4-DQ8 a DR4/DR4, které zodpovídají za přibližně 30-50% insulinitid prvního typu (Steck & Rewers, 2011). V procentech se písemné prameny poměrně liší, recentní studie přisuzují většinový podíl, přispívající k rozvinutí diabetu, právě genům mimo HLA (Redondo et al., 2022). Další poměrně vlivné geny jsou CTLA-4 (zodpovědný za supresi negativní selekce autoreaktivních T-lymfocytů v brzlíku) a insulin-VNTR (variabilní repetitivní část krátkého raménka chromozomu 11, geny v této oblasti hrají roli v transkripci proinsulinu, některé alely v této oblasti vedou k rezistenci vůči diabetu, jiné zas naopak predisponují k rozvinutí této choroby) (Paschou et al., 2017).

3.1.3 Environmentální faktory

Dle studií na monozygotních dvojčatech bylo dokázáno, že i environmentální faktory mají značný vliv na patogenezi. Největší podíl je přisuzován virům (rubella, coxsackievirus B, enteroviry). Z diety pak zejména kravské mléko (přítomnost BSA a insulinu). Zatímco principem rozvoje diabetu prostřednictvím virů je zejména přílišný stimul imunitního systému, u mléka je tomu tak, že příliš brzká expozice vysokým titrům insulinu v mléce v útlém věku může vyvolávat autoreaktivitu vůči lidskému insulinu jako takovému (JM Norris et al., 2003). Bovinní sérový albumin (BSA) obsahuje část známou jako ABBOS, která může fungovat jako autoreaktivní epitop k β -buňkám, konkrétně k povrchovému proteinu p69 (W Karges et al., 1996; MG Karlsson & J. Ludvigsson, 2000). Do jaké míry toto opravdu přispívá k rozvoji onemocnění je však nejasné, na druhou stranu se lze, v porovnání s genetickými faktory, preventivně vyvarovat těmto faktorům (Paschou et al., 2017).

3.2 NIDDM (DM2)

3.2.1 Etiologie nemoci

Etiologie diabetu 2. typu je multifaktoriální a na jeho vzniku se podílí hned několik genetických, ale i environmentálních faktorů.

Za dysfunkcí β -buněk u DM2 nestojí jejich samotné zničení, ale v první řadě poruchy v komplexní síti interakcí mezi prostředím a molekulárními drahami spojené s insulinem (Halban et al., 2014; Christensen & Gannon, 2019). Hlavní dva faktory přispívající k etiologii DM2 jsou obezita a sekundárně vzniklá insulinová rezistence (IR). Při nadměrném příjmu potravy, který se často vyskytuje u obezity, je přítomna hyperglykémie a hyperlipidémie, což v konečném důsledku vede k IR a chronickému zánětu.

Za těchto okolností jsou β -buňky vystaveny toxickým tlakům zahrnujícím zánět, stres endoplasmatického retikula, oxidační/metabolický stres a amyloidový stres (Christensen & Gannon, 2019).

Nadbytek volných mastných kyselin a hyperglykémie vedou k dysfunkci β -buněk tím, že vyvolávají stres ER prostřednictvím aktivace apoptotických cest prostřednictvím fenoménu “unfolded protein response” (UPR) (Wang et al., 2015). Tento stres může aktivovat dráhu UPR několika mechanismy, včetně inhibice Ca^{2+} ATPázy sarko/endoplazmatického retikula (SERCA) zodpovědné za mobilizaci Ca^{2+} v ER, aktivací IP3 receptorů nebo přímého narušení homeostázy ER (Bidwell et al., 2022). Kromě toho trvale vysoké hladiny glukózy zvyšují biosyntézu proinsulinu a amyloidních polypeptidů ostrůvků (IAAP) v β -buňkách, což vede k akumulaci chybně složeného insulínu a IAAP, která zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) zprostředkovanou oxidativním skládáním proteinů. Všechny tyto účinky přispívají k narušení fyziologické mobilizace Ca^{2+} v ER a podporují pro-apoptotické signály, degradaci mRNA proinsulinu a uvolňování pro-inflamatorních cytokinů (IL-1 β) rekrutujících makrofágy (Galicia-Garcia et al., 2020).

V součinnosti všech těchto jevů pak dochází ke ztrátě integrity ostrůvků, která je klíčová pro správnou regulaci glykémie. Zejména pak dochází k zvyšování hyperglykémie, neboť vyplavování insulínu i glukagonu je neadekvátně regulováno. Nutno dodat, že dráha k správné sekreci insulínu může být přerušena, alespoň částečně, kdekoli, jak v syntéze prekurzorů insulínu, tak i jeho sekreci ale například i pomocí snížené exprese GLUT2 (Wang et al., 2019; Liu et al., 2018).

Obezita, zejména vyšší tukové zásoby na břiše, pozitivně koreluje s rozvojem diabetu, hned na několika úrovních ještě mimo ty výše zmíněné. Produkce leptinu se se zvyšujícím se BMI indexem také zvyšuje a v důsledku jeho působení na sympatikus nervového systému zvyšuje insulinovou rezistenci (Considine et al., 1996). Leptin mimo jiné také zvyšuje hladinu TNF- α a sám snižuje citlivost jater vůči insulínu (Wang et al., 1997). TNF- α pak snižuje tyrosinkinázovou aktivitu insulinového receptoru, a tak snižuje efektivitu jeho funkce. Má se za to že zvýšená insulinová rezistence kvůli TNF- α je zprostředkována skrze nižší expresi GLUT-4 (Nolte et al., 1998; Stephens et al., 1997).

Zvýšené hladiny jaterních enzymů, γ -glutamyltransferáza (GGT), aspartátaminotransferáza (AST), alkalické fosfatáza (ALP) a alaninaminotransferáza (ALT), které jsou obrazem snížené integrity hepatocytů, pozitivně korelují s incidencí diabetu. Zvýšené hladiny těchto enzymů jsou ukazatelem steatózy jater, nadměrným ukládáním triglyceridů v játrech. Ta obousměrně souvisí s mírou obezity organismu potažmo insulinovou rezistencí, s rizikem rozvinutí diabetu v důsledku disregulace jaterní enzymatické funkčnosti. Míra příspěvku jednotlivých enzymů k rozvinutí diabetu se dle publikací liší (Noroozi Karimabad et al., 2022).

3.2.2 Genetika za DM2

Byly lokalizovány již desítky genů (např. *TCF7L2*, *PPARG*, *FTO*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *WFS1*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *JAZF1*, *HHEX*) (Lyssenko et al., 2008), kde SNPs v těchto genech souvisí se zvýšeným rizikem rozvoje diabetu 2. typu. Jednou z prvních mutací, která byla dána do souvislosti s diabetem díky vazebným studiím je intronová mutace (rs7903146) v *TCF7L2* (transkripční faktor hrající důležitou roli ve Wnt signální dráze). Jedná se o velmi konzervativně přenášenou mutaci napříč generacemi, byla nalezena jak v asijských, evropských, tak i afrických populacích, s relativním rizikem pro diabetes 1,4 (Grant et al., 2006; Tong et al., 2009).

Jednotlivé proteiny lze rozdělit do dvou skupin, dle jejich dopadu na metabolismus glukózy. Na ty, co navozují vyšší hladiny cukru, při hladovění, například mutované *TCF7L2*, *SLC30A8*, *GIPR*. Ty ovlivňují sekreci či "processing" insulínu (Ingelsson et al., 2010). A na ty, co zvyšují hladiny insulínu, při hladovění, například mutované *PPARG*, *IRS1*. Ty ovlivňují přímo působení insulínu (Voight et al., 2010). Mechanismy navozované jednotlivými polymorfismy jsou značně různé, ne všechny však zvyšují šanci na rozvinutí diabetu, ale dokáží před ním naopak chránit.

Komplexnost genetického příspěvku pro rozvoj diabetu, ještě navíc komplikují strukturní polymorfismy, microRNA (Fernandez-Valverde et al., 2011), ncRNA (Panni et al., 2020), epigenetika (Brasacchio et al., 2009), genové interakce (Phillips, 2008), různé penetrance genů (Agarwala et al., 2013).

Protektivní varianty

Při populačních studiích, zabírajících se DM2, ve Finsku, Dánsku, Íránu a na Islandu, bylo objeveno několik nízkofrekvenčních mutací s protektivními účinky vůči diabetu. I přes vyšší počet mutací v rizikových genech pro diabetes, mají lidé s těmito protektivními mutacemi snížené riziko na diabetes až o 65 %. Varianta *SLC30A8* vyskytující se s frekvencí 0,66 % v oblasti Botnického zálivu, zapříčiňuje ztrátu funkce tohoto genu pro zinkový transporter 8, který ovlivňuje sekreční dráhu insulínu a tím chrání před diabetem, avšak jiné alelické varianty v tomto genu naopak zvyšují šanci na DM2 (viz výše) (Flannick et al., 2014). Nízkofrekvenční varianty v genech *CCND2* a *TCF2* také vykazovali protektivní účinky (Gudmundsson et al., 2007; Steinthorsdottir et al., 2014).

Tabulka 1

Šance na přenos diabetu v rámci rodiny

Šance na rozvoj diabetu pokud:	jeden z rodičů trpí diabetem	oba rodiče trpí diabetem	se jedná o monozygotní dvojče nemocného	se jedná o dizygotní dvojče nemocného	Se jedná o sourozence nemocného	Není riziko na rozvoj nemoci nijak zvýšeno
DM1	4-6%	10-25%	50%	6-10%	6%	0.4%
DM2	22-40%	41-70%	70%	20-30%	17%	9-10%

(Kyvik et al., 1995; Hyttinen et al., 2003; Tillil & Köbberling, 1987; Kaprio et al., 1992; Shaw et al., 2010; Dean et al., 2004; Weijnen et al., 2002; Medici et al., 1999)

Data uvedená v Tabulce 1 spojují poznatky z mnoha populačních studií, lišící se například etnickou skupinou, či jiným poměrem mezi pohlavími, což zapříčiňuje odchylky mezi jednotlivými publikacemi. Nutno dodat, že u DM2 jde většinou o jedince ve věku 35-60 let, data získaná od seniorů by totiž ztrácela na výpovědní hodnotě, neboť by se do nich až přespříliš promítaly environmentální faktory, včetně stáří. Pro správnou interpretaci dat z tabulky je také nutné mít na mysli, že zejména ukazuje dědičnost obezity a v jejím důsledku diabetu 2. typu, přičemž u diabetu 1. typu do dat obezita příliš nepromlouvá.

3.3 Gestační a mitochondriální diabetes

3.3.1 Gestační diabetes (GDM)

Gestační forma diabetu je etiologií částečně blízká DM2. Příčinou gestačního diabetu je zejména činnost hormonů spojená s vývojem plodu, zejména těch produkovaných placentou, které snižují efekt insulinu v tkáních. Vyšší tvorba tukových zásob také přispívá k rozvoji symptomů diabetu, podobně jako u DM2. To, že po porodu ustupují symptomy diabetu velmi rychle, naznačuje, že hormony produkované placentou hrají hlavní roli v gestačním diabetu (Buchanan & Xiang, 2005).

