



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
FARMACIA**

Strategie terapeutiche innovative nel diabete mellito di tipo 1
per superare i limiti della terapia insulinica convenzionale

Relatore: *Prof. Pasquale Linciano*

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Luana Cordì

Matricola 502467

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

Capitolo 1 Introduzione	1
1.1 Definizione ed epidemiologia del diabete mellito	1
1.2 Classificazione del diabete mellito	1
1.2.1 Diabete mellito di tipo 1	2
1.2.2 Diabete mellito di tipo 2	2
1.2.3 Diabete mellito gestazionale	3
1.2.4 Diabete mellito monogenico	4
1.2.5 Diabete secondario ad altre condizioni	5
1.3 Sintomatologia del diabete mellito	5
1.4 Diagnosi del diabete mellito	6
1.5 Complicanze del diabete mellito	8
1.5.1 Chetoacidosi diabetica	8
1.5.2 Ipoglicemia	10
1.5.3 Complicanze microvascolari	12
1.5.4 Complicanze macrovascolari	13
1.6 Epidemiologia e fisiopatologia del diabete mellito di tipo 1	14
Capitolo 2 Terapie attuali del diabete mellito di tipo 1	24
2.1 L'insulina	24
2.2 Insulina regolare	28
2.3 Insuline prandiali	30
2.3.1 Insulina lispro	31
2.3.2 Insulina aspart	32
2.3.3 Insulina glulisina	32
2.3.4 Insuline ultrarapide	34
2.3.4.1 Insulina aspart ad azione ultrarapida	35
2.3.4.2 Insulina lispro ultrarapida	36
2.4 Insuline intermedie	37

2.4.1	Insulina NPH	37
2.4.2	Insulina NPL	38
2.5	Insuline basali	38
2.5.1	Insulina glargine U100	39
2.5.2	Insulina detemir	40
2.5.3	Insuline basali di seconda generazione	40
2.5.3.1	Insulina degludec	40
2.5.3.2	Insulina glargine U300	41
2.6	Limiti della terapia insulinica convenzionale	43
Capitolo 3 Scopo della tesi		47
Capitolo 4 Insuline innovative		49
4.1	Insuline basali settimanali	49
4.1.1	Insulina icodec	49
4.1.2	Insulina efsitora alfa	58
4.2	Insulina glucosio-sensibile NNC2215	64
Capitolo 5 Nuove formulazioni di insulina e nuove vie di somministrazione		70
5.1	BioChaperone lispro	70
5.2	BioChaperone glargine lispro	73
5.3	Vie di somministrazione alternative	75
5.3.1	Insulina per via orale	76
5.3.2	Insulina per via inalatoria	96
Capitolo 6 Le terapie adiuvanti		105
6.1	Introduzione	105
6.2	Metformina	105
6.3	Agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone	108
6.4	Inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT)	109
6.5	Amilina e pramlintide	111

Capitolo 7 Terapie innovative alternative all'insulina	113
7.1 Introduzione	113
7.2 Trapianto di pancreas	113
7.3 Trapianto di isole pancreatiche	115
7.4 Lantidra	117
7.5 Terapie basate sulle cellule staminali	120
7.6 Immunoterapia	123
Capitolo 8 Conclusione e approccio critico	136
Bibliografia	140

Capitolo 1 Introduzione

1.1 Definizione ed epidemiologia del diabete mellito

Il diabete mellito (DM) è una patologia metabolica cronica caratterizzata da iperglicemia, ovvero livelli elevati di glucosio nel sangue, dovuta a un deficit della quantità o dell'efficacia biologica dell'insulina. Esso rappresenta una delle principali patologie croniche a livello mondiale, con rilevanti implicazioni cliniche, sociali ed economiche. Inoltre, le complicanze a lungo termine associate alla malattia la rendono una delle principali cause di morbidità e mortalità a livello mondiale. Secondo le stime epidemiologiche, infatti, il diabete mellito causa ogni anno circa 4 milioni di decessi a livello globale. Attualmente in tutto il mondo circa 537 milioni di persone sono affette da tale patologia. Un dato ancora più allarmante è rappresentato dalle stime dell'*International Diabetes Federation (IDF)*, secondo cui questo numero raggiungerà i 643 milioni entro il 2030 e 783 milioni entro il 2045. [1], [2]

1.2 Classificazione del diabete mellito

Il diabete mellito comprende diverse forme cliniche, accomunate tutte dall'alterazione dei livelli glicemici ma caratterizzate da peculiarità in termini di eziologia, meccanismi patogenetici, età di insorgenza, progressione clinica e risposta terapeutica. La corretta identificazione della specifica tipologia di diabete riveste un ruolo fondamentale nella pratica clinica poiché consente di impostare un approccio terapeutico mirato e personalizzato. Tale eterogeneità ha portato alla classificazione del diabete in diverse tipologie da parte dell'*American Diabetes Association (ADA)* e della *World Health Organization (OMS)*. [3]

1.2.1 Diabete mellito di tipo 1

Il diabete mellito di tipo 1 (DM1) è noto anche come diabete giovanile o insulino-dipendente, rappresenta circa il 5-10% di tutti i casi di diabete a livello mondiale. Questa tipologia di diabete presenta un esordio precoce, manifestandosi prevalentemente durante l'infanzia o l'adolescenza, ed è caratterizzata da un'origine autoimmune. In particolare, il sistema immunitario attacca e distrugge le cellule β delle isole di Langerhans del pancreas, responsabili della produzione di insulina, determinando così una carenza assoluta di tale ormone e una conseguente condizione di iperglicemia cronica. La gestione del DM1 richiede una terapia insulinica sostitutiva per tutta la vita, basata sulla somministrazione di insulina esogena basale e prandiale tramite numerose iniezioni sottocutanee quotidiane. Tale trattamento ha l'obiettivo di riprodurre il più fedelmente possibile la secrezione fisiologica di insulina e garantire un adeguato controllo glicemico. [3]

1.2.2 Diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito di tipo 2 (DM2) è noto anche come diabete a esordio tardivo o non insulino-dipendente, rappresenta il 90-95% dei casi diagnosticati ed è la tipologia di diabete più comune. L'esordio avviene generalmente in età adulta. In questo caso la patologia è caratterizzata da insulino-resistenza, ovvero una ridotta risposta biologica all'insulina da parte delle cellule che, di conseguenza, non sono in grado di utilizzare il glucosio. Il pancreas inizialmente reagisce con l'attivazione di un meccanismo compensatorio aumentando la secrezione insulinica. Ciò col passare del tempo porta a un progressivo esaurimento funzionale delle cellule β e conseguente carenza di insulina. I fattori eziologici predominanti del DM2 sono, quindi, insulino-resistenza, fattori ambientali e stile di vita (obesità, sedentarietà), associati a predisposizione genetica.

Nella fase iniziale della patologia si ricorre a una terapia non farmacologica, ovvero il controllo del peso tramite la dieta e l'esercizio fisico attivo. Se tali misure non risultano efficaci si ricorre alla terapia farmacologica con farmaci ipoglicemizzanti orali che comprendono insulino-sensibilizzanti (tiazolidindioni e biguanidi), secretagoghi dell'insulina (sulfoniluree e glinidi), inibitori dell' α -glucosidasi che riducono l'assorbimento intestinale dei carboidrati, agonisti del recettore dell'amilina, inibitori della dipeptidil peptidasi-4 (o gliptine), agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1) e inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT-2) che favoriscono l'eliminazione del glucosio attraverso le urine. Negli stadi avanzati della malattia o in caso di mancato raggiungimento degli obiettivi glicemici tramite l'impiego dei farmaci sopra citati, si ricorre all'aggiunta o al passaggio alla terapia insulinica. [3], [4]

1.2.3 Diabete mellito gestazionale

Il diabete mellito gestazionale (GDM) viene definito come un'alterazione del metabolismo glucidico diagnosticata per la prima volta durante la gravidanza. Tuttavia, tale condizione non sempre corrisponde a un diabete insorto effettivamente durante la gestazione: in una quota rilevante dei casi si tratta di un diabete preesistente, più frequentemente di tipo 2, non diagnosticato in precedenza e reso manifesto dall'aumentata domanda metabolica della gravidanza. Il diabete mellito gestazionale è correlato all'incremento di insulino-resistenza che si verifica fisiologicamente durante la gravidanza per effetto degli ormoni placentari ma non compensato dall'aumento della secrezione insulinica. Esso è associato a un aumentato rischio di complicanze per la madre e per il feto, tra cui preeclampsia, parto pretermine, macrosomia fetale, ipoglicemia, emergenza respiratoria neonatale e mortalità perinatale. La gestione del

GDM si basa principalmente sulla modifica dello stile di vita mediante una dieta corretta personalizzata, monitoraggio della glicemia, attività fisica e controllo del peso. Qualora tali interventi non risultino sufficienti a mantenere i valori di glicemia entro i target raccomandati è necessario il ricorso alla terapia farmacologica. L'insulina rappresenta il trattamento di prima scelta, grazie alla sua efficacia e sicurezza durante la gravidanza. In alcuni casi possono essere impiegati anche farmaci ipoglicemizzanti orali come sulfoniluree o biguanidi le quali però attraversano la placenta, motivo per cui il loro impiego nel GDM è ancora controverso. Dopo il parto, nella maggior parte dei casi, si osserva una normalizzazione della glicemia; tuttavia, le donne con pregresso GDM mantengono un rischio aumentato di sviluppare DM2 nel lungo periodo, motivo per cui è raccomandata una rivalutazione metabolica a 6-12 settimane dal parto e un monitoraggio periodico nel tempo. [3]

1.2.4 Diabete mellito monogenico

Il diabete mellito monogenico rappresenta una forma rara di diabete mellito causata da mutazioni ereditarie a carico di un singolo gene che compromette la normale funzionalità delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas, con conseguente alterazione della secrezione insulinica. Tra le principali forme di diabete monogenico rientra il diabete neonatale o congenito (TNDM) che si manifesta entro i primi 6 mesi di vita, distinguendosi così dal diabete mellito di tipo 1 autoimmune il cui esordio avviene dopo tale periodo. Il diabete neonatale può presentarsi in forma transitoria oppure permanente. La forma transitoria è associata spesso a una sovra espressione dei geni situati nella regione cromosomica 6q24, mentre la forma permanente è spesso correlata a mutazioni nei geni KCNJ11 e ABCC8 che codificano rispettivamente le subunità Kir6.2 e SUR1 del canale del potassio ATP-dipendente delle cellule β . In questi casi

la terapia prevede la somministrazione di farmaci ipoglicemizzanti orali, in particolare sulfoniluree. Al contrario, le mutazioni del gene INS, responsabile della produzione dell'insulina endogena, determinano una forma permanente di diabete neonatale che richiede la terapia sostitutiva insulinica. Un'altra forma di diabete monogenico è il *maturity onset diabetes of the young* (MODY), caratterizzato da un esordio generalmente prima dei 25 anni. Alla base di tale patologia sono state identificate mutazioni in almeno 13 geni localizzati su diversi cromosomi coinvolti nella regolazione della secrezione insulinica. Le varianti più frequenti sono GCK-MODY (MODY2), HNF1A-MODY (MODY3) e HNF4A-MODY (MODY1). MODY2 è generalmente associato a una lieve iperglicemia a digiuno stabile nel tempo e spesso non richiede alcuna terapia farmacologica, invece, MODY1 e MODY3 presentano un progressivo deterioramento della funzione delle cellule β del pancreas per cui si rende necessaria la terapia farmacologica con sulfoniluree. [3]

1.2.5 Diabete secondario ad altre condizioni

Il diabete secondario ad altre condizioni comprende le forme di diabete che insorgono come conseguenza di altre patologie o dell'utilizzo di specifici farmaci. Tra le principali cause rientrano malattie del pancreas esocrino (ad esempio pancreatite, fibrosi cistica e neoplasie), cirrosi epatica, insufficienza renale cronica e trattamenti farmacologici, in particolare con glucocorticoidi. [3]

1.3 Sintomatologia del diabete mellito

Per tutte le tipologie di diabete mellito la sintomatologia clinica iniziale è prevalentemente correlata allo stato di iperglicemia. Quando la concentrazione plasmatica di glucosio supera la soglia renale, la capacità

massima di riassorbimento viene saturata e il glucosio compare nelle urine determinando glicosuria. Proprio questa caratteristica ha portato, fin dal XVI secolo, all'associazione del termine latino *mellitus* ("dolce"), in riferimento alla presenza di urine dolci dovuta all'elevato contenuto glucidico. La glicosuria determina un aumento della pressione osmotica del filtrato tubulare, inducendo una diuresi osmotica responsabile della poliuria, altro sintomo cardine della malattia. La conseguente eccessiva perdita di acqua ed elettroliti comporta una progressiva disidratazione che stimola il centro ipotalamico della sete, causando polidipsia. A questi sintomi si associano frequentemente astenia e calo ponderale, quest'ultimo secondario all'attivazione di lipolisi e proteolisi in condizioni di carenza insulinica, nonché polifagia, determinata dall'assenza del segnale anoressigeno insulinico a livello ipotalamico e dalla percezione dello stato catabolico sistemico. [3], [5]

1.4 Diagnosi del diabete mellito

La diagnosi di diabete mellito si basa principalmente sulla misurazione dell'emoglobina glicata (HbA1c) e della glicemia. In particolare, l'HbA1c riflette la glicemia media ponderata dei 2-3 mesi precedenti, con maggiore contributo delle settimane più prossime in quanto correlata all'emivita degli eritrociti. La glicemia plasmatica viene misurata a digiuno (*fasting plasma glucose FPG*) e a distanza di 2 ore dalla somministrazione orale di 75g di glucosio anidro disciolto in acqua nel test di tolleranza al glucosio orale (*oral glucose tolerance test OGTT*). A questi si aggiunge, in presenza di sintomi tipici, la misurazione della glicemia plasmatica in qualsiasi momento della giornata come ulteriore criterio diagnostico. Secondo i criteri diagnostici attualmente riconosciuti, la diagnosi di diabete può essere formulata in presenza di valori di HbA1c $\geq 6,5\%$ (≥ 48 mmol/mol), glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL ($\geq 7,0$ mmol/L), glicemia a 2 ore ≥ 200

mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L) oppure in presenza di sintomi tipici glicemia plasmatica casuale ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L), come riportato nella *Tabella 1*. [3]

Criterio diagnostico	Valore diagnostico
Emoglobina glicata (HbA1c)	$\geq 6,5\%$ (≥ 48 mmol/mol). Il test deve essere eseguito in un laboratorio che utilizzi un metodo certificato NGSP e standardizzato secondo il Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *
O	
Glicemia plasmatica a digiuno (FPG)	≥ 126 mg/dL ($\geq 7,0$ mmol/L). Il digiuno è definito come assenza di apporto calorico per almeno 8 ore. *
O	
Glicemia plasmatica a 2 ore durante OGTT	≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L), misurata durante un test da carico orale di glucosio (OGTT) eseguito secondo le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), con somministrazione di 75 g di glucosio anidro disciolto in acqua. *
O	
Glicemia plasmatica casuale	≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L) in presenza di sintomi classici di iperglicemia o di crisi iperglicemica. Per glicemia casuale si intende un valore misurato in qualsiasi momento della giornata, indipendentemente dall'ultimo pasto.

* In assenza di iperglicemia inequivocabile, la diagnosi richiede due risultati anomali da test diversi, che possono essere ottenuti contemporaneamente (ad esempio, HbA1c e glicemia a digiuno), oppure lo stesso test in due momenti diversi.

Tabella 1. Illustrazione schematica dei criteri per la diagnosi di diabete mellito in soggetti non gravidi secondo l'ADA (adattata da [3])

L'ADA raccomanda nei pazienti adulti non in gravidanza il raggiungimento di un controllo glicemico ottimale definito da valori di HbA1c $< 7,0\%$, glicemia preprandiale compresa tra 80 e 130 mg/dL e picchi glicemici postprandiali < 180 mg/dL. Tali obiettivi rappresentano indicazioni generali che l'ADA raccomanda di personalizzare sulla base delle caratteristiche cliniche individuali, considerando fattori quali l'età, l'aspettativa di vita, la presenza di comorbidità e il rischio ipoglicemico. Inoltre, gli obiettivi glicemici necessitano di rivalutazioni periodiche nel corso della progressione della malattia. In alcuni pazienti, infatti, possono essere perseguiti target glicemici più stringenti, purché siano raggiungibili in sicurezza, con un carico gestionale accettabile e con un'aspettativa di vita tale da consentire il beneficio. Al contrario, obiettivi meno rigorosi

risultano maggiormente appropriati nei casi in cui i rischi superino i potenziali benefici o quando l'aspettativa di vita e le condizioni cliniche potrebbero non consentire il raggiungimento di tali benefici. In generale, il raggiungimento degli obiettivi glicemici e il mantenimento di un adeguato controllo glicemico rivestono un ruolo fondamentale nella gestione del diabete mellito poiché l'iperglicemia cronica rappresenta uno dei fattori predisponenti accertati per lo sviluppo di complicanze a breve e lungo termine. [3]

1.5 Complicanze del diabete mellito

Il diabete mellito, se non adeguatamente gestito, può causare gravi complicanze sia acute che croniche. Tra le manifestazioni acute rientrano la chetoacidosi diabetica, lo stato iperglicemico iperosmolare non chetotico e l'ipoglicemia, quest'ultima configurandosi prevalentemente come complicanza iatrogena della terapia insulinica piuttosto che della malattia in sé. Nel lungo periodo possono svilupparsi complicanze microvascolari, quali retinopatia, nefropatia o malattia renale cronica diabetica e neuropatia clinica, e macrovascolari, quali aterosclerosi, ictus, infarto miocardico e malattia arteriosa periferica. Tali condizioni contribuiscono a una riduzione dell'aspettativa e della qualità di vita dei pazienti, oltre a comportare un significativo impatto economico sui sistemi sanitari. [2], [3]

1.5.1 Chetoacidosi diabetica

Nell'ultimo decennio, in Europa e negli Stati Uniti, si è osservato un incremento dell'incidenza della chetoacidosi diabetica (CAD) negli adulti. Si tratta di una grave emergenza metabolica acuta caratterizzata da iperglicemia, acidosi metabolica e chetonemia elevata, conseguente a una

carenza assoluta o relativa di insulina per periodi prolungati, e responsabile di un'elevata incidenza di morbidità e mortalità. In condizioni fisiologiche, l'insulina promuove l'assorbimento e l'utilizzo del glucosio a livello cellulare, inibendo la lipolisi e la produzione di chetoni, sopprimendo la glicogenolisi (degradazione del glicogeno in glucosio) e favorendo la glicogenosintesi (accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno). In presenza di deficit insulinico, le cellule non sono in grado di assorbire una quantità sufficiente di glucosio e utilizzarlo adeguatamente, per cui necessitano di un altro substrato energetico. Si ha, quindi, l'attivazione di vie metaboliche alternative, in particolare la lipolisi, ovvero la degradazione dei trigliceridi con formazione di acidi grassi liberi. Questi ultimi, come illustrato nella *Figura 1*, vengono convertiti in acil-CoA e successivamente ossidati tramite β -ossidazione, producendo acetil-CoA. In condizioni normali l'acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs, portando alla produzione di ATP. Tuttavia, in caso di carenza insulinica si ha un'elevata disponibilità di acidi grassi liberi e un sovraccarico del ciclo di Krebs per cui l'acetil-CoA viene convertito nel fegato in corpi chetonici, quali β -idrossibutirrato, acetoacetato e acetone. L'accumulo a livello del circolo sistemico di tali corpi chetonici determina lo sviluppo di acidosi metabolica ad elevato gap anionico. Il gap anionico rappresenta un indice della presenza nel plasma di anioni non rilevati dai comuni esami di elettroliti sierici; nella CAD il suo incremento è dovuto all'accumulo dei chetoanioni derivanti dalla dissociazione dei corpi chetonici. La CAD, pertanto, richiede un trattamento immediato, basato sulla reidratazione tramite liquidi, infusione endovenosa di insulina e correzione degli squilibri elettrolitici fino alla normalizzazione dei parametri metabolici e del gap anionico. [6]

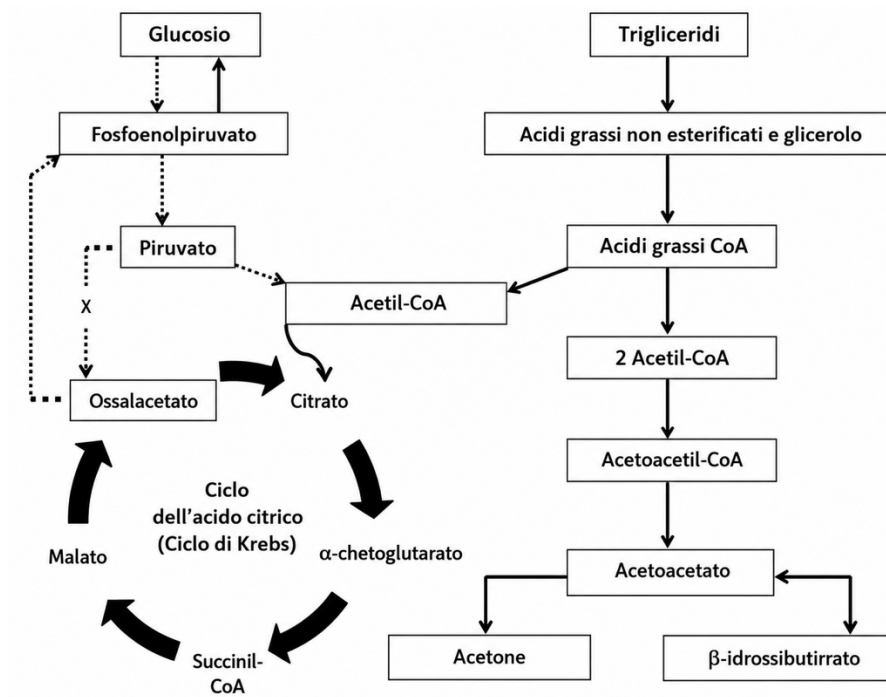


Figura 1. Illustrazione schematica del processo chetogenico alla base della chetoacidosi diabetica (adattata da [6])

1.5.2 Ipoglicemia

Un'altra complicanza acuta frequentemente osservata nei pazienti con diabete mellito è l'ipoglicemia, che rappresenta principalmente una conseguenza della terapia insulinica piuttosto che della patologia stessa. Essa è considerata uno dei principali fattori limitanti nel raggiungimento di un controllo glicemico ottimale. L'ipoglicemia si verifica quando la concentrazione di glucosio nel sangue scende al di sotto di 70 mg/dL. Secondo le linee guida sviluppate nel 2017 dall'*International Hypoglycemia Study Group* si definisce ipoglicemia di livello 1 una glicemia compresa tra 54 e 70 mg/dL (3,0-3,9 mmol/L), mentre valori inferiori a 54 mg/dL (3 mmol/L) identificano un'ipoglicemia clinicamente significativa, definita di livello 2. La carenza di glucosio nei neuroni a livello del sistema nervoso centrale determina la comparsa dei sintomi neuroglicopenici, che tendono a manifestarsi soprattutto per valori

glicemici intorno a 54 mg/dL. Tali sintomi comprendono alterazioni della vista e del comportamento, difficoltà cognitive, fino a convulsioni e perdita di coscienza. Nei casi più severi, in particolare per valori glicemici inferiori di 50 mg/dL, l'ipoglicemia può evolvere in grave disfunzione cerebrale, coma e addirittura morte. Si parla in questo caso di ipoglicemia grave di livello 3, caratterizzata da una grave alterazione cognitiva e/o fisica che richiede l'intervento di un'altra persona per il recupero del paziente (*Tabella 2*). [7]

Criteri/descrizione glicemica	
Livello 1	Glicemia <70 mg/dL (<3,9 mmol/L) e ≥54 mg/dL (≥3,0 mmol/L)
Livello 2	Glicemia <54 mg/dL (<3,0 mmol/L)
Livello 3	Evento grave definito da alterazioni dello stato mentale e/o fisico che richiedono assistenza per il trattamento dell'ipoglicemia, indipendentemente dal valore di glicemia

Tabella 2. Illustrazione schematica della classificazione dei tre livelli di ipoglicemia (adattata da [7])

L'educazione del paziente da parte degli operatori sanitari sulla prevenzione, riconoscimento precoce, consapevolezza e gestione dell'ipoglicemia è fondamentale. Quando il valore di glicemia è pari o inferiore di 70 mg/dL è raccomandata l'assunzione immediata da parte del paziente di carboidrati ad azione rapida, preferibilmente glucosio puro, al fine di riportare rapidamente i livelli glicemici a valori adeguati. Nei casi di ipoglicemia grave, il trattamento di prima scelta è la somministrazione di glucagone. Attualmente sono disponibili diverse formulazioni, caratterizzate da maggiore praticità e lunga conservazione, tra cui glucagone nasale in polvere e preparazioni in penne preriempite pronte all'uso per via iniettiva. Le conseguenze acute dell'ipoglicemia possono interessare numerosi organi e apparati; oltre alla compromissione delle funzioni cognitive, possono verificarsi deficit focali transitori, alterazioni

della memoria ed effetti cardiovascolari come tachicardia, aritmie o, in alcuni casi, bradicardia. Per questo motivo la prevenzione dell'ipoglicemia rappresenta un aspetto cruciale nella gestione del diabete mellito. A tal fine sono stati sviluppati dei programmi di formazione volti a migliorare la consapevolezza e l'educazione sulla prevenzione degli episodi ipoglicemici. Tra questi, il programma britannico *DAFNE* (*Dose Adjustment for Normal Eating*) ha dimostrato di ridurre la frequenza degli eventi ipoglicemici gravi e di migliorare la capacità dei pazienti di riconoscere precocemente i sintomi dell'ipoglicemia, in particolare nei soggetti che avevano mostrato inconsapevolezza dell'ipoglicemia. [7]

