

Arh.farm 2010;60: 207 – 225

Stručni rad/Professional paper

Hormoni kao biotehnološki lekovi: humani insulin i analozi

Snežana Savić¹, Gordana Vuleta¹, Miroslav Savić²

¹Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

²Katedra za farmakologiju
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kratak sadržaj

Biotehnološki lekovi ili biofarmaceutici su proteini ili nukleinske kiseline koje proizvode živi organizmi primenom biotehnoloških postupaka. Tri decenije nakon početnih koraka, oni čine trećinu svih novih lekova koji se svake godine pojave na tržištu u svetu. Era insulina životinjskog porekla je prošla i humani insulin dobijen rekombinantnom DNK tehnologijom i insulinski analozi, kao biotehnološki lekovi prve, odnosno druge generacije, čine osnovu savremene terapije dijabetes melitusa. Svi preparati insulina dele se u tri osnovne grupe: 1) kratko- i brzo-delujuće insuline; 2) srednje-delujuće insuline; 3) dugo-delujuće insuline. Kratko-delujući humani insulin i brzo-delujući analozi insulin lispro, insulin aspart i insulin glulizin prisutni su u obliku rastvora za injekcije. U cilju postizanja srednje dužine dejstva humani insulin se formuliše kao ko-kristalizat sa protaminom (insulin izofan suspenzija) ili se humani insulin i brzo-delujući analozi pripremaju kao mešavine insulin izofan suspenzije i monomernog rastvornog oblika u određenim odnosima (75/25, 70/30, 50/50). Kao dugo-delujući insulini primenjuju se analozi insulin glargin i insulin detemir, dok se produženje dejstva stvaranjem amorfnog ili kristalnog insulina cink suspenzije (lente i ultralente insulini) sve manje koristi, zbog nedovoljno povoljne farmakokinetike. Slično, inhalaciona primena insulina, iako uvedena u kliničku praksu, nije pokazala očekivane prednosti u odnosu na konvencionalnu parenteralnu primenu.

Ključne reči: humani insulin, biotehnološki lekovi, analozi insulina, rekombinantna DNK tehnologija

Uvod

Biotehnološki lekovi ili biofarmaceutici (eng. *biopharmaceuticals*) su proteini ili nukleinske kiseline, koje proizvode živi organizmi primenom određenih, biotehnoloških postupaka. Poslednjih godina na svetskom tržištu pojavio se veliki broj biotehnoloških lekova sa veoma raznovrsnim indikacijama, a očekuje se da se ovakav trend inovacija nastavi nesmanjenom brzinom i u budućnosti; zapravo, poslednjih godina više od jedne trećine novih lekova na tržištu su biotehnološki lekovi (1, 2).

U grupu biofarmaceutika spadaju monoklonska antitela, rekombinantni proteini ili oligonukleotidi koji se koriste kao vakcine, nukleotidne sekvence i vektori koji imaju perspektivu primene u genskoj terapiji, i veoma širok opseg rekombinantnih proteina koji se koriste kao lekovi u tretmanu niza oboljenja (rekombinantni hormoni, rekombinantni enzimi, hematopoetski faktori, faktori koagulacije i trombolitički faktori, interferoni i interleukini...) (1, 2).

Prvi humani rekombinantni protein bio je somatostatin, proizveden primenom bakterije *Escherichia coli*. Prvi pravi biofarmaceutik proizveden primenom **tehnologije rekombinantne DNK (rDNK)** davne 1982. godine bio je **humani insulin**, indikovano u terapiji **dijabetes melitusa**, dok je prva terapijska primena monoklonskog antitela zabeležena 1986. godine (1, 2).

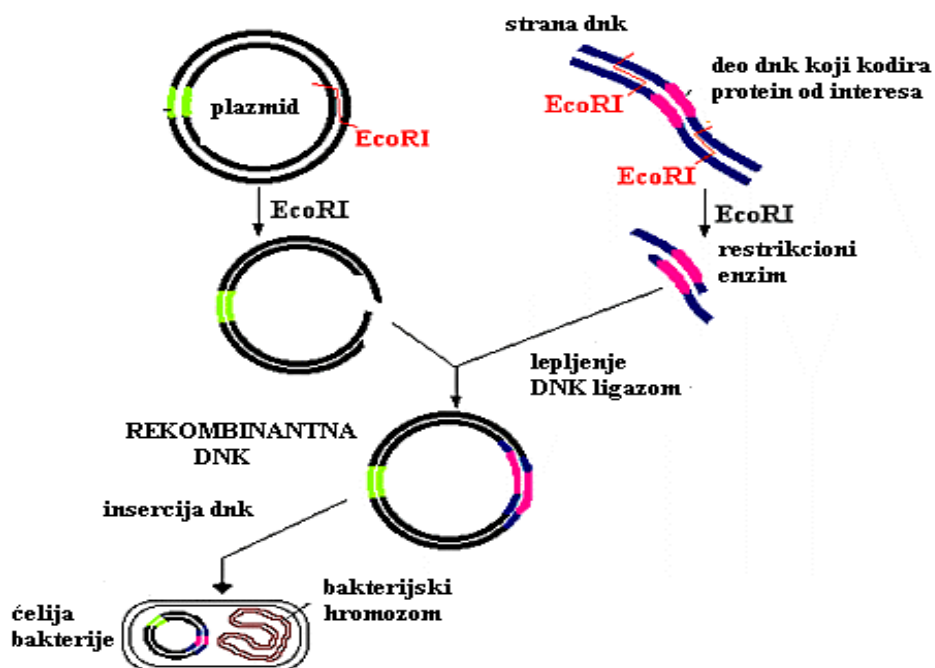
Danas postoje brojni načini za dobijanje biotehnoloških lekova. Na prvom mestu su tehnologija rekombinantne DNK i tehnologija monoklonskih antitela. U ovom radu daje se kratak opis tehnologije rDNK.