3.3.2 Mitochondriální diabetes

Mitochondriální diabetes má mnohem nižší incidenci než všechny zvýšené formy diabetu. Dělí se na MIDD a MELAS, oba tyto typy se dědí po mateřské linii. MIDD je doprovázen hluchotou, zatímco lidé trpící MELAS mimo diabetes trpí dále mitochondriální myopatií, encefalopatií, laktátovou acidózou a infarktu podobnými příhodami. U MIDD chybí velká část mtDNA, což snižuje syntézu ATP a schopnost správné funkce β -buněk v regulaci glykémie. Díky výzkumu mitochondriálního genomu se později objevila spousta abnormalit i u lidí trpící DM1 i DM2 (Barroso, 2005; Maassen et al., 2004).

4. OD OBJEVENÍ INSULINU K DESIGNU ANALOGŮ V TERAPII

Roku 2021 tomu bylo právě 100 let od první úspěšné aplikace insulínu pacientovi (Rosenfeld, 2002). Tento historický moment je jedním z největších úspěchů moderní medicíny. V průběhu tohoto století byl objeven nejen léčebný potenciál insulínu, ale i mnoho komplikací při použití této látky jako léku. Hlavním problémem stále zůstává složitost fyziologické sekrece insulínu, jak z hlediska jeho dávkování, tak i distribuce v těle. Velmi nízký terapeutický index, čili koncentrační rozmezí, do jakého množství je lékem a kdy už je pro tělo toxický, také značně komplikuje terapii diabetu (Zaykov et al., 2016a). Rozličná účinnost insulínu mezi jednotlivými pacienty, ale i v rámci jednoho pacienta, v závislosti na místě injekce, aktuální glykémii či denní době, vnáší do problematiky mnoho dalších neznámých.

Pro snazší simulaci fyziologické sekrece insulínu byla jednou z prvních idejí urychlit nástup jeho efektu po jídle, respektive prodloužit jeho efekt přes noc. Cílem bylo zúžit časové intervaly hyperglykemií a hypoglykemií ve kterých se pacient, při neadekvátní medikaci, nacházel. Bohužel tento problém přetrvává až dodnes, neboť léčba stále není dokonalá.

Určení struktury insulínu umožnilo lépe pochopit jeho funkci a otevřelo možnosti modifikace jeho stavby a tím i jeho farmakokinetiku, farmakodynamiku (Bliss, 2013).

4.1 Nativní struktura insulínu

Nativní struktura insulínu sestává ze dvou řetězců aminokyselin, A-řetězec z 21 a B-řetězec z 30 aminokyselinových zbytků. Řetězce jsou propojeny pomocí dvou disulfidických můstků, a to mezi aminokyselinami na pozicích A7-B7 a A20-B19. Dále je ve struktuře přítomen ještě jeden disulfidický internální můstek v A-řetězci, A6-A11. Primární struktura byla objasněna Frederickem Sangerem, za což dostal roku 1958 Nobelovu cenu. K rozřešení sekundární, terciální a kvartérní struktury došlo až roku 1969 vědeckou skupinou Dorothy C. Hodgkinové, laureátky Nobelovy ceny za chemii, která se věnovala rentgenové krystalografii (ADAMS et al., 1969). Ukázalo se, že se insulin skládá do tří α -helixů a jednoho β -skládaného listu. Insulin je rovněž schopen za přítomnosti Zn^{2+} (a i jiných dvoumocných) iontů tvořit hexamerní strukturu složenou ze tří dimerů (Dunn, 2005).

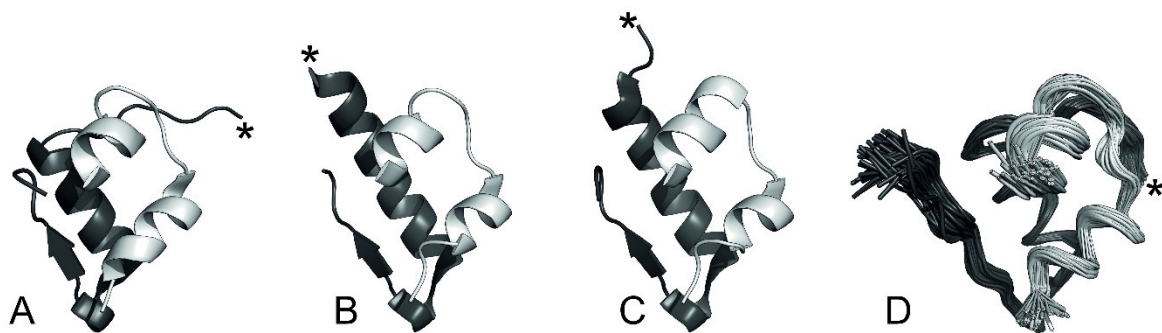
Dimery pospolu drží hydrofobními interakcemi mezi B-řetězci, konkrétně mezi antiparalelně orientovanými C-terminálními doménami β -skládaných listů (Weiss et al., 2000).

V závislosti na vazbě různých ligandů (např. malé cyklické alkoholy jako fenol nebo Cl^- ionty), může mít insulinový monomer v hexameru různé konformace. Za „normálních okolností“ je N-koncová helikální část B-řetězce přerušena ohybem a dále zaujímá strukturu označovanou jako tenzní (T), napjatá, konformace (Obrázek 1A), a vytváří tzv. T6 hexamer (Obrázek 2A). V přítomnosti fenolu zaujímá N-konec řetězce B tzv. relaxovaný stav (R), kdy je α -helix B-řetězce protažený směrem od B7-B18 až k N-konci (B1-B6) (Obrázek 1B).

Tento konformační stav se v hexameru nazývá jako R6 hexamer (Obrázek 2C). Za specifických podmínek, jako je vysoká koncentrace SCN^- , Cl^- , nebo Zn^{2+} iontů, je šroubovice na N-konci řetězce B zkrácena pouze do B3-B19 segmentu a aminokyseliny B1-B3 jsou neuspořádané. Tento stav se nazývá R^f (Obrázek 1C) a obvykle bývá přítomný v hexamerech „smíšeného“ typu $T3R^f3$ (Obrázek 2B). V roztoku ředěné kyseliny octové je možné určit pomocí NMR monomerní strukturu insulinu, která je podobná konformaci T (Obrázek 1D) (Dunn, 2005).

Obrázek 1

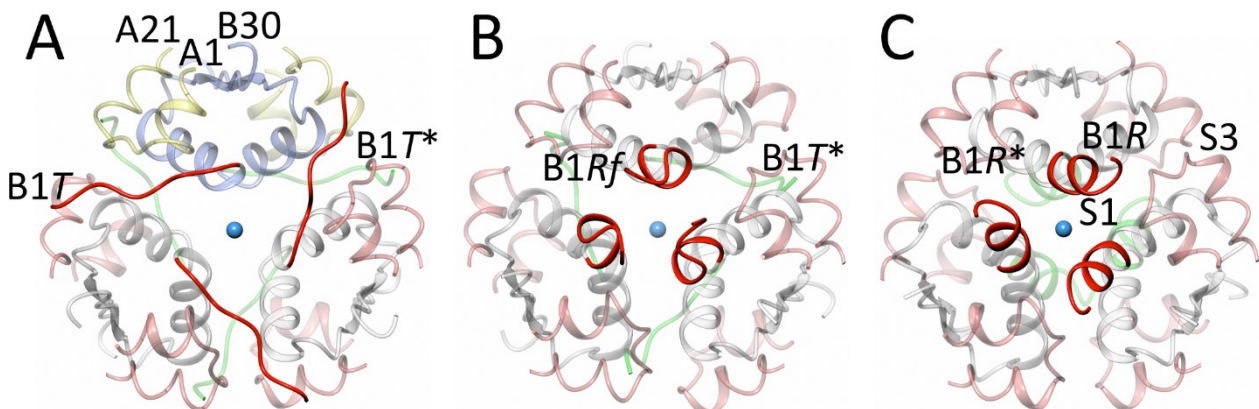
Krystalové struktury monomerů insulinu v tzv. T stavu (A), R stavu (B) a R^f stavu (C). Na konci panelu je ukázána struktura monomeru insulinu v roztoku, která je podobná stavu T a která byla analyzována pomocí NMR. N konec B řetězce je označen hvězdičkou.



Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

Obrázek 2

Strukturní uspořádání tří základních typů hexameru insulinu: T_6 (A), $T3R^f3$ (B) a R_6 (C). N-konce řetězce B, kterými se konformace liší, jsou znázorněny červeně.



General structural organization of the three main forms of insulin hexamer. (2017). Pubmed. Retrieved July 25, 2023, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28348075/#&gid=article-figures&pid=figure-1-uid-0>

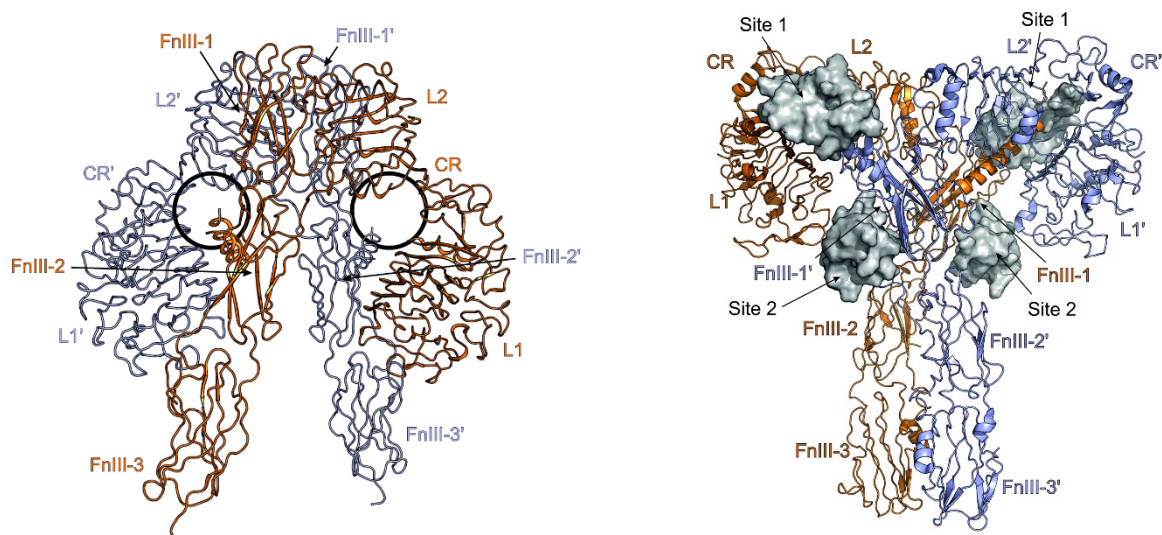
Různé typy hexamerů insulínu se liší svou stabilitou, přičemž R6 hexamery jsou nejstabilnější. Toho se využívá při skladování insulínu dodávaného pacientům, kdy se do roztoku přidává fenol, který stabilizuje R6 konformaci a tím i insulín (viz dále).