1.5.3 Complicanze microvascolari

Le complicanze microvascolari, quali retinopatia, neuropatia e nefropatia, sono la conseguenza diretta dell'esposizione prolungata all'iperglicemia cronica. A differenza dei tessuti insulino-dipendenti, le cellule retiniche, nervose e renali assorbono glucosio in modo proporzionale alla sua concentrazione extracellulare, indipendentemente dall'azione insulinica. Di conseguenza, in condizioni di iperglicemia persistente, l'eccessivo ingresso intracellulare di glucosio determina un aumento dello stress ossidativo, in particolare a livello mitocondriale, e l'attivazione di vie metaboliche dannose, con conseguente disfunzione cellulare e danno progressivo del microcircolo. A livello retinico ciò favorisce lo sviluppo della retinopatia diabetica, principale causa di deficit visivo e cecità; a livello del sistema nervoso periferico determina neuropatia diabetica, responsabile di alterazioni della sensibilità, dolore neuropatico e, nei casi più avanzati, ulcere del piede; a livello renale induce nefropatia diabetica, caratterizzata da progressiva perdita della funzione renale fino all'insufficienza renale cronica. [8] Il mantenimento di un controllo glicemico ottimale riduce significativamente del 50-76% l'incidenza e la

progressione di queste complicanze in pazienti con DM1, come dimostrato dal *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*. [9] Il successivo studio di follow up *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)* ha, inoltre, dimostrato il mantenimento di questi risultati per oltre due decenni, confermando il fenomeno della memoria metabolica, ovvero la persistenza a lungo termine degli effetti benefici sulle complicanze microvascolari dopo un periodo di controllo glicemico quasi fisiologico, nonostante aumenti successivi dei livelli glicemici. [10] Tassi ridotti di complicanze microvascolari sono stati dimostrati anche su pazienti con DM2 nello *UK Prospective Diabetes Study (UKPDS)*. [11] I dati del *DCCT* e *UKPDS* hanno pertanto stabilito che un controllo glicemico ottimale riduce significativamente l'insorgenza e la progressione delle complicanze microvascolari del DM1 e nel DM2 rispettivamente. [9], [10], [11]

1.5.4 Complicanze macrovascolari

Un'altra grave complicanza è rappresentata dalle malattie cardiovascolari quali infarto del miocardio, ictus, malattia cardiovascolare aterosclerotica e insufficienza cardiaca. Oltre al diabete mellito stesso, che conferisce di per sé un rischio cardiovascolare significativamente aumentato, i principali fattori di rischio modificabili sono ipertensione, dislipidemia, obesità, fumo e malattia renale cronica. Nel diabete mellito di tipo 1, l'iperglicemia cronica svolge un ruolo centrale nello sviluppo del danno cardiovascolare attraverso diversi meccanismi fisiopatologici riportati nella *Figura 3*. L'eccesso di glucosio nel sangue favorisce, infatti, la formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) in grado di alterare la funzionalità della parete vascolare, a seguito di un aumento dello stress ossidativo e risposta infiammatoria. Parallelamente, si osservano alterazioni del metabolismo lipidico caratterizzate da

ipertrigliceridemia, accumulo di IDL aterogene e riduzione quantitativa e funzionale delle HDL, dotate al contrario di proprietà antinfiammatorie e vasoprotettive. Infine, la carenza insulinica e la persistente iperglicemia contribuiscono al mantenimento di uno stato infiammatorio sistemico cronico che amplifica il danno vascolare. L'insieme di questi meccanismi favorisce lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi, aumentando significativamente il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1. Di conseguenza la terapia ipoglicemizzante, l'utilizzo di statine, il controllo della pressione sanguigna e gli interventi sullo stile di vita sono fondamentali per la prevenzione o ritardo della progressione delle patologie cardiovascolari in soggetti con diabete mellito. [12], [13]

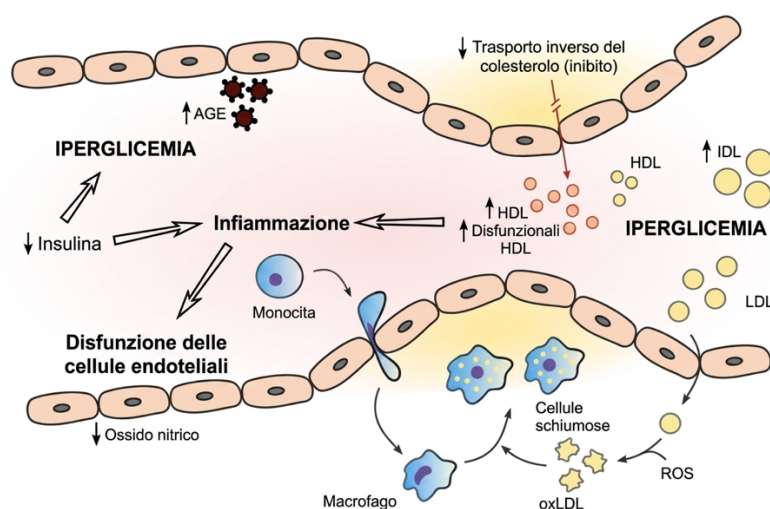


Figura 2. Rappresentazione schematica dei meccanismi alla base del danno cardiovascolare nel diabete mellito di tipo 1 (adattato da [13])

1.6 Epidemiologia e fisiopatologia del diabete mellito di tipo 1

Negli ultimi decenni, sebbene la forma di diabete maggiormente diffusa sia il diabete mellito di tipo 2, è stato osservato un progressivo e preoccupante aumento dell'incidenza del diabete mellito di tipo 1. Ciò sottolinea la grande rilevanza di tale forma di diabete in questi anni. Ad oggi, infatti, le persone che convivono con il diabete mellito di tipo 1 sono

9,5 milioni in tutto il mondo e si stima che entro il 2040 saranno 17 milioni.
[5]

Al fine di comprendere pienamente il razionale alla base delle attuali strategie terapeutiche, è necessario approfondire i principali meccanismi fisiopatologici coinvolti nello sviluppo della malattia. Il diabete mellito di tipo 1 è una condizione patologica cronica complessa caratterizzata dalla distruzione immunomediata delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas, con conseguente riduzione o completa assenza della secrezione insulinica e lo sviluppo di iperglicemia cronica. La perdita della massa funzionale delle cellule β deriva da una complessa catena di eventi patogenetici dovuta alla combinazione di alterazione funzionale delle cellule β , che ne aumenta l'immunogenicità, e disregolazione e risposta eccessiva immunitaria. In particolare, i linfociti T autoreattivi sfuggendo alla selezione timica migrano in periferia, riconoscono gli autoantigeni espressi dalle cellule delle isole pancreatiche e infiltrano il pancreas, promuovendo progressivamente la distruzione delle cellule β . [14], [15]

Alla base di tali meccanismi autoimmuni vi è un'eziopatogenesi multifattoriale piuttosto complessa, determinata dall'interazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali. È stato osservato che la comparsa di autoanticorpi diretti contro le cellule β è strettamente associata a variazioni genetiche localizzate nella regione HLA (*human leukocyte antigen*) del cromosoma 6, in particolare agli allotipi HLA-DR e HLA-DQ, che contribuiscono all'innescare dell'autoimmunità. Tale associazione sembra essere correlata soprattutto alle fasi iniziali della malattia, in particolare alla comparsa dei primi autoanticorpi tra cui quelli diretti contro la decarbossilasi dell'acido glutammico GAD65 (GADA) e l'insulina (IAA). Sebbene la regione HLA, come è noto da tempo, rappresenti il principale locus di suscettibilità al diabete mellito di tipo 1, negli ultimi anni grazie ai progressi della genetica umana sono stati

identificati in tutto il genoma numerosi altri loci, almeno 50. Tra questi il gene INS che influenza l'espressione dell'insulina, PTPN22 che è coinvolto nella regolazione dell'attivazione dei linfociti T e CTLA4 che è implicato nei meccanismi di controllo della risposta immunitaria. Sono necessari ulteriori studi per stabilire se vi sono altri marcatori genetici importanti per l'eziologia del diabete mellito di tipo 1. [16], [17]

A tal proposito, Insel et al. hanno proposto una stadiazione del diabete mellito di tipo 1, secondo la quale la patogenesi della malattia si articola in tre stadi differenti, illustrati graficamente nella *Figura 4*: stadio 1 che è la fase iniziale, quindi, la malattia preclinica solitamente asintomatica, normoglicemica ma caratterizzata dallo sviluppo di autoimmunità delle cellule β , evidenziata dalla presenza di due o più autoanticorpi anti-isole pancreatiche diretti contro l'insulina o altre molecole proteiche, come gli anticorpi anti-GAD65 (decarbossilasi dell'acido glutammico 65), anti-IA2 (proteina tirosina fosfatasi IA2) e anti-ZnT8 (trasportatore dello zinco 8). Quando si innesca la perdita di gran parte della massa funzionale di cellule β la malattia progredisce verso lo stadio 2, sempre preclinico asintomatico ma con disglycemia. Nel momento in cui si manifestano i sintomi tipici la malattia evolve allo stadio 3, ovvero la malattia clinica sintomatica caratterizzata da iperglicemia. La progressione dallo sviluppo di autoimmunità al manifestarsi della patologia clinica può durare da mesi a decenni. Questa classificazione a stadi riveste un ruolo consolidato nello sviluppo di terapie e nella progettazione di studi clinici volti a prevenire l'insorgenza della malattia sintomatica, nonché nell'ottimizzazione di trattamenti personalizzati in base alla specifica fase della malattia. [18]

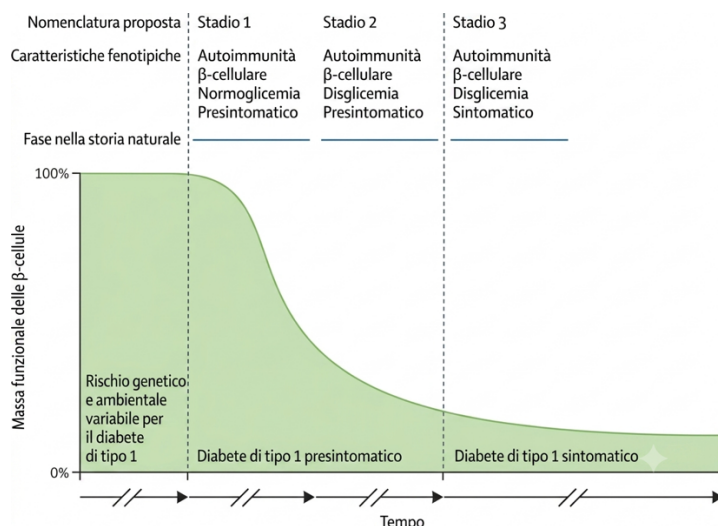


Figura 3. Illustrazione schematica della progressiva riduzione della funzionalità delle cellule β pancreatiche in relazione alla stadiazione del diabete mellito di tipo 1 (adattata da [18])

La predisposizione genetica da sola non è sufficiente a determinare l'insorgenza del diabete di tipo 1, evidenziando il ruolo rilevante dei fattori ambientali nell'innescare o sostenere la progressione della patologia conclamata. Sono state avanzate diverse ipotesi su possibili fattori ambientali, tra cui infezioni virali, peso corporeo e microbiota intestinale. Per quanto riguarda le infezioni virali, gli enterovirus, tra cui i Cocksackievirus del gruppo B, sono i principali sospettati come potenziali fattori virali infettivi scatenanti del diabete mellito di tipo 1. Un'altra famiglia di virus su cui ricadono dei sospetti è rappresentata dagli Herpesvirus i quali in seguito all'infezione primaria rimangono nelle cellule umane in uno stato latente per tutta la vita riattivandosi in fasi successive. In particolare, è stato ipotizzato che il virus di Epstein-Barr (EBV), appartenente agli Herpesvirus, possa contribuire allo sviluppo di autoimmunità nel diabete mellito di tipo 1 a causa dell'omologia della sequenza amminoacidica tra la proteina virale EBNA3C e la variante genetica della regione HLA HLA-DQ8 che potrebbe innescare l'attivazione della risposta immunitaria contro il virus ma anche contro le cellule β del pancreas. Analogamente al virus di Epstein-Barr, il citomegalovirus umano (hCMV) produce delle proteine la cui sequenza

amminoacidica presenta delle omologie con GAD65 favorendo anche in questo caso l'attivazione di una risposta immunitaria cross-reattiva. Tuttavia, le evidenze a supporto di un ruolo causale di questi virus nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1 derivano principalmente da studi sierologici e in vitro, mentre i dati ottenuti da studi su pancreas umano rimangono limitati e non conclusivi. [19]

Anche l'eccesso di peso corporeo, sebbene il suo ruolo sia ancora oggetto di dibattito, sembra costituire un possibile fattore di rischio per il diabete mellito di tipo 1. Tale ipotesi è supportata dal parallelo incremento, a livello globale, dell'incidenza del diabete mellito di tipo 1 e della prevalenza di sovrappeso e obesità. Secondo la cosiddetta *accelerator hypothesis*, un indice di massa corporea (BMI) elevato, inducendo insulino-resistenza, potrebbe innescare o accelerare la distruzione immunomediata delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas nella fase iniziale del diabete mellito di tipo 1, soprattutto in bambini e adolescenti, con conseguente aumento del rischio di insorgenza clinica del diabete mellito di tipo 1. [14] In uno studio prospettico condotto nell'ambito del *TrialNet Pathway to Prevention Study* sono stati monitorati con cadenza semestrale o annuale, 706 soggetti di età compresa tra i 2 e 18 anni, parenti di primo, secondo o terzo grado di pazienti con diabete mellito di tipo 1, positivi per un singolo autoanticorpo delle isole pancreatiche ma ancora non diabetici. Il 25% di questi soggetti presentava un BMI $\geq 85^{\circ}$ percentile, indicativo di sovrappeso o obesità. Durante il follow up, circa il 20% dei partecipanti ha sviluppato positività per autoanticorpi multipli, evento indicativo della progressione verso uno stadio più avanzato dell'autoimmunità anti cellule β . I risultati hanno evidenziato che il *cumulative excess BMI (ceBMI)*, parametro che indica l'esposizione a valori di BMI $\geq 85^{\circ}$ percentile, influenza il rischio di sviluppare positività ad autoanticorpi multipli delle isole pancreatiche in

modo specifico per età. I soggetti con età pari o maggiore di 9 anni in una condizione persistente di sovrappeso o obesità ($\text{ceBMI} \geq 0 \text{ kg/m}^2$, ovvero persistente $\text{BMI} \geq 85^\circ$) hanno mostrato un aumentato tasso di progressione, quasi raddoppiato, verso autoanticorpi multipli rispetto ai coetanei normopeso. Al contrario, nei bambini di età inferiore a 9 anni l'effetto del ceBMI sul rischio di progressione è risultato minimo (*Figura 5*). [20]

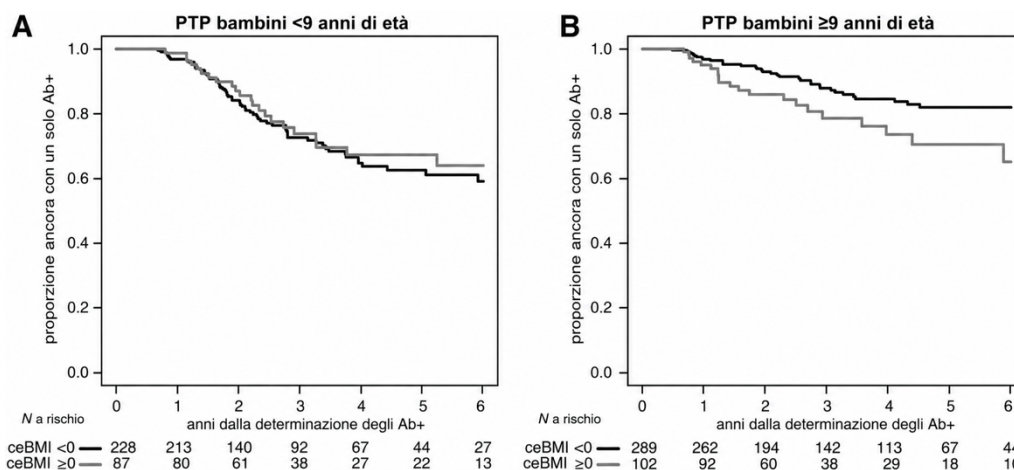


Figura 4. Rappresentazione grafica dell'influenza in modo età-specifico del ceBMI sulla progressione verso autoanticorpi multipli nei bambini di età inferiore a 9 anni (A) e di età pari o superiore a 9 anni (B) (adattata da [20])

L'influenza del BMI è risultata particolarmente rilevante nei soggetti pediatrici con minor predisposizione genetica. Infatti, nei partecipanti di età pari o superiore a 9 anni privi degli aplotipi HLA ad alto rischio, un $\text{ceBMI} \geq 0 \text{ kg/m}^2$ aumentava di oltre 7 volte il rischio di progressione verso la positività per gli autoanticorpi, portando questi individui a un livello di rischio simile a quello dei soggetti geneticamente predisposti (*Figura 6*). Nei bambini con aplotipi HLA ad alto rischio il ceBMI non è risultato un fattore significativo per l'aumento del rischio di progressione verso più autoanticorpi, probabilmente perché la predisposizione genetica rappresentava già il principale determinante del processo autoimmune. Nei bambini di età inferiore a 9 anni il ceBMI non ha influenzato la

progressione verso l'autoimmunità multipla, indipendentemente dall'aplotipo HLA. [20]

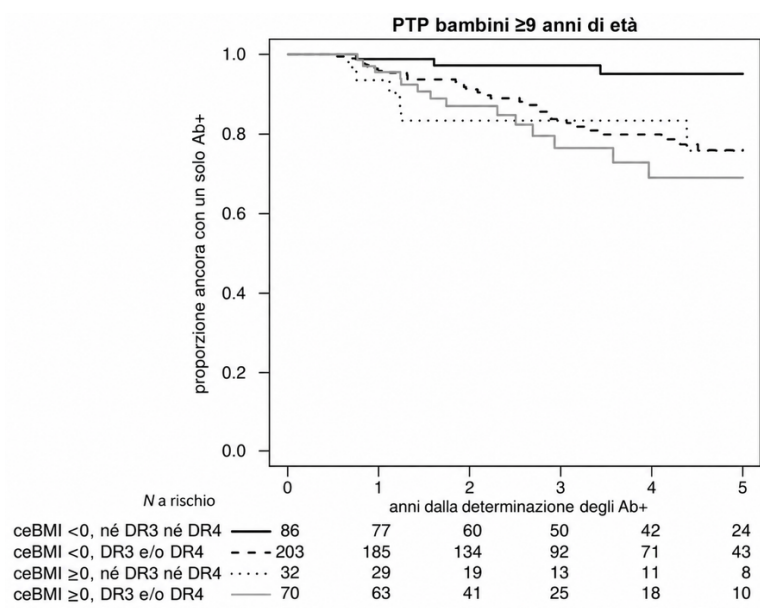


Figura 5. Rappresentazione grafica dell'influenza del ceBMI sulla progressione verso autoanticorpi multipli in bambini di età pari o superiore a 9 anni non predisposti geneticamente (adattata da [20])

Poiché la comparsa di autoanticorpi multipli segna l’ingresso nello stadio 1 del diabete mellito di tipo 1 e circa il 70% di questi individui sviluppa il diabete di stadio 3 entro 10 anni dalla sieroconversione, il controllo del peso corporeo potrebbe rappresentare un potenziale fattore modificabile per prevenire o ritardare la progressione della malattia. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi fisiopatologici coinvolti e definire con maggiore precisione il reale impatto dell’eccesso ponderale sullo sviluppo del diabete mellito di tipo 1. [20]

Un altro fattore ambientale potenzialmente coinvolto nell’insorgenza del diabete mellito di tipo 1 è rappresentato dal microbiota intestinale. Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato come le alterazioni microbiche intestinali possano contribuire alla patogenesi di diverse malattie autoimmuni, tra cui artrite reumatoide, morbo di Crohn, lupus eritematoso sistemico e diabete mellito di tipo 1, attraverso interazioni dirette e indirette con il sistema immunitario innato e adattativo. [21] Nei

soggetti geneticamente predisposti e nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 è stato osservato un profilo del microbiota caratteristico e differente rispetto a quello dei soggetti sani. In particolare, si riscontra una ridotta diversità batterica e una minore stabilità dell'ecosistema intestinale associate a una composizione aberrante caratterizzata dalla prevalenza di specie appartenenti ai generi *Bacteroides* e *Clostridium* e dalla diminuzione di batteri considerati protettivi, quali *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Prevotella*. Il microbiota intestinale potrebbe favorire lo sviluppo dell'autoimmunità delle cellule β del pancreas attraverso differenti meccanismi fisiopatologici, tra cui processi infiammatori, l'aumento della permeabilità intestinale, la compromissione dell'integrità della barriera epiteliale e la conseguente maggiore esposizione agli antigeni alimentari. [22] Inoltre, la composizione del microbiota intestinale nei primi anni di vita è influenzata da numerosi fattori ambientali, tra cui le modalità del parto, l'allattamento al seno e, in generale, il tipo di alimentazione neonatale, utilizzo di antibiotici, dieta, obesità e condizioni ambientali. Tali elementi svolgono un ruolo determinante nella maturazione immunologica del neonato e possono avere effetti a lungo termine sulla regolazione della risposta immunitaria. Pertanto, una colonizzazione intestinale alterata nelle prime fasi di vita potrebbe aumentare il rischio di sviluppare malattie autoimmuni. Per quanto riguarda le modalità del parto, il parto vaginale favorisce la colonizzazione intestinale da parte di batteri benefici, in particolare *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, provenienti dal microbiota materno. Al contrario, il parto cesareo è associato prevalentemente a una colonizzazione da microrganismi cutanei materni, come *Clostridium* e *Staphylococcus*. Alcuni studi epidemiologici hanno riportato nei bambini nati con taglio cesareo un aumento del rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 1, sebbene i risultati presenti in letteratura non siano completamente concordi. [23] La ridotta presenza di *Bifidobacterius* e *Lactobacillum*,

batteri produttori di acidi grassi a catena corta (*short chain fatty acids*, *SCFA*), in particolare butirrato, potrebbe contribuire a un'alterata immunomodulazione. Gli SCFA, infatti, svolgono importanti funzioni antinfiammatorie, favoriscono il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale e contribuiscono alla regolazione della risposta immunitaria. [21] Alla luce di queste evidenze, il microbiota intestinale rappresenta oggi un importante ambito di ricerca per lo sviluppo di strategie preventive e terapeutiche, con un crescente interesse per gli interventi volti al ripristino di un microbiota sano, mediante modifiche dietetiche, utilizzo di probiotici e prebiotici. Tuttavia, considerata l'elevata complessità del microbiota intestinale, sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi coinvolti e identificare le specie batteriche realmente protettive o potenzialmente patogene nello sviluppo del diabete mellito di tipo 1. [22]

In conclusione, l'insorgenza del diabete mellito di tipo 1 non può essere attribuita esclusivamente né alla predisposizione genetica né ai soli fattori ambientali. Secondo la cosiddetta *threshold hypothesis* (ipotesi della soglia), lo sviluppo della patologia deriva dalla complessa interazione tra suscettibilità genetica ed esposizione ambientale, che contribuiscono all'attivazione della risposta autoimmune diretta contro le cellule β delle isole di Langerhans del pancreas. La progressione verso la malattia sintomatica si verifica quando la somma di tali molteplici fattori predisponenti, genetici e ambientali, supera una soglia critica, oltre la quale il processo autoimmune diventa autosufficiente e conduce alla distruzione significativa delle cellule β . Secondo questa teoria, i fattori genetici e ambientali non agiscono in maniera indipendente, ma come componenti interconnesse. Di conseguenza, individui con elevata predisposizione genetica potrebbero necessitare di una minore esposizione a fattori ambientali per raggiungere la soglia patologica, mentre soggetti

geneticamente meno predisposti potrebbero sviluppare la malattia solo in presenza di un maggior carico di esposizioni ambientali favorevoli. Questo modello teorico potrebbe spiegare la notevole eterogeneità osservata nell'età di esordio e nella progressione del diabete mellito di tipo 1 tra individui diversi. [22]

Capitolo 2 Terapie attuali del diabete mellito di tipo 1

2.1 L'insulina

Dati provenienti dal mondo reale evidenziano che l'insulina è uno dei farmaci antidiabetici più prescritti con la previsione che entro il 2030 il numero di pazienti in tutto il mondo in trattamento con l'insulina supererà i 37 milioni. [2]

L'insulina umana è un ormone proteico costituito da due catene polipeptidiche denominate catena A (21 amminoacidi) e catena B (30 amminoacidi), tenute insieme da due ponti disolfuro intercatena (A7-B7 e A20-B19); un ulteriore ponte disolfuro intracatena (A6-A11) stabilizza la conformazione della catena A. Questa architettura, riportata in forma schematica nella *Figura 7*, conferisce alla molecola la sua conformazione nativa, alla base sia dell'attività biologica sia della propensione all'autoassociazione. [17]