Tehnologija rekombinantne DNK

Ph. Eur. 6.0 definiše proizvode rekombinantne DNK tehnologije kao one proizvedene genetskom modifikacijom u kojoj se DNK koja nosi šifru (kod) za sintezu željenog proteina uvodi posredstvom bakterijskog plazmida ili viralnog vektora u pogodni mikroorganizam ili ćelijsku liniju, u kojoj dolazi do ekspresije DNK i translacije u odgovarajući protein. Željeni proizvod se potom ekstrahuje i prečišćava.

Zapravo, rekombinantna DNK tehnologija obuhvata procedure kojima se DNK različitih vrsta mogu isecati, izolovati i spajati u nove „rekombinantne” molekule i potom multiplikovati u većoj količini u populaciji mitotički visoko-aktivnih ćelija (npr. bakterije, plesni). S obzirom na to da se DNK sekvence mogu modifikovati, ova tehnologija omogućava dizajniranje finalnog proteina, koji će se dobiti nakon ekspresije gena, tako da odgovara specifičnim zahtevima za npr. jedan lek (1, 2).

Princip ove tehnologije je da se primenom odgovarajućih enzima, tzv. restrikcionih endonukleaza gen iz humane DNK izoluje i insertuje u male ekstrahromozomalne bakterijske DNK, tj. plazmide. Zatim se pomoću enzima ligaza povezuju delovi različitih DNK (humane i bakterijske). Jednom konstruisan, rekombinantni plazmid se insertuje u odgovarajući ekspresioni sistem (slika 1). Bakterije (*E. coli* ili *Bacillus subtilis*) su najčešće korišćeni ekspresioni sistemi zbog kratkog ciklusa, visokog nivoa ekspresije i lakoće proizvodnje. Problem kod bakterija je što se u njima ne vrše post-translacijske modifikacije (najvažnija je glikozilacija) koje su bitne za stabilnost i funkciju proteina. Iz ovog razloga se primenjuju i eukariotski sistemi, kao što su različite vrste plesni i kulture ćelija sisara i insekata. U novije vreme se kao „fabrike proteina” sve više koriste transgene biljke i životinje (3).



Slika 1. Prikaz rekombinantne DNK tehnologije
Figure 1. Schematic presentation of recombinant DNA technology

Poređenje biotehnoških i konvencionalnih lekova

Osobine biotehnoških lekova, po kojima se oni razlikuju od konvencionalnih, mogu se sumirati kroz njihove prednosti i nedostatke (1-3):

Prednosti biotehnoških lekova

- Mogućnost proizvodnje lekova koji su identični humanim proteinima, čime se izbegava problem alergija. Najbolji primer za to je **primena rekombinantnog humanog insulina u tretmanu dijabetes melitusa**.
- Korišćenjem rekombinantnih tehnika isključuje se potreba za ekstrakcijom proteina iz ljudskog tkiva. Na ovaj način nema rizika od inficiranja virusima ili prionima koji potiču iz ljudskog tkiva.
- Biotehnoške lekove je relativno lako proizvesti (na laboratorijskom nivou) i obično je potrebno kraće vreme za njihov razvoj u poređenju sa konvencionalnim lekovima, jer su u pitanju molekuli koji se nalaze u ljudskom organizmu (endogeni proteini).
- Mnogi biotehnoški lekovi su specifični i izazivaju efekte na samo jednom tipu molekula (receptora). Iako visoka ili apsolutna selektivnost na nivou receptora smanjuje verovatnoću pojave neželjenih efekata, ona može stvoriti ozbiljne probleme *per se* prilikom procene bezbednosti primene novog biofarmaceutika.

Nedostaci biotehnoških lekova

- Iako se relativno lako proizvode na laboratorijskom nivou, biotehnoške lekove je teško proizvesti u velikim količinama i zbog toga su ovi lekovi izuzetno skupi. Za razliku od konvencionalnih lekova, kod kojih nakon isteka patentne zaštite postoji mogućnost proizvodnje generičkog leka, što smanjuje troškove terapije, kod biofarmaceutika i po isteku patentne zaštite ne dolazi do značajnog smanjenja cene, budući da je sama proizvodnja leka skupa.
- Tokom proizvodnog procesa postoji rizik od kontaminacije finalnog biofarmaceutika infektivnim agensima ili drugim komponentama poreklom iz ćelija domaćina, medijuma ili sporednih proizvoda. Šta više, veoma male promene proizvodnog procesa mogu da dovedu do značajnih promena leka; zato su kontrola kvaliteta, validacija procesa i prečišćavanje finalnog proizvoda veoma važni.

- „Idealan” lek primenjuje se oralno, i po mogućstvu jednom dnevno. Biotehnoški lekovi često imaju „nekonvencionalne“ režime doziranja; na primer, **etanercept** se kod reumatoidnog artritisa primenjuje kao supkutana injekcija jednom ili dva puta nedeljno. Slično, **anti-TNF antitelo, infliksimab**, u istoj indikaciji se primenjuje u vidu spore intravenske infuzije; nakon prve doze, druga doza primenjuje se nakon dve nedelje, a treća posle četiri nedelje i terapija nastavlja daljim doziranjem u 8-nedeljnim intervalima.
- I pored visoke selektivnosti, ovi lekovi imaju jasan potencijal da izazivaju neželjene efekte. Na primer, **omalizumab** je visoko specifično monoklonsko antitelo za IgE, namenjeno terapiji teških oblika perzistentne alergijske astme. Zabeležen je veliki broj mogućih neželjenih efekata ovog biofarmaceutika, uključujući mučninu, povraćanje, dijareju, vrtoglavicu, slabost, parestezije, gubitak težine i simptome slične gripu.