4.2 Vazba na receptor

Struktura insulinového receptoru (IR), ať už samotného (apo forma) (Obrázek 3, vlevo), či v komplexu s insulínem, byla postupně objasňována pomocí rentgenové krystalografie (McKern et al., 2006; Menting et al., 2013) a v posledních letech kryo-elektronové mikroskopie (Gutmann et al., 2019; Uchikawa et al., 2019). Bylo ukázáno, že IR je $(\alpha\beta)_2$ dimer skládající se ze dvou protomerů $\alpha\beta$ spojených disulfidickými můstky. Strukturní studie potvrdily předchozí výsledky mutagenese jak receptoru, tak insulínu (Macháčková et al., 2018) a vyjevily, že IR může vázat až 4 insulíny v páru dvou symetrických vazebných míst 1,2 a 1',2' (Obrázek 3, vpravo), na která se insulín váže prostřednictvím vazebných míst 1 a 2 ve své molekule.

Obrázek 3

Vlevo, krystalová struktura apo formy receptoru insulínu, který obsahuje dvě symetrická vazebná místa pro insulín (označená kruhy). Předpokládá se, že každé z těchto vazebných míst je ještě tvořeno vazebným místem 1 a 2 (respektive 1' a 2'), která jsou v apo formě velmi blízko sebe (v kruhu). Vpravo je ukázán IR plně saturovaný 4 molekulami insulínu ve vazebných místech 1 a 2 (respektive 1' a 2').



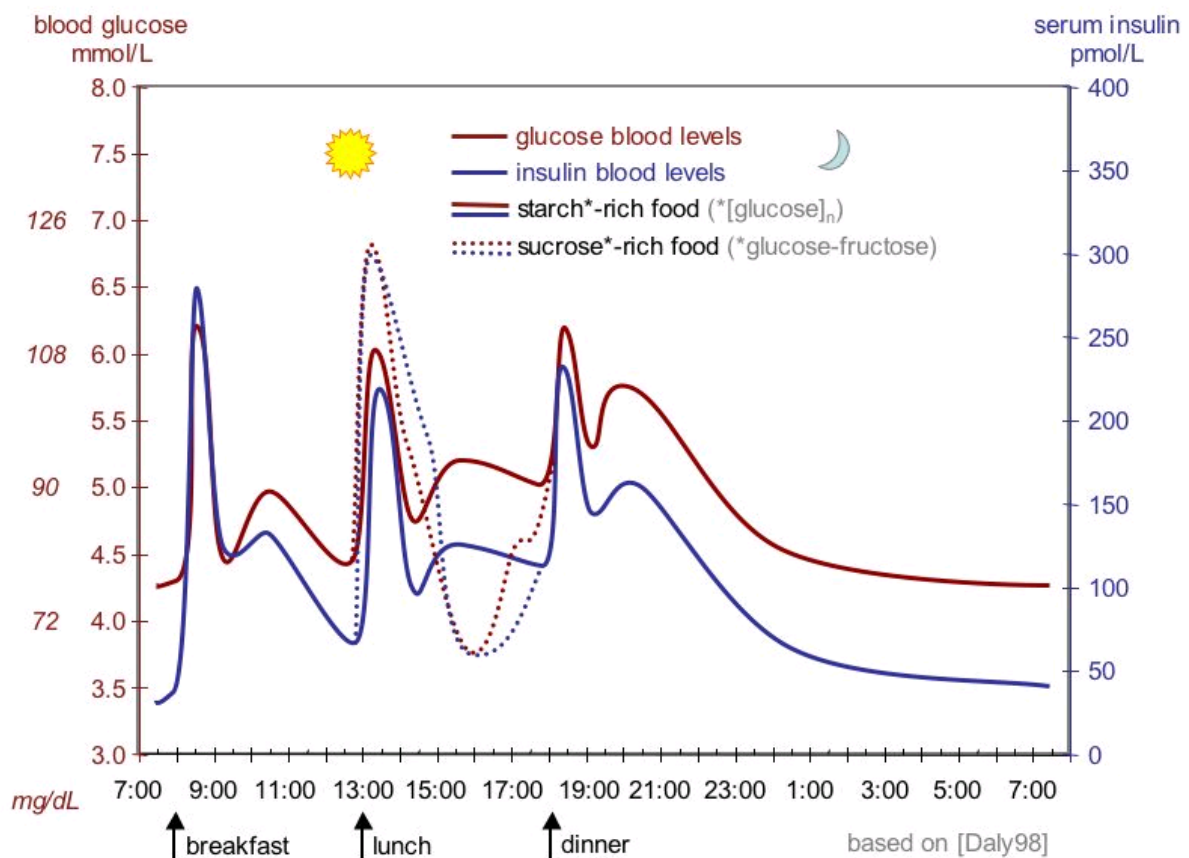
Vytvořeno Lenkou Žákovou podle struktury PDB 6SOF z článku: Cryo-EM structure of the complete and ligand-saturated insulin receptor ectodomain. (2020). *The Journal of Cell Biology*, 219(1). <https://doi.org/10.1101/679233>

5. PŘELOMOVÉ PŘÍSTUPY PRO TVORBU ANALOGŮ ZA POSLEDNÍ STOLETÍ

U zdravého člověka je insulin schopen vysoce citlivě a efektivně regulovat hladinu krevní glukózy. Pankreatické buňky okamžitě po detekci vyšší hladiny cukru v krvi sekretují insulin a sekrece insulinu se okamžitě zastaví, jakmile hladina cukru opět klesne na normální hladinu (Obrázek 4). To je velmi důležité, protože příliš prodlužované působení insulinu může způsobit příliš veliký pokles krevní glukózy, což může být pro organismus fatální (Shorr et al., 1997).

Obrázek 4

Citlivá regulace hladiny krevní glukózy insulinem sekretovaným z pankreatu.



Suckale, J., & Solimena, M. (2008). *The fluctuation of blood sugar*. Wikipedia: the free encyclopedia. Retrieved July 25, 2023, from https://en.wikipedia.org/wiki/Blood_sugar_level#/media/File:Suckale08_fig3_glucose_insulin_day.png

Jedním z problémů nefyziologického podání insulínu diabetikům je, že se uvolňuje z místa vpichu pod kůží (s.c. podání) relativně pomalu a jeho účinek je tak proti fyziologickému působení značně zpožděn. Fyziologicky je insulin sekretován z pankreatu portální žílou přímo do jater a teprve pak do periférií. Subkutánní podání insulínu tedy vede k časovým prodlevám snížení hladiny krevního cukru a k nutnosti pečlivě plánovat injekce insulínu dostatečně brzo před jídlem. Dalším problémem s.c. (subkutánní, tj. podkožní) podání také je, že insulin se z místa vpichu dostává do cirkulace, i když už je hladina cukru normální a může tak docházet k nebezpečným hypoglykemiím (Rasmussen et al., 1990; Popper & Schaffner, 1957).

Z těchto důvodů byla snaha přizpůsobit molekulu insulínu tak, aby se z místa vpichu vstřebávala rychleji než insulin lidský anebo naopak, aby zůstal v krvi déle než insulin lidský.

5.1 Rychle účinkující analogy

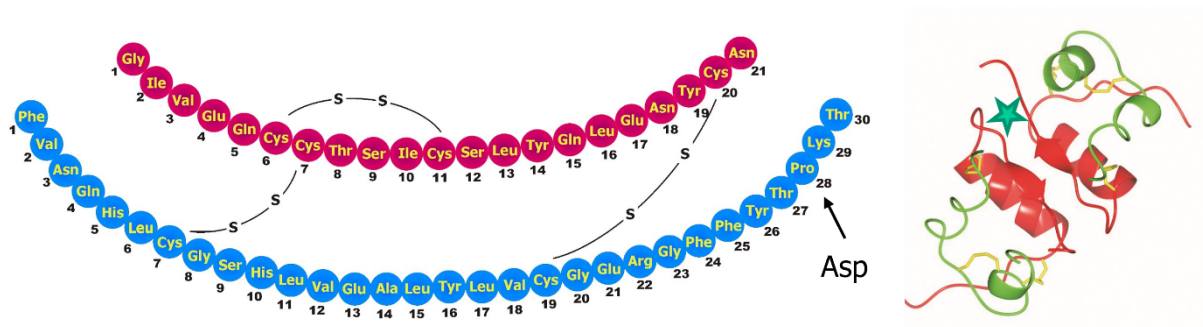
Inspirací pro vývoj těchto analogů bylo, že insulin se přirozeně uskládá v β buňkách jako stabilní Zn^{2+} hexamer (Obrázek 2), který po sekreci do krevního řečiště spontánně disociuje v biologicky aktivní monomery (Emdin et al., 1980). Tato schopnost oligomerizace insulínu byla klíčová pro porozumění biologické aktivitě a pro následnou manipulaci s rychlostí absorpce po s.c. podání. Principem vývoje analogů bylo znemožnit tvorbu hexamerů a dimerů, neboť monomery díky své menší molekulární velikosti mají vyšší prostupnost kapilárami a obecně vyšší míru difúze. Molekulární strategie byly snížit stabilitu hexameru pomocí racionálních záměn na interakčním místě monomer-monomer, nebo pomocí odstranění Zn^{2+} vazebného místa (Mosekilde et al., 1989).

5.1.1 Aspart

Brange et al. (Brange & Vølund, 1999) byli první kteří demonstrovali rychle účinkující analog, konkrétně (ProB28Asp insulin) aspart (Obrázek 5). Insulin aspart má sníženou tvorbu dimerů, díky odstranění důležitých van der Waalsových interakcí a tvorbě statické repulze mezi C-konci řetězců B monomerů insulinu.

Obrázek 5

Vlevo: Primární struktura insulinu aspart (*AspB28-insulin*). Vpravo: Zelená hvězda ukazuje umístění mutace v dimerizační oblasti insulinu



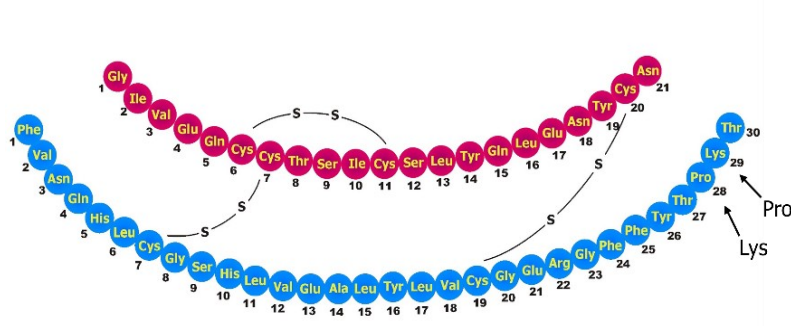
Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

5.1.2 Lispro

Prvním klinicky schváleným analogem byl insulin lispro (B28Lys, B29Pro-insulin), inspirovaný insulinu-podobným růstovým faktorem 1 (IGF-1), který přirozeně obsahuje odpovídající Lys-Pro sekvenci, bránící autoasociaci tohoto faktoru. V lidském insulinu je oproti tomu sekvence B28Pro, B29Lys (Howey et al., 1994). Molekulárním mechanismem stojícím za tímto fenoménem je pravděpodobně eliminace kontaktů a sterickej bránění na ploše interakce monomerů v dimeru (Ciszak et al., 1995).