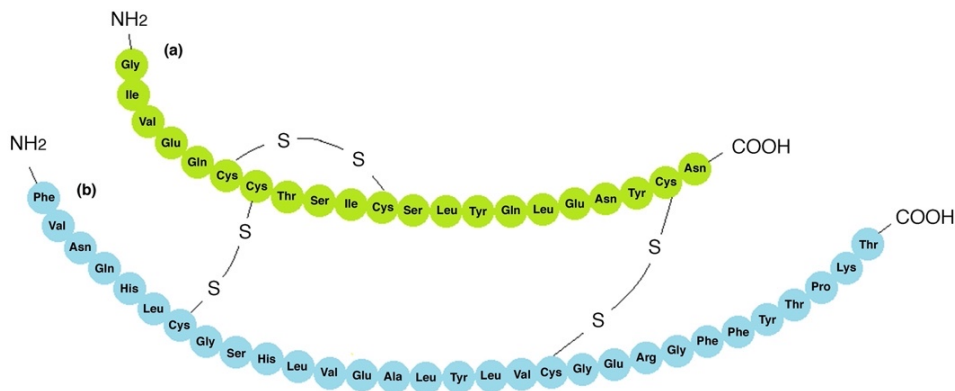


Figura 6. Rappresentazione schematica della struttura primaria dell'insulina umana (riprodotta da [17])

In condizioni fisiologiche, l'insulina viene sintetizzata dalle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas a partire dalla preproinsulina¹, che viene

¹ Forma primaria dell'insulina costituita da una catena di 110 amminoacidi tradotta a partire dall'mRNA dell'insulina. [17]

successivamente convertita in proinsulina² e infine in insulina matura e peptide C³. Dopo la sintesi come monomero, l'insulina viene immagazzinata nei granuli secretori delle cellule β sotto forma di esameri, stabilizzati dal coordinamento di ioni zinco (Zn^{2+}) attraverso i residui di istidina in posizione B10, una configurazione più stabile che consente la conservazione di grandi quantità dell'ormone. In seguito all'aumento della glicemia, l'insulina viene secreta nel circolo ematico dissociandosi da esameri a dimeri e, soprattutto, monomeri, la forma biologicamente attiva in grado di legare il recettore insulinico ed esplicare la sua azione biologica. La dissociazione dell'insulina è un prerequisito essenziale per l'assorbimento dal tessuto sottocutaneo in seguito a iniezione e per l'interazione recettoriale. Come verrà discusso nei paragrafi successivi, la cinetica di questa dissociazione rappresenta il principale determinante farmacocinetico delle diverse formulazioni insuliniche e il bersaglio delle modifiche strutturali alla base degli analoghi dell'insulina. [17] Una volta in circolo, i monomeri di insulina si legano al recettore dell'insulina (IR), una glicoproteina eterotetramerica costituita da due subunità α extracellulari e due subunità β transmembrana. Il legame dell'insulina alla subunità α induce una variazione conformazionale del recettore che attiva il dominio tirosin-chinasico intracellulare delle subunità β , determinando l'autofosforilazione del recettore stesso su specifici residui tirosinici. Ciò permette il reclutamento e la fosforilazione di proteine adattatrici intracellulari che a loro volta attivano le vie di segnalazione a valle, in particolare quella mediata dalla fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3) e dalla proteina chinasi B (AKT). L'attivazione di tali pathway determina

² Precursore dell'insulina costituito da 86 amminoacidi, derivante dalla rimozione del peptide segnale dalla preproinsulina durante il processo di biosintesi nelle cellule β pancreatiche. [17]

³ Frammento peptidico di 31 amminoacidi, derivante dalla scissione della proinsulina durante il processo di biosintesi dell'insulina. Esso viene rilasciato nel sangue in quantità uguali all'insulina per cui rappresenta un marker della produzione endogena di insulina. [17]

molteplici effetti metabolici: nelle cellule muscolari scheletriche e adipose si ha la traslocazione del trasportatore GLUT4 a livello della membrana cellulare, favorendo l'ingresso del glucosio ematico con conseguente effetto ipoglicemizzante; a livello epatico l'insulina promuove la glicogenosintesi e inibisce la glicogenolisi. Inoltre, l'insulina favorisce il trasporto degli amminoacidi dal sangue alle cellule, esercitando un'azione anabolica attraverso la stimolazione della sintesi proteica e l'inibizione della gluconeogenesi (sintesi di glucosio a partire da precursori non glucidici, tra cui alcuni amminoacidici). [24]

In condizioni fisiologiche, le cellule β delle isole di Langerhans del pancreas secernono insulina in risposta alle variazioni dei livelli di glucosio nel sangue. In particolare, come mostrato nella *Figura 8*, in corrispondenza dei pasti principali si osserva un aumento della secrezione di insulina prandiale per contrastare l'incremento della glicemia postprandiale, mentre nello stato di digiuno interprandiale e notturno si ha una secrezione basale di insulina per mantenere la glicemia nell'intervallo compreso tra 70 mg/dL a digiuno e 140 mg/dL nelle 2 ore successive al pasto. [25]

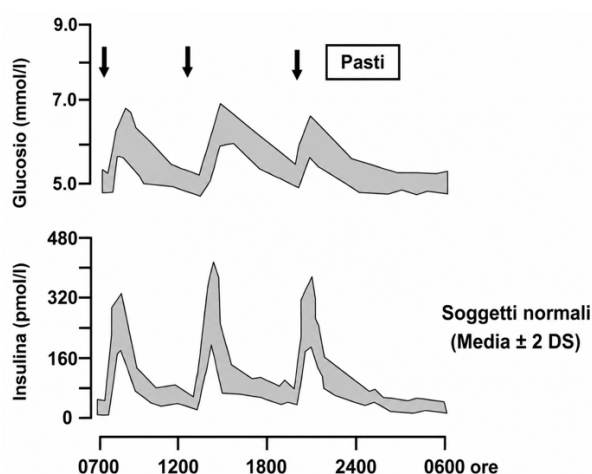


Figura 7. Illustrazione grafica delle concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina dopo i tre pasti principali e negli intervalli interprandiali in soggetti non diabetici (adattata da [25])

Dalla scoperta dell'insulina nel 1921, considerata una delle più importanti scoperte scientifiche del XX secolo e riconosciuta con l'assegnazione del Premio Nobel per la Fisiologia o Medicina nel 1923 a Frederick Banting e John J.R. Macleod, si è assistito a un'evoluzione significativa e continua, parallelamente ai progressi della chimica, della biologia molecolare e delle tecnologie per la somministrazione dei farmaci, fino ad arrivare all'attuale panorama della terapia insulinica. I primi trattamenti, agli inizi del XX secolo, si basavano su insuline animali estratte e purificate da pancreas bovino o suino. Dal punto di vista strutturale, l'insulina bovina e l'insulina suina presentano un'elevata omologia con l'insulina umana, dalla quale differiscono esclusivamente per alcune sostituzioni amminoacidiche in posizione A8, A10 e B30: nell'insulina bovina si ha un'alanina (Ala) in A8 al posto di una treonina (Thr), una valina (Val) in A10 al posto di una isoleucina (Ile) e un'alanina (Ala) in B30 al posto di una treonina (Thr), mentre l'insulina suina differisce da quella umana esclusivamente per la sostituzione di un'alanina (Ala) in B30 al posto di una treonina (Thr). Tuttavia, nonostante l'elevata similarità della sequenza amminoacidica e della conformazione tridimensionale di queste insuline animali con l'insulina umana, l'utilizzo e la somministrazione di tali preparazioni erano associati a diverse problematiche, tra cui l'elevato dispendio in termini non solo economici per l'estrazione e la purificazione ma anche di risorse biologiche in quanto il fabbisogno insulinico annuale di un singolo paziente diabetico di tipo 1 poteva richiedere l'equivalente del pancreas di circa 50 animali, la breve durata d'azione con conseguente necessità di numerose somministrazioni giornaliere, il rischio di contaminazione da agenti patogeni di origine animale e la possibile reazione di immunogenicità dovuta al riconoscimento da parte del sistema immunitario della molecola come *non self* con conseguente produzione di anticorpi diretti verso tale immunogeno. [25], [26]

2.2 Insulina regolare

Per superare i limiti delle insuline animali, all'inizio degli anni '80 viene sintetizzata l'insulina umana regolare, definita anche rapida o standard, prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante con sequenza amminoacidica identica all'insulina nativa. Tuttavia, questa insulina presenta un'insorgenza d'azione (*onset*) ritardato, intorno ai 30-60 minuti, e un picco farmacocinetico effettivo dopo 2-4 ore a causa del lento assorbimento a livello del tessuto sottocutaneo. Tale ritardo è attribuibile all'elevata tendenza dell'insulina umana, in presenza di ioni zinco, ad autoassociarsi in esameri. La forma esamerica T_6 , strutturalmente più distesa, in presenza di conservanti fenolici, converte nella struttura esamerica R_6 ad α -elica, più stabile grazie alla formazione di legami idrogeno. Per questo motivo, nelle formulazioni di insulina ad oggi in commercio tra gli eccipienti sono presenti, oltre allo zinco, anche i conservanti fenolici in modo da conferire una maggiore stabilità alla molecola di insulina. L'insulina nelle formulazioni viene somministrata generalmente alla concentrazione di 10^{-4} M (100 UI) nella forma esamerica R_6 , più stabile. Dopo l'iniezione sottocutanea, la progressiva perdita di conservante fenolico nel sito di iniezione induce la conversione verso le forme meno stabili T_3R_3 e infine T_6 , fino alla dissociazione, favorita anche dall'allontanamento dello zinco, in dimeri e, soprattutto, monomeri, le specie in grado di essere assorbite e di raggiungere la circolazione sistemica. Contemporaneamente alla dissociazione, la diluizione nel fluido interstiziale riduce la concentrazione di insulina disponibile per l'assorbimento da circa 10^{-4} M a 10^{-8} M. Questo processo è alla base della latenza d'azione dell'insulina regolare poiché è necessario un intervallo di tempo di 30-60 minuti perché l'insulina si dissoci, passi in circolo e possa esplicare la sua azione. Inoltre, questo lento processo si sviluppa nell'arco di diverse ore, motivo per cui la durata d'azione di

questa insulina è di circa 5-8 ore, e questo fa sì che ore dopo l'iniezione ci sia ancora l'assorbimento dell'insulina dal sito sottocutaneo mantenendo così l'insulina sierica a livelli troppo elevati anche quando ormai il glucosio derivante dal pasto è quasi completamente assorbito determinando ipoglicemia postprandiale tardiva. [25]

Questa insulina presenta, quindi, il limite di un assorbimento troppo lento dal sito di iniezione per riprodurre il profilo fisiologico della secrezione insulinica postprandiale: per ottenere un picco di insulina sierica in corrispondenza del picco glicemico postprandiale, l'iniezione deve essere effettuata 30-60 minuti prima del pasto, un approccio poco pratico e scarsamente accettato dai pazienti. A questo limite si associa un secondo problema, di segno opposto: se l'iniezione viene effettuata troppo a ridosso del pasto, l'assorbimento ritardato dell'insulina determina inizialmente uno scarso controllo della glicemia postprandiale, con iperglicemia nella fase immediatamente successiva al pasto. Successivamente, poiché il glucosio alimentare viene generalmente assorbito ed eliminato entro circa 2 ore, mentre l'insulina regolare permane in circolo più a lungo, si determina una condizione di iperinsulinemia relativa che esita in ipoglicemia postprandiale tardiva. [5]

Dalla produzione dell'insulina umana ricombinante il mercato si è evoluto e, sempre grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, per mimare in maniera più simile possibile la secrezione endogena di insulina basale e prandiale con un minor rischio di sviluppo di ipoglicemia dagli anni '90 si ha la possibilità di modificare in maniera selettiva la sequenza e la struttura della molecola di insulina umana ricombinante per ottenere gli analoghi dell'insulina i quali sono preparati insulinici più efficaci, sicuri, versatili. Inoltre, essi consentono una maggiore flessibilità negli orari dei pasti principali (colazione, pranzo, cena), spuntini ed esercizio fisico con un

miglioramento della qualità di vita e una conduzione di una vita normale. Da un punto di vista di pratica clinica la terapia sostitutiva insulinica consiste nella somministrazione di un'insulina prandiale o bolo per mimare la secrezione endogena di insulina all'assunzione di cibo, un'insulina basale per mimare l'apporto basale endogeno di insulina nello stato di digiuno interprandiale e un supplemento di insulina a dose correttiva che agisce sull'iperglicemia pre-pasto o inter-pasto. Gli analoghi dell'insulina attualmente disponibili in commercio vengono distinti per tempo d'insorgenza d'azione e durata d'azione in insuline ad azione rapida, ultrarapida, a lunga durata d'azione e intermedie. [5], [25]

2.3 Insuline prandiali

Le insuline prandiali vengono somministrate al momento del pasto in modo da controllare le escursioni della glicemia postprandiale mimando la fisiologica secrezione di insulina prandiale, un obiettivo reso complesso dalla molteplicità di variabili che influenzano il picco glicemico postprandiale, tra cui quantità, qualità e composizione del pasto, motilità gastrointestinale e dinamica dell'assorbimento del glucosio a livello intestinale. [5], [27]

Gli analoghi dell'insulina ad azione rapida (RAA, *Rapid-Acting Analogues*) o *short acting* sono ottenuti grazie ad alcune modifiche apportate alla sequenza amminoacidica dell'insulina umana, affinché questa si dissocia rapidamente in monomeri in seguito a somministrazione sottocutanea permettendo così di avere un rapido *onset* in grado di contrastare l'iperglicemia postprandiale e una precoce cessazione dell'azione in modo da ridurre il rischio di ipoglicemia postprandiale tardiva. Ciò permette anche di ridurre l'intervallo di tempo che deve intercorrere tra l'iniezione di insulina prandiale e il pasto (nella pratica attuale si raccomanda la somministrazione di questi analoghi fino a 20

minuti prima dei pasti ed entro 20 minuti dall'inizio del pasto) e una maggiore flessibilità nei tempi e dosi di iniezione che possono essere meglio adattati al contenuto di carboidrati e alla quantità di cibo ingerito. Questi analoghi, quindi, sono in grado di mimare meglio il profilo di secrezione endogena di insulina prandiale consentendo così un migliore controllo glicemico postprandiale. Se confrontati con l'insulina umana ricombinante queste insuline rapide migliorano l'HbA1c dello 0,15%, e dello 0,20% se somministrati tramite pompe insuliniche sottocutanee, fino a raggiungere lo 0,30% in regimi terapeutici ottimizzati. Gli analoghi ad azione rapida ad oggi disponibili sul mercato sono l'insulina lispro, aspart e glulisina. [5], [27]

2.3.1 Insulina lispro

L'insulina lispro è la prima insulina ad azione rapida sviluppata a metà degli anni '90. È stata ottenuta invertendo la prolina in posizione 28 e la lisina in posizione 29 della catena B: la sequenza Pro-B28-Lys-B29 dell'insulina umana viene così sostituita da Lys-B28-Pro-B29 (da cui il nome "lispro"). Questa modifica induce una variazione conformazionale che riduce la propensione dell'insulina ad autoassociarsi in dimeri ed esameri, permettendo una rapida dissociazione in monomeri a livello sottocutaneo ed un assorbimento quasi istantaneo. A differenza dell'insulina regolare, inoltre, questa rapida dissociazione fa sì che la concentrazione della molecola nel sito di iniezione rimanga prossima a quella di formulazione (10^{-4} M), senza l'effetto di diluizione progressiva osservato per l'insulina umana. Il profilo farmacocinetico dell'insulina lispro è caratterizzato da un *onset* di 5-15 minuti, un picco effettivo dopo 1-3 ore e una durata d'azione di 4-7 ore, riproducendo più fedelmente rispetto all'insulina umana il profilo di secrezione insulinica in bolo, con conseguente miglior controllo glicemico e minor rischio di ipoglicemia

postprandiale tardiva. La specialità medicinale a base di insulina lispro attualmente in commercio è *Humalog*, in penne preriempite. La formulazione contiene zinco, che favorisce comunque la formazione di esameri, sebbene meno stabili rispetto a quelli dell'insulina umana, agendo, quindi, come agente stabilizzante della forma di deposito, e un conservante fenolico (metacresolo). [5], [25]

2.3.2 Insulina aspart

Nell'insulina aspart la prolina in posizione 28 della catena B viene sostituita con l'acido aspartico; la sostituzione di un amminoacido neutro con uno dotato di carica negativa induce una repulsione elettrostatica tra le varie molecole di insulina e l'alterazione del contatto tra la prolina B28 e glicina B23 all'interfaccia monomero-monomero, riducendo, in maniera analoga a quanto osservato per l'insulina lispro, la tendenza all'autoassociazione in oligomeri. Ne consegue una minore tendenza dell'insulina aspart ad aggregare con immediata dissociazione in monomeri dopo la somministrazione e rapido assorbimento, con un profilo farmacocinetico caratterizzato da un picco plasmatico dopo 1-3 ore, una durata di 4-7 ore e un *onset* di 5-15 minuti. La specialità contenente insulina aspart ad oggi in commercio è *Novorapid* in penne preriempite contenente anche zinco e conservanti fenolici (fenolo e metacresolo). [5], [25]

2.3.3 Insulina glulisina

L'insulina glulisina presenta un profilo farmacocinetico simile a quello di lispro e aspart. Presenta due sostituzioni amminoacidiche a livello della catena B rispetto all'insulina umana, ovvero in B3 una lisina al posto dell'asparagina e in B29 un acido glutammico al posto della lisina. Questa

redistribuzione delle cariche con l'introduzione di una carica positiva in B3 e una carica negativa in B29 altera la conformazione della proteina riducendone la propensione all'associazione. A questo contribuisce in modo determinante anche l'assenza di zinco nella formulazione, sostituito da Polisorbato 20 (*Tween* 20) come agente stabilizzante: l'assenza dello ione zinco, indispensabile per la formazione degli esameri, rappresenta, infatti, una caratteristica distintiva di questo analogo rispetto a lispro e aspart. La combinazione di questi fattori si traduce in un assorbimento sottocutaneo più rapido, con un *onset* di circa 15-18 minuti. La specialità medicinale a base di insulina glulisina attualmente in commercio è *Apidra*, in penne preriempite. [5], [25]

Queste tre insuline, lispro, aspart e glulisina presentano un elevato grado di somiglianza da un punto di vista strutturale ma anche di profili farmacocinetici e farmacodinamici per cui i benefici farmacocinetici e farmacodinamici dimostrati dagli studi di fase III sull'insulina lispro che verranno esposti di seguito possono essere estesi all'intera classe di analoghi ad azione rapida di prima generazione. In particolare, la somministrazione sottocutanea di insulina lispro 5 minuti prima del pasto, indicata nella *Figura 10 B* con i cerchi pieni, determina un picco di concentrazione plasmatica doppio, raggiunto in circa la metà del tempo rispetto a una dose equivalente di insulina regolare somministrata 30 minuti prima del pasto, indicata nella *Figura 10 B* con i cerchi vuoti. Inoltre, la concentrazione sierica dell'insulina lispro diminuisce più rapidamente, determinando uno spostamento a sinistra del suo profilo farmacocinetico. Questo profilo riproduce più fedelmente la secrezione endogena di insulina prandiale e si traduce in una farmacodinamica migliore rispetto all'insulina umana con un picco glicemico postprandiale inferiore grazie principalmente a una più rapida insulinizzazione epatica, come mostrato nella *Figura 10 A*. Inoltre, nelle *Figure 10 A e 10 B* viene mostrata anche la durata d'azione più breve dell'analogo ad azione rapida

rispetto all'insulina umana, con maggiore evidenza a 2-3 ore dall'iniezione. [25]

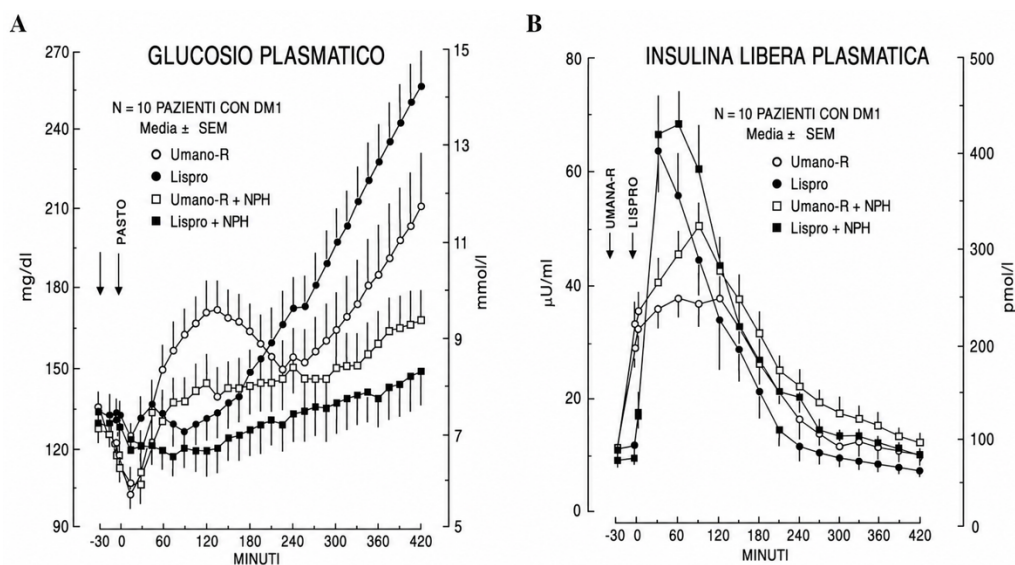


Figura 8. Illustrazione grafica della concentrazione plasmatica postprandiale di glucosio (A) e di insulina (B) in seguito all'iniezione sottocutanea di insulina lispro e insulina regolare (adattata da [25])

Tuttavia, nonostante l'assorbimento sottocutaneo più rapido rispetto all'insulina regolare, queste insuline hanno un'insorgenza d'azione e un assorbimento ancora troppo lenti a causa del tessuto sottocutaneo che funge da barriera all'ingresso di insulina nella circolazione sistemica, limitando la possibilità di replicare fedelmente il profilo fisiologico postprandiale e lasciando persistere livelli di glicemia postprandiale troppo elevati. Questo limite ha motivato lo sviluppo di insuline prandiali ad azione ancora più rapida, le cosiddette insuline rapide di seconda generazione o ultrarapide (URAI, *Ultra-Rapid-Acting Insulins*). [5], [27]

2.3.4 Insuline ultrarapide

Le insuline ultrarapide sono state sviluppate per aumentare ulteriormente la velocità di assorbimento dal tessuto sottocutaneo e migliorare il controllo della glicemia postprandiale, rispetto agli analoghi rapidi di prima generazione, dei quali presentano un *onset* più precoce e una durata

d'azione più breve. Questi analoghi ad azione rapida di seconda generazione presentano una struttura primaria sovrapponibile a quella delle molecole di prima generazione; tuttavia, si distinguono per un meccanismo di assorbimento più rapido grazie alla presenza nella formulazione di specifici eccipienti. La *Tabella 3* riporta le due insuline ultrarapide attualmente disponibili in commercio (insulina aspart e insulina lispro ad azione ultrarapida) e una terza, ancora in fase di studio, (BioChaperone lispro), evidenziandone i rispettivi eccipienti e la funzione svolta da ciascuno di essi nella formulazione. [25]

Farmaco	Struttura centrale dell'insulina	Eccipienti aggiunti	Meccanismo d'azione
Aspart ad azione ultrarapida	Insulina aspart	Niacinamide (vitamina B3), L-arginina	Aumento del flusso sanguigno sottocutaneo
Lispro ultraveloce	Insulina lispro	treprostinil sodico, citrato di sodio diidrato	Aumento della permeabilità vascolare e incremento della vasodilatazione locale.
BioChaperone lispro	Insulina lispro	BioChaperone BC222, citrato	Diffusione potenziata

Tabella 3. Illustrazione schematica delle insuline ad azione rapida di seconda generazione o ultrarapide (adattata da [25])

2.3.4.1 Insulina aspart ad azione ultrarapida

L'insulina aspart ad azione ultrarapida (*Faster acting Aspart*) è stata la prima insulina ultrarapida disponibile. Presenta un *onset* più precoce rispetto all'insulina aspart (5 minuti prima), un picco plasmatico dopo 1-1,5 ore e una durata d'azione di 4-5 ore. Questo profilo è ottenuto grazie all'aggiunta nella formulazione di L-arginina quale agente stabilizzante e di niacinamide (o nicotinamide o vitamina B3) come modificatore/facilitatore dell'assorbimento in virtù della sua capacità di

aumentare il flusso sanguigno sottocutaneo. Questo fa sì che con questa insulina ci si avvicini ancora di più al profilo fisiologico del bolo. La specialità medicinale a base di insulina aspart ad azione ultrarapida *Fiasp* è stata approvata nel 2017 in Europa e negli Stati Uniti per l'uso negli adulti con diabete e anche in bambini e adolescenti di età superiore a un anno. [5], [25]

2.3.4.2 Insulina lispro ultrarapida

L'insulina lispro ultrarapida (URLi, *ultra rapid Lispro*, o Lispro-aabc) è un'altra insulina prandiale ultrarapida con un picco plasmatico dopo 1-1,5 ore e una durata di 4-5 ore. Presenta le stesse modifiche dell'insulina lispro e la formulazione include treprostnil sodico che favorisce la vasodilatazione locale e citrato di sodio diidrato che aumenta la permeabilità vascolare locale; l'effetto combinato è un assorbimento più rapido rispetto alla lispro. Questa insulina permette di avere una riduzione dell'iperglicemia postprandiale rispetto alla lispro e minore frequenza di ipoglicemie; per contro si assiste a una maggiore incidenza di reazioni cutanee nel sito di iniezione. La specialità medicinale a base di insulina lispro ultrarapida attualmente in commercio è *Lyumjev*. [5], [25]

Poiché attualmente è in fase di studio un'altra insulina ad azione rapida di seconda generazione, ovvero BioChaperone lispro, la quale presenta delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche comuni i profili farmacocinetici e farmacodinamici di tutte e tre queste insuline verranno discusse nel capitolo dedicato alle insuline innovative.