Kontinuirani razvoj biotehnologije uslovio je da se na tržištu danas mogu naći dve klase biotehnoških lekova: *biofarmaceutici prve i biofarmaceutici druge generacije*. *Biofarmaceutici prve generacije* su uglavnom kopije endogenih proteina ili antitela, proizvedeni rekombinantnom DNK tehnologijom (npr. humani insulin, humani hormon rasta...), ili tehnologijom monoklonskih antitela (2).

Biofarmaceutici druge generacije su inženjeringom „poboljšani” proteini ili antitela (na nivou fizičko-hemijskih karakteristika i farmakokinetičkih osobina), uz očuvanost farmakodinamskog profila svojstvenog endogenom molekulu (2).

Insulin je slikovit primer biotehnoškog leka koji je na tržištu zastupljen kao rekombinantni humani insulin različitih proizvođača (biofarmaceutik prve generacije identičan endogenom proteinu), ili u obliku tzv. izmenjenih insulina, tj. biofarmaceutika druge generacije, odnosno **insulinskih analoga**.

Insulin: fiziološka uloga

Insulin je hormon koji proizvode beta ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa i ključni je regulator homeostaze glukoze u ljudskom organizmu. Ima važne uloge kako u proizvodnji glukoze (brzini pojavljivanja u sistemskoj cirkulaciji), tako i u kontroli korišćenja unetog šećera, tj. načinu i brzini raspolaganja glukozom. Celokupna količina insulina koga luči pankreas portalnom venom dospeva do jetre, gde utiče na brojne biohemijske puteve, pošto se veže za specifični receptor na površini hepatocita. Kada je u pitanju

metabolizam glukoze, insulin smanjuje oslobađanje glukoze iz glikogena i inhibira sintezu iz glukoneogenih prekursora. Glavni regulator oslobađanja insulina iz pankreasa je koncentracija glukoze u krvi. Na taj način pad nivoa glukoze u plazmi tokom vežbanja rezultuje brзом i preciznom redukcijom nivoa insulina u portalnom krvotoku. To omogućuje oslobađanje dovoljne količine glukoze da bi se izbeglo stanje hipoglikemije i održala njena koncentracija u homeostatski regulisanom opsegu. Približno 50% insulina koji dospeva u jetru biva degradirano pre prelaska u sistemsку cirkulaciju, odnosno druga tkiva u organizmu. Kod zdravih osoba, insulin se luči veoma brzo nakon unosa hrane. Na ovaj način moguće je efikasno smanjenje stvaranja endogene glukoze, tj. kontrola njenog pojavljivanja u sistemskoj cirkulaciji, uz uporedno olakšano preuzimanje i skladištenje glukoze u mišićima i masnom tkivu. Rezultat ovog homeostatskog mehanizma je održavanje koncentracije glukoze u plazmi u opsegu 3,5-7,0 mmol/l i u periodu nakon obroka i tokom perioda gladovanja (4-6).

Insulin: struktura i tipovi insulina

Humani insulin, koji se enzimskim transformacijama stvara iz pre- i proinsulina u beta ćelijama pankreasa, strukturno je protein koji se sastoji od dva polipeptidna lanca (A i B lanci), međusobno povezana sa dve međulančane disulfidne veze. A-lanac broji 21, a B-lanac 30 aminokiselina (AK). Takođe, unutar A-lanca locirana je i treća disulfidna veza između rezidua A6 i A11. Insulin svinjskog porekla razlikuje se od humanog u samo jednoj AK u B-lancu, dok se goveđi insulin dodatno razlikuje u dve AK u A-lancu (2, 7).

Rani komercijalni insulini dobijani su ekstrakcijom iz goveđeg ili smeše goveđeg i svinjskog pankreasa i potom prečišćavani samo postupkom rekristalizacije. Nadalje su usavršavane tehnike prečišćavanja primenom gel filtracije i jono-izmenjivačke hromatografije, tako da su postali dostupni *visoko prečišćeni* ili *monokomponentni insulini* goveđeg ili svinjskog porekla, koje američka Uprava za hranu i lekove (FDA) označava i kao *prečišćene insuline*, ukoliko sadrže manje od 10 ppm proinsulina (2, 7).

Ph. Eur. 6.0 (8) daje monografije goveđeg i svinjskog insulina: Ph.Eur 6.2 (Insulin, goveđi) i Ph. Eur. 6.2 (Insulin, svinjski). Iako su goveđi i svinjski insulin veoma slični humanom insulinu, ipak su beležene brojne neželjene imunološke reakcije pri njihovom korišćenju u terapiji dijabetes melitusa, zbog prisustva određenih proteinskih nečistoća (npr. proinsulin i insulinski polimeri). Pored toga raspoloživost izvora za njihovo dobijanje je nepouzdana. Iz tih razloga, najveći deo terapije dijabetes melitusa u svetu danas je pokriven primenom humanog insulina i insulinskih analoga (2).

Ph. Eur. 6.2 daje monografije humanog insulina i insulinskih analoga (8):

- **Ph. Eur. 6.2 (Insulin, humani).** Protein koji ima strukturu antidijabetskog hormona koga proizvodi humani pankreas. Proizvodi se bilo enzimskom modifikacijom insulina dobijenog iz pankreasa svinja, uz dalje pogodno prečišćavanje, ili metodom rekombinantne DNK tehnologije (rDNK).
- **Ph. Eur. 6.2 (Insulin, aspart; Insulinum Aspartum).** Dvolančani peptid koji sadrži 51 AK. A-lanac je sastavljen od 21 AK, a B-lanac od 30 AK. Identične je primarne strukture kao humani insulin, izuzev što je aspartat umetnut umesto prolina na poziciji 28 B-lanca. Kao i humani insulin, ovaj insulinski analog sadrži dve među-lančane disulfidne veze i jednu unutar lanca A. Dobija se metodom koja je bazirana na tehnologiji rDNK.
- **Ph. Eur. 6.2 (Insulin lispro; Insulinum Lisprum).** Dvolančani peptid koji sadrži 51 AK. A-lanac se sastoji od 21 AK, a B-lanac od 30 AK. Ima identičnu primarnu strukturu kao humani insulin, a razlika je jedino u sekvenci AK na pozicijama 28 i 29 B-lanca. Humanu insulin ima AK prolina na poziciji B28, a lizin na poziciji B29, dok je kod insulinskog analoga (insulina lispro) izvedena inverzija primenom genetskog inženjeringa tako da je dobijena sekvenca Lys(B28), Pro(B29). Kao i humani insulin, insulin lispro sadrži dve međulančane disulfidne veze i jednu unutar A-lanca. Dobija se primenom metode bazirane na tehnologiji rDNK.