Obrázek 6

Primární struktura insulinu lispro (*LysB28,ProB29-insulin*).



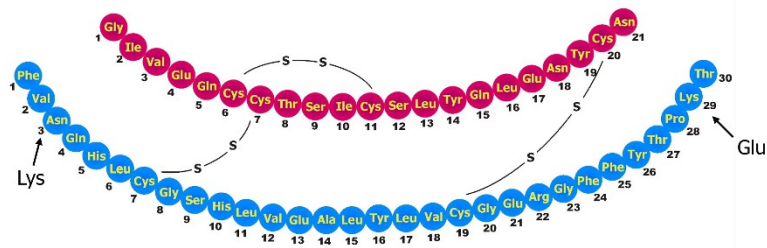
Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

5.1.3 Glulisine

Třetím analogem využívaným v medicíně je insulin glulisine (B3Lys, B29Glu-insulin) (Becker, 2007). Principem za rychlým nástupem účinku tohoto analogu díky lysinu na B3 je sterické bránění a statická repulze na interakčním místě monomer-monomer. Glutamát na B29 má rovněž vliv na dimerizaci a stabilitu monomeru (Becker & Frick, 2008).

Obrázek 7

Primární struktura insulinu glulisine (B3Lys, B29Glu-insulin)

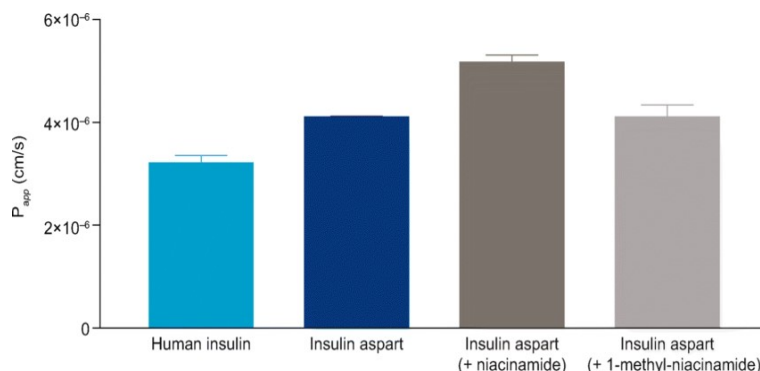


Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

Insulin lispro i aspart se velmi podobně vážou na receptor a spouští tvorbu dalších signálních molekul podobně jako humánní insulin. Vzhledem k humánnímu insulinu tedy působí velmi podobně, ale jejich efekt nastupuje rychleji (Obrázek 8). Tohoto je dosaženo díky rychlejší absorpci a distribuci monomerních forem těchto insulinů do cirkulace po s.c. injekci, což lépe napomáhá simulovat přirozenou sekreci. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou v klinice používanější než humánní insulin. Umožňují totiž injikovat insulin těsně před jídlem, bez nutnosti plánovat jídla a vpich insulinu déle dopředu (Senior & Hramiak, 2019). V praxi je pak snazší korigovat výkyvy glykémie pomocí aspartu a lispra než lidským insulinem (Monami et al., 2009). Kvůli snaze o vývoj ultra-rychlých analogů, byly v nedávné době oba tyto analogy použity v nových farmakologických formulacích, které by ještě více urychlily jejich nástup po injekci. Zejména pro insulinové pumpy je nutné mít ultra-rychlé analogy pro co nejrychlejší odezvu na výkyvy glykémie v reálném čase. Naprosto klíčové jsou dnes tyto analogy pro takzvané hybridní insulinové pumpy s polouzavřenou smyčkou a v konečném důsledku pro insulinové pumpy s uzavřenou smyčkou. Proto byla vyvinuta formulace aspartu Fiasp (Faster insulin aspart), což je analog Aspartu, který byl obohacen o niacinamid (vitamin B3) a L-arginin (Obrázek 8). Niacinamid usnadňuje rozpad hexameru analogu na monomery a dále přechodně zvyšuje lokální průtok krve v místě vpichu. Arginin zde zvyšuje stabilitu analogu (Biester et al., 2017).

Obrázek 8

Rychlost nástupu efektu insulínu, resp. jeho analogů



Převzato z (Biester et al., 2017).

Zvýšený průtok krve a cévní propustnost a potenciálně rychlejší rozpad na monomery může podobně vysvětlit fungování nově formulovaného ultra-rychlého insulínu na bázi analogu lispro (URLi), který byl obohacen o prostacyclin, treprostinil a kyselinu citrónovou. Obě tyto nové formulace analogů aspart a lispro byly schváleny pro klinické použití (Bode et al., 2021).

5.2 Bazální analogy

Analogy s prodlouženou dobou účinku neboli tzv. bazální analogy nevytvářejí v krvi po vpichu tak vysokou hladinu insulínu jako insulín lidský díky tomu, že se uvolňují pomaleji než lidský insulín, ale na druhou stranu vydrží v cirkulaci výrazně déle, až 8 hodin (lidský insulín odezní z cirkulace přibližně po dvou hodinách a „rychlé analogy“ ještě mnohem dříve) (Obrázek 12). Cílem použití bazálních analogů je redukovat počet injekcí, které si pacienti musí aplikovat denně.

Bazální analogy se změněným izoelektrickým bodem

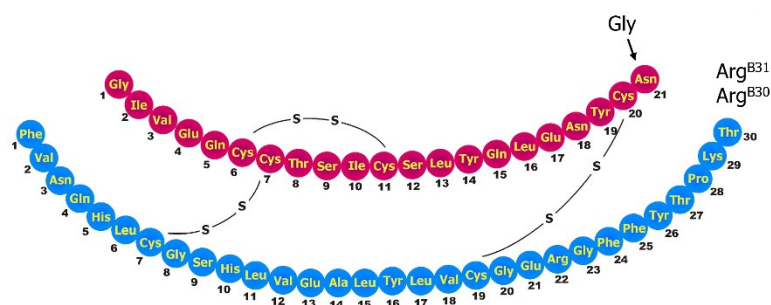
Prvním přístupem pro vývoj bazálních analogů bylo ovlivnit rozpustnost a tím i aktivitu insulínu vzhledem k změnám v pH. Humánní insulín má izoelektrický bod (pI) 5,4, což znamená že při této hodnotě pH je neutrální a nejméně rozpustný. Posun pI k hodnotám okolo 6,8, které je blíže fyziologickému pH, byl dosažen záměnami glutaminu nebo kyseliny glutamové za lysin nebo arginin, nebo C-koncovou amidací (Kohn et al., 2007). Zvýšení pI analogu tedy přispívá k jeho menší rozpustnosti v cirkulaci a tím prodlouženému uvolňování z místa vpichu.

5.2.1 Glargin

Prvním analogem uznaným pro užití v medicíně využívajícím tohoto konceptu s pl byl insulin glargin (Obrázek 9), původně pojmenován jako HOE 901. V porovnání s humánním insulinem je o dva argininové zbytky prodloužen na C-konci β -řetězce (B31Arg, B32Arg), což posouvá pl směrem k neutrální hodnotě. Dále má asparagin na pozici A21 substituovaný za glycin z důvodu zajištění stability při pH 4 (nedochází k deamidace asparaginu A21). Při s.c. injekci dochází ke sražení insulinu díky lokálnímu neutrálnímu pH, poté dochází k pozvolnému rozpouštění a k s tím i spojené absorpci. Výsledkem je mnohem delší a plošší křivka uvolňování tohoto analogu (Obrázek 12). Nově je glargin podáván v koncentrovanější formě U300 o delším poločasu rozpadu (19 h) v porovnání s původní formou U100 (13,5h). Díky vyšší koncentraci je pak precipitát v místě injekce kompaktnější, a tak má styčnou plochu s okolím menší, čímž se i pomaleji rozpouští (Pasquel et al., 2020; Campbell et al., 2001; Rosenstock et al., 2000).

Obrázek 9

Analog insulin glargin (GlyA21, ArgB30, ArgB31-insulin)



Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

Bazální analogy s acylovanými mastnými kyselinami

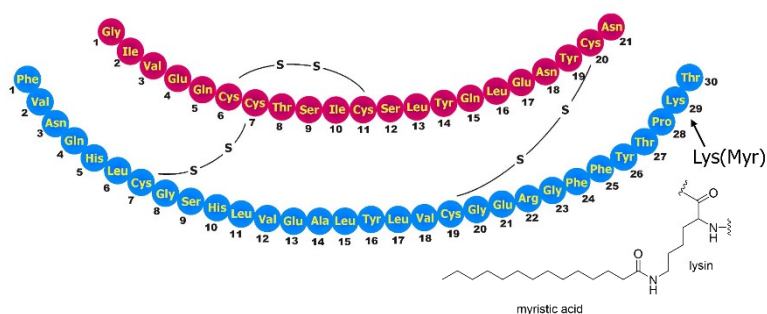
Acylace mastnými kyselinami a s tím spojená vazba analogu na sérový albumin byla navržena jako alternativní metoda pro prodloužení efektu insulinu. Tělu je tento mechanismus znám, například když tělo pomocí vázání albuminu na volné mastné kyseliny označuje proteiny pro transport mezi intracelulárními kompartmenty (Kurtzhals, 2004; Klein et al., 2007).

5.2.2 Detemir

Za pomoci výše popsaného konceptu byl vyvinut insulin detemir, který byl testován na prasatech. Za principem jeho dlouhého účinku (Obrázek 10) je kovalentní vazba mezi C14 mastnou kyselinou připojenou na ϵ -amino skupině B29Lys pomocí amidové vazby (Obrázek 10). Tato modifikace způsobuje reverzibilní vazbu s albuminem. Detemir, tj. lidský insulin s připojenou kyselinou myristovou, byl vybrán pro klinický vývoj. Vyšší strukturou detemiru je velmi stabilní hexamer, který je stálější než hexamer lidského insulinu. Bylo usouzeno, že pro dlouhý účinek detemiru je potřeba obou faktorů, jak asociace v hexamer, tak i vazba na albumin (Soran & Younis, 2006; Danne et al., 2003; Philips & Scheen, 2006).

Obrázek 10

Primární struktura analogu insulin detemir a struktura myristové kyseliny připojené k LysB29.



Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

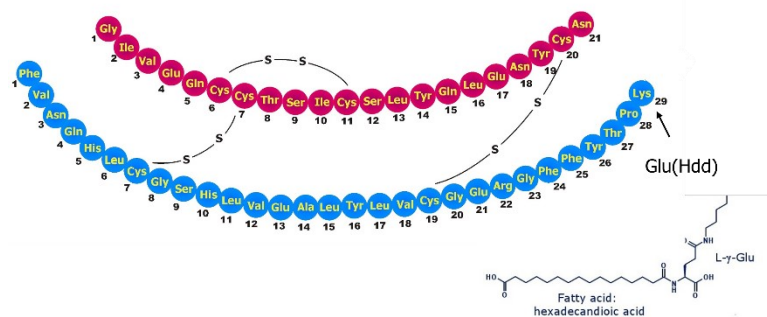
5.2.3 Degludec

Pro dosažení ještě delšího účinku insulinu bylo přistoupeno ke konceptu acylace mastnými kyselinami ještě z trochu jiného úhlu a to hypotézou o rozpustném multihexameru, kde jednotlivé hexamery by byly propojeny právě díky těmto mastným kyselinám jako "korálky na provázku" (Jonassen et al., 2012). Z mnoha analogů s různými postranními řetězci byly vybrány dva s léčebným potenciálem. Jedním z nich byl insulin degludec (LysB29Ne-C16 diacid- γ -Glu desB30 insulin), který má na pozici B29 přes γ -glutamátový spacer připojenou kyselinu thapsovou (C16 dikarboxylová kyselina). V přítomnosti fenolu, běžně používaném v insulinových roztocích jako stabilizátor R hexameru, a zinku degludec zaujímá strukturu dihexameru ve stavu T3R3. Po disociaci fenolu, k čemuž dochází spontánně po s.c. injekci a naředění v krvi, mění degludec svou kvartérní strukturu v multihexamerní, složenou z lineárně seřazených hexamerů v T6 stavu. Po disociaci zinečnatých iontů dochází postupně k uvolňování jednotlivých hexamerů z obou konců polymeru. Krystalová struktura degludecu objasnila koordinaci karboxylátových kyslíků mastné kyseliny k zinku v jádru hexameru.

V klinických studiích pak vykazoval degludec poločas rozpadu 25 h, proto splňoval požadavky pro dávkování jednou za den. Dalším pozitivem tohoto analogu byla kombinovatelnost s rychle účinkujícími analogy insulínu či peptidem liraglutidem (GLP-1 analog, antidiabetické, obezitologické léčivo podávané zejména pacientům s DM2) přímo ve stejném roztoku. To je umožněno díky zachování vlastností jednotlivých komponent roztoku (Peter Kurtzhals et al., 2021a).

Obrázek 11

Primární struktura analogu insulínu degludec a struktura thapsové kyseliny připojené k LysB29 prostřednictvím glutamátu.



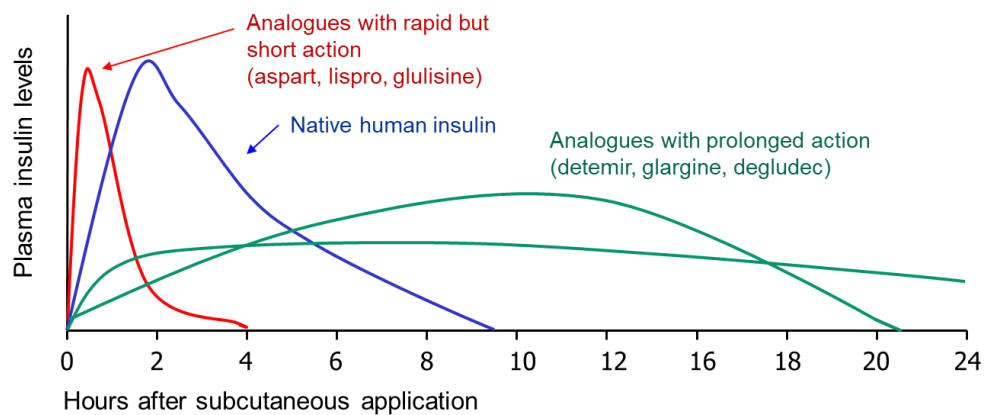
Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

Konceptu acylace s mastnými kyselinami, jakožto způsobu prodlužování efektu insulínu i jiných peptidů, bylo později využito i u dalších peptidových léčiv, zejména z kategorie analogů GLP-1 (glucagon-like peptide 1), které mohou být dávkovány i pouze jednou za týden.

Grafické znázornění porovnání délky setrvání lidského insulínu v krvi po vpichu pod kůži s rychle působícími a bazálními analogy je znázorněno na obrázku 12.

Všechny klinicky používané analogy insulínu spolu s jejich komerčními názvy a daty, kdy byly uvedeny do praxe jsou uvedeny na obrázku 13.

Obrázek 12 Zjednodušené znázornění koncentrace insulinu či jeho analogů s rychlým či prodlouženým nástupem účinku v krvi po subkutánním podání. Změna krevní koncentrace nativního lidského insulinu je ukázána modře, rychle působící insuliny jsou červeně a insuliny s prodlouženým účinkem jsou ukázány zeleně. Vysvětlení je v textu.



Vytvořila Lenka Žáková ze skupiny J. Jiráčka (ÚOCHB).

Obrázek 13

Shrnutí klinicky používaných analogů insulinu společně s jejich obchodními názvy, společnostmi, které je produkují a rokem, kdy byly uvedeny do praxe.

Long - acting

Glargine	[GlyA21, ArgB31, ArgB32]-insulin, Lantus®	Sanofi-Aventis	2000
Detemir	LysB29-bound myristic acid, Levemir®	Novo Nordisk	2004
Degludec	LysB29-bound omega-carboxypentadecanoyl-gamma-L-glutamyl desB30 human insulin, Tresiba®	Novo Nordisk	2015

Rapid - acting

Lispro	[LysB28, ProB29]-insulin, Humalog®	Eli Lilly	1996
Aspart	[AspB28]-insulin, Novalog®	Novo Nordisk	2000
Glulisine	[LysB3, GluB29]-insulin, Apidra®	Sanofi-Aventis	2007

Vytvořil J. Jiráček (ÚOCHB).

5.3 Orální analogy

Snaha o vyvinutí funkčního orálního analogu je tu již několik dekad, jakožto možná cesta, jak se vyhnout nepříjemnému podávání insulínu jehlou (Heinemann & Jacques, 2009). Hlavním problémem s podáváním insulínu orální cestou jsou tělu vlastní mechanismy jako enzymatická proteolýza, degradace žaludečními kyselinami a absorpční bariéra (Hamman et al., 2005). I když stále není komerčně dostupný takový analog, několika výzkumným skupinám se některé z bariér podařilo obejít. Zejména ochránit insulín před degradací bylo docíleno obalením insulínu několika vrstvami nanoparticulí (Woitiski et al., 2010). Většinou však problém tvoří velmi nízká absorpce, respektive biopotence insulínu. Z toho důvodu by bylo nutné podávat vysoké dávky insulínu či facilitovat absorpci pomocí lauryl sulfátu sodného (SLS) či žlučových solí, pro solubilizaci mucusu střeva, což spekulativně může být pro tělo toxické. Mimo to příjem potravy značně ovlivňuje biopotenci orálně podaného insulínu a v tomto směru nebyla tato problematika dostatečně prostudována (Heinemann & Jacques, 2009).

6. INSULINOVÉ ANALOGY NOVÉ GENERACE

6.1 Hepatoselektivní analogy

Těchto šest kovalentně upravených analogů insulínu, které jsme právě popisovali a které jsou shrnuty na Obrázku 13, zcela jistě představuje výrazný pokrok a zlepšení komfortu pro diabetické pacienty. Problémy s podáním insulínu i těchto analogů nicméně stále přetrvávají. Endogenně je insulín slinivkou nejprve sekretován do jater, kde působí antagonisticky vůči glykogenolýze a glukoneogenezi a až poté distribuován cévním systémem do zbytku těla, kde aktivuje transportér GLUT4 (Liu et al., 1993). Tento způsob endogenního působení insulínu je logický, neboť pokud je v krvi přítomný cukr z potravy, není žádoucí, aby játra produkovala cukr endogenně. Odhaduje se, že játra metabolizují až polovinu všeho insulínu sekretovaného slinivkou. Naproti tomu, s.c. aplikovaný insulín působí nejprve na periférii organismu a do jater se dostává se zpožděním, což způsobuje problémy s regulací glykémie u diabetiků.

Z výše uvedených důvodů byla snaha o pozměnění vlastností insulínu tak, aby po s.c. podání preferenčně působil na játra, tzn. hepatoselektivně.

6.1.1 PEGylované Lispro

Firma Eli Lilly vyvinula analog peglispro (Y2605541, čili PEGylované lispro, PEG = polyethylenglykol), což je insulín peglispro, kovalentně modifikovaný 20 kDa velkým polyethylenglykolovým řetězcem. Peglispro je jako molekula větší než insulín, což jí uděluje velmi zajímavé hydrodynamické vlastnosti v organismu a zároveň nižší ledvinové odbourávání a signifikantní hepatoselektivitu. Peglispro díky svému většímu hydrodynamickému poloměru méně vstupuje do mikrokapilár a je více metabolizován játry. Zatímco zachovává schopnost efektivně snižovat glykémii má nízkou incidenci nočních hypoglykemií. Také zapříčiňuje úbytky na váze pacientů, což je u diabetiků velmi žádoucí. Bohužel se ve třetí fázi klinických studií ukázalo, že léčba peglisprem způsobuje vyšší tvorbu jaterní tukové tkáně. V některých případech také po léčbě pomocí peglispra docházelo ke zvýšení hladin cholesterolu, triglyceridů a transamináz v krvi. Z těchto důvodů byl peglispro stažen z klinických studií (Caparrotta & Evans, 2014).

6.2 “Chytré“ insulinové analogy (Glucose-responsive “smart“ insulin; GRI)

Ideálním řešením stále fluktuující glykémie, zejména u MD1, by byl analog sám reagující na aktuální potřeby těla (Jarosinski et al., 2021). Přístupů pro vývoj takto fungujících analogů je několik, avšak žádný zatím není v praxi využíván pro svoje nedostatky (Wang et al., 2020). Nefunkční vzájemná komunikace mezi glukózou a insulinem je právě úskalím neustále hrozící hypoglykémie pro diabetiky. Ideje o insulínu schopného sám sobě regulovat biologickou aktivitu byly přítomny již v sedmdesátých letech minulého století (Brownlee & Cerami, 1979).

Hlavní myšlenkou bylo uzavřít insulin do specifického polymeru, za současné modifikace molekuly insulinu chemickým motivem vázajícím glukózu na sebe, typicky jím bývá specifický lektin (např. GBP) či boronové kyseliny. V polymeru obsahujícím navázané molekuly glukózy je tak boronovou kyselinou modifikovaný insulin nekovalentně vázán pomocí vazby boronové kyseliny (připojené k insulinu) a molekuly glukózy (je součástí polymeru). Vyšší koncentrace glukózy v prostředí kompetitivně vytlačí z nekovalentního komplexu insulin z polymeru do cirkulace. Podobně působí glukózou modifikované insuliny vázané na lektin.