2.4 Insuline intermedie

Prima dell'introduzione dei moderni analoghi basali a lunga durata d'azione l'unica insulina basale disponibile, oggi classificata come insulina ad azione intermedia, era l'insulina NPH. [26]

2.4.1 Insulina NPH

L'insulina NPH (*neutral protamine Hagedorn*) o isofano è caratterizzata da una durata d'azione maggiore rispetto all'insulina umana, di 14-24 ore, e da un *onset* ritardato rispetto alle insule prandiali, di 1-2 ore. Questo profilo deriva dalla sua formulazione come insulina cristallizzata in presenza di sali di protamina: la presenza di esameri in forma cristallina rallenta il processo di dissociazione dopo la somministrazione sottocutanea, mentre la successiva diluizione nel tessuto determina una concentrazione di insulina disponibile per l'assorbimento significativamente ridotta rispetto a quella somministrata (da circa 10^{-4} M a 10^{-5} - 10^{-8} M). Le specialità medicinali attualmente disponibili sono *Humulin I* e *Protaphane*. Il profilo farmacocinetico di questa insulina non consente la singola somministrazione giornaliera per un rischio piuttosto elevato di ipoglicemia notturna. Il regime posologico per questa insulina prevede, perciò, la somministrazione di piccole dosi più volte al giorno in combinazione con l'insulina prandiale durante i pasti e un'ultima dose serale. Questo schema sebbene permetta un miglior controllo dei picchi glicemici postprandiali e tardivi e un minor rischio di eventi ipoglicemici comportava la criticità delle quattro somministrazioni giornaliere, oltre alle tre di insulina prandiale. L'introduzione degli analoghi basali a lunga durata d'azione ha progressivamente sostituito questo schema posologico. [26]

2.4.2 Insulina NPL

L'insulina NPL (*neutral protamine lispro*) è un'insulina ad azione intermedia ottenuta mediante cristallizzazione dell'insulina ad azione rapida lispro in presenza di sali di protamina. Analogamente all'insulina NPH, la formazione di esameri cristallizzati determina un rallentamento della dissociazione, conferendo una durata d'azione prolungata rispetto all'insulina lispro non protaminata. Dal punto di vista farmacocinetico, l'insulina NPL presenta, quindi, caratteristiche sovrapponibili a quelle della NPH, con una durata d'azione di 14-24 ore e un *onset* di 1-2 ore. Rispetto all'insulina NPH, la letteratura disponibile sulla NPL è più limitata, poiché il suo impiego clinico è stato prevalentemente circoscritto alle formulazioni premiscelate, nelle quali fornisce la componente basale in associazione all'insulina lispro. La preparazione è stata commercializzata anche come *Humalog basal*, sebbene il suo utilizzo sia oggi principalmente rappresentato dalle sospensioni bifasiche *Humalog Mix*. [26]

2.5 Insuline basali

Come affermato in precedenza, la terapia sostitutiva insulinica nei pazienti diabetici di tipo 1 consiste nella somministrazione di un'insulina prandiale più volte al giorno in corrispondenza dei pasti in combinazione con un'insulina basale. La somministrazione di insulina basale (*long acting* o a lunga durata d'azione), infatti, è un elemento imprescindibile nella terapia del diabete mellito di tipo 1, sempre in combinazione all'insulina prandiale, ma spesso è richiesta anche per la gestione del diabete mellito di tipo 2 nel caso di iperglicemia significativa (glicemia al di sopra di 300 mg/dL o HbA1c al di sopra del 10%) o sintomatica o se vi sono segni di catabolismo come calo ponderale, ipertrigliceridemia o chetosi. L'impiego delle insuline basali è, infatti, raccomandato dalle linee guida della Società

Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione Medici Diabetologi (AMD) e dell'*ADA* in quanto esse sono caratterizzate da una durata d'azione prolungata, un basso picco farmacocinetico, quindi, un profilo farmacocinetico più piatto, e un ridotto rischio di ipoglicemia. A differenza delle insuline ad azione rapida ed ultrarapida che devono essere somministrate immediatamente prima dei pasti, le insuline basali vengono solitamente somministrate una o due volte al giorno. Negli ultimi venti anni la ricerca si è focalizzata sullo sviluppo di analoghi dell'insulina basale a lunga durata d'azione con profili farmacocinetici e farmacodinamici meno variabili, più affidabili e più piatti in modo da ridurre il rischio di ipoglicemia. La prima generazione di insuline basali a lunga durata d'azione è rappresentata dall'insulina glargine U100 e detemir. [2], [26]

2.5.1 Insulina glargine U100

L'insulina glargine U100 è il primo analogo di insulina a lunga durata d'azione introdotto negli USA nel 2000 e commercializzato nel 2001 con il nome commerciale *Lantus*. La molecola presenta la sostituzione dell'asparagina con la glicina in posizione 21 della catena A e l'estensione della catena B con due residui di arginina (B31-B32), carichi positivamente. Queste due cariche positive aggiunte spostano il punto isoelettrico della molecola da 5,4 a 6,7, ovvero verso il pH fisiologico: questo rende necessaria una formulazione a pH acido, in cui la molecola risulta solubile, mentre al pH neutro del sito di iniezione la solubilità si riduce drasticamente. La conseguente precipitazione forma un deposito di microprecipitati nel tessuto sottocutaneo, da cui l'insulina viene rilasciata lentamente, estendendo la sua durata d'azione a 20-24 ore. Questo meccanismo determina un profilo farmacocinetico caratterizzato da assorbimento prolungato e picco plasmatico ridotto. [5], [26]

2.5.2 Insulina detemir

L'insulina detemir è un derivato acilato dell'insulina umana, ottenuto mediante legame di un acido grasso a 14 atomi di carbonio (gruppo miristoile) alla lisina in posizione B29, con eliminazione della treonina in B30. La catena acilica consente alla molecola di legarsi all'albumina sia a livello del tessuto sottocutaneo, formando un deposito locale, sia in circolo, prolungandone la permanenza in circolazione e rallentando la clearance, determinando così un profilo d'azione prolungato, con una durata fino a circa 24 ore. La specialità medicinale attualmente in commercio è *Levemir*. [5], [26]

Le insuline basali di prima generazione garantiscono un buon controllo glicemico, con un profilo privo di picchi pronunciati e comportano un rischio inferiore di eventi ipoglicemici rispetto alle insuline a intermedia durata d'azione. Tuttavia, a causa delle emivite ridotte, soprattutto nel caso della detemir, non consentono la singola somministrazione giornaliera. [26]

2.5.3 Insuline basali di seconda generazione

Dalle criticità emerse dalle insuline basali di prima generazione si è sviluppata la seconda generazione di analoghi basali con durata d'azione superiore alle 24 ore, ovvero l'insulina degludec e glargine U300. [26]

2.5.3.1 Insulina degludec

L'insulina degludec è un derivato acilato dell'insulina umana, caratterizzato da un acido grasso a 16 atomi di carbonio (acido

esadecanedioico), legato tramite un distanziatore γ -glutammilico alla lisina in posizione B29, con eliminazione della treonina in B30. Queste modifiche strutturali sono state progettate per prolungare la durata d'azione attraverso due meccanismi complementari: la formazione di un deposito sottocutaneo e il legame reversibile con l'albumina nel tessuto sottocutaneo e nel circolo ematico. Dopo l'iniezione sottocutanea e la perdita del conservante fenolico, i di-esameri T₃R₃ nella formulazione a base di insulina degludec si autoassociano a formare delle catene di multi-esameri T₆ stabilizzate dalle interazioni tra acidi grassi e ioni zinco di molecole adiacenti. Da questo deposito l'insulina viene rilasciata in maniera lenta e continua sottoforma di monomeri, determinando un assorbimento graduale. Il legame con l'albumina contribuisce, inoltre, a prolungare la permanenza nella circolazione sistemica e rallentare la clearance. Tutto ciò determina una durata d'azione superiore a 42 ore e un profilo d'azione complessivamente piatto, ovvero senza significative variazioni giornaliere. Grazie a queste proprietà, l'insulina degludec, commercializzata con il nome *Tresiba*, consente di ottenere un minor rischio di ipoglicemia, inclusa l'ipoglicemia grave notturna, rispetto alle insuline basali di prima generazione, in particolare l'insulina glargine U100. Inoltre, l'insulina degludec ha dimostrato una riduzione dell'ipoglicemia notturna grave e sintomatica, una riduzione della dose di insulina e una maggiore flessibilità nell'orario di somministrazione, rispetto all'insulina glargine U300, un'altra insulina basale di seconda generazione. [2], [5], [26]

2.5.3.2 Insulina glargine U300

L'insulina glargine U300 ha la stessa sequenza amminoacidica dell'insulina glargine U100 e lo stesso meccanismo che determina una durata d'azione prolungata. È, però, una formulazione più concentrata

dell'insulina glargine. La concentrazione tre volte maggiore determina differenti caratteristiche farmacocinetiche. Dopo l'iniezione sottocutanea, la formazione del precipitato nel tessuto sottocutaneo avviene analogamente alla formulazione U100; tuttavia, il volume di iniezione inferiore determina la formazione di un deposito più compatto e con una superficie di diffusione ridotta. Ciò rallenta ulteriormente il rilascio di monomeri verso la circolazione sistemica, determinando una durata d'azione ancora più prolungata, pari a circa 30-34 ore. Queste caratteristiche si traducono in un profilo d'azione complessivamente piatto, con una minore variabilità dell'effetto ipoglicemizzante nel corso delle 24 ore. Di conseguenza, l'insulina glargine U300, commercializzata con il nome *Toujeo*, consente un controllo glicemico più stabile e con un minor rischio di eventi ipoglicemici notturni e diurni rispetto all'insulina glargine U100. [26]

Nonostante l'elevata efficacia terapeutica, il ridotto rischio di eventi ipoglicemici e la possibilità di una sola somministrazione giornaliera offerti dalle attuali insuline basali di seconda generazione permangono dei problemi per l'avvio della terapia insulinica. In particolare, molti pazienti tendono a ritardarne l'inizio a causa della scarsa accettazione della necessità di effettuare un'iniezione quotidiana di insuline basali, in aggiunta a quelle di insuline prandiali. A tale aspetto si aggiungono ulteriori criticità, comuni a tutte le formulazioni insuliniche iniettabili, quali il timore dell'ipoglicemia, il possibile aumento di peso, la paura delle iniezioni e la percezione di una riduzione della qualità di vita. L'insieme di questi fattori influenza negativamente l'aderenza terapeutica. [26]

2.6 Limiti della terapia insulinica convenzionale

Nonostante la terapia insulinica sia essenziale e imprescindibile per la sopravvivenza delle persone affette da diabete mellito di tipo 1 e per il raggiungimento di una prospettiva di vita pari agli individui sani, essa è tuttora associata a numerosi limiti. Uno dei principali limiti della terapia convenzionale è rappresentato dalla necessità di iniezioni sottocutanee per la somministrazione di insulina, una modalità piuttosto invasiva e gravosa per molti pazienti. In alcuni soggetti subentra anche la paura delle iniezioni e la fobia degli aghi. Inoltre, le ripetute iniezioni possono determinare complicanze locali nel sito di somministrazione, quali lipodistrofia e lipertrofia del tessuto adiposo, reazioni allergiche, eritema, prurito, dolore, indurimento cutaneo e, più raramente, ascessi o infezioni. [2], [5], [28]

Oltre agli aspetti legati all'accettabilità da parte del paziente, la via sottocutanea presenta importanti limiti di natura fisiopatologica. A differenza dell'insulina endogena, secreta dalle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas e indirizzata inizialmente verso il fegato attraverso la circolazione portale, l'insulina somministrata per via sottocutanea raggiunge dapprima la circolazione periferica e solo successivamente il fegato. Di conseguenza, affinché una quantità sufficiente di insulina raggiunga il fegato, è necessario che la sua concentrazione plasmatica periferica sia circa 3-4,5 volte superiore rispetto ai valori fisiologici, poiché solo una quota limitata dell'insulina somministrata (circa il 20%) raggiunge effettivamente la circolazione portale. Ciò determina una condizione di iperinsulinemia periferica non fisiologica, associata a numerose conseguenze a livello metabolico, tra cui un aumento del rischio di ipoglicemia, l'inibizione della lipolisi con conseguente incremento dell'accumulo di tessuto adiposo e aumento di peso, nonché la possibile comparsa di insulino-resistenza soprattutto a livello muscolare. La somministrazione sottocutanea, pertanto, non è in

grado di riprodurre il percorso fisiologico dell'insulina endogena né la sua distribuzione preferenziale a livello epatico. [25]

Ulteriori criticità riguardano le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche delle formulazioni a base di insulina attualmente disponibili; sebbene lo sviluppo degli analoghi dell'insulina ad azione rapida e ultrarapida abbia consentito un significativo miglioramento del controllo glicemico postprandiale rispetto all'insulina umana regolare, tali formulazioni non sono ancora in grado di riprodurre fedelmente il rapido incremento della concentrazione plasmatica insulinica che si verifica fisiologicamente dopo un pasto. L'assorbimento dal tessuto cutaneo richiede, infatti, un intervallo di tempo inevitabile, determinando un'insorgenza d'azione più lenta rispetto alla secrezione endogena e una durata dell'effetto più prolungata. Ciò si traduce in un inadeguato contrasto del picco glicemico postprandiale, esponendo le persone con diabete a iperglicemia postprandiale, seguito da una prolungata attività insulinica responsabile di ipoglicemia postprandiale tardiva. Analogamente, anche gli analoghi basali, pur garantendo profili di assorbimento più stabili rispetto alle precedenti formulazioni, non riescono a mimare perfettamente la secrezione basale fisiologica dell'insulina e richiedono un'ulteriore iniezione giornaliera. [5]

La terapia insulinica continua, inoltre, a essere associata a complicanze rilevanti, tra cui il rischio di aumento di peso e, soprattutto, di ipoglicemia. Quest'ultima rappresenta ancora oggi il principale limite della terapia insulinica e il fattore che maggiormente ostacola il raggiungimento di un controllo glicemico ottimale. Gli episodi ipoglicemici, in particolare quelli gravi o notturni, possono compromettere significativamente la qualità di vita, causare alterazioni cognitive e determinare una marcata paura dell'ipoglicemia. Tale timore induce frequentemente i pazienti ad adottare comportamenti compensatori, quali la riduzione volontaria delle dosi di

insulina o il mantenimento di valori glicemici intenzionalmente superiori agli obiettivi terapeutici, con conseguente peggioramento del compenso metabolico. Sebbene gli analoghi insulinici di ultima generazione abbiano ridotto l'incidenza delle ipoglicemie, questo rischio non è stato completamente eliminato e continua a rappresentare una delle principali sfide della terapia insulinica. [15]

Accanto ai limiti farmacologici, un ruolo altrettanto rilevante è svolto dall'elevato carico gestionale che caratterizza la terapia insulinica convenzionale. Il trattamento richiede, infatti, un costante monitoraggio della glicemia, numerose iniezioni giornaliere, l'adattamento delle dosi in funzione dell'alimentazione, dell'attività fisica, dello stato di salute e di numerosi altri fattori che influenzano il fabbisogno insulinico. Tale complessità rende la terapia particolarmente impegnativa per molte categorie di pazienti, soprattutto bambini, adolescenti, anziani e persone con limitata autonomia, contribuendo alla percezione della terapia come restrittiva, rigida e difficile da integrare nella vita quotidiana. [5], [15]

L'impatto della terapia insulinica si estende inevitabilmente anche alla sfera psicologica e sociale; i pazienti diabetici percepiscono una riduzione della qualità legata alla necessità di programmare costantemente i pasti, pianificare l'attività fisica, effettuare controlli glicemici frequenti e praticare le iniezioni anche in contesti lavorativi, scolastici o sociali. Tutti questi aspetti possono generare un persistente senso di dipendenza dalla terapia. A ciò si il cosiddetto *burnout del diabete*, una condizione di stress, oppressione, stanchezza psicologica, frustrazione legata alla gestione quotidiana per tutta la vita della malattia. [5]

Nel complesso, tutti questi limiti contribuiscono a rendere particolarmente difficile il raggiungimento di un controllo glicemico adeguato stabile e duraturo. Nonostante i notevoli progressi compiuti nello sviluppo di analoghi insulinici sempre più evoluti, solo una minoranza di pazienti con

diabete mellito di tipo 1 (circa il 20%) riesce a raggiungere gli obiettivi glicemici raccomandati dall'*ADA*. Il mancato raggiungimento di tali target si associa a un maggior rischio di complicanze acute e croniche, un aumento del numero di accessi al pronto soccorso e di ricoveri ospedalieri e un incremento dei costi dell'assistenza medica ambulatoriale e ospedaliera con un impatto drastico non solo da un punto di vista sociale in termini di qualità della vita e benessere del paziente ma anche economico per la sostenibilità dei sistemi sanitari. Pertanto, le criticità della terapia insulinica convenzionale costituiscono il principale razionale per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative, finalizzate a riprodurre in maniera più fedele la fisiologia della secrezione insulinica, ridurre il rischio di ipoglicemia, semplificare la gestione quotidiana della malattia e migliorare, nel complesso, la qualità di vita delle persone con diabete mellito di tipo 1. [2], [5]

Capitolo 3 Scopo della tesi

Il presente elaborato si propone di analizzare l'evoluzione e la direzione della ricerca terapeutica nel diabete mellito di tipo 1 nel decennio 2015-2025, con particolare attenzione alle strategie sviluppate per superare le limitazioni delle terapie convenzionali, discusse nel Capitolo 2, e alle più recenti innovazioni terapeutiche insuliniche e non insuliniche.

Nonostante i progressi ottenuti nell'ambito della terapia insulinica sostitutiva e la disponibilità di numerose opzioni terapeutiche, permangono limitazioni rilevanti che ostacolano il raggiungimento di un controllo glicemico ottimale, come discusso nel paragrafo conclusivo del Capitolo 2. La ricerca degli ultimi anni si è pertanto concentrata sullo sviluppo di strategie innovative volte a migliorare efficacia, sicurezza e aderenza terapeutica. Parallelamente, la ricerca ha riguardato anche lo sviluppo di dispositivi tecnologici avanzati per la somministrazione e il monitoraggio dell'insulina; questi aspetti, di natura prevalentemente ingegneristica, non saranno tuttavia approfonditi nel presente elaborato, in quanto esulano dall'approccio farmacologico, farmaceutico e chimico qui adottato.

Nel presente elaborato verranno pertanto trattate le innovazioni terapeutiche secondo tre direttrici principali: in primo luogo, le modifiche strutturali della molecola di insulina finalizzate a variarne emivita, assorbimento e biodisponibilità. In questo contesto saranno descritte le insuline basali settimanali, quali l'insulina icodec ed efsitora alfa, in grado di semplificare la gestione terapeutica, le nuove insuline prandiali *short acting*, come BioChaperone lispro, sviluppate per riprodurre più fedelmente la risposta insulinica fisiologica ai pasti, le formulazioni contenenti un'insulina basale e una prandiale, come BioChaperone glargine lispro, e le innovative insuline glucosio-sensibili, come NNC2215, capaci di modulare la propria attività biologica in funzione

della glicemia. In secondo luogo, verrà analizzato lo sviluppo di vie di somministrazione alternative a quella sottocutanea, con particolare attenzione alla via nasale e orale, con l'obiettivo di migliorare la compliance del paziente e riprodurre in maniera fedele il percorso fisiologico dell'insulina. In terzo luogo, verrà presa in esame l'elaborazione di terapie avanzate non insuliniche volte al ripristino della secrezione endogena insulinica e alla preservazione della funzionalità residua delle cellule β pancreatiche, quali il trapianto di pancreas o di isole pancreatiche, le terapie basate sull'impiego di cellule staminali e l'immunoterapia. Inoltre, verrà approfondito l'impiego di terapie adiuvanti in associazione alla terapia insulinica, tra cui metformina e agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone, che contribuiscono a migliorare il controllo glicemico, ridurre il fabbisogno insulinico giornaliero e mitigare alcuni importanti effetti indesiderati associati alla terapia insulinica.

Capitolo 4 Insuline innovative

4.1 Insuline basali settimanali

Le insuline basali settimanali si configurano come una valida alternativa alle insuline basali quotidiane precedentemente descritte, quali glargine, degludec e detemir. Le insuline basali settimanali rappresentano nuove formulazioni di insulina ricombinante a rilascio prolungato con un'azione ultralunga progettate per alleggerire il carico gestionale della patologia per i pazienti diabetici e migliorare l'aderenza terapeutica, al contempo riducendo gli effetti indesiderati e preservando efficacia e sicurezza, in quanto si riduce la frequenza delle somministrazioni a una singola iniezione una volta alla settimana anziché quotidianamente (una/due volte al giorno), anche se la via di somministrazione rimane quella sottocutanea. [2], [26]

Diversi sono stati gli approcci studiati per rallentare l'assorbimento degli analoghi dell'insulina e aumentarne l'emivita, come la fusione con la regione costante Fc modificata di anticorpi umani di analoghi dell'insulina o insuline ricombinanti native a catena singola (es. efsitora alfa, HM12460A e HM12470) o PEGilata (es. analogo dell'insulina AB101) o ancora come l'acilazione di analoghi dell'insulina con catene di acidi grassi di diversa lunghezza. Tuttavia, molte di queste insuline hanno interrotto gli studi clinici e non sono più in fase di sviluppo attivo. Solo due analoghi basali settimanali hanno proseguito gli studi clinici fino alla fase III o addirittura fino all'immissione in commercio. [26]

4.1.1 Insulina icodec

L'insulina icodec rappresenta un'importante innovazione nel panorama delle insuline basali, configurandosi come il primo analogo ricombinante dell'insulina umana settimanale a somministrazione sottocutanea.

Approvata dall'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) nel marzo 2024 con il nome commerciale *Awigli* (sviluppata da Novo Nordisk), la molecola ha superato con successo il programma clinico ONWARDS, che ha coinvolto complessivamente oltre 4 mila pazienti adulti (3746 con diabete mellito di tipo 2 e 580 di tipo 1). Icodec ha mostrato un'azione ipoglicemizzante costante indipendente dal sito d'iniezione sottocutanea (parte superiore del braccio, addome, coscia), la non inferiorità in termini di riduzione media dei valori di HbA1c e la comparabilità del profilo di sicurezza rispetto agli analoghi basali disponibili ad oggi. [2]

La somministrazione settimanale di questa insulina ricombinante è resa possibile dalle modifiche apportate all'insulina umana, evidenziate nella *Figura 9*. Nella catena A la tirosina in posizione A14 è sostituita con glutammato (A14E); nella catena B la tirosina in B16 è sostituita con istidina (B16H) e la fenilalanina in B25 con istidina (B25H). È stata eliminata la treonina terminale in posizione B30. La lisina in B29 è coniugata, tramite un linker idrofilo miniPEG-γGlu (acidoγ-glutammico e un piccolo linker simile al PEG), a un acido grasso 1,20-icosanedioico (20 atomi di carbonio). [29]

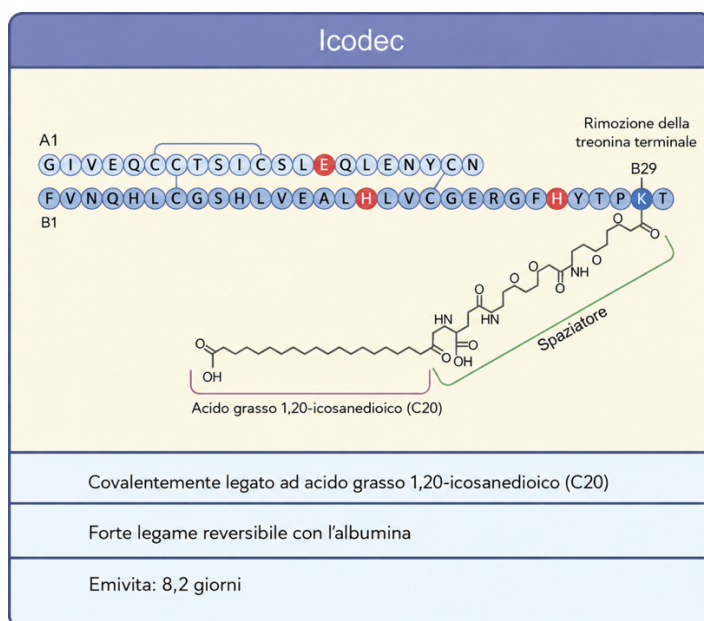


Figura 9. Rappresentazione schematica della struttura primaria dell'insulina icodec (adattata da [30])

Le tre sostituzioni nella sequenza amminoacidica conferiscono stabilità alla degradazione proteolitica, aumentano la solubilità e riducono l'affinità per l'IR, rallentando la clearance mediata dall'internalizzazione recettoriale al fine di conferire un'azione più lenta e prolungata nel tempo. In particolare, ogni singola sostituzione amminoacidica contribuisce ad abbassare l'affinità per l'IR: A14E: all'80%, B16H: al 22%, B25H: al 30% rispetto all'insulina umana. Studi in vitro confermano che tale ridotta affinità non ne compromette l'efficacia biologica né altera le vie di segnalazione a valle del recettore, ma si traduce esclusivamente in una cinetica di attivazione più lenta. Inoltre, la coniugazione con l'acido grasso determina una maggiore capacità da parte dell'insulina in forma monomerica di legarsi ai siti di legame dell'albumina sierica umana (HSA) a livello del circolo sanguigno in modo reversibile e particolarmente forte tanto che il legame dell'insulina icodec con l'albumina sia circa sette volte e mezzo maggiore rispetto all'insulina degludec e circa nove volte e mezzo rispetto alla detemir, come mostrato nella *Figura 10*. L'aggiunta dell'acido grasso 1,20-icosanedioico segue il principio dell'estensione dell'emivita tramite catene lipidiche già applicato all'insulina detemir e degludec. Studi preclinici condotti su cani hanno dimostrato che l'aumento del numero di atomi di carbonio della catena dell'acido grasso è associato a un incremento dell'emivita del farmaco, attribuibile alla maggiore affinità di legame con l'albumina (*Figura 11*). L'effetto combinato di queste proprietà determina un'emivita plasmatica dell'insulina icodec di 196 ore (circa 8 giorni), garantendo un profilo farmacocinetico ultralungo e una distribuzione pressoché uniforme dell'effetto ipoglicemizzante durante tutta la settimana. [29]

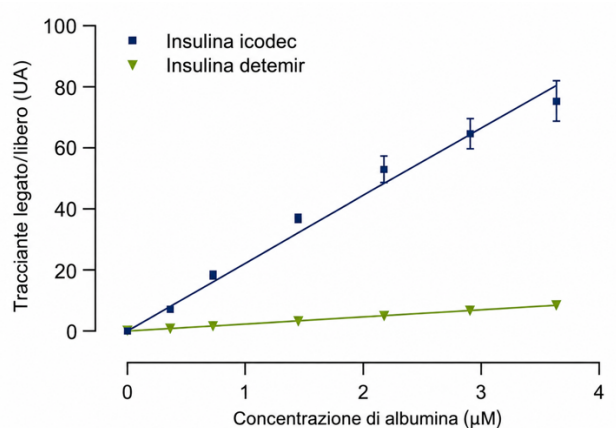


Figura 10. Rappresentazione grafica del confronto dell'affinità di legame per l'albumina dell'insulina icodec e detemir (adattata da [29])

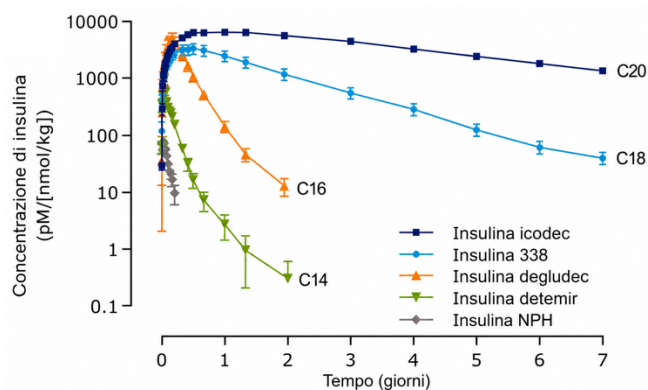


Figura 11. Illustrazione grafica dei profili farmacocinetici delle insuline basali e intermedie in seguito a singola somministrazione in cani (adattata da [29])

Il tempo medio per raggiungere la concentrazione plasmatica massima (t_{max}) è di 16 ore e nella maggior parte dei soggetti lo stato stazionario, ovvero il momento in cui la velocità di eliminazione eguaglia la velocità di assorbimento, viene raggiunto entro 3-4 settimane dall'inizio della somministrazione una volta a settimana dell'insulina icodec, valori nettamente diversi rispetto alle formulazioni basali disponibili in commercio ad oggi, come mostrato nella *Tabella 4*. [29]

Insulina, tipo	T $\frac{1}{2}$ (h)	Tmax (h)	Stato stazionario (giorno)
Insulina NPH	4.4	8	N / A
Insulina detemir	7	8	2–4
Glargine U100	12.1	8–12	2–4
Glargine U300	19.0	12–16	3–5
Degludec	25.4	10–12	2–3
Icodec	196	16	21–28

Abbreviazioni: h = ore; N/A = non disponibile; NPH = Neutral Protamine Hagedorn.