Hemijske osobine i razvoj različitih formulacija insulina

Ukupno naelektrisanje insulinskog molekula je rezultat prisustva četiri rezidue glutamata, četiri rezidue tirozina, dve α -karboksilne grupe, dve α -amino grupe, dve rezidue histidina i po jedne rezidue lizina i arginina. Izoelektrična tačka insulina u denaturisanom stanju je 5.3; iz tog razloga je insulin negativno naelektrisan pri neutralnom pH. Ova osobina insulina (ukupno negativno naelektrisanje) koristi se u razvoju formulacija insulina različite dužine delovanja (2, 7).

Pored naelektrisanja, druga osobina insulina bitna za razvoj formulacija jeste njegova sposobnost da lako asocira u dimere i agregate višeg reda. Pokretačka sila za dimerizaciju su hidrofobne interakcije na karboksi (C) kraju B-lanca. Insulin može da asocira u diskretne heksamerne komplekse u prisustvu različitih dvovalentnih jona. Fiziološki, insulin se skladišti kao Zn-heksamerni kompleks u beta ćelijama pankreasa. Upravo ova sposobnost, da se formiraju

diskretni heksameri u prisustvu jona Zn, veoma je važna u razvoju različitih tipova formulacija insulina (2, 7, 8).

Komercijalni preparati insulina sadrže i fenolne ekscipijense (npr. fenol, m-krezol ili metilparahidroksibenzoat) kao konzervanse. Dodatno, ova jedinjenja imaju sposobnost da se vežu za specifična mesta na insulin heksameru (šest veznih mesta), što dovodi do konformacionih promena koje povećavaju hemijsku stabilnost insulina u komercijalnim preparatima (2, 7, 8).

Pored jona Zn i fenolnih konzervanasa savremene formulacije insulina sadrže sredstva za izotonizaciju (glicerol ili NaCl) i/ili fiziološki pufer (fosfatni pufer) da bi se umanjilo variranje pH vrednosti u preparatima koji su osetljivi na promene pH (2).

Kod zdravih osoba insulin se luči u dva slučaja: 1) kao odgovor na unetu hranu, 2) i u cilju održanja bazalnog nivoa insulina između obroka i u toku noći. Odgovor pankreasa na unos hrane rezultuje pikom insulina koji se kreće u opsegu 60-80 μ jedinica/ml, dok je bazalni nivo u serumu 5-15 μ jedinica/ml. Zbog veoma različitih zahteva u pogledu potreba pacijenata sa dijabetes melitusom ulažu se znatni naponi da se razviju formulacije koje mogu da zadovolje farmakokinetičke i farmakodinamske zahteve svakog stanja. Iz tog razloga se pristupa razvoju novih tipova insulinskih analoga i njihovih formulacija (9-12).

Preparati humanog insulina i insulinskih analoga

Svi insulinski preparati dele se u tri grupe:

1. Kratko-delujuće
2. Srednje-delujuće
3. Dugo-delujuće

Pregled različitih preparata insulina oficinalnih u Ph. Eur. 6.0 (8) dat je u Tabeli I.

Tabela I Preparati insulina oficinalni u Ph. Eur. 6.0 (8)

Table I Ph. Eur. insulin preparations (8)

Tip	Naziv preparata / sinonim	Opis	pH
Rastvorni insulini (regularni ili nemodifikovani)	Injekcije rastvornog insulina (Ph. Eur. 6.2) / Neutralni insulin	Rastvor goveđeg, svinjskog ili humanog insulina	6,9-7,8
Dvofazni insulini	Injekcije dvofaznog insulina (Ph. Eur. 6.2) / Dvofazni insulin	Kristalna suspenzija koja sadrži goveđi insulin u rastvoru svinjskog insulina	6,6-7,2
	Injekcije dvofaznog izofan insulina (Ph. Eur. 6.2) / Dvofazni izofan insulin	Puferovana suspenzija svinjskog ili humanog insulina kompleksiranog sa protamin sulfatom ili drugim pogodnim protaminom, u rastvoru svinjskog ili humanog insulina	6,9-7,2
Suspenzije insulina	Injekcije izofan insulina (Ph. Eur. 6.2) / Izofan insulin (NPH)	Suspenzija goveđeg, svinjskog ili humanog insulina kompleksiranog sa protamin sulfatom ili drugim pogodnim protaminom. Sadrži 300-600 µg protamin sulfata /100 i.j. insulina	6,9-7,8
	Suspenzija insulin Zn za injekciju (amorfna) (Ph. Eur. 6.2) / Insulin Semilente	Suspenzija goveđeg, svinjskog ili humanog insulina kompleksiranih sa pogodnim solima Zn; ovaj oblik insulina je praktično nerastvoran u vodi	6,9-7,8
	Suspenzija insulin Zn za injekciju (Ph. Eur. 6.2) / Insulin Lente	Suspenzija goveđeg ili svinjskog ili smeše goveđeg i svinjskog ili humanog insulina sa pogodnim solima Zn; insulin je u obliku praktično nerastvornom u vodi. Može da se proizvede mešanjem Insulin Zn suspenzije (amorfne) i Insulin Zn suspenzije (kristalne) u odnosu 3 : 7	6,9-7,8
	Suspenzija insulin Zn za injekciju (kristalna) (Ph. Eur. 6.2) / Insulin Ultralente	Suspenzija goveđeg, svinjskog ili humanog insulina kompleksiranog sa pogodnim solima Zn; insulin je u obliku praktično nerastvornom u vodi	6,9-7,8