Při transdermálním podání těchto analogů, mikrojehlami, bylo na zvířatech sice dosaženo dobrých výsledků, avšak zatím nikdy tyto analogy nedosáhly klinických studií (Yu et al., 2020). Hlavním nedostatkem z podstaty metody samostatné, je pomalá odezva systému a neschopnost zpětně vychytávat již vyplavený insulin, který tak působí i když už je koncentrace cukru nízká.

Systémy umožňující obejít tyto problémy tak vyžadují sofistikovanější a komplexnější provedení (Chou et al., 2015). V tomto duchu, oligomannosyl/fucosyl-insulin konjugáty vykazují preferenčně vazbu k různým receptorům v závislosti na krevní glykémii. Za nízké koncentrace glukózy se insulin váže na manózový receptor, zatímco za vysoké koncentrace na inzulinový. MK-2640, analog právě s těmito vlastnostmi sice byl v první fázi klinických testů, avšak vykazoval nízkou potenci. Ta pramenila z vysoké clearance skrze manózové receptory. V porovnání s lidským insulinem byl efekt analogu na snižování glykémie 25 x nižší, a proto by dávky musely být neprakticky velké (Krug et al., 2019).

V posledních letech se výzkum chytrého analogu ubíral směrem k analogu s takzvaným "přepínačem" (*switch*). Přepínač je na analogu umístěn v takovém místě, které mu umožňuje přepínat mezi stavy lišícími se biologickou aktivitou analogu, například na C-konci B-řetězce insulinu, který se musí „odklopit“ od centrální části insulinu, aby byla molekula insulinu schopná efektivně vázat a aktivovat receptor. Takovýto analog musí obsahovat motiv vázající glukózu a motiv mimikující glukózu. Oba motivy spolu interagují při nízké koncentraci glukózy, ale rozpojí se při její vyšší koncentraci a insulin je tak aktivován. Limitujícím faktorem je omezené množství motivů vázajících glukózu ve fyziologických koncentracích glukózy (2-20 mM) (Hoeg-Jensen, 2021). Boronové kyseliny sice byly testovány jako potenciální výše zmíněné motivy, ale bylo od nich ustoupeno pro jejich nízkou dlouhodobou stabilitu a toxicitu. Slibnějším modelem by dle dosavadních studií byl "switch" s zainkorporovanými makrocykly vázající glukózu (Tromans et al., 2019).

Koncepce senzitivního analogu na okolní glykémii se objevuje i ve velmi recentních studiích ohledně orálního analogu s potenciálně jednodenním dávkováním i pro diabetiky 1. typu (Xiao et al., 2021).

6.4 “Once-weekly“ analogy

Zatím nejdále postoupivším směrem výzkumu je úsilí pro vytvoření nového bazálního analogu insulínu s ještě více prodlouženým účinkem, než mají insulín detemir, glargin či degludec. Analog, který by se uvolňoval z místa vpichu do cirkulace až po dobu jednoho týdne (once-weekly insulin analog).

Injektování insulínu je pro mnohé pacienty důvodem oddalování léčby (Hauber et al., 2005). Proto by se analog umožňující méně časté vpichování mohl těšit lepšího přijetí mezi pacienty (Rosenstock et al., 2020).

6.4.1 Icodec

Příkladem takového nového analogu v klinických studiích je insulín icodec (A14Glu, B16His B25His, B29Nε-C20 diacid-γ-Glu-OEG-OEG desB30 human insulín, kde OEG je 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid) (obrázek 14) (Kjeldsen et al., 2021a). Díky internalizaci s receptorem má insulín icodec sníženou afinitu vůči receptoru insulínu a tím i dramaticky sníženou clearance. Zároveň má kvůli těmto mutacím vysokou schopnost vázat se na albumin. Tento derivát insulínu potvrdil velmi dobré výsledky v první i druhé fázi klinických studií, které ukázaly, že má extrémně prodloužený účinek in vivo s poločasem rozpadu až 196 h. In vitro studie ukazují, že i přes tyto změny aktivuje icodec stále stejné množství receptorů jako stejná dávka insulínu lidského (Nishimura et al., 2021). V druhé fázi klinických studií v porovnání s U100 glargin, vykazoval podobně dobrou kompenzaci bez zvýšeného rizika hypoglykémie (Lingvay et al., 2021). Třetí fáze klinických studií již byla zahájena (Rosenstock et al., 2020).

Obrázek 14

Primární struktura „once-weekly“ derivátu insulínu icodec.



Převzato z KURTZHALS, Peter. Once-weekly basal insulin analogs (administrated s.c.). In: *Cell.com* [online]. United States: Cell Press, 2021 [cit. 2023-08-01]. Dostupné z: [https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/pdf/S0165-6147\(21\)00100-0.pdf](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/pdf/S0165-6147(21)00100-0.pdf)

7. ZÁVĚR

Život zachraňující objev insulinu v Torontu v roce 1921 je jedním z nejvýznamnějších objevů v dějinách medicíny a v té době byl označován za zázračnou léčbu diabetu. Samotná molekula insulinu je však jako léčivo obtížně použitelná díky svému bílkovinnému charakteru a labilitě. Problém dnes není insulin vyrobit v dostatečném množství, ale jeho aplikace do organismu a přizpůsobení množství podaného insulinu hladině krevní glukózy tak, aby byla regulována ve fyziologickém rozmezí. Problém činí tzv. nízký terapeutický index insulinu, kdy existuje jen velmi jemná hranice mezi množstvím, které je prospěšné a množstvím, které může pacientům ublížit. V této rešeršní práci podávám stručný přehled o struktuře insulinu, působení insulinu, poruchách v jeho působení a způsobech léčby těchto onemocnění pomocí podání exogenního insulinu či jeho derivátů. Současný vývoj se zaměřil na kombinaci genetického a chemického inženýrství ve spojení s farmaceutickou optimalizací s cílem vytvořit velmi rychle či velmi dlouho působící insuliny, tkáňově selektivní insuliny (zejména jaterně selektivní) či deriváty insulinu aktivované pouze vyšší hladinou glukózy a neaktivní při nízké hladině glukózy.

8. SEZNAM ZDROJŮ

- ADAMS, M. J., BLUNDELL, T. L., DODSON, E. J., DODSON, G. G., VIJAYAN, M., BAKER, E. N., HARDING, M. M., HODGKIN, D. C., RIMMER, B., & SHEAT, S. (1969). Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature*, 224(5218), 491–495.
<https://doi.org/10.1038/224491a0>
- Agarwala, V., Flannick, J., Sunyaev, S., & Altshuler, D. (2013). Evaluating empirical bounds on complex disease genetic architecture. *Nature Genetics*, 45(12), 1418–1427.
<https://doi.org/10.1038/ng.2804>
- Banting, F. G., & Campbell, W. R. (n.d.). *THE EFFECT PRODUCED ON DIABETES BY EXTRACTS OF PANCREAS*.
- Barroso, I. (2005). Genetics of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 22(5), 517–535.
<https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01550.x>
- Becker, R. H. A. (2007). Insulin glulisine complementing basal insulins: a review of structure and activity. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 9(1), 109–121.
<https://doi.org/10.1089/dia.2006.0035>
- Becker, R. H. A., & Frick, A. D. (2008). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Insulin Glulisine. *Clinical Pharmacokinetics*, 47(1), 7–20. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847010-00002>
- Bidwell, P. A., Yuen, S. L., Li, J., Berg, K., Rebbeck, R. T., Aldrich, C. C., Roopnarine, O., Cornea, R. L., & Thomas, D. D. (2022). A Large-Scale High-Throughput Screen for Modulators of SERCA Activity. *Biomolecules*, 12(12), 1789. <https://doi.org/10.3390/biom12121789>
- Biester, T., Kordonouri, O., & Danne, T. (2017). Pharmacological Properties of Faster-Acting Insulin Aspart. *Current Diabetes Reports*, 17(11), 101. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0931-y>
- Bliss, M. (2013). *The Discovery of Insulin*. University of Chicago Press.
- Bode, B., Carlson, A., Liu, R., Hardy, T., Bergenstal, R., Boyd, J., Morrett, S., & Ignaut, D. (2021). Ultrarapid Lispro Demonstrates Similar Time in Target Range to Lispro with a Hybrid Closed-Loop System. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 23(12), 828–836.
<https://doi.org/10.1089/dia.2021.0184>
- Brange, J., & Vølund, A. (1999). Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(2), 307–335. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00079-9)
- Brasacchio, D., Okabe, J., Tikellis, C., Balcerczyk, A., George, P., Baker, E. K., Calkin, A. C., Brownlee, M., Cooper, M. E., & El-Osta, A. (2009). Hyperglycemia Induces a Dynamic Cooperativity of Histone Methylase and Demethylase Enzymes Associated With Gene-Activating Epigenetic Marks That Coexist on the Lysine Tail. *Diabetes*, 58(5), 1229–1236.
<https://doi.org/10.2337/db08-1666>

- Brownlee, M., & Cerami, A. (1979). A Glucose-Controlled Insulin-Delivery System: Semisynthetic Insulin Bound to Lectin. *Science*, *206*(4423), 1190–1191.
<https://doi.org/10.1126/science.505005>
- Buchanan, T. A., & Xiang, A. H. (2005). Gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(3), 485–491. <https://doi.org/10.1172/JCI24531>
- Campbell, R. K., White, J. R., Levien, T., & Baker, D. (2001). Insulin glargine. *Clinical Therapeutics*, *23*(12), 1938–1957. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(01\)80148-X](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(01)80148-X)
- Caparrotta, T. M., & Evans, M. (2014). PEGylated insulin Lispro, (LY2605541)—a new basal insulin analogue. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *16*(5), 388–395.
<https://doi.org/10.1111/dom.12196>
- Chou, D. H.-C., Webber, M. J., Tang, B. C., Lin, A. B., Thapa, L. S., Deng, D., Truong, J. V., Cortinas, A. B., Langer, R., & Anderson, D. G. (2015). Glucose-responsive insulin activity by covalent modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(8), 2401–2406.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1424684112>
- Christensen, A. A., & Gannon, M. (2019). The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, *19*(9), 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>
- Cinek, O., & Šumník, Z. (2019). Type 1 diabetes: etiology and epidemiology. *Vnitřní lékařství*, *65*(4), 235–247. <https://doi.org/10.36290/vnl.2019.041>
- Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., & Smith, G. D. (1995). Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. *Structure (London, England: 1993)*, *3*(6), 615–622.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00195-2)
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., & Caro, J. F. (1996). Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *New England Journal of Medicine*, *334*(5), 292–295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>
- Danne, T., Lüpke, K., Walte, K., von Schuetz, W., & Gall, M.-A. (2003). Insulin Detemir Is Characterized by a Consistent Pharmacokinetic Profile Across Age-Groups in Children, Adolescents, and Adults With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, *26*(11), 3087–3092.
<https://doi.org/10.2337/diacare.26.11.3087>
- Dean, L., McEntyre, J., Dean, L., & McEntyre, J. (2004). *The Genetic Landscape of Diabetes*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Dunn, M. F. (2005). Zinc–Ligand Interactions Modulate Assembly and Stability of the Insulin Hexamer – A Review. *Biometals*, *18*(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3685-y>
- Emdin, S. O., Dodson, G. G., Cutfield, J. M., & Cutfield, S. M. (1980). Role of zinc in insulin biosynthesis. *Diabetologia*, *19*(3), 174–182. <https://doi.org/10.1007/BF00275265>