Tabella 4. Illustrazione schematica dei parametri farmacocinetici delle insuline basali e intermedie (riprodotta da [2])

A differenza della terapia insulinica convenzionale la quale è molto sensibile alle variazioni dell'orario di somministrazione con il rischio di iperglicemia per una quantità insufficiente di insulina e di ipoglicemia per una quantità eccessiva, l'insulina icodec presenta una maggiore flessibilità terapeutica. Le modifiche strutturali introdotte nella molecola e la sua lunga emivita determinano, una volta raggiunto lo stato stazionario, un'elevata stabilità delle concentrazioni plasmatiche. Di conseguenza, modeste variazioni dell'orario di iniezione o della dose somministrata producono effetti limitati sull'attività ipoglicemizzante. Inoltre, mentre l'insulina detemir e degludec prolungano la propria azione formando di-esameri e multi-esameri nel tessuto sottocutaneo, se ciò avvenisse anche per icodec porterebbe a irritazione locale o immunogenicità. Per questo motivo l'insulina icodec si dissocia rapidamente in monomeri nel sottocute. Il deposito inattivo si sposta, quindi, nel torrente circolatorio tramite il legame con l'albumina, prevenendo il rischio di ipoglicemia acuta da sovradosaggio iniziale. La *Figura 12* consente una più chiara comprensione del meccanismo d'azione dell'insulina icodec e degli eventi che si susseguono dalla prima iniezione fino al raggiungimento dello stato stazionario. Il pannello A1 mostra la prima iniezione di icodec (azzurro) che, dopo la dissociazione in monomeri nel tessuto sottocutaneo e il

passaggio in circolo, si lega all'albumina (grigio) e inizia a costituire un deposito innattivo, mentre una frazione raggiunge i tessuti bersaglio determinando un lieve effetto ipoglicemizzante che aumenta gradualmente durante la prima settimana (pannello B punto 1); i pannelli A2 e B punto 2 mostrano la presenza di una quota significativa di insulina legata all'albumina dopo una settimana dall'iniezione; il pannello A3 mostra l'ulteriore formazione di deposito di insulina legata all'albumina che determina un effetto ipoglicemizzante (pannello B punto 3) che si protrae anche grazie alle successive iniezioni settimanali fino al raggiungimento dello stato stazionario dopo 3-4 settimane (pannello A4 e B punto 4). Il punto 4 del pannello B mostra l'ottenimento di un effetto ipoglicemizzante dell'insulina icodec (curva blu) simile a quello dell'insulina glargine U100 somministrata quotidianamente (curva grigia). [29]

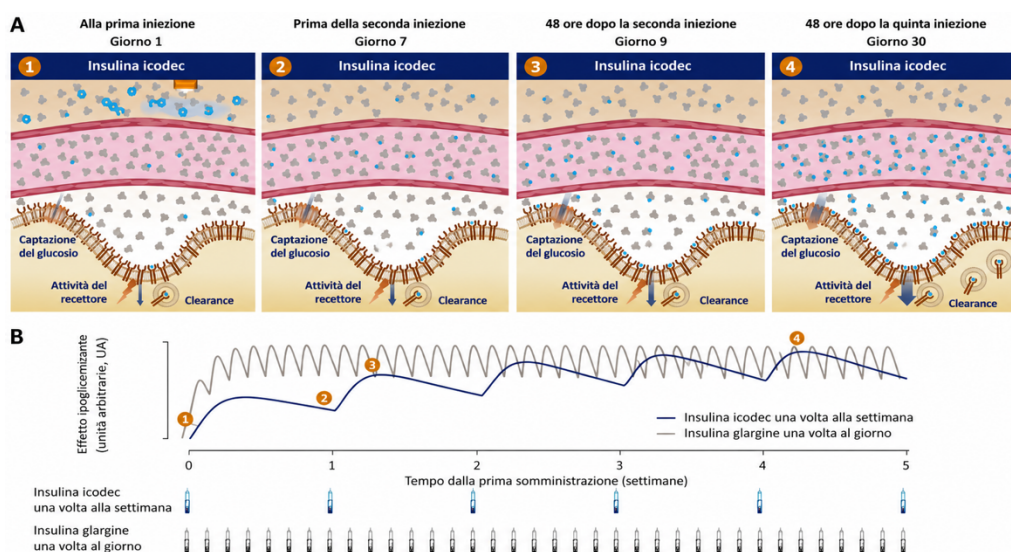


Figura 12. Illustrazione grafica del meccanismo d'azione dell'insulina icodec (adattata da [29])

In termini di profilo rischio-beneficio, in studi di fase II condotti su pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 sia naive sia precedentemente trattati con insulina la somministrazione settimanale di insulina icodec ha dimostrato un'efficacia comparabile alla somministrazione quotidiana di insulina glargine U100 nei pazienti senza precedente trattamento con insulina in termini di riduzione dei livelli di HbA1c. Inoltre, entrambi i

gruppi trattati con icodec e glargine U100 hanno mostrato una bassa incidenza di ipoglicemia di tipo 2 e di tipo 3 e nello specifico la percentuale di pazienti che ha raggiunto livelli di HbA1c inferiori a 7,0% senza sviluppare ipoglicemia di tipo 2 e 3 è stata più alta nei pazienti trattati con icodec rispetto a glargine U100 e per questi pazienti è stato anche maggiore il tempo trascorso nell'intervallo glicemico target 70-180 mg/dL (TIR *time in range*). Altro dato importante è che per pazienti che hanno effettuato il passaggio all'utilizzo di insulina icodec l'aggiunta di una dose extra del 50% di icodec alla prima somministrazione ha portato a un controllo glicemico ottimale senza iperglicemia transitoria a digiuno o aumento del rischio di ipoglicemia di tipo 2 rispetto ai pazienti che sono passati a insulina glargine U100. Grazie alle modifiche amminoacidiche (A14E e B25H) che ne aumentano la solubilità, icodec è formulata in forma altamente concentrata (4,2 mM/700 U, una concentrazione sette volte superiore a glargine U100). Ciò consente di mantenere il volume di un'unica iniezione settimanale equivalente a quella di una singola dose giornaliera di glargine U100. A partire da questi risultati, come precedentemente accennato, è stato sviluppato il programma di 6 studi clinici randomizzati multicentrici di fase III ONWARDS (*Once weekly insulin icodec phase III programme*), volto a valutare l'efficacia (con endpoint primario la variazione dei livelli di HbA1c) e la sicurezza (con endpoint il tasso di ipoglicemia di tipo 2 o 3 per paziente-anno di esposizione) dell'insulina icodec somministrata una volta a settimana rispetto alle insuline basali una volta al giorno (degludec, glargine U100 e glargine U300) in diversi contesti clinici, in particolare, come indicato nella *Tabella 5*, cinque RCT (*Randomized Controlled Trial*) hanno arruolato pazienti con diabete mellito di tipo 2 e uno di tipo 1, due di questi sei RCT hanno messo a confronto l'insulina icodec con la degludec in pazienti naive all'insulina (ONWARDS 3) e in pazienti precedentemente sottoposti al trattamento insulinico (ONWARDS 2). Inoltre, negli studi

ONWARDS 1 e 5 sono stati arruolati pazienti con diabete mellito di tipo 2 naive all'insulina mentre in ONWARDS 4 e 6 rispettivamente pazienti con diabete mellito di tipo 2 e di tipo 1 però precedentemente trattati con insulina basale-bolo (insulina basale in combinazione con insulina prandiale aspart ad azione ultrarapida). [2]

Studio	Disegno	N. di partecipanti	Popolazione	Comparatore	Trattamento di base	Durata (settimane)
Icodec						
ONWARDS 1	Studio in aperto	984	Partecipanti naive con DM2	Glargine U100	Qualsiasi farmaco non insulinico	78
ONWARDS 2	Studio in aperto	526	Partecipanti trattati con insulina con DM2	Degludec	Insulina basale ± farmaci ipoglicemizzanti non insulinici	26
ONWARDS 3	Doppio cieco	588	Partecipanti naive con DM2	Degludec	Qualsiasi farmaco non insulinico	26
ONWARDS 4	Studio in aperto	582	Partecipanti trattati con insulina con DM2	Glargine U100	Multiple iniezioni giornaliere di insulina ± farmaci non insulinici	26
ONWARDS 5	Studio in aperto	1085	Partecipanti naive con DM2	Glargine U100/300 e degludec	Qualsiasi farmaco non insulinico	52
ONWARDS 6	Studio in aperto	583	Partecipanti con DM1	Degludec	Multiple iniezioni giornaliere di insulina	52

Tabella 5. Rappresentazione schematica di riepilogo del programma clinico ONWARDS (adattata da [30])

In questi studi sono stati per lo più confermati i risultati ottenuti negli studi di fase II con una percentuale di pazienti che hanno raggiunto i livelli di HbA1c inferiori a 7,0% senza ipoglicemia di livello 2 o 3 statisticamente superiore, come mostrato nella *Figura 13*, una riduzione dei livelli di HbA1c e un tempo nell'intervallo glicemico target maggiori nei pazienti trattati con icodec rispetto alle insuline basali giornaliere glargine U100 per pazienti naive all'insulina (ONWARDS 1), degludec per pazienti precedentemente trattati (ONWARDS 2), degludec per pazienti naive all'insulina (ONWARDS 3) e degludec o glargine U100 o glargine U300 per pazienti naive all'insulina (ONWARDS 5). [2]

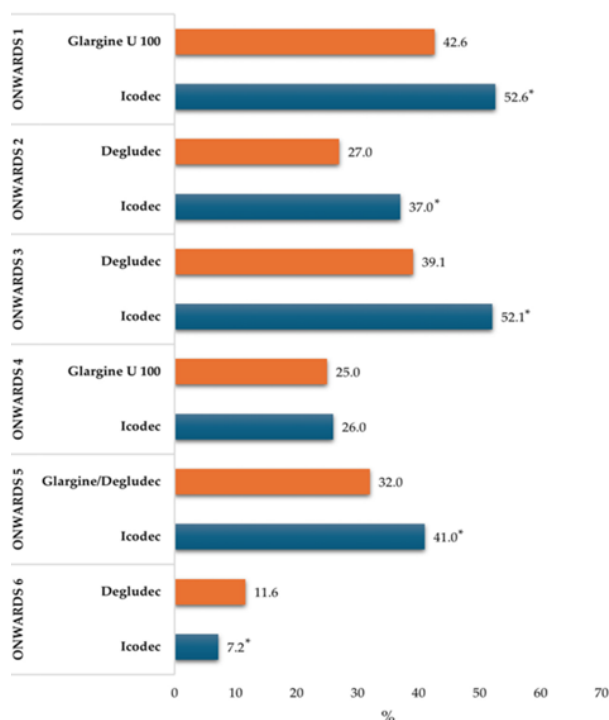


Figura 13. Rappresentazione grafica della percentuale di pazienti che hanno raggiunto livelli di HbA1c <7,0% senza sviluppare ipoglicemia di tipo 1 e 2 nel programma clinico ONWARDS (riprodotta da [2])

Tuttavia, in ONWARDS 4 nei pazienti precedentemente trattati con uno schema basale-bolo icodec ha determinato una riduzione dell'HbA1c maggiore rispetto a glargine U100, senza però tradursi in un aumento significativo del tempo trascorso nell'intervallo glicemico target. La percentuale di soggetti che ha raggiunto un valore di HbA1c inferiore al 7,0% senza sviluppare ipoglicemia di tipo 2 o 3 non è risultata diversa tra i due gruppi. Analogamente, nello studio ONWARDS 6, condotto su 583 pazienti con diabete mellito di tipo 1 e della durata di 52 settimane, l'insulina icodec si è dimostrata non inferiore a degludec nella riduzione media dell'HbA1c ma è stata associata a una percentuale minore di pazienti che hanno raggiunto valori di HbA1c inferiori a 7,0% senza eventi ipoglicemici clinicamente significativi o gravi. I tassi di ipoglicemia di livello 2 o 3 sono risultati significativamente più elevati per l'insulina icodec rispetto al gruppo di controllo di pazienti con diabete mellito di tipo 1 precedentemente sottoposti a terapia con insulina bolo-basale, con la

maggior parte degli eventi ipoglicemici verificatisi nelle prime 12 settimane di studio. In conclusione, l'insulina icodec si dimostra non inferiore, e in molti contesti superiore (ONWARDS 1, 2, 3 e 5), agli analoghi giornalieri nel diabete mellito di tipo 2, indipendentemente dal background terapeutico del paziente. Nel diabete mellito di tipo 1 sono, invece, necessarie ulteriori valutazioni cliniche a causa del profilo di sicurezza meno favorevole. Questa insulina basale settimanale non rappresenta solo un'innovazione per le sue caratteristiche farmacologiche pionieristiche ma anche per il suo impatto sociale perché il passaggio dall'assunzione giornaliera a quella settimanale rappresenta un enorme passo in avanti nella gestione del diabete verso una semplificazione della terapia insulinica ancora troppo complessa e dispendiosa (si passa da 365 a sole 52 iniezioni di insulina basale all'anno circa) aumentando così auspicabilmente l'aderenza terapeutica ma anche migliorando la qualità di vita e riducendo i costi sanitari. Permane, tuttavia, la necessità dell'iniezione sottocutanea per la somministrazione la quale ancora rappresenta un grosso scoglio e la co-somministrazione con insuline prandiali in corrispondenza dei pasti principali. [2]

4.1.2 Insulina efsitora alfa

Efsitora alfa, nota anche come insulina basale Fc (BIF *basal insulin Fc*), è anch'essa un'insulina basale settimanale somministrata per via sottocutanea attualmente in fase di sperimentazione clinica. Si tratta di una proteina di fusione altamente ingegnerizzata, come mostrato nella *Figura 14*, strutturata come un omodimero in cui ciascun monomero è costituito da una nuova variante di insulina a catena singola; la catena B è unita alla catena A tramite un breve linker di 7 amminoacidi (linker 1) e la catena A, a sua volta, è fusa covalentemente mediante un linker peptidico interdominio (linker 2) con la frazione costante (Fc)

dell'immunoglobulina G2 (Ig2) umana. I due monomeri sono legati tra di loro a formare l'omodimero tramite ponti disolfuro. [30], [31]

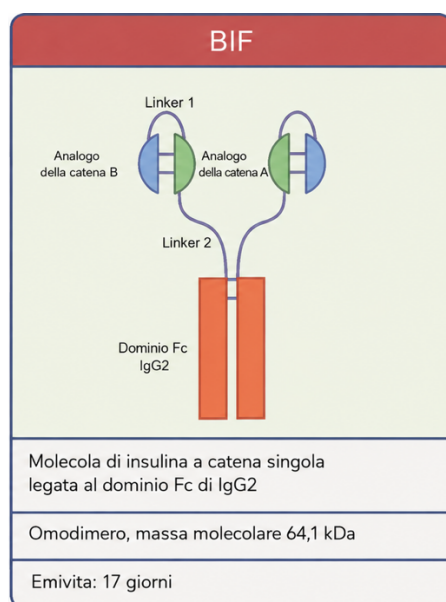


Figura 14. Illustrazione schematica della struttura dell'insulina efsitora alfa (adattata da [30])

L'elevata emivita plasmatica di efsitora alfa (fino a 17 giorni) è determinata dalla fusione covalente con il dominio Fc dell'IgG2. Le IgG, insieme all'albumina, possiedono l'emivita fisiologica più lunga (circa 20 giorni). Efsitora alfa sfrutta il processo definito come sistema di riciclo FcRn o via di salvataggio dell'anticorpo: il dominio Fc dell'IgG2 grazie alla presenza del sito di legame per FcRn (recettore Fc neonatale) è in grado di riconoscere e legare FcRn nell'ambiente endosomiale acido (pH ~ 5,8) in seguito all'assorbimento cellulare per pinocitosi dell'insulina con formazione del complesso FcRn/Fc che impedisce l'avviamento al lisosoma proteggendo così l'anticorpo dalla degradazione. In seguito, quando l'endosoma migra verso la superficie cellulare, a contatto con il pH neutro dell'ambiente extracellulare (pH ~ 7,2), il dominio Fc si dissocia dal complesso FcRn/Fc e ritorna nel sangue, in questo modo si attenua la clearance e si aumenta la durata d'azione ed emivita plasmatica. Quindi, l'insulina efsitora alfa ha una durata d'azione notevolmente lunga. Un secondo meccanismo farmacocinetico ipotizzato riguarda il processo

di convezione, ovvero il lento transito attraverso l'endotelio vascolare tipico delle macromolecole polari ad alto peso idrodinamico, come gli anticorpi. Il compartimento vascolare funge da serbatoio circolante per il farmaco, che diffonde molto lentamente verso i tessuti bersaglio. Anche l'efsitora alfa presenta diverse sostituzioni amminoacidiche (TyrB16Glu, PheB25His, ThrB27Gly, ProB28Gly, LysB29Gly, ThrB30Gly, IleA10Thr, TyrA14Asp e AsnA21Gly), riportate nella *Figura 15*, che conferiscono all'insulina maggiore stabilità chimica e fisica, ridotta tendenza ad autoassociare e ridotta affinità per l'IR, la quale è inferiore di circa due ordini di grandezza rispetto all'insulina endogena, con conseguente ridotta clearance tramite endocitosi mediata dal recettore. Tutti questi aspetti incidono sull'aumento dell'emivita plasmatica e sulla possibilità di somministrare l'insulina efsitora alfa una volta a settimana con il potenziale di ridurre il carico terapeutico dei pazienti diabetici. [30], [31]



Figura 15. Illustrazione schematica della sequenza amminoacidica dell'insulina efsitora alfa (adattata da [31])

L'insulina efsitora alfa ha completato gli studi di fase II condotti su pazienti con diabete mellito di tipo 1 e 2 naive e precedentemente trattati con insuline basali dimostrando un'efficacia simile all'insulina degludec in termini di riduzione media dell'HbA1c rispetto al basale e una minore incidenza di episodi ipoglicemici sia totali che notturni rispetto a degludec. Tuttavia nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 sono emersi valori di HbA1c e di glicemia a digiuno significativamente maggiori rispetto a

degludec. Attualmente è in corso un programma clinico di fase III QWINT (*Once Weekly Insulin Therapy*), composto da cinque studi randomizzati su larga scala volti a confrontare efsitora alfa con gli analoghi giornalieri degludec e glargine U100 (*Tabella 6*). Il programma include pazienti con diabete mellito di tipo 2 naive all'insulina (QWINT 1 e 2) e precedentemente sottoposti a trattamento insulinico (QWINT 3 e 4) e pazienti con diabete mellito di tipo 1 (QWINT 5) allo scopo di valutarne l'efficacia, in termini di variazione dei livelli di HbA1c dal basale (endpoint primario di tutti gli studi) ma anche di tempo trascorso nell'intervallo glicemico target (70-180 mg/dL o 3,9-10 mmol/L) e la sicurezza, in termini di tasso di eventi ipoglicemici di livello 2 e 3 e di tempo trascorso al di sotto o al di sopra dell'intervallo glicemico target, a confronto con le insuline basali somministrate quotidianamente degludec e glargine U100. [30]

Studio	Disegno	N. di partecipanti	Popolazione	Comparatore	Trattamento basale	Durata (settimane)
BIF						
QWINT-1	Studio in aperto	670	Partecipanti naive con DM2	Glargine U100	Almeno un farmaco ipoglicemizzante	52
QWINT-2	Studio in aperto	912	Partecipanti naive con DM2	Degludec	Almeno un farmaco ipoglicemizzante	52
QWINT-3	Studio in aperto	986	Partecipanti in trattamento insulinico con DM2	Degludec	Insulina basale ± fino a tre farmaci non insulinici (esclusi SU)	78
QWINT-4	Studio in aperto	670	Partecipanti in trattamento insulinico con DM2	Glargine U100	Multiple iniezioni quotidiane di insulina	26
QWINT-5	Studio in aperto	670	Partecipanti con DM1	Degludec	Multiple iniezioni quotidiane di insulina	52

Tabella 6. Rappresentazione schematica di riepilogo del programma clinico QWINT (adattata da [30])

I risultati finora ottenuti dagli studi clinici di fase III, in particolare dallo studio QWINT 3 che è lo studio più ampio e di più lunga durata del programma, condotto su pazienti adulti con diabete mellito di tipo 2 precedentemente in terapia insulinica, e dallo studio QWINT 4, unico nel suo genere all'interno del programma in quanto è l'unico studio a valutare l'efficacia e la sicurezza di efsitora alfa somministrata una volta a

settimana in combinazione con un'insulina prandiale (insulina lispro) in pazienti con diabete mellito di tipo 2, evidenziano la non inferiorità dell'insulina efsitora alfa rispetto alla degludec nel primo caso e alla glargine U100 nel secondo in termini di riduzione dei livelli di HbA1c e un profilo di sicurezza comparabile, ovvero senza differenze rilevanti, in termini di rischio di eventi ipoglicemici di livello 2 o 3, oltre all'aumento del tempo nell'intervallo glicemico 70-180 mg/dL, diminuzione del tempo al di sopra dell'intervallo (>180 mg/dL) e lieve aumento non significativo del tempo al di sotto dell'intervallo (<54 mg/dL) durante il trattamento, indicando così efsitora alfa come un'alternativa ben tollerata ed efficace all'insulina basale giornaliera da somministrare una volta a settimana. Inoltre, come per l'insulina icodec anche per questa insulina basale settimanale, negli studi clinici sono stati evidenziati aspetti positivi non solo clinici ma anche sociali, cioè una maggiore soddisfazione da parte dei soggetti. [32], [33]