Regularni (kratko-delujući) i brzo-delujući rastvorni preparati insulina

Prve formulacije rastvornog insulina imale su kiseli pH i zbog toga su bile hemijski nestabilne. Vremenom, razvijene su neutralne Zn-stabilizovane formulacije rastvora insulina. Stabilizacija se postiže sa približno 0.4% jona cinka (Zn) i dodatkom fenolnih konzervansa. Zn dovodi do stvaranja diskretnih heksamernih struktura (dva atoma Zn/heksameru). Heksameri insulina mogu da vežu šest molekula fenolnog konzervansa, npr. m-krezola. Vezivanje ovog ekscipijensa povećava stabilnost heksamernog oblika insulina, zauzimanjem konformacije α -heliksa na nivou B-lanca, tako da su aminokiseline B1 i B8 zaštićene od deamidacije, a smanjuje se i tendencija stvaranja polimera velike molekulske mase (2, 13).

Neutralne, regularne formulacije pokazuju pik aktivnosti insulina nakon 2-3 h po primeni, sa maksimalnim trajanjem dejstva 6-8 h (Tabela II). Moguća su određena odstupanja, zavisno od doze, mesta injektovanja insulina, temperature i fizičke aktivnosti pacijenta. Uprkos tome što je insulin u ovim formulacijama u rastvorenom stanju, početak delovanja hormona je u izvesnoj meri odložen. Ovo se dešava zbog postepene disocijacije heksamera u dimer i/ili monomerni oblik insulina pre nego što dođe do resorpcije iz intersticijuma. Disocijacija heksamera se odigrava pošto konzervansi i insulin difunduju sa mesta injektovanja, tako da efektivna koncentracija proteina opada i dolazi do pomeranja ravnoteže u pravcu dimera i monomera, za šta je potrebno određeno vreme (2, 13).

Da bi se postigao što prirodniji odgovor na povećani nivo glukoze nakon obroka (postprandijalno) razvijeni su **monomerni insulinski analozi**. Razvoj monomernih analoga insulina za tretman insulin-zavisnog dijabetes melitusa bio je fokusiran na promenu svojstva insulina da se samo-asocira. Na ovaj način značajno je skraćeno vreme koje protekne od injektovanja do početka delovanja insulina (Tabela 2). Jedan takav monomerni analog insulina, **insulin lispro** (Lys^{B28}Pro^{B29}-humani insulin), ispoljava značajno bržu aktivnost, sa pikom približno 1 h nakon primene (Tabela I). Inverzija sekvence na pozicijama 28 i 29 B-lanca proizvela je insulinski analog sa smanjenim potencijalom za samo-asociranje u poređenju sa humanim (regularnim) insulinom. Međutim, nasuprot nekim drugim monomernim analogima, **insulin lispro** može biti stabilizovan u obliku konzervans-zavisnog heksamernog kompleksa koji obezbeđuje neophodnu hemijsku i fizičku stabilnost preparata insulina. Iako se **insulin lispro** asocira u heksamer, ipak se ostvaruje veoma brzo delovanje, pošto heksamer lako disocira u monomere posle difuzije fenolnog konzervansa u supkutano tkivo na mestu injektovanja (2, 9-12).

Još jedan brzo-delujući insulinski analog prisutan na tržištu je Asp^{B28}-humani insulin (**insulin aspart**), kod koga je na poziciji 28 u B-lancu AK prolin

zamenjena aspartatom. I kod ovog oblika brzina nastupa dejstva je povećana zahvaljujući smanjenom potencijalu za samo-asociranje u odnosu na humani (regularni) insulin (Tabela II) (2).

Konačno, poslednji u nizu brzo-delujućih insulina je **insulin glulizin**. Kod ovog analoga, AK asparagin na poziciji 3 B-lanca zamenjena je lizinom, a lizin na B-29 zamenjen je glutaminom. I u ovom slučaju, rezultat je smanjeni potencijal formiranja heksamera i povećanje brzine nastupanja dejstva.

Tabela II Farmakokinetika preparata insulina (7)

Table II Pharmacokinetics of insulin preparations (7)

PREPARAT	Vreme delovanja		
	Početak delovanja (h)	Pik (h)	Efektivno trajanje delovanja (h)
Kratko-delujući, supkutani			
Lispro	<0,25	0,5-1,5	3-4
Aspart	<0,25	0,5-1,5	3-4
Glulizin	<0,25	0,5-1,5	3-4
Regularni	0,5-1,0	2-3	4-6
Kratko-delujući, inhalacioni			
Inhalacioni regularni insulin	<0,25	0,5-1,5	4-6
Dugo-delujući			
NPH	1-4	6-10	10-16
Detemir	1-4	— ^a	12-20
Glargin	1-4	— ^a	24
Kombinacije insulina			
75/25 – 75% protamin lispro, 25% lispro	<0,25	1,5 h ^b	do 10-16
70/30 – 70% protamin aspart, 30% aspart	<0,25	1,5 h ^b	do 10-16
50/50 – 50% protamin lispro, 50% lispro	0,5-1	dvojni	10-16
70/30 – 70% NPH, 30% regularni insulin	0,5-1	dvojni	10-16
50/50 – 50% NPH, 50% regularni insulin			

^aGlargin ima minimalni pik; detemir ima pik 6-14 h nakon primene

^bDvojni: dva pika; jedan 2-3 h nakon primene; drugi nekoliko sati kasnije

Srednje-delujući preparati insulina

Postoje dva načina produžavanja dejstva insulina i dobijanja srednje-delujućih preparata. U prvom slučaju, insulin se kompleksira sa proteinom protaminom (standardni primer izofan ili NPH insulin), a u drugom se stvaraju različite insulin cink suspenzije (standardni primer insulin lente). Oba tipa formulacija omogućuju postizanje produženog vremena delovanja insulina, kao rezultat postepenog rastvaranja insulina iz kristalne ili taložne forme. Ovaj proces ograničava biološku raspoloživost srednje- i dugo-delujućih insulina. Dodatno produženje vremena delovanja insulina iz ovih preparata je posledica disocijacije heksamera u dimere i monomere.