- Fernandez-Valverde, S. L., Taft, R. J., & Mattick, J. S. (2011). MicroRNAs in β -Cell Biology, Insulin Resistance, Diabetes and Its Complications. *Diabetes*, *60*(7), 1825–1831.
<https://doi.org/10.2337/db11-0171>
- Flannick, J., Thorleifsson, G., Beer, N. L., Jacobs, S. B. R., Grarup, N., Burt, N. P., Mahajan, A., Fuchsberger, C., Atzmon, G., Benediktsson, R., Blangero, J., Bowden, D. W., Brandslund, I., Brosnan, J., Burslem, F., Chambers, J., Cho, Y. S., Christensen, C., Douglas, D. A., ... Altshuler, D. (2014). Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *46*(4), 357–363. <https://doi.org/10.1038/ng.2915>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6275.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gepts, W. (1965). Pathologic Anatomy of the Pancreas in Juvenile Diabetes Mellitus. *Diabetes*, *14*(10), 619–633. <https://doi.org/10.2337/diab.14.10.619>
- Grant, S. F. A., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Wilensky, R. L., ... Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *38*(3), 320–323.
<https://doi.org/10.1038/ng1732>
- Gudmundsson, J., Sulem, P., Steinthorsdottir, V., Bergthorsson, J. T., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Rafnar, T., Gudbjartsson, D., Agnarsson, B. A., Baker, A., Sigurdsson, A., Benediktsson, K. R., Jakobsdottir, M., Blondal, T., Stacey, S. N., Helgason, A., Gunnarsdottir, S., Olafsdottir, A., Kristinsson, K. T., ... Stefansson, K. (2007). Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *39*(8), 977–983. <https://doi.org/10.1038/ng2062>
- Gutmann, T., Schäfer, I. B., Poojari, C., Brankatschk, B., Vattulainen, I., Strauss, M., & Coskun, Ü. (2019). Cryo-EM structure of the complete and ligand-saturated insulin receptor ectodomain. *The Journal of Cell Biology*, *219*(1), e201907210. <https://doi.org/10.1083/jcb.201907210>
- Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., Powers, A. C., Rhodes, C. J., Sussel, L., & Weir, G. C. (2014). β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care*, *37*(6), 1751–1758. <https://doi.org/10.2337/dc14-0396>
- Hamman, J. H., Enslin, G. M., & Kotzé, A. F. (2005). Oral Delivery of Peptide Drugs. *BioDrugs*, *19*(3), 165–177. <https://doi.org/10.2165/00063030-200519030-00003>
- Hauber, A. B., Johnson, F. R., Sauriol, L., & Lescrauwaet, B. (2005). Risking Health to Avoid Injections. *Diabetes Care*, *28*(9), 2243–2245. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.9.2243>

- Heinemann, L., & Jacques, Y. (2009). Oral Insulin and Buccal Insulin: A Critical Reappraisal. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(3), 568–584.
<https://doi.org/10.1177/193229680900300323>
- Hoeg-Jensen, T. (2021). Review: Glucose-sensitive insulin. *Molecular Metabolism*, 46, 101107.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101107>
- Howey, D. C., Bowsher, R. R., Brunelle, R. L., & Woodworth, J. R. (1994). [Lys(B28), Pro(B29)]-Human Insulin: A Rapidly Absorbed Analogue of Human Insulin. *Diabetes*, 43(3), 396–402.
<https://doi.org/10.2337/diab.43.3.396>
- Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., & Tuomilehto, J. (2003). Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*, 52(4), 1052–1055. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.1052>
- Ingelsson, E., Langenberg, C., Hivert, M.-F., Prokopenko, I., Lyssenko, V., Dupuis, J., Mägi, R., Sharp, S., Jackson, A. U., Assimes, T. L., Shrader, P., Knowles, J. W., Zethelius, B., Abbasi, F. A., Bergman, R. N., Bergmann, A., Berne, C., Boehnke, M., Bonnycastle, L. L., ... on behalf of the MAGIC investigators. (2010). Detailed Physiologic Characterization Reveals Diverse Mechanisms for Novel Genetic Loci Regulating Glucose and Insulin Metabolism in Humans. *Diabetes*, 59(5), 1266–1275. <https://doi.org/10.2337/db09-1568>
- Jarosinski, M. A., Dhayalan, B., Rege, N., Chatterjee, D., & Weiss, M. A. (2021). ‘Smart’ insulin-delivery technologies and intrinsic glucose-responsive insulin analogues. *Diabetologia*, 64(5), 1016–1029. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05422-6>
- Jaroslav, R. (2007). *Diabetes mellitus - Komplikace a přidružená onemocnění: Diagnostické a léčebné postupy*. Grada Publishing a.s.
- JM Norris, K Barriga, G Klingensmith, M Hoffman, GS Eisenbarth, HA Erlich, & M Rewers. (2003). Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*, 290, 1713. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1713>
- Jonassen, I., Havelund, S., Hoeg-Jensen, T., Steensgaard, D. B., Wahlund, P.-O., & Ribøl, U. (2012). Design of the Novel Protraction Mechanism of Insulin Degludec, an Ultra-long-Acting Basal Insulin. *Pharmaceutical Research*, 29(8), 2104–2114. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0739-z>
- Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanov, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengård, J., & Kesäniemi, Y. A. (1992). Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*, 35(11), 1060–1067. <https://doi.org/10.1007/BF02221682>
- Kjeldsen, T. B., Hubálek, F., Hjørringgaard, C. U., Tagmose, T. M., Nishimura, E., Stidsen, C. E., Porsgaard, T., Fledelius, C., Refsgaard, H. H. F., Gram-Nielsen, S., Naver, H., Pridal, L., Hoeg-Jensen, T., Jeppesen, C. B., Manfè, V., Ludvigsen, S., Lautrup-Larsen, I., & Madsen, P. (2021). Molecular Engineering of Insulin Icodec, the First Acylated Insulin Analog for Once-

- Weekly Administration in Humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(13), 8942–8950.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00257>
- Klein, O., Lyngø, J., Endahl, L., Damholt, B., Nøse, L., & Heise, T. (2007). Albumin-bound basal insulin analogues (insulin detemir and NN344): comparable time-action profiles but less variability than insulin glargine in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(3), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00685.x>
- Kohn, W. D., Micanovic, R., Myers, S. L., Vick, A. M., Kahl, S. D., Zhang, L., Striffler, B. A., Li, S., Shang, J., Beals, J. M., Mayer, J. P., & DiMarchi, R. D. (2007). pI-shifted insulin analogs with extended in vivo time action and favorable receptor selectivity. *Peptides*, 28(4), 935–948.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.01.012>
- Krug, A. W., Visser, S. A. G., Tsai, K., Kandala, B., Fancourt, C., Thornton, B., Morrow, L., Kaarsholm, N. C., Bernstein, H. S., Stoch, S. A., Crutchlow, M., Kelley, D. E., & Iwamoto, M. (2019). Clinical Evaluation of MK-2640: An Insulin Analog With Glucose-Responsive Properties. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(2), 417–425.
<https://doi.org/10.1002/cpt.1215>
- Kurtzhals, P. (2004). Engineering predictability and protraction in a basal insulin analogue: the pharmacology of insulin detemir. *International Journal of Obesity*, 28(2), S23–S28.
<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802746>
- Kurtzhals, Peter, Nishimura, E., Haahr, H., Høeg-Jensen, T., Johansson, E., Madsen, P., Sturis, J., & Kjeldsen, T. (2021). Commemorating insulin’s centennial: engineering insulin pharmacology towards physiology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(8), 620–639.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.05.005>
- Kyvik, K. O., Green, A., & Beck-Nielsen, H. (1995). Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 311(7010), 913–917. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7010.913>
- Lingvay, I., Buse, J. B., Franek, E., Hansen, M. V., Koefoed, M. M., Mathieu, C., Pettus, J., Stachlewska, K., & Rosenstock, J. (2021). A Randomized, Open-Label Comparison of Once-Weekly Insulin Icodec Titration Strategies Versus Once-Daily Insulin Glargine U100. *Diabetes Care*, 44(7), 1595–1603. <https://doi.org/10.2337/dc20-2878>
- Liu, M., Weiss, M. A., Arunagiri, A., Yong, J., Rege, N., Sun, J., Haataja, L., Kaufman, R. J., & Arvan, P. (2018). Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(S2), 28–50. <https://doi.org/10.1111/dom.13378>
- Liu, Z., Gardner, L. B., & Barrett, E. J. (1993). Insulin and glucose suppress hepatic glycogenolysis by distinct enzymatic mechanisms. *Metabolism*, 42(12), 1546–1551.
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90149-I](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90149-I)
- Lyssenko, V., Jonsson, A., Almgren, P., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Berglund, G., Altshuler, D., Nilsson, P., & Groop, L. (2008). Clinical Risk Factors, DNA Variants, and the

- Development of Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 359(21), 2220–2232.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0801869>
- Maassen, J. A., 't Hart, Leen. M., van Essen, E., Heine, R. J., Nijpels, G., Jahangir Tafrechi, R. S., Raap, A. K., Janssen, G. M. C., & Lemkes, H. H. P. J. (2004). Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation. *Diabetes*, 53(suppl_1), S103–S109.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S103>
- Macháčková, K., Chrudinová, M., Radosavljević, J., Potalitsyn, P., Křížková, K., Fábry, M., Selicharová, I., Collinsová, M., Brzozowski, A. M., Žáková, L., & Jiráček, J. (2018). Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation. *Biochemistry*, 57(16), 2373–2382. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01260>
- McKern, N. M., Lawrence, M. C., Streltsov, V. A., Lou, M.-Z., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Richards, K. M., Bentley, J. D., Pilling, P. A., Hoyne, P. A., Cartledge, K. A., Pham, T. M., Lewis, J. L., Sankovich, S. E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C. P., Frenkel, M. J., ... Ward, C. W. (2006). Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature*, 443(7108), 218–221. <https://doi.org/10.1038/nature05106>
- Medici, F., Hawa, M., Ianari, A., Pyke, D. A., & Leslie, R. D. (1999). Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia*, 42(2), 146–150.
<https://doi.org/10.1007/s001250051132>
- Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K.-W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., & Lawrence, M. C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 493(7431), 241–245.
<https://doi.org/10.1038/nature11781>
- MG Karlsson & J. Ludvigsson. (2000). The ABBOS-peptide from bovine serum albumin causes an IFN-gamma and IL-4 mRNA response in lymphocytes from children with recent onset of type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 47, 199–207.
[https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(99\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(99)00127-8)
- Monami, M., Marchionni, N., & Mannucci, E. (2009). Long-acting insulin analogues vs. NPH human insulin in type 1 diabetes. A meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(4), 372–378. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00976.x>
- Mosekilde, E., Jensen, K. S., Binder, C., Pramming, S., & Thorsteinsson, B. (1989). Modeling absorption kinetics of subcutaneous injected soluble insulin. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 17(1), 67–87. <https://doi.org/10.1007/BF01059088>
- Nishimura, E., Pridal, L., Glendorf, T., Hansen, B. F., Hubálek, F., Kjeldsen, T., Kristensen, N. R., Lützen, A., Lyby, K., Madsen, P., Pedersen, T. Å., Ribel-Madsen, R., Stidsen, C. E., & Haahr, H. (2021). Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal

- insulin analog designed for once-weekly dosing. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 9(1), e002301. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2021-002301>
- Nobuko, T., Kousuke, K., Ayako, S., Shinpei, N., Daisuke, H., Yamini, A., Noriko, M., Yu-Hsueh, W., Tomoo, S., Yoshihisa, F., & Tetsuo, F. (2002). MHC Class II Antigen Expression was Different from MHC Class I Antigen Expression in Irradiated and Recovering Rat Thymus. *Acta Histochemica Et Cytochemica*, 35(2), 101–105. <https://doi.org/10.1267/ahc.35.101>
- Nolte, L. A., Hansen, P. A., Chen, M. M., Schluter, J. M., Gulve, E. A., & Holloszy, J. O. (1998). Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes*, 47(5), 721–726. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.5.721>
- Noroozi Karimabad, M., Khalili, P., Ayoobi, F., Esmaili-Nadimi, A., La Vecchia, C., & Jamali, Z. (2022). Serum liver enzymes and diabetes from the Rafsanjan cohort study. *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-01042-2>
- Okur, M. E., Karantas, I. D., & Siafaka, P. I. (2017). *Diabetes mellitus: A review on pathophysiology, current status of oral medications and future perspectives*. <https://earsiv.anadolu.edu.tr/xmlui/handle/11421/13312>
- Östenson, C.-G. (2001). The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171(3), 241–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00826.x>
- Panni, S., Lovering, R. C., Porras, P., & Orchard, S. (2020). Non-coding RNA regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(6), 194417. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2017). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections*, 7(1), R38–R46. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0347>
- Pasquel, F. J., Lansang, M. C., Khowaja, A., Urrutia, M. A., Cardona, S., Albury, B., Galindo, R. J., Fayfman, M., Davis, G., Migdal, A., Vellanki, P., Peng, L., & Umpierrez, G. E. (2020). A Randomized Controlled Trial Comparing Glargine U300 and Glargine U100 for the Inpatient Management of Medicine and Surgery Patients With Type 2 Diabetes: Glargine U300 Hospital Trial. *Diabetes Care*, 43(6), 1242–1248. <https://doi.org/10.2337/dc19-1940>
- Philips, J.-C., & Scheen, A. (2006). Insulin Detemir in the Treatment of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 277–283. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s23277>
- Phillips, P. C. (2008). Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics*, 9(11), 855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>
- Popper, H., & Schaffner, F. (1957). Liver : structure and function. *Liver : Structure and Function*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19582202378>

- Rasmussen, H., Zawalich, K. C., Ganesan, S., Calle, R., & Zawalich, W. S. (1990). Physiology and Pathophysiology of Insulin Secretion. *Diabetes Care*, *13*(6), 655–666.
<https://doi.org/10.2337/diacare.13.6.655>
- Redondo, M. J., Gignoux, C. R., Dabelea, D., Hagopian, W. A., Onengut-Gumuscu, S., Oram, R. A., & Rich, S. S. (2022). Type 1 diabetes in diverse ancestries and the use of genetic risk scores. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *10*(8), 597–608. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00159-0)
- Rosenfeld, L. (2002). Insulin: Discovery and Controversy. *Clinical Chemistry*, *48*(12), 2270–2288.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/48.12.2270>
- Rosenstock, J., Park, G., Zimmerman, J., & U.S. Insulin Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group. (2000). Basal insulin glargine (HOE 901) versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes on multiple daily insulin regimens. U.S. Insulin Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group. *Diabetes Care*, *23*(8), 1137–1142.
<https://doi.org/10.2337/diacare.23.8.1137>
- Rosenstock, Julio, Bajaj, H. S., Janež, A., Silver, R., Begtrup, K., Hansen, M. V., Jia, T., & Goldenberg, R. (2020). Once-Weekly Insulin for Type 2 Diabetes without Previous Insulin Treatment. *New England Journal of Medicine*, *383*(22), 2107–2116.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022474>
- Senior, P., & Hramiak, I. (2019). Fast-Acting Insulin Aspart and the Need for New Mealtime Insulin Analogues in Adults With Type 1 and Type 2 Diabetes: A Canadian Perspective. *Canadian Journal of Diabetes*, *43*(7), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2019.01.004>
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *87*(1), 4–14.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Shorr, R. I., Ray, W. A., Daugherty, J. R., & Griffin, M. R. (1997). Incidence and Risk Factors for Serious Hypoglycemia in Older Persons Using Insulin or Sulfonylureas. *Archives of Internal Medicine*, *157*(15), 1681–1686. <https://doi.org/10.1001/archinte.1997.00440360095010>
- Soran, H., & Younis, N. (2006). Insulin detemir: a new basal insulin analogue. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *8*(1), 26–30. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00487.x>
- Steck, A. K., & Rewers, M. J. (2011). Genetics of Type 1 Diabetes. *Clinical Chemistry*, *57*(2), 176–185. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.148221>
- Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Sulem, P., Helgason, H., Grarup, N., Sigurdsson, A., Helgadóttir, H. T., Johannsdóttir, H., Magnusson, O. T., Gudjonsson, S. A., Justesen, J. M., Harder, M. N., Jørgensen, M. E., Christensen, C., Brandslund, I., Sandbæk, A., Lauritzen, T., Vestergaard, H., Linneberg, A., ... Stefansson, K. (2014). Identification of low-frequency and rare sequence variants associated with elevated or reduced risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *46*(3), 294–298. <https://doi.org/10.1038/ng.2882>

- Stephens, J. M., Lee, J., & Pilch, P. F. (1997). Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 971–976. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.971>
- Tillil, H., & Köbberling, J. (1987). Age-Corrected Empirical Genetic Risk Estimates for First-Degree Relatives of IDDM Patients. *Diabetes*, 36(1), 93–99. <https://doi.org/10.2337/diab.36.1.93>
- Tong, Y., Lin, Y., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, Y., Liu, H., & Zhang, B. (2009). Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-15>
- Tromans, R. A., Carter, T. S., Chabanne, L., Crump, M. P., Li, H., Matlock, J. V., Orchard, M. G., & Davis, A. P. (2019). A biomimetic receptor for glucose. *Nature Chemistry*, 11(1), 52–56. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0155-z>
- Uchikawa, E., Choi, E., Shang, G., Yu, H., & Bai, X.-C. (2019). Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex. *ELife*, 8, e48630. <https://doi.org/10.7554/eLife.48630>
- Voight, B. F., Scott, L. J., Steinthorsdottir, V., Morris, A. P., Dina, C., Welch, R. P., Zeggini, E., Huth, C., Aulchenko, Y. S., Thorleifsson, G., McCulloch, L. J., Ferreira, T., Grallert, H., Amin, N., Wu, G., Willer, C. J., Raychaudhuri, S., McCarroll, S. A., Langenberg, C., ... McCarthy, M. I. (2010). Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature Genetics*, 42(7), 579–589. <https://doi.org/10.1038/ng.609>
- W Karges, M Pietropaolo, CA Cackerley, & HM. Dosch. (1996). Gene expression of islet cell antigen p69 in human ,mouse, and rat. *Diabetes*, 45, 513–521. <https://doi.org/10.2337/diab.45.4.513>
- Wang, J., Wang, Z., Yu, J., Kahkoska, A. R., Buse, J. B., & Gu, Z. (2020). Glucose-Responsive Insulin and Delivery Systems: Innovation and Translation. *Advanced Materials*, 32(13), 1902004. <https://doi.org/10.1002/adma.201902004>
- Wang, P., Alvarez-Perez, J.-C., Felsenfeld, D. P., Liu, H., Sivendran, S., Bender, A., Kumar, A., Sanchez, R., Scott, D. K., Garcia-Ocaña, A., & Stewart, A. F. (2015). Induction of human pancreatic beta cell replication by inhibitors of dual specificity tyrosine regulated kinase. *Nature Medicine*, 21(4), 383–388. <https://doi.org/10.1038/nm.3820>
- Wang, P., Karakose, E., Liu, H., Swartz, E., Ackeifi, C., Zlatanovic, V., Wilson, J., González, B. J., Bender, A., Takane, K. K., Ye, L., Harb, G., Pagliuca, F., Homann, D., Egli, D., Argmann, C., Scott, D. K., Garcia-Ocaña, A., & Stewart, A. F. (2019). Combined Inhibition of DYRK1A, SMAD and Trithorax Pathways Synergizes to Induce Robust Replication in Adult Human Beta Cells. *Cell Metabolism*, 29(3), 638-652.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.005>

- Wang, Y., Kuropatwinski, K. K., White, D. W., Hawley, T. S., Hawley, R. G., Tartaglia, L. A., & Baumann, H. (1997). Leptin receptor action in hepatic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16216–16223. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16216>
- Weijnen, C. F., Rich, S. S., Meigs, J. B., Krolewski, A. S., & Warram, J. H. (2002). Risk of diabetes in siblings of index cases with Type 2 diabetes: implications for genetic studies. *Diabetic Medicine*, 19(1), 41–50. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2002.00624.x>
- Weiss, M., Steiner, D. F., & Philipson, L. H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
- Woitiski, C. B., Neufeld, R. J., Veiga, F., Carvalho, R. A., & Figueiredo, I. V. (2010). Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(3), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.009>
- Xiao, Y., Tang, Z., Huang, X., Joseph, J., Chen, W., Liu, C., Zhou, J., Kong, N., Joshi, N., Du, J., & Tao, W. (2021). Glucose-responsive oral insulin delivery platform for one treatment a day in diabetes. *Matter*, 4(10), 3269–3285. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.08.011>
- Yu, J., Wang, J., Zhang, Y., Chen, G., Mao, W., Ye, Y., Kahkoska, A. R., Buse, J. B., Langer, R., & Gu, Z. (2020). Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs. *Nature Biomedical Engineering*, 4(5), 499–506. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0508-y>
- Zaykov, A. N., Mayer, J. P., & DiMarchi, R. D. (2016). Pursuit of a perfect insulin. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(6), 425–439. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.36>