Considerata la prevalenza di studi condotti su pazienti con diabete mellito di tipo 2 nel programma QWINT, è importante soffermarsi a questo punto sull'analisi dei dati provenienti dallo studio QWINT 5 il quale valuta l'efficacia e la sicurezza dell'insulina efsitora alfa rispetto all'insulina degludec in pazienti con diabete mellito di tipo 1 per contestualizzare le evidenze scientifiche relative alla popolazione di interesse di questa tesi, evidenziando le peculiarità terapeutiche e cliniche di tale gruppo rispetto ai risultati ottenuti nel diabete mellito di tipo 2. Lo studio QWINT 5 di 52 settimane vede l'assegnazione in maniera casuale in rapporto 1:1 di adulti (età superiore a 18 anni) con diabete mellito di tipo 1 ed HbA1c compresa tra 7,0 e 10,0% al trattamento con efsitora alfa una volta a settimana o con degludec una volta al giorno, in combinazione con iniezioni multiple giornaliere di insulina prandiale lispro. Anche in questo caso l'endpoint primario è la variazione di HbA1c rispetto al basale alla settimana 26 e gli endpoint secondari sono il tasso di eventi ipoglicemici di livello 2 o 3, il

tempo trascorso nell'intervallo glicemico target (70-180 mg/dL), la variazione della glicemia a digiuno, il tempo trascorso al di sotto (<54 mg/dL) e al di sopra (>180 mg/dL) dell'intervallo, la variazione di peso corporeo... I risultati hanno dimostrato una diminuzione dei livelli medi di HbA1c alla settimana 26 sia per efsitora che per degludec, in particolare, la variazione media dell'HbA1c è stata di -0,51 punti percentuali per efsitora alfa e -0,56 per degludec dimostrando la non inferiorità di efsitora alfa rispetto a degludec. Inoltre, la percentuale di tempo trascorso nell'intervallo 70-180 mg/dL è stata simile per efsitora alfa e per degludec così come il tempo trascorso al di sotto e al di sopra dell'intervallo e la glicemia media a digiuno è diminuita in entrambi i gruppi senza differenze significative. Tuttavia, durante tutte le 52 settimane sono stati evidenziati tassi più elevati per efsitora alfa di ipoglicemia di livello 2 o 3 (10% rispetto al 3% di degludec), con particolare attenzione alle prime 12 settimane di studio in cui si è verificato il 64% di questi eventi, suggerendo così la necessità di valutazioni più approfondite dell'inizio della terapia con efsitora alfa e dell'ottimizzazione della dose di efsitora alfa nei pazienti con diabete di tipo 1 al fine di mantenere l'efficacia e al contempo diminuire il rischio di ipoglicemia. [34]

In conclusione, le nuove insuline basali a somministrazione settimanale, tra cui l'insulina icodec e l'insulina efsitora alfa, costituiscono una recente innovazione nell'ambito della terapia insulinica, con l'obiettivo di semplificare lo schema terapeutico e favorire una migliore aderenza al trattamento. È tuttavia necessario evidenziare, come precedentemente accennato, che le principali evidenze cliniche attualmente disponibili derivano per la maggior parte da studi condotti su soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2. In tali studi, queste molecole hanno dimostrato un'efficacia sovrapponibile alle insuline basali a somministrazione giornaliera, in particolare per quanto riguarda la riduzione dei livelli di HbA1c, accompagnata da un profilo di sicurezza nel complesso

comparabile. Inoltre, i parametri derivati dal monitoraggio continuo della glicemia indicano un miglioramento del controllo glicemico globale, con un incremento del tempo trascorso nell'intervallo target e una riduzione del tempo in iperglicemia. Nonostante questi risultati promettenti, l'applicabilità diretta di tali evidenze ai pazienti con diabete mellito di tipo 1 richiede cautela in quanto le differenze fisiopatologiche tra le due forme di diabete, in particolare la carenza assoluta di insulina e la maggiore suscettibilità agli episodi ipoglicemici nel diabete di tipo 1, rendono necessaria una valutazione specifica in questa popolazione. Pertanto, i dati provenienti da studi dedicati, come quelli inclusi nel programma ONWARDS (in particolare ONWARDS 6) e QWINT (QWINT 5), risultano essenziali per definire in modo più accurato il ruolo di queste nuove insuline nel trattamento del diabete di tipo 1. Infatti, in questi due studi viene evidenziato come le insuline icodec e efsitora alfa rappresentino una valida e promettente alternativa di insulina basale settimanale nel diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2, tuttavia, a differenza del diabete di tipo 2 nell'1 i benefici in termini di semplificazione della terapia e miglioramento dell'aderenza sono controbilanciati da un aumento del rischio ipoglicemico dato dall'emivita prolungata, rendendo necessaria una valutazione più approfondita della sicurezza nonché la conduzione di ulteriori studi clinici di fase III e di fase IV nel mondo reale con un numero maggiore di partecipanti e periodi di follow up più estesi al fine di ottenere evidenze più solide e conclusioni definitive sull'incidenza, durata e gravità degli episodi ipoglicemici. [35]

4.2 Insulina glucosio-sensibile NNC2215

Uno dei limiti associati alla terapia insulinica attuale, nonostante i numerosi progressi effettuati con gli analoghi ricombinanti dell'insulina, è il rischio di eventi ipoglicemici. Infatti, per riuscire a mantenere i valori

di glicemia all'interno dell'intervallo di normalità è fondamentale adattare le dosi di insulina in funzione dei livelli estremamente fluttuanti e difficilmente prevedibili di glucosio nel sangue. Pertanto, da tempo ci si pone l'obiettivo di sviluppare un'insulina sensibile al glucosio in grado di autoregolare la propria attività biologica in maniera reversibile in base ai livelli di glicemia con lo scopo di migliorare il controllo glicemico e soprattutto attenuare il rischio di ipoglicemia. Diversi sono stati gli studi e le pubblicazioni a proposito, alcuni dei quali ipotizzavano l'utilizzo di polimeri in grado di rilasciare l'insulina da depositi sottocutanei in risposta alle variazioni dei livelli di glicemia, tuttavia presentavano importanti criticità come l'assorbimento lento e ritardato a livello del tessuto sottocutaneo e il rilascio irreversibile per cui una volta liberata l'insulina dal deposito non era più sensibile al glucosio. Nessuno di questi studi ha dimostrato un'efficacia tale da consentirne l'utilizzo per il trattamento del diabete, per cui è nata l'idea di dotare l'insulina stessa di sensibilità al glucosio e di proprietà di risposta reversibile a quest'ultimo. Per fare ciò è necessaria la presenza nella molecola di insulina di un gruppo chimico definito da T. Hoeg-Jensen et al. come “*glucose-sensitive switch*”, ovvero un interruttore in grado di legarsi al glucosio con la massima sensibilità nell'intervallo all'interno del quale variano i valori di glucosio nel sangue nelle persone con diabete (da circa 2 a circa 20-30 mM) in modo tale che, a basse concentrazioni di glucosio, tale interruttore induca una conformazione della molecola chiusa e meno attiva, invece, all'aumentare di tali concentrazioni ci sia una variazione verso uno stato aperto più attivo. Un'opzione ad oggi interessante che persegue il concetto appena esposto è la progettazione dell'insulina NNC2215, ovvero una molecola sviluppata incorporando nell'insulina un glucoside e un macrociclo, come mostrato nella *Figura 16*, il quale funge da interruttore presentando una cavità di legame per il glucosio con elevata affinità a quest'ultimo e selettività rispetto ad altri carboidrati e molecole interferenti. Dal punto di

vista strutturale, la molecola è basata sull'insulina umana priva della treonina terminale in posizione B30. L'estremità N-terminale della fenilalanina in B1 è coniugata a un O1-glucoside tramite un breve linker mentre il gruppo amminico della lisina in B29 a un macrociclo mediante un anello triazolico. [36]

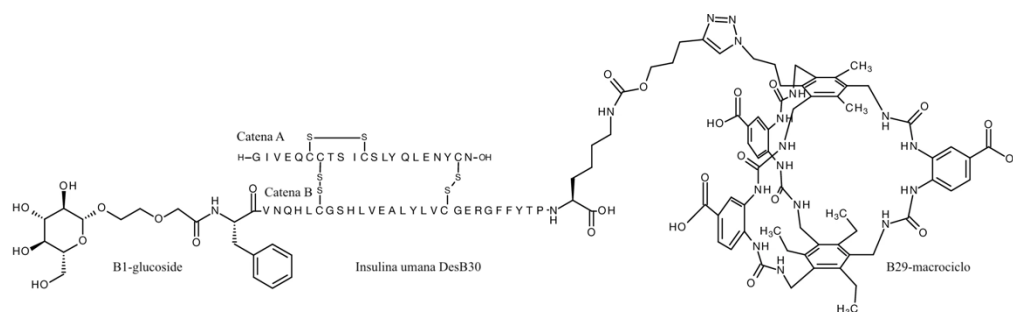


Figura 16. Illustrazione schematica della struttura chimica dell'insulina glucosio-sensibile NNC2215 (adattata da [36])

Questa insulina smart è in equilibrio tra una conformazione aperta attiva ed una conformazione chiusa inattiva. L'equilibrio tra queste due conformazioni è fortemente regolato dalla concentrazione di glucosio presente in soluzione. Come mostrato nella *Figura 17A*, a basse concentrazioni di glucosio la porzione B1-glucoside di NNC2215 si lega all'interno della cavità della porzione B29-macrociclo, portando a un ripiegamento dell'insulina in conformazione inattiva. Al contrario, in presenza di alte concentrazioni di glucosio, questo si lega alla cavità macrociclica, spiazzando il glucoside in B1. Ciò porta a un rilassamento della molecola di insulina verso una conformazione aperta attiva. La *Figura 17B* mostra un modello 3D di NNC2215 in cui si può osservare la differenza della conformazione aperta e chiusa: le superfici bianche e grigie indicano il recettore dell'insulina, lo scheletro dell'insulina è rappresentato come nastri, invece, il glucoside e il macrociclo come bastoncini. Lo stato aperto è rappresentato dal colore giallo e si nota in alto a sinistra di colore arancione il glucosio legato alla cavità di legame del macrociclo giallo e a destra in arancione il glucoside. Invece, lo stato

chiuso è in ciano con il glucoside (arancione a destra) legato al macrociclo (ciano a destra) e si ha anche un'interferenza tra l'estremità C-terminale della catena B dell'insulina, incluso il macrociclo, e il dominio C-terminale del recettore dell'insulina (α -CT) indicato in viola. Si ritiene che sia proprio questo ingombro sterico nello stato chiuso a determinare la minore affinità di NNC2215 al recettore dell'insulina. [36]

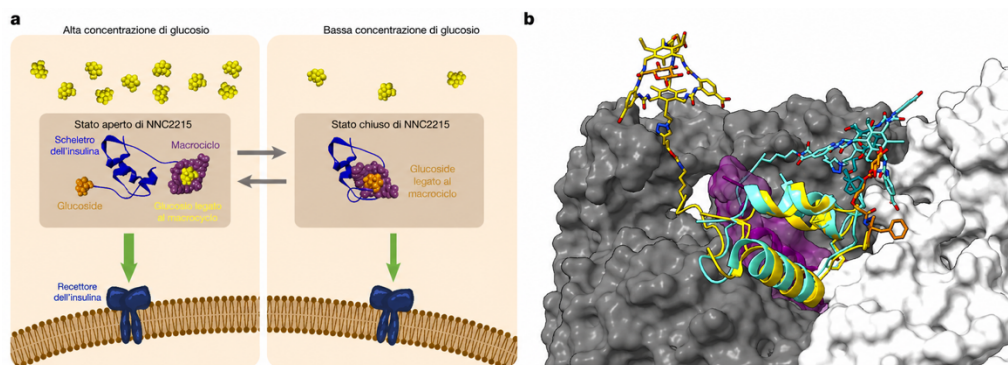


Figura 17. Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione glucosio-sensibile (A) e di modelli 3D delle conformazioni chiusa e aperta (B) dell'insulina NNC2215 (adattata da [36])

Inoltre, per quanto riguarda l'interazione glucosio-sensibile di NNC2215 con il recettore dell'insulina sono stati condotti degli studi in vitro in assenza o in presenza di diverse concentrazioni di glucosio e una caratteristica peculiare di NNC2215 è che le curve di legame, riportate nella *Figura 18A*, sono influenzate dalle concentrazioni di glucosio, in particolare l'affinità di NNC2215 per il recettore dell'insulina aumenta dallo 0,75% al 2,9%, 4,3%, 6,5% e 9,2% nell'intervallo di concentrazione di glucosio di 0, 3, 5, 10 e 20 mM, a differenza dell'insulina degludec la cui affinità rimane costante (*Figura 18B*). NNC2215 ha dimostrato un aumento di 12,5 volte dell'affinità per il recettore dell'insulina quando la concentrazione di glucosio aumenta da 0 a 20 mM e di 3,2 volte quando passa da 3 a 20 mM. [36]

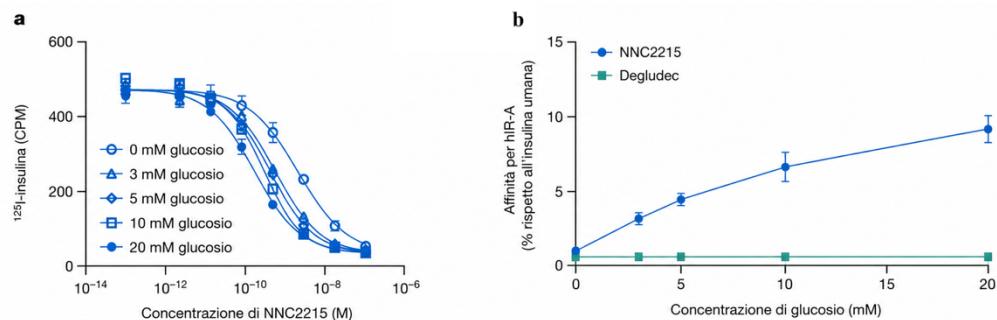


Figura 18. Illustrazione grafica delle curve di legame di NNC2215 al recettore insulinico in funzione della concentrazione di glucosio (A) e del confronto dell'affinità per il recettore tra NNC2215 e degludec (B) (adattata da [36])

Sono stati anche condotti, seguendo tre diversi protocolli, studi in vivo per dimostrare l'attività glucosio-sensibile di NNC2215 e la conseguente protezione dall'ipoglicemia: nel protocollo più semplice è stato somministrata ai ratti per via endovenosa una stessa dose di NNC2215 seguita da 4 diversi dosaggi di L-glucosio, che è l'enantiomero del D-glucosio fisiologicamente attivo, in modo da attivare in maniera dose-dipendente l'azione insulinica di NNC2215 determinando una riduzione dei livelli di D-glucosio, come mostrato nella *Figura 19A*. Nel secondo protocollo è stata studiata l'attività di NNC2215 in vivo nei suini i quali sono stati sottoposti a infusione di somatostatina per sopprimere la secrezione di glucagone e insulina e infusione costante di NNC2215 rispetto a insulina degludec ma anche di D-glucosio. Nel momento in cui è stata interrotta l'infusione di D-glucosio si è osservata una diminuzione del D-glucosio plasmatico meno pronunciata con NNC2215 rispetto a degludec, come mostrato nella *Figura 19B*. Nel terzo protocollo è stata studiata l'attivazione di NNC2215 durante le escursioni glicemiche dei pasti tramite dei test di tolleranza al glucosio per via endovenosa in ratti diabetici ed è stato dimostrato che NNC2215 ha ridotto l'aumento della glicemia in misura maggiore rispetto all'insulina umana, indicando una maggiore efficacia ad alte concentrazioni di glucosio. Quest'ultimo risultato potrebbe suggerire la necessità di dosi inferiori di insulina ad azione rapida in combinazione con NNC2215 determinando un minor

rischio di ipoglicemia e un miglior controllo glicemico. In conclusione, questa insulina intelligente si profila come una potenziale opzione terapeutica promettente per il trattamento del diabete attenuando il rischio di eventi ipoglicemici e riducendo in parte la necessità di insulina ad azione rapida dopo i pasti. [36]

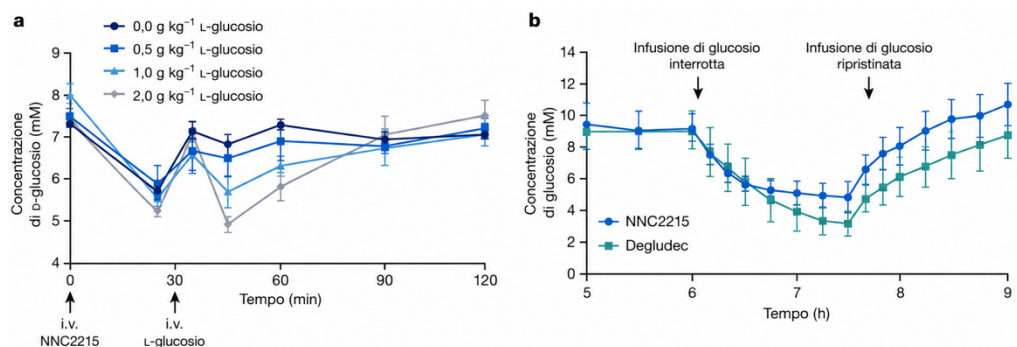


Figura 19. Illustrazione grafica dell'attivazione di NNC2215 in ratti e conseguente riduzione dei livelli di D-glucosio (A) e dei profili glicemici di suini durante infusione endovenosa continua di NNC2215 o insulina degludec dopo l'interruzione e la ripresa dell'infusione endovenosa continua di glucosio (B) (adattata da [36])

Capitolo 5 Nuove formulazioni di insulina e nuove vie di somministrazione

5.1 BioChaperone lispro

Nel panorama degli analoghi dell'insulina *short acting* di seconda generazione, progettati per ottimizzare il controllo dell'iperglicemia postprandiale, si colloca BioChaperone lispro (BCLIS), una formulazione ultrarapida attualmente in fase III di sperimentazione clinica. Essa è una formulazione sperimentale in cui si associano all'insulina prandiale lispro gli eccipienti citrato sodico il quale aumenta la permeabilità vascolare nel sito d'iniezione e BioChaperone BC222, un oligosaccaride sintetico progettato a partire da componenti naturali il quale, formando un complesso fisico con l'insulina, la protegge dalla degradazione enzimatica e ne migliora stabilità e solubilità favorendo ulteriormente la dissociazione degli esameri di insulina lispro in monomeri e l'assorbimento di questi ultimi dal tessuto sottocutaneo al torrente circolatorio. Questo è stato dimostrato in uno studio clinico di fase I di circa 3 mesi randomizzato, monocentrico, in doppio cieco, crossover a tre trattamenti condotto su 43 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1, di età compresa tra i 18 e i 64 anni, con HbA1c < 9,0% e con un BMI compreso tra 18,5 e 28,5 kg/m²: i partecipanti sono stati randomizzati al trattamento con BioChaperone lispro o aspart o aspart ad azione ultrarapida, oltre alle iniezioni di insulina basale, ed è stato osservato nella prima ora dalla somministrazione di insulina BCLIS un aumento del 69% della quantità di insulina assorbita, quindi, un'esposizione iniziale all'insulina doppia in modo simile ad aspart ad azione ultrarapida, rispetto alla aspart presentando, quindi, anche un profilo di concentrazione plasmatica di insulina in funzione del tempo (*Figura 20A*) e un profilo dell'effetto ipoglicemizante (*Figura 20B*) anticipati nel tempo con BCLIS rispetto ad aspart. Nello specifico, come mostrato nella *Figura 20A*, il tempo per raggiungere il 50% della

concentrazione plasmatica massima (C_{max}) è risultato anticipato di circa 12 minuti e il t_{max} di 26 minuti rispetto ad aspart. Nel confronto con aspart ad azione ultrarapida non sono emerse differenze significative nella cinetica di assorbimento complessiva sebbene il t_{max} sia stato anticipato di 14 minuti con BCLIS che ha mostrato anche una cessazione dell'effetto più rapida, proprietà terapeutica utile a ridurre il rischio di ipoglicemia postprandiale tardiva. L'insieme delle caratteristiche farmacocinetiche di questa formulazione sperimentale, ovvero l'assorbimento più rapido, l'inizio d'azione più precoce e la durata d'azione più breve, fa sì che l'effetto complessivo mimi in modo migliore la secrezione endogena postprandiale di insulina a differenza delle insuline prandiali ad oggi disponibili. [37]

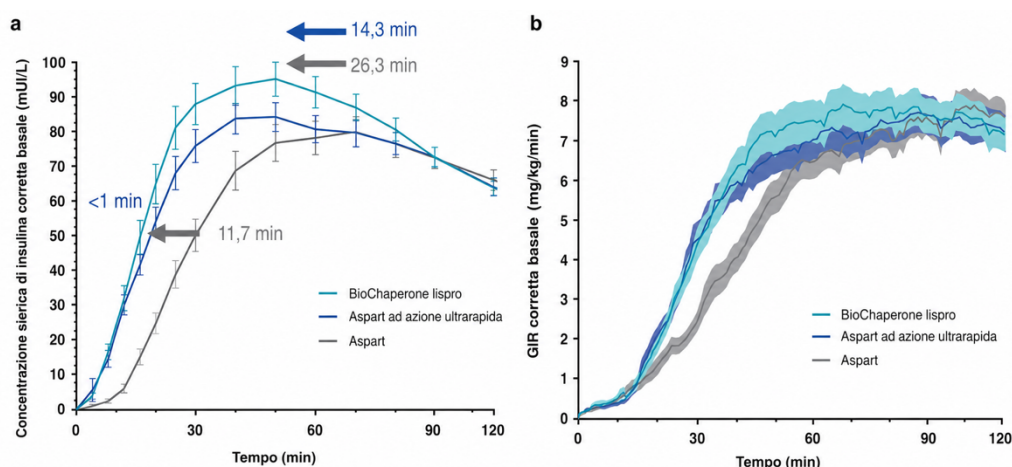


Figura 20. Illustrazione grafica dei profili farmacocinetici (A) e dell'effetto ipoglicemizante (B) delle insuline short acting (adattata da [37])

Un secondo studio di fase I randomizzato, controllato, crossover della durata di 14 giorni, condotto su 36 soggetti con diabete mellito di tipo 1 ha confrontato i boli di BCLIS rispetto a lispro standard (LIS). I risultati ottenuti evidenziano come ci sia stata una riduzione significativa del 31% delle escursioni glicemiche postprandiali nelle prime 2 ore post somministrazione nei giorni 1-3 (Figura 21A), beneficio mantenutosi stabile fino al giorno 14, senza variazioni sull'intero periodo postprandiale di 6 ore (Figura 21B). La cinetica di assorbimento accelerata nei giorni da

1 a 3 (*Figura 21C*), che si è mantenuta tale fino al giorno 14, e il minor tempo per raggiungere la metà della concentrazione sierica massima hanno confermato la costanza della prestazione farmacocinetica nel breve termine. Il profilo della sicurezza è risultato sovrapponibile a LIS, con tassi di ipoglicemia analoghi e l'assenza di eventi avversi significativi correlati al farmaco sperimentale. [38]

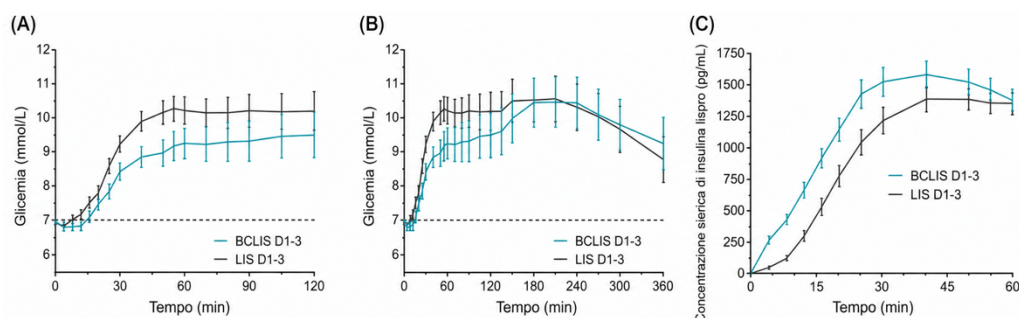


Figura 21. Illustrazione grafica dei profili glicemici nelle prime 2 ore postprandiali (A) e nelle 6 ore postprandiali (B) e profili farmacocinetici (C) di BCLIS e LIS (adattata da [38])

Il confronto tra BCLIS e gli analoghi ultrarapidi già in commercio (aspart ad azione ultrarapida e lispro ultrarapida) evidenzia caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche comuni, coerenti con gli obiettivi della progettazione della seconda generazione di insuline prandiali. Rispetto alle formulazioni di prima generazione (lispro e aspart), queste molecole anticipano l'inizio e la fine dell'azione di 10 minuti. Questa variazione cinetica determina un incremento di 2-3 volte dell'esposizione all'insulina nei primi 30 minuti dalla somministrazione, riducendo il picco glicemico postprandiale di circa 1,0-1,5 mmol/L. La tempestività del picco ematico sfrutta l'elevata sensibilità epatica all'insulina: un incremento precoce dell'insulinemia nella circolazione portale permette, infatti, un'immediata soppressione della produzione endogena di glucosio da parte del fegato, mimando fedelmente la secrezione pulsatile fisiologica. [25], [27]

Nonostante i risultati di rilevante importanza di questi studi si sollevano degli interrogativi a proposito di questi analoghi dell'insulina ad azione

rapida di seconda generazione in quanto l'insulina aspart ad azione ultrarapida, l'insulina lispro ultrarapida e l'insulina BioChaperone lispro sembrano piuttosto simili in termini di efficacia e caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche per cui sono necessari del tempo, un'esperienza consolidata e studi comparativi diretti per individuare le eventuali differenze in modo da capire quando, come e per quali pazienti potrebbero essere più indicati. [25]