NPH (od Neutralni Protamin Hagedorn, označen po H.C. Hagedornu koji ga je pronašao) je neutralna kristalna suspenzija koja se priprema ko-kristalizacijom insulina i protamina. Protamin je protein ribljeg porekla, koji sadrži približno 30 AK, od čega 65-70% čini arginin. Formulacije kristalnog NPH insulina imaju veoma niske nivoe rastvorenog insulina ili protamina. Stanje pri kome nema merljivog protamina ili insulina u rastvoru posle kristalizacije označava se kao *izofanska tačka* (2, 14).

NPH insulin (suspenzija humanog insulina) se karakteriše početkom delovanja 1-2 h nakon primene, pik aktivnosti se dostiže nakon 6-12 h, a efektivno trajanje delovanja se kreće u rasponu 18-24 h (Tabela II). I ovde su moguće varijacije, uslovljene faktorima kao što su doza, mesto injektovanja, temperatura i fizička aktivnost pacijenta (2, 14).

NPH insulin se može mešati sa regularnim insulinom neposredno pred primenu (*ex tempore*), a na tržištu postoje i gotove mešavine različitih odnosa NPH i regularnog insulina (npr. u odnosu 30/70 ili 50/50). Ove mešavine rastvorenog, regularnog insulina sa ko-kristalizovanim NPH insulinom (suspenzija) pacijentima obezbeđuju poboljšanu tačnost doziranja i uspešniju kontrolu glikemije. U ovim preparatima deo rastvorenog (regularnog) insulina reverzibilno je adsorbovan na površini kristala NPH insulina, ali se *in vivo* (pod fiziološkim uslovima) desorbuje, tj. prelazi u rastvoren oblik. Zahvaljujući ovom svojstvu mešavine NPH/regularni humani insulini su veoma stabilne i imaju rok upotrebe od dve godine (2).

Brzo-delujući insulinski analog, **insulin lispro**, može da se meša sa NPH humanim insulinom *ex tempore*, ali se ovakve mešavine moraju injektovati odmah, zbog moguće izmene između rastvorene i kristalne forme insulina. Prisustvo humanog insulina u rastvoru može da uspori delovanje insulinskog analoga (2).

Iz tog razloga, formulisane su NPH suspenzije insulinskih analoga (insulin lispro i insulin aspart) sa farmakodinamskim i farmakokinetičkim

osobinama koje koreliraju sa onima kod NPH suspenzija humanog insulina (Tabela 2). Na taj način moguće je *ex tempore* pripremati homogene stabilne dvofazne smeše srednje- i brzo-delujuće komponente insulinskih analoga. Ove mešavine danas su komercijalno dostupne u različitim odnosima u mnogim zemljama.

Pacijenti kod kojih se javljaju imunološke reakcije zbog protamina mogu da se prebace na lente ili ultralente preparate za kontrolu bazalnog nivoa glukoze. Lente insulin je Zn-insulin suspenzija formulisana za primenu jednom dnevno. Predstavlja smešu dva nerastvorna oblika insulina, 70% romboedralnih Zn insulin kristala (ultralente komponenta) i 30% amorfnih čestica insulina (semilente komponenta). Formulacija ima neutralan pH i sadrži acetatni pufer i višak Zn. Višak jona Zn se verovatno vezuje za slobodna mesta na površini heksamernog kompleksa, smanjujući na taj način rastvorljivost insulina, što usporava njegovo delovanje. Volumen kristalne ultralente komponente kreće se između 200 i 1000 μm^3 . Lente insulin karakteriše se početkom delovanja 1-3 h nakon primene, pik aktivnosti dostiže se posle 6-12 h, a trajanje dejstva kreće se u opsegu 18-24 h (2, 10). Ipak, farmakokinetičke karakteristike lente i ultralente formulacija sa humanim insulinom nisu tako povoljne kao sa goveđim/svinjskim insulinom i lente i ultralente insulin se sve više napuštaju (10).

Mešanje lente insulina sa regularnim insulinom dozvoljeno je samo *ex tempore*, neposredno pred primenu. Produženo čuvanje ovih mešavina dovodi do taloženja frakcije regularnog insulina i promene farmakokinetičkog profila preparata (2).

Dugo-delujući preparati insulina

Pankreas zdrave osobe luči približno 1 jedinicu (0,035 mg) insulina u toku 1 h, da bi se održala kontrola bazalne glikemije. Adekvatni bazalni nivoi insulina su ključna komponenta terapije dijabetes melitusa, zbog čega dugodelujući preparati insulina moraju da obezbede veoma različit farmakokinetički profil u odnosu na insulin indikovani postprandijalno (14).

Po tehnološkim karakteristikama izdvajaju se tri tipa dugodelujućih insulina: insulin cink suspenzija (kristalna, ultralente) i insulinski analozi, insulin glargin i insulin detemir. Kod insulina ultralente i insulina glargina produženo vreme delovanja ostvaruje se usled sporog i relativno konstantnog rastvaranja čvrstih čestica u supkutanom tkivu. Ovo sporo rastvaranje prethodi disocijaciji insulina u monomerni oblik koji se konačno resorbuje, što značajno smanjuje brzinu delovanja preparata u odnosu na rastvorne brzo-delujuće insuline. Produženo delovanje insulina detemira je posledica reverzibilnog vezivanja za albumin (2, 14).