5.2 BioChaperone glargine lispro

Ad oggi è in fase di studio anche la co-formulazione BioChaperone glargine lispro (Biochaperone combo) la quale combina due *gold standard* della terapia insulinica, ovvero l'insulina *long acting* glargine che costituisce il 75% della miscela e l'insulina *short acting* lispro il 25%. Il principale vantaggio di unire in un'unica formulazione un'insulina basale e una prandiale risiede nella possibilità di effettuare una sola iniezione sottocutanea al posto di due per somministrare entrambi i farmaci, semplificando così lo schema terapeutico. Tuttavia, ciò presenta rilevanti criticità poiché l'insulina glargine non può essere formulata con le insuline ad azione rapida a causa delle sue proprietà chimico-fisiche né miscelata immediatamente prima dell'iniezione poiché determinerebbe un picco dell'insulina lispro precoce e ridotto oltre a una curva d'azione in funzione del tempo ritardata. In questo contesto si inserisce l'impiego dell'eccipiente BioChaperone 147, un polimero anfifilico polianionico in grado di solubilizzare l'insulina glargine a pH neutro tramite la formazione di un complesso fisico reversibile permettendone così la miscelazione con insuline ad azione rapida come l'insulina lispro. Le proprietà di BioChaperone combo sono state valutate in uno studio clinico di fase I (multicentrico, in doppio cieco, crossover a tre periodi) condotto su 39 pazienti con diabete mellito di tipo 2. I partecipanti sono stati randomizzati

al trattamento con la co-formulazione sperimentale, con insulina premiscelata lispro Mix25 (75% lispro protaminata, 25% lispro) o con iniezioni separate e contemporanee di insulina glargine e lispro. I risultati indicano che l'escursione glicemica, valutata tramite l'area sotto la curva (AUC), nelle prime 2 ore dalla somministrazione è significativamente inferiore nel braccio BioChaperone combo rispetto sia a Mix25 sia alle iniezioni separate. Questo beneficio iniziale viene, tuttavia, controbilanciato da una successiva tendenza a una maggiore escursione glicemica nell'intervallo compreso tra le 2 e le 6 ore post somministrazione. Di conseguenza, considerando l'intero periodo postprandiale di 6 ore, l'efficacia sul controllo glicemico globale non mostra differenze statisticamente significative tra i tre regimi terapeutici. Queste differenze osservate nel profilo glicemico postprandiale possono essere spiegate dalle caratteristiche farmacocinetiche di queste insuline. In particolare, il profilo insulinico totale postprandiale della formulazione BioChaperone combo mostra un inizio di comparsa dell'insulina nel sangue più rapido rispetto a Mix25 e alle iniezioni separate, con il raggiungimento del picco prima ma che diminuisce più rapidamente (*Figura 22*). Sotto il profilo della sicurezza, gli eventi ipoglicemici registrati nello studio sono stati quasi esclusivamente diurni, in assenza di episodi di ipoglicemia grave. Il tasso di eventi ipoglicemici totali è risultato inferiore nel gruppo BioChaperone combo rispetto a Mix25 e sovrapponibile a quello osservato con le iniezioni separate. Tale evidenza è coerente con la ridotta esposizione insulinica registrata nell'intervallo 2-6 ore dopo il pasto. Infine, la tollerabilità locale e sistemica della formulazione sperimentale è apparsa favorevole: l'incidenza di cefalea e di reazioni nel sito d'iniezione è risultata analoga a quella riscontrata con i trattamenti di controllo, confermando la sicurezza biologica dell'eccipiente polimerico utilizzato. [39]

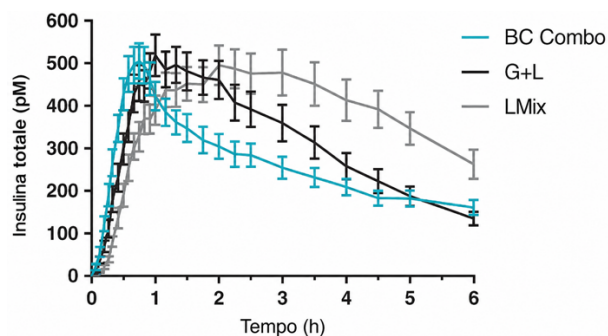


Figura 22. Illustrazione grafica dei profili farmacocinetici di BioChaperone combo, Mix25 e iniezioni separate di glargine e lispro (adattata da [39])

5.3 Vie di somministrazione alternative

La via di somministrazione sottocutanea, come sottolineato nel paragrafo conclusivo del Capitolo 2, è un importante limite della terapia insulinica convenzionale a causa delle complicanze locali nel sito d'iniezione, iperinsulinemia periferica non fisiologica e disagio psicologico del paziente. Nel tempo fin dalla scoperta dell'insulina ed oggi in maniera più accentuata vi è un'ampia ricerca di vie di somministrazione non invasive alternative a quella iniettiva tra cui la via rettale, transoculare, buccale, transdermica, orale e inalatoria (comprendente la via nasale e polmonare) (Figura 23). Le vie di somministrazione orale e inalatoria rappresentano un ambito di ricerca di grande interesse in quanto sono le più accettate da parte del paziente ma anche sicure e convenienti per la somministrazione di insulina. Presentano, tuttavia, delle problematiche rilevanti, quali la bassa biodisponibilità e di conseguenza la difficoltà nell'ottenere gli effetti terapeutici in quanto sia l'epitelio nasale che quello intestinale fungono da barriere per l'assorbimento dell'insulina. [28], [40]

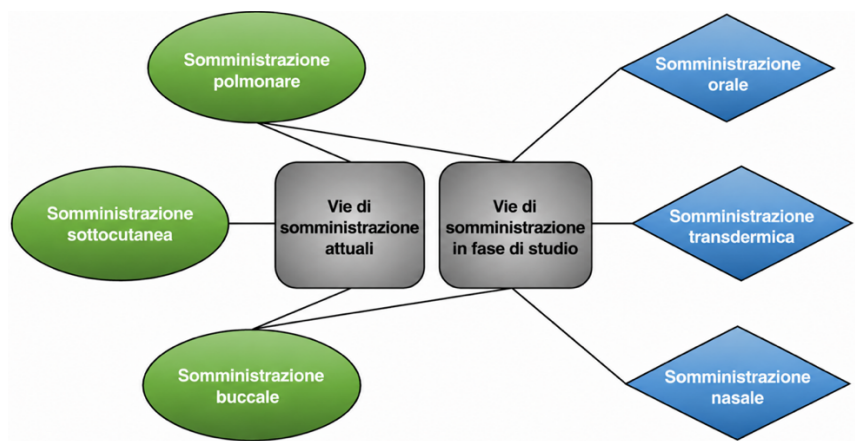


Figura 23. Illustrazione schematica delle vie di somministrazione dell'insulina attualmente in uso e in fase di studio (adattata da [17])

5.3.1 Insulina per via orale

Nel campo dei farmaci peptidici e proteici la somministrazione per via orale rappresenta senza alcun dubbio una delle sfide più complesse, considerata il “Santo Graal” come affermato da Zhang E. et al. Un obiettivo a lungo atteso è stato, e lo è tuttora, un sistema di somministrazione di insulina orale efficace ed affidabile. Tale via di somministrazione offrirebbe, rispetto a quella sottocutanea, non solo un potenziale miglioramento dell'aderenza terapeutica ma anche una riproduzione più fedele del percorso fisiologico dell'insulina la quale, una volta secreta dalle isole di Langerhans o, se somministrata per via orale, assorbita dal tratto gastrointestinale, viene indirizzata verso il fegato attraverso la circolazione portale avendo così un effetto prevalentemente a livello epatico e, in misura minore, a livello della circolazione periferica, evitando così l'iperinsulinemia periferica. Tuttavia, la principale criticità di questa via di somministrazione è la bassa biodisponibilità (inferiore all'1%), e di conseguenza un'attività biologica in vivo trascurabile, a causa delle barriere gastrointestinali che ostacolano l'assorbimento e la distribuzione dell'insulina. [1], [25]

Affinché l'insulina orale espliciti la sua azione biologica essa deve transitare lungo il tratto gastrointestinale, aderire e penetrare nello strato di muco, attraversare l'epitelio intestinale, entrare nella vena porta e infine raggiungere la circolazione periferica. Per fare ciò deve oltrepassare diverse barriere fisiologiche chimiche, enzimatiche e fisiche: l'insulina, a causa della sua natura proteica, deve superare a livello dello stomaco la degradazione causata dall'ambiente fortemente acido che, scindendo i ponti disolfuro presenti nella molecola, ne determinerebbe la denaturazione e la digestione proteolitica da parte di enzimi gastrici come la pepsina e catepsina. Inoltre, essendo una macromolecola idrofila con un elevato peso molecolare (circa 5800 Da), a livello dell'intestino oltre alla degradazione da parte di enzimi intestinali come la tripsina, chimotripsina e carbossipeptidasi deve anche contrastare la presenza di uno strato di muco protettivo e una bassa permeabilità attraverso la mucosa intestinale, non riuscendo a diffondere attraverso le membrane delle cellule epiteliali intestinali verso il flusso sanguigno. Un'ulteriore problematica è l'aggregazione e fibrillazione, ovvero i monomeri di insulina derivanti dalla dissociazione degli esameri favorita dal pH acido gastrico tendono a instaurare interazioni idrofobiche, per cui si assiste all'aggregazione di questi a formare fibrille inattive. Ciò causa, quindi, l'inattivazione farmacologica dell'insulina e l'innescare di potenziali reazioni immunitarie. La *Figura 24* mostra i principali ostacoli del tratto gastrointestinale e gli approcci utilizzati per superarli. Sono state sviluppate diverse strategie per consentire la somministrazione per via orale e sono stati pubblicati numerosi studi preclinici che hanno mostrato risultati incoraggianti, tuttavia l'applicazione a livello clinico non ha raggiunto una sufficiente sicurezza ed efficacia. Ad oggi, infatti, non esiste una formulazione di insulina orale disponibile in commercio. [1], [41]

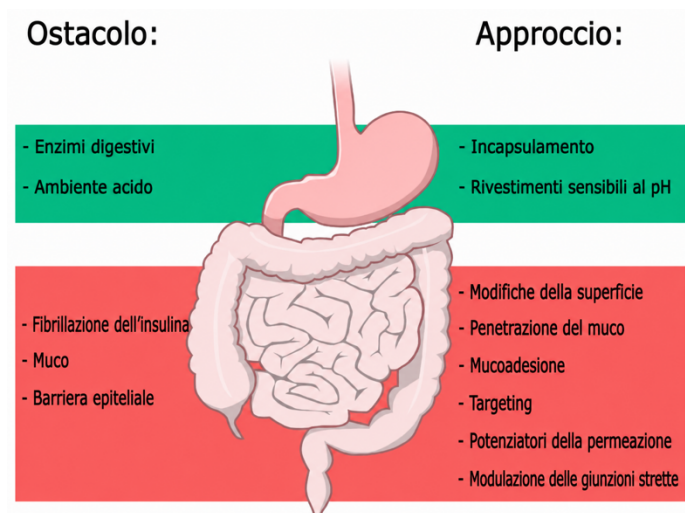


Figura 24. Rappresentazione schematica dei fattori che ostacolano l'assorbimento dell'insulina per via orale e delle strategie sviluppate per superarli (adattata da [1])

Innanzitutto, è stata modificata chimicamente la molecola di insulina, tramite coniugazione con acidi grassi e sostituzione di amminoacidi in siti suscettibili alla degradazione proteolitica. La *Figura 25* mostra gli analoghi ottenuti in seguito a diverse modifiche dell'insulina umana: nell'analogo OI106 nella catena A la tirosina in A14 è stata sostituita con il glutammato (A14E) e nella catena B la fenilalanina in B25 è stata sostituita con l'istidina (B25H) e la treonina terminale in B30 è stata eliminata. Ciò ha determinato la riduzione della degradazione proteolitica e l'aumento della stabilità nel duodeno di ratto di circa 10 volte rispetto all'insulina umana. Nell'analogo OI189 l'ulteriore delezione della treonina in B27 ha consentito un ulteriore incremento della stabilità di 3-5 volte. L'aggiunta di catene di acidi grassi negli analoghi OI216, OI338 e OI320, invece, ha mostrato un impatto limitato sulla stabilità della molecola verso gli enzimi proteolitici. Parallelamente, l'introduzione di gruppi leganti l'albumina, come nel caso di OI338 in cui un acido dicarbossilico a 18 atomi di carbonio è stato coniugato alla lisina in B29 tramite un linker idrofilo, ha consentito di diminuire l'affinità per l'IR e prolungare il profilo farmacocinetico. [42]

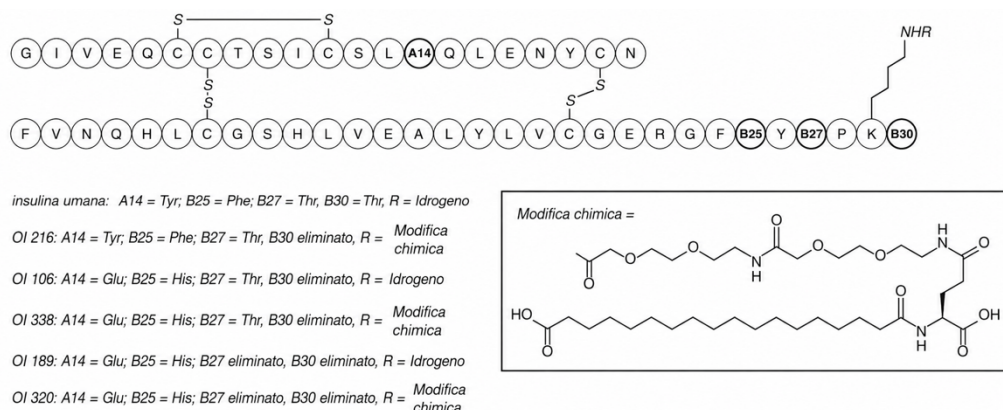


Figura 25. Rappresentazione schematica dei diversi analoghi dell'insulina umana ottenuti tramite modifiche chimiche (adattata da [42])

In studi preclinici condotti su cani beagle, la somministrazione orale di questi analoghi mediante compresse GIPET I, contenenti caprato di sodio come potenziatore dell'assorbimento, ha mostrato una biodisponibilità pari a circa il 3,0% per OI338 e il 3,9% per OI320 rispetto alla somministrazione endovenosa. Sebbene tali valori di biodisponibilità rimangano relativamente bassi, risultano significativamente superiori rispetto a quelli osservati per l'insulina non modificata (circa 0,6%). L'analogo OI338 ha mostrato un profilo farmacocinetico simile all'insulina somministrata per via endovenosa caratterizzato da un rapido assorbimento e raggiungimento del picco. Inoltre, la somministrazione orale ripetuta quotidianamente dell'analogo OI338 a 8 cani per 14 giorni ha evidenziato una riduzione della variabilità farmacocinetica giornaliera dal 100% al giorno 1 al 40% al giorno 14. Nonostante i miglioramenti ottenuti persistono importanti limitazioni legate alla bassa biodisponibilità e all'elevata variabilità dell'assorbimento intestinale dell'insulina portando alla conclusione che l'approccio di apportare esclusivamente modifiche alla molecola non sembra essere sufficiente per ottenere una somministrazione di insulina sicura e fisiologica. [42]

Un'altra strategia consiste nell'impiego di fattori funzionali come potenziatori di permeazione, inibitori enzimatici e regolatori di pH che vengono aggiunti alla formulazione di insulina. I potenziatori di

permeazione, tra cui il taurocolato di sodio, caprato di sodio, sali biliari come il glicocolato di sodio, hanno la funzione di migliorare la permeabilità intestinale dell'insulina andando ad interrompere in maniera reversibile le giunzioni strette (*tight junction* TJ), come mostrato nella *Figura 26A*, le quali si trovano tra gli enterociti dell'epitelio intestinale permettendo così il trasporto paracellulare che normalmente è limitato a piccole molecole idrofile di peso molecolare inferiore a 500 Da. Tuttavia, la perturbazione dell'epitelio intestinale causata da tali agenti dà effetti potenzialmente tossici consentendo l'accesso al flusso sanguigno anche di tossine e agenti patogeni a causa della mancanza di specificità e aumentando il rischio di malattie autoimmuni, infezioni batteriche e malattie infiammatorie intestinali. Gli inibitori delle proteasi (*Figura 26B*), come l'aprotinina, inibitori della tripsina, bacitracina e camostat mesilato, determinano da un lato il miglioramento della stabilità grazie alla protezione dalla degradazione enzimatica dall'altro un aumento del rischio di tossicità sistemica, assorbimento di proteine indesiderate e disturbi nella digestione delle proteine nutritive. [1], [41]

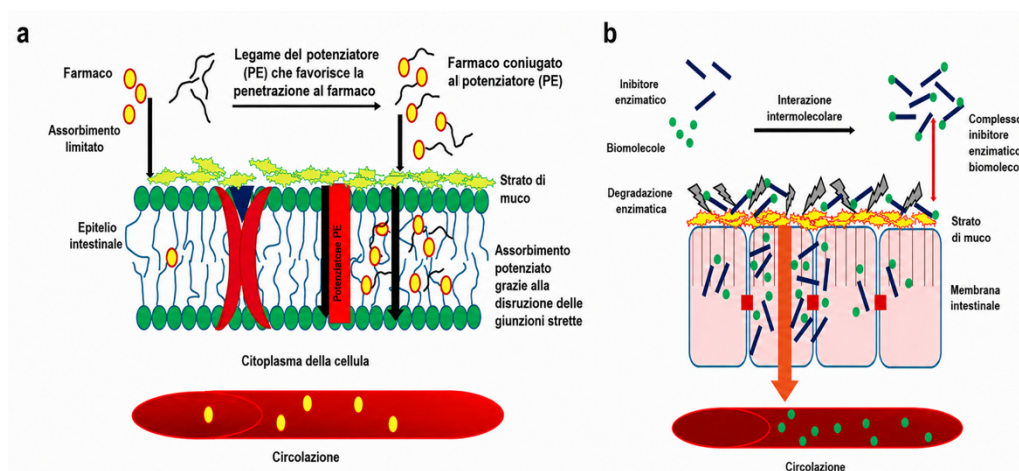


Figura 26. Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione dei potenziatori di permeazione (A) e degli inibitori delle proteasi (B) (adattata da [43])

In questo contesto, un esempio particolarmente rilevante che ha mostrato risultati promettenti nelle fasi cliniche avanzate è rappresentato dall'insulina tregopil (IN-105), un analogo ricombinante dell'insulina

umana a somministrazione orale ad azione ultrarapida sviluppato da Biocon per il controllo glicemico postprandiale. Dal punto di vista strutturale, questo analogo orale è un oligomero anfifilico a catena corta di struttura simile all'insulina umana modificato con l'attacco covalente del gruppo metossi-trietilenglicole-propionile al gruppo amminico della lisina in posizione B29 tramite legame amidico (*Figura 27*). Inoltre, la formulazione include un potenziatore dell'assorbimento, il caprato di sodio, per favorire l'assorbimento intestinale limitato dall'idrofilia e dall'elevato peso molecolare dell'insulina tregopil (circa 6000 Da). [24]

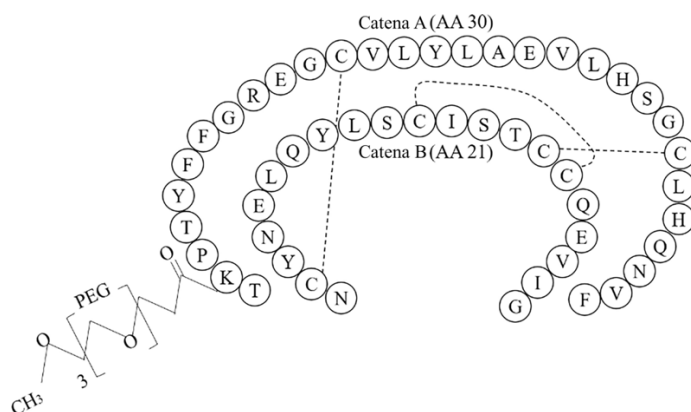


Figura 27. Rappresentazione schematica della struttura dell'insulina tregopil (adattata da [24])

Tutti gli studi hanno dimostrato una riduzione significativa ma variabile della glicemia postprandiale rispetto al placebo a 1 ora e a 2 ore dalla somministrazione e un'azione più marcata nelle fasi precoci del periodo postprandiale ma una minore efficacia nelle fasi tardive rispetto all'insulina aspart, riflettendo un profilo d'azione ultrarapido. Tuttavia, tale effetto non si traduce in un miglioramento significativo dell'HbA1c né rispetto al placebo né rispetto all'insulina aspart indicando un impatto limitato sul controllo glicemico globale. L'assenza di una riduzione significativa dell'HbA1c non rappresenta un risultato discordante, bensì riflette il profilo farmacocinetico di tregopil, caratterizzato da un'azione precoce (*onset* di circa 10-20 minuti) e di breve durata (2-3 ore), insufficiente a influenzare in modo sostanziale la glicemia media nel lungo

periodo, pur essendo efficace nel controllo dell'iperglicemia postprandiale. Un aspetto rilevante emerso dagli studi clinici è rappresentato dall'elevata variabilità farmacocinetica. In particolare, nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 è stata osservata una variabilità farmacocinetica intra-soggetto (nello stesso paziente in momenti diversi) superiore rispetto a quella inter-soggetto (tra pazienti), con valori significativamente maggiori rispetto all'insulina aspart sia in termini di AUC nelle prime 3 ore dalla somministrazione rispettivamente 80,3% e 38,1% per tregopil rispetto a 18,3% e 30,5% per aspart sia in termini di C_{max} rispettivamente 51,0% e 33,6% per tregopil e 33,2% e 25,8% per aspart. Questa maggiore variabilità farmacocinetica è attribuibile all'assorbimento orale incostante e difficoltoso influenzato da molteplici fattori tra cui l'elevata idrofilia, l'elevato peso molecolare, la degradazione proteolitica e la diffusione attraverso lo strato mucoso. Nonostante ciò, la breve durata d'azione e la rapida captazione tissutale del farmaco potrebbero attenuare l'impatto clinico di tale variabilità, pur contribuendo a una risposta glicemica meno prevedibile. Tregopil ha anche mostrato un buon profilo di sicurezza e tollerabilità con una minore incidenza di ipoglicemie clinicamente significative rispetto all'insulina aspart e senza evidenza di effetti collaterali a livello gastrointestinale. In conclusione, sebbene siano necessari ulteriori dati per confermarne pienamente l'efficacia e la sostenibilità a lungo termine, l'insulina tregopil rappresenta attualmente una delle strategie più promettenti nel panorama delle insuline orali. Il suo impiego come insulina prandiale orale per il controllo precoce della glicemia postprandiale potrebbe, nel prossimo futuro, avvicinarsi a una possibile introduzione nella pratica clinica. [24]

La ricerca si è orientata anche verso l'ingegneria fisica, ovvero la progettazione di un "physical shield" (scudo fisico) per proteggere l'insulina, come definito da G. Fontana et al., ovvero l'utilizzo di rivestimenti gastroresistenti costituiti da strati polimerici resistenti agli

acidi (ad esempio, lo ftalato acido di acetato di cellulosa) per proteggere l'insulina dalla degradazione causata dall'ambiente estremamente acido dello stomaco i quali, però, non riescono a proteggere l'insulina dalle proteasi intestinali. Per cui si è pensato alla possibilità di somministrare in maniera congiunta anche gli inibitori delle proteasi e i potenziatori dell'assorbimento. [1]

Tutti questi approcci, tuttavia, presentano ancora diverse problematiche, che non consentono una somministrazione orale di insulina efficace e sicura. Attualmente i sistemi di somministrazione orale più interessanti che hanno dimostrato risultati promettenti in numerosi studi preclinici sono i nanovettori (*nanocarriers*) o nanoparticelle. Questa opzione terapeutica consiste nell'incapsulamento dell'insulina in particelle colloidali di dimensioni nanometriche, le quali offrono la possibilità di adattare le loro proprietà chimico-fisiche, come dimensioni, struttura, composizione chimica e carica superficiale, per superare gli ostacoli presenti nel tratto gastrointestinale proteggendo l'insulina dalla degradazione e denaturazione e migliorandone la biodisponibilità. Negli ultimi venti anni la combinazione di nanotecnologia e farmaceutica ha permesso la somministrazione orale di farmaci macromolecolari perciò rappresenta una promettente direzione di ricerca per l'insulina orale. Sono stati, infatti, sviluppati numerosi nanosistemi con diverse funzioni e modalità di rilascio. L'utilizzo di *nanocarriers* per l'insulina orale richiede un attento e approfondito controllo delle loro caratteristiche chimico-fisiche in modo da garantire la biocompatibilità ed evitare i problemi di bioaccumulo di materiali non biodegradabili e di perdita di *targeting*. Questi nanosistemi nei diversi studi riportati in letteratura hanno mostrato vantaggi significativi nella protezione dell'insulina dalla degradazione acida ed enzimatica, nella penetrazione dello strato mucoso intestinale e nel passaggio attraverso la barriera epiteliale intestinale dimostrando, dunque, miglioramenti nella biodisponibilità orale. Inoltre, i *nanocarriers*

alterano il profilo farmacocinetico dell'insulina allungando il t_{max} e mantenendo una concentrazione plasmatica insulinica più sostenuta rispetto alle iniezioni sottocutanee determinando così una riduzione del rischio di eventi ipoglicemici e una secrezione di insulina più simile a quella fisiologica. Tuttavia, persistono anche in questo caso diverse problematiche tra cui la biodisponibilità non ancora ottimale e variabile e sono necessarie ulteriori valutazioni sulla sicurezza dei nanomateriali utilizzati, la fattibilità del processo produttivo e il passaggio dal laboratorio alla pratica clinica. [1], [28]