Ultralente insulin ne sadrži protamin i kristališe pri pH 5,5 u prisustvu jona Zn, NaCl i acetatnog pufera. Nakon kristalizacije pH finalne formulacije se prilagođava na 7,4, uz dodatak viška jona Zn i metilparahidroksibenzoata (metilparaben). Ultralente romboedralni kristali su veći od štapićastih NPH mikrokristala, što je posledica različitih uslova kristalizacije prilikom pripreme ovih formulacija. Ovaj tip insulina treba uniformno resuspendovati pre primene da bi se postiglo tačno doziranje. Početak delovanja ostvaruje se 4-6 h nakon primene, pik se dostiže u periodu 8-20 h po aplikaciji, a trajanje dejstva se kreće u rasponu 24-48 h. Ultralente insulin može da se meša sa regularnim humanim insulinom i insulinskim analogom tipa insulina lispro, ali isključivo *ex tempore* (neposredno pred primenu) (2, 14). Ipak, kao što je napred objašnjeno, insulin cink suspenzije se generalno sve manje primenjuju (10).

Drugi primer dugo-delujućeg insulina je preparat insulinskog analoga, Gly^{A21}, Arg^{B31}, Arg^{B32}-humani insulin (**insulin glargin**). Ovaj analog razlikuje se od humanog insulina u tome što je aminokiselina asparagin zamenjena glicinom na poziciji A-21, a na kraju B-lanca dodate su dve rezidue arginina. Ova promena B-lanca dovodi do pomeranja izoelektrične tačke insulina sa pH 5,4 na pH 6,7, što je blisko neutralnom pH u supkutanom tkivu humanog organizma. Otuda je dobijeni insulinski analog rastvoran u kiseloj sredini (pH 4,0), a precipitira na mestu primene. Uvođenje AK glicina na A-21 poziciju dobijeni protein čini hemijski stabilnim u kiseloj sredini. Drugim rečima, genetskim inženjeringom izmenjena je molekulska sekvenca humanog insulina, a dobijeni analog ima dobru farmaceutsku stabilnost i usporenu brzinu apsorpcije iz supkutanog tkiva, uz očuvane farmakodinamske karakteristike humanog insulina. Insulin glargin je bistar kisel (pH=4,0) rastvor (nije potrebno resuspendovanje), u koji su inkorporirani Zn i m-krezol. Nakon injiciranja u supkutano tkivo, insulin glargin precipitira usled promene pH sredine. Nastali kristali se usporeno rastvaraju, tako da se dobija relativno konstantna brzina apsorpcije insulina tokom 24 h, bez pojave izraženih pikova. Ovakav profil dopušta doziranje jednom dnevno, u cilju kontrole bazalnog nivoa insulina. Insulin glargin ne sme se razblaživati ili mešati ni sa jednim drugim rastvorom insulina (2).

Konačno, **insulin detemir** predstavlja najnoviji analog insulina dugog dejstva. Izostavljanjem terminalne AK treonina sa pozicije B-30 i vezivanjem miristinske kiseline za AK lizin na poziciji B-29 dobijena je struktura koja se reverzibilno vezuje za albumin u intravaskularnom i intersticijskom prostoru.

Čuvanje preparata insulina

Insulin može biti dostupan u staklenim bočicama od 10 ml, po pravilu u jačini od 100 i.j./ml. Pored toga, insulin je dostupan u obliku pen injektora (sa

karpulama od 1,5 i 3 ml), što je daleko komfornije za pacijenta, zbog tačnijeg i reproduktivnijeg doziranja leka, lakšeg transporta i diskretnog načina primene (2).

Preparate insulina (bočice ili penove sa karpulama) treba čuvati na hladnom mestu (temperatura frižidera 2-8°C), a nakon prve primene mogu se čuvati i na sobnoj temperaturi. Treba izbegavati direktan uticaj sunčeve svetlosti i povišene temperature (tokom letnjih meseci). **Insulin se ne sme zamrzavati ili koristiti u terapiji po isteku roka upotrebe (2).**

Primena

Insulinske suspenzije (NPH smeše, lente, ultralente) treba resuspendovati blagim mešanjem napred-nazad i valjanjem između dlanova, da se dobije homogena mlečna suspenzija. Pacijent mora biti upoznat sa tehnikom resuspendovanja za svaki specifični nerastvorni oblik humanog insulina ili insulinskog analoga (adekvatno uputstvo za pacijenta). Homogenost suspenzije je kritičan faktor za tačno doziranje. Pen injektori se resuspenduju na sličan način, u skladu sa veličinom kontejnera i oblikom injektora (2).

Doziranje

Primena insulina se mora obaviti odmah nakon resuspendovanja, posebno kod lente i ultralente formulacija, budući da se one relativno brzo talože. Treba sprovesti dezinfekciju vrha injektora i mesta primene leka. Pacijent treba da koristi novu iglu i špric pri svakom doziranju (2).

Ex tempore mešanje

Regularni insulin se može mešati u istom špricu sa NPH, lente i ultralente preparatima. Međutim, samo smeše NPH/regularni insulin su stabilne dovoljno dugo da bi se čuvale u toku dužeg perioda. Mešavine lente/regularni i ultralente/regularni insulin moraju da se koriste odmah nakon pripreme. U protivnom, brzo delovanje regularnog insulina biće narušeno (2).

Primer nekih preparata insulina registrovanih na domaćem tržištu

Insulini i analozi, parenteralni, kratkog dejstva (15)

Insulin humani, parenteralno

1. Actrapid HM; Hemofarm AD-Srbija
rastvor za injekcije; 100 i.j./ml, bočica 1x10 ml
2. Actrapid® Flexpen®; Novo Nordisk A/S-Danska
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

3. Actrapid® Novolet®; Novo Nordisk A/S-Danska
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulin lispro, parenteralno

1. Humalog Pen; Eli Lilly Export S.A. – Švajcarska
rastvor za injekcije; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulin aspart, parenteralno

1. Novorapid®; Novo Nordisk A/S-Danska
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, bočica, 1x10 ml

Insulin glulizin, parenteralno

1. Apidra®; Sanofi-Aventis Deutschland Gmbh, Nemačka
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, karpula, 5x3 ml
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, bočica, 1x10 ml

Insulini i analozi, parenteralni, srednje dugog dejstva (15)

Insulin humani, parenteralno

1. Insuman® Basal; Sanofi-Aventis Deutschland Gmbh, Nemačka
suspenzija za injekciju; 100 i.j./ml, uložak, 5x3 ml
2. Insuman® Bazal Opti Set; Sanofi-Aventis Deutschland Gmbh, Nemačka
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulin izofan, parenteralno

1. Humulin Pen NPH; Eli Lilly Export S.A.-Švajcarska
suspenzija za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulini i analozi, parenteralni, srednje dugog dejstva u kombinaciji sa insulinima kratkog dejstva (15)

Insulin humani

1. Mixtard® 30 Penfill; Hemofarm Koncern A.D. Vršac – po licenci Novo Nordiska A/S-Srbija
suspenzija za injekciju; 100 i.j./ml, karpula, 5x3 ml

Insulin kristalni i protamin izofan, humani

1. Mixtard® 50 Novolet; Novo Nordisk A/S-Danska
suspencija za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulin aspart, parenteralno

1. Novomix® 30 Flexpen; Novo Nordisk A/S-Danska
suspencija za injekciju; 100 i.j./ml, karpula sa dozerom u pen aplikatoru, 5x3 ml

Insulini i analozi, parenteralni, dugog dejstva (15)

Insulin cink suspencija (kristalni), parenteralno

1. Ultratard HM; Hemofarm AD-Srbija
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, bočica, 1x10 ml

Insulin glargin, parenteralno

1. Lantus® for Optipen; Sanofi-Aventis Deutschland Gmbh, Nemačka
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, karpula, 5x3 ml

Insulin detemir, parenteralno

1. Levemir® Flexpen®; Novo Nordisk A/S-Danska
rastvor za injekciju; 100 i.j./ml, uložak, 5x3 ml

Literatura

1. Pongracz J, Keen M. *Medical Biotechnology*. 1st ed. Churchill Livingstone Elsevier, London, 2009: 135-147.
2. Crommelin DJA, Sindelar RD. *Pharmaceutical Biotechnology*. 3rd ed. Routledge Taylor&Francis Group, London, New York, 2007.
3. Rang HP. *Drug discovery and development*. Churchill Livingstone Elsevier, London, 2006, 177-194.
4. Dodson GG, Whittingham JL. Insulin: Sequence, structure and function-a story of surprises. U: Federwisch M, Leyck Dieken M, De Meyts P. (eds.), *Insulin&Related Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002, 29-30.
5. Jones RH, Shojaee-Moradie F. Relationships between the structure of insulin and its physiological effects. In: Federwisch M, Leyck Dieken M, De Meyts P. (eds.), *Insulin&Related Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002, 121-130.
6. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Fauci AS et al. (eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. McGraw Hill Medical, New York, 2008, 2275-2304.
7. Sweetman SC (ed.) *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th ed. Pharmaceutical Press, London, 2009, 443-453.
8. *European Pharmacopoeia 6th Edition*, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
9. Gough SCL. A review of human and analogue insulin trials. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007; 77: 1-15.
10. Bell DSH. Insulin therapy in diabetes mellitus. How can the currently available injectable insulins be most prudently and efficaciously utilised? *Drugs* 2007; 67 (13): 1813-1827.
11. Roach P. New insulin analogues and routes of delivery. Pharmacodynamic and clinical considerations. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47 (9): 595-610.
12. Sheldon B, Russell-Jones D, Wright J. Insulin analogues: an example of applied medical science. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009; 11: 5-19.
13. Mannucci E, Monami M, Marchionni N. Short-acting insulin analogues vs. regular human insulin in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009; 11: 53-59.
14. Monami M, Mannucci E, Marchionni N. Long-acting insulin analogues vs. NPH human insulin in type 1 diabetes. A meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009; 11: 372-378.
15. Nacionalni registar lekova 2009. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd, 2009.

Hormones as biotech-drugs: human insulin and insulin analogues

Snežana Savić¹, Gordana Vuleta¹, Miroslav Savić²

¹Department of pharmaceutical technology and cosmetology

²Department of pharmacology

Faculty of pharmacy University of Belgrade

Summary

Biotech-drugs or biopharmaceuticals are proteins or nucleic acids, which have been produced by living organisms as a result of biotechnology. Three decades after the beginning steps, they make a third part of all new drugs appearing each year at the world market. The era of animal source insulins has passed away and human recombinant DNA insulin and insulin analogues, as biopharmaceutics of the first and second generations, respectively, are the cornerstone of the diabetes mellitus current therapy. All insulin preparations are divided into three groups: 1) short- and rapid-acting insulins; 2) intermediate-acting insulins and 3) long-acting insulins. Short-acting human insulins and rapid-acting analogous insulin lispro, aspart and glulisine are available in form of solution for injections. In order to achieve the intermediate duration of action, human insulin is co-crystallized with protamine (insulin isophane suspensions) or human insulins and rapid-acting analogues are prepared as mixtures of isophane insulin suspension and monomer soluble form in fixed-ratios (75/25, 70/30, 50/50). The currently available long-acting insulins are analogues insulin glargine and insulin detemir, whereas use of amorphous and crystalline insulin zinc suspensions (lente and ultralente insulins) for prolonged action is now very rare, because of insufficiently favorable pharmacokinetics. Similarly, inhalation administration of insulin, although introduced into clinical practice, did not show the expected benefits in comparison to the conventional parenteral use.

Key words: human insulin. biopharmaceutics. insulin analogues, recombinant DNA technology