Strategie ampiamente utilizzate si basano sull'impiego di nanoparticelle lipidiche, polimeriche e ibride polimero-lipidiche. Tra le nanoparticelle lipidiche, un ruolo di particolare interesse è ricoperto dalle nanoparticelle lipidiche solide (SLN), ovvero vescicole costituite da una matrice di lipidi solidi a temperatura ambiente e un rivestimento esterno di fosfolipidi e tensioattivi, dai vettori lipidici nanostrutturati (NLC), che presentano la stessa struttura delle SLN con la differenza che la matrice è costituita da una miscela di lipidi solidi e liquidi, e dai liposomi, ovvero strutture vescicolari costituite da un doppio strato fosfolipidico (*bilayer*) e da una struttura interna acquosa le quali però presentano una bassa stabilità nel tratto gastrointestinale. [44]

Le SLN presentano numerosi vantaggi, tra cui la capacità di incorporare farmaci sia lipofili che idrofili, una maggiore stabilità fisica, costi di produzione relativamente contenuti e semplicità di preparazione. In uno studio sperimentale tali nanoparticelle sono state preparate tramite tecnica di evaporazione del solvente a doppia emulsione impiegando gliceriltrimistrato come fase lipidica e lecitina di soia e alcol polivinilico (PVA) come agenti emulsionanti. Sono state così ottenute otto tipologie di formulazioni (F1-F8) diverse per dimensione media delle particelle, indice di polidispersione (PDI) ed efficienza di incapsulamento del farmaco. Tra

queste, la formulazione F7 ha mostrato le proprietà più favorevoli con una dimensione media delle particelle di 99 nm, un basso PDI (0,021) indicativo di una distribuzione dimensionale omogenea ed elevata capacità di incapsulamento del farmaco (56,5%). Gli studi di rilascio in vitro dell'insulina dalla formulazione ottimizzata hanno evidenziato un rilascio piuttosto lento e prolungato sia in ambiente acido (HCl 0,1 N) sia a pH fisiologico (tampone fosfato pH 7,4). Nel dettaglio, dopo 12 ore circa vi è stato un rilascio dell'insulina caricata in tampone fosfato del 67% e in mezzo acido del 40%, come mostrato nella *Figura 28*. Parallelamente le prove di permeazione intestinale ex vivo hanno dimostrato che l'incorporazione di insulina nelle SLN ha aumentato circa del doppio la permeabilità intestinale rispetto all'insulina pura, come mostrato nella *Figura 29*. Tale condizione può essere attribuita alle ridotte dimensioni e all'aumentata superficie delle nanoparticelle, che determinano una maggiore velocità di dissoluzione e diffusione del farmaco, e alla capacità di queste di diffondere attraverso lo strato di muco a livello intestinale rilasciando l'insulina direttamente sulla superficie delle membrane cellulari epiteliali. [41]

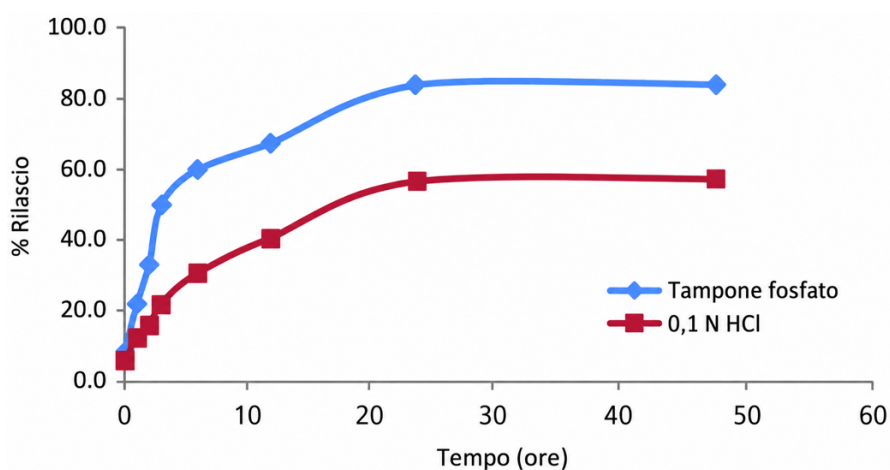


Figura 28. Rappresentazione grafica del rilascio di insulina dalla formulazione F7 a pH acido e fisiologico (adattata da [41])

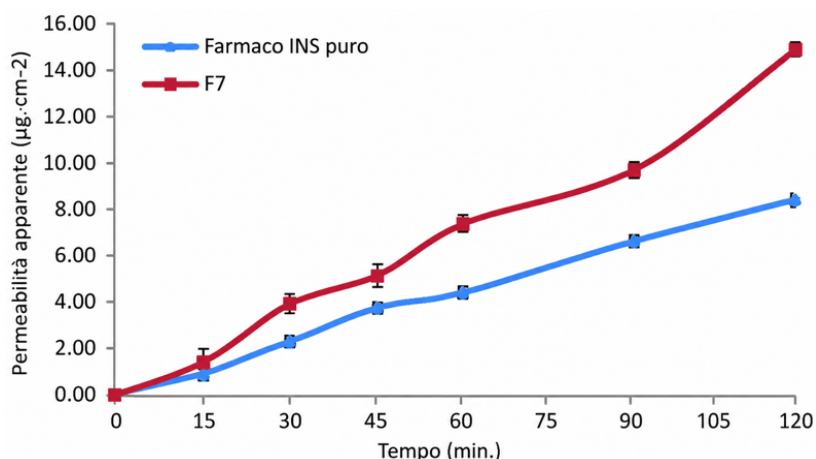


Figura 29. Rappresentazione grafica della permeabilità intestinale dell'insulina nella formulazione F7 rispetto all'insulina pura (adattata da [41])

Gli studi di stabilità hanno, inoltre, dimostrato l'effetto delle SLN nell'aumentare la resistenza dell'insulina alla degradazione da parte degli enzimi proteolitici pepsina e tripsina rispetto all'insulina pura, probabilmente per la matrice lipidica solida che rende difficile la penetrazione degli enzimi e il raggiungimento del farmaco. come riportato nella *Figura 30*. Nonostante sia le curve marrone e rossa dell'insulina incapsulata sia quelle blu e rosa dell'insulina pura indichino la degradazione di una quota di insulina, nel caso delle SLN si osservano percentuali di insulina rimanente maggiori, circa il 20% e il 40%, dopo incubazione di 1 ora della formulazione F7 rispettivamente con pepsina e tripsina, rispetto al 10% e 20% di insulina pura. [41]

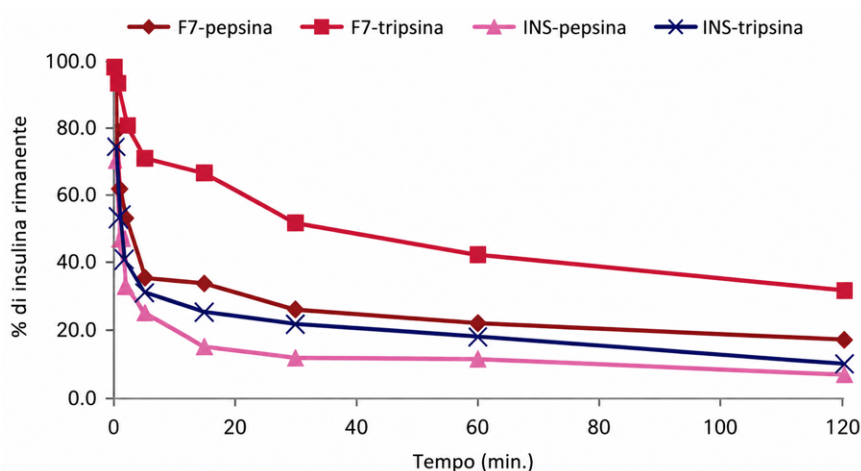


Figura 30. Rappresentazione grafica dell'effetto delle SLN nel preservare l'insulina dalla degradazione enzimatica da parte di pepsina e tripsina (adattata da [41])

Infine, sono state effettuate valutazioni farmacologiche e di biodisponibilità su quattro gruppi di ratti maschi diabetici, a un primo gruppo che funge da controllo è stata somministrata soluzione fisiologica, a un secondo insulina per via sottocutanea, a un terzo insulina per via orale e a un quarto SLN caricate di insulina. I ratti diabetici trattati con insulina incapsulata in SLN hanno mostrato una riduzione più marcata della glicemia, una C_{max} di insulina doppia e una biodisponibilità maggiore (addirittura di cinque volte superiore all'insulina pura, 8,26% rispetto a 1,7%) rispetto a quelli trattati con insulina pura orale. Ciò è dovuto alla capacità delle nanoparticelle di proteggere l'insulina dalla degradazione enzimatica e di essere assorbite a livello intestinale e successivamente essere degradate rilasciando così l'insulina nella circolazione sanguigna. [41]

Tuttavia, nonostante le grandi potenzialità dimostrate dalle SLN la loro natura idrofobica generalmente comporta una bassa efficienza di incapsulamento dell'insulina (EE%) che ha una così elevata idrofilia che durante il processo di preparazione tende a ripartirsi nella fase acquosa esterna determinando una bassa EE%. Sebbene l'uso di particolari metodi di preparazione, come la tecnica di evaporazione del solvente a doppia emulsione sopra citata, in parte riduca questa problematica i valori di EE% rimangono ancora insoddisfacenti. Per risolvere tale problematica è stata adottata una nuova strategia, ovvero lo sviluppo di nanovettori a viscosità aumentata (*viscosity enhanced nanoparticles* VEN) tramite l'incorporazione di agenti idrofili in varie concentrazioni come glicole propilenico (PG), polietilenglicole 400 (PEG 400) e polietilenglicole 600 (PEG 600) nella matrice di questi sistemi in modo da aumentarne la viscosità e consentire l'incapsulamento di una frazione maggiore di farmaco. La *Figura 31* rappresenta due possibili strutture di VEN. L'incorporazione di basse concentrazioni (10 e 30% v/v) dei tre agenti idrofili non ha aumentato significativamente il valore di EE%. Al

contrario, l'utilizzo di concentrazioni più elevate (50 e 70% v/v) ha determinato un incremento significativo di tale parametro, il che significa che è possibile somministrare quantità maggiori di proteina terapeutica a parità di nanocarrier impiegato. Questo miglioramento può essere ricondotto principalmente a due meccanismi: in primo luogo, durante la preparazione delle VEN l'aumento della viscosità della fase acquosa interna ha contribuito a rallentare il rilascio di insulina nella fase acquosa esterna; in secondo luogo, gli agenti idrofili formano dei legami idrogeno con l'insulina, migliorandone la ritenzione all'interno del sistema. In particolare, l'utilizzo di PG al 70% v/v ha determinato l'EE% più alta (54,5%), più del doppio rispetto alle SLN non modificate (20,4%). Inoltre, questa formulazione ha dimostrato di preservare le caratteristiche favorevoli delle SLN, tra cui la biocompatibilità e sicurezza, la capacità di mantenere l'integrità della molecola di insulina incapsulata dall'attacco degli enzimi gastrointestinali, un buon effetto ipoglicemizzante nei ratti diabetici e un aumento della biodisponibilità. [45]

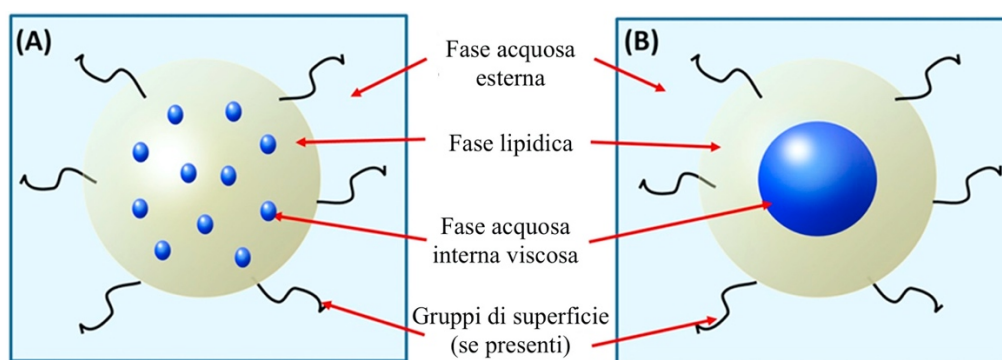


Figura 31. Rappresentazione schematica di due tipologie di VEN e della loro composizione (adattata da [45])

Una valida alternativa alle SLN è rappresentata dalle nanoparticelle polimeriche. Questi nanovettori possono essere funzionalizzati con rivestimenti polimerici che consentono un rilascio controllato e sito-specifico dell'insulina a livello intestinale mediante meccanismi pH-responsivi o con specifici ligandi sulla superficie che interagiscono con specifici recettori migliorando l'assorbimento intestinale e il trasporto

transcellulare. Tra gli esempi più rilevanti vi sono le nanoparticelle di Eudragit, un copolimero dell'acido metacrilico insolubile nell'ambiente acido gastrico ma solubile al pH neutro intestinale, caratteristica che consente il rilascio di insulina nel sito di assorbimento. Un altro esempio è rappresentato dalle nanoparticelle di acido poli-lattico-co-glicolico (PLGA), un polimero sintetico biodegradabile e biocompatibile, che protegge l'insulina a livello gastrico consentendone il passaggio a livello intestinale. Tuttavia, l'idrofobicità del PLGA limita l'incapsulamento di proteine idrofile, come l'insulina, determinando una bassa EE%. Per superare questa problematica sono stati proposti diversi approcci, tra cui l'introduzione di poliesteri più idrofili, come l'acido poli-lattico-co-idrossimetilglicolico (PLHMGA) che, seppur migliori le proprietà di incapsulamento, comporta una riduzione della stabilità del sistema, una maggiore complessità del processo di sintesi e un conseguente aumento dei costi di produzione delle nanoparticelle. [1]

Negli ultimi anni, oltre alle tipologie di nanoparticelle già descritte, le nanoparticelle ibride polimero-lipidiche hanno suscitato un crescente interesse come sistemi per la somministrazione orale dei farmaci. Tra le formulazioni proposte in letteratura, un esempio particolarmente promettente è rappresentato da nanoparticelle composte da un nucleo idrofobico di PLGA, nel quale è incapsulata l'insulina, uno strato intermedio anfifilico di fosfatidilcolina di soia, un lipide naturale biodegradabile, biocompatibile e bassa tossicità che fungendo da barriera aumenta l'EE% e promuove l'assorbimento intestinale del farmaco, e un guscio esterno idrofilo di PEG, che migliora la stabilità e minimizza le interazioni con le glicoproteine del muco favorendo così la diffusione delle nanoparticelle attraverso lo strato mucoso fino all'epitelio intestinale. Considerata l'instabilità termodinamica delle sospensioni di nanoparticelle, queste sono state incorporate in microparticelle a loro volta inserite in capsule di gelatina rigida rivestite con

idrossipropilmetilcellulosa ftalato, un polimero gastroresistente pH-sensibile. Il processo di preparazione delle capsule è illustrato nella *Figura 32*. Dal punto di vista funzionale, queste nanoparticelle ibride hanno evidenziato un maggiore assorbimento cellulare in vitro rispetto all'insulina pura. Studi in vivo condotti su ratti diabetici hanno, inoltre, mostrato che la somministrazione orale delle capsule gastroresistenti induce un marcato effetto ipoglicemizzante, associato a una biodisponibilità minore rispetto all'iniezione sottocutanea di insulina ma caratterizzato da una durata più prolungata. [46]

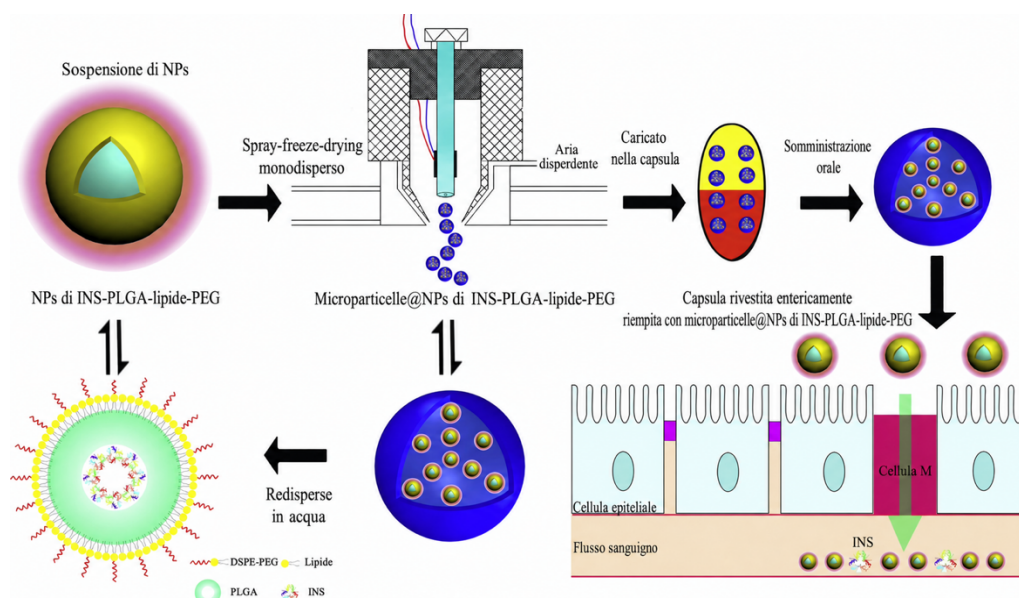


Figura 32. Rappresentazione schematica del processo di produzione delle nanoparticelle ibride polimero-lipidiche incorporate in microparticelle gastroresistenti (adattata da [46])

Un ostacolo all'assorbimento dell'insulina somministrata per via orale è lo strato di muco protettivo che riveste l'epitelio intestinale il quale ha la funzione di impedire il passaggio verso la circolazione sistemica di tossine, agenti patogeni, particelle estranee e macromolecole proteiche, come l'insulina. Per superare questa problematica sono state sviluppate due strategie basate sull'impiego di nanoparticelle: favorire la penetrazione attraverso il muco o promuovere l'adesione ad esso. La prima strategia prevede l'impiego di nanoparticelle con carica superficiale neutra in modo da minimizzare le interazioni con le mucine, ovvero le

glicoproteine cariche negativamente che costituiscono la matrice del muco, facilitandone così la diffusione. A questo scopo sono state sviluppate nanoparticelle rivestite con PEG, che conferisce una superficiale idrofila e neutra riducendo l'interazione con le mucine e aumentando fino a tre ordini di grandezza il trasporto dell'insulina attraverso il muco. Tuttavia, queste nanoparticelle mostrano una limitata capacità nell'attraversare successivamente l'epitelio intestinale. Un'alternativa migliore è l'utilizzo di rivestimenti costituiti da polimeri zwitterionici, caratterizzati da carica netta nulla. Oltre a diffondere efficacemente nello strato mucoso, questi materiali vengono internalizzati nelle cellule epiteliali intestinali attraverso il trasporto transcellulare. In uno studio, nanoparticelle di PLGA rivestite con analoghi zwitterionici del Pluronic, una famiglia di copolimeri composti da due catene terminali idrofile di PEG e un segmento centrale di ossido di polipropilene idrofobo, hanno mostrato un'elevata diffusione nel muco e un maggiore assorbimento cellulare in vitro. Dopo il caricamento con l'insulina, queste nanoparticelle hanno indotto un'efficace risposta ipoglicemizzante nei ratti diabetici, con una biodisponibilità orale circa undici volte superiore rispetto all'insulina pura. L'approccio opposto consiste nello sviluppo di nanoparticelle rivestite di polimeri mucoadesivi, progettate per aumentare il tempo di permanenza dell'insulina sulla superficie dell'epitelio intestinale. Un esempio è rappresentato dalle nanoparticelle di Eudragit L100 tiolato caricate con insulina. I gruppi tiolici presenti sulla superficie delle nanoparticelle formano ponti disolfuro con i residui di cisteina delle mucine. Nei ratti diabetici, la somministrazione orale di queste nanoparticelle ha determinato un aumento della biodisponibilità dell'insulina. Tra i materiali dotati di proprietà mucoadesive rientrano anche il chitosano, polimero cationico naturale biocompatibile, biodegradabile e non tossico, e il PLGA. [1], [47]

Un sistema per la somministrazione orale dell'insulina che potrebbe avere potenziali applicazioni cliniche future è rappresentato dalle nanoparticelle di chitosano innestato con carbossimetil- β -ciclodestrina (CMCD). Negli studi di rilascio in vitro, condotti in fluido gastrico simulato (pH 1,2) e fluido intestinale simulato (pH 7,4), è stato osservato un rilascio iniziale del 35,4% dell'insulina entro 15 minuti nel fluido gastrico, seguito da un aumento fino all'82,9% dopo 120 minuti nel fluido intestinale (*Figura 33*). Questi risultati indicano un rilascio pH-dipendente dell'insulina: in ambiente gastrico acido una quota significativa di insulina viene trattenuta nelle nanoparticelle, mentre in ambiente intestinale neutro viene progressivamente rilasciata. Questo meccanismo è attribuito alla deprotonazione del chitosano a pH fisiologico, che induce il rigonfiamento del polimero causando una riduzione della stabilità delle nanoparticelle che si disgregano e rilasciano l'insulina. Il chitosano possiede, inoltre, proprietà mucoadesive dovute alla presenza di gruppi amminici protonati, che interagiscono con i residui di acido sialico e con i gruppi solfato delle mucine mediante legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche. È stato, inoltre, dimostrato che queste nanoparticelle sono in grado di indebolire e aprire in maniera reversibile le giunzioni strette delle cellule Caco-2, favorendo il trasporto paracellulare e l'assorbimento dell'insulina in vitro. Ciò è dovuto al fatto che il chitosano è in grado di indurre la redistribuzione della proteina claudina-4 dalla membrana cellulare al citoplasma, causandone la degradazione da parte dei lisosomi e la temporanea riduzione della funzione di barriera delle giunzioni strette. L'efficacia in vivo è stata valutata in modelli murini diabetici. Mentre l'insulina orale pura non ha mostrato effetti ipoglicemizzanti significativi ed è risultata caratterizzata da una biodisponibilità molto bassa, le nanoparticelle di chitosano hanno determinato una riduzione graduale e persistente della glicemia, con valori pari al 51,22% del livello iniziale dopo 12 ore, come mostrato nella *Figura 34*. Al contrario, l'insulina

somministrata per via sottocutanea ha dato una risposta più rapida, con una riduzione della glicemia al 29,33% dopo 1 ora, seguita però da un progressivo aumento fino all'89,51% del valore iniziale dopo 12 ore. [28], [48]

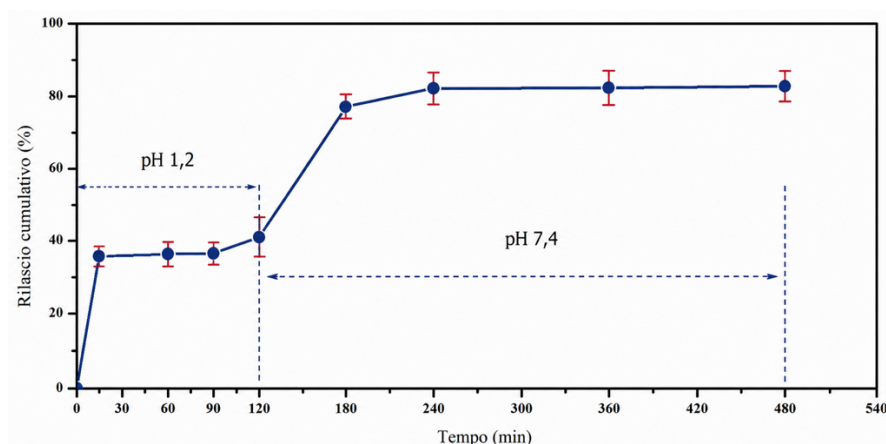


Figura 33. Illustrazione grafica del rilascio in vitro dell'insulina incapsulata in nanoparticelle di chitosano innestato con CMCD nel fluido gastrico e intestinale (adattata da [48])

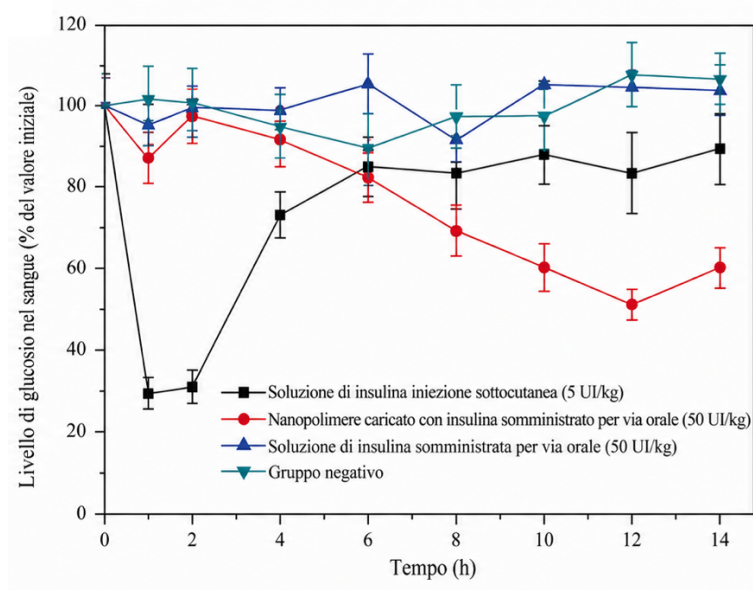


Figura 34. Illustrazione grafica del confronto dell'effetto ipoglicemizzante determinato dall'insulina somministrata per via sottocutanea, orale pura e incapsulata in nanoparticelle di chitosano innestato con CMCD (adattata da [48])

In conclusione, le formulazioni di insulina per somministrazione orale, comprese quelle basate su nanoparticelle, hanno mostrato risultati promettenti negli studi preclinici dimostrando, in particolare, una notevole capacità di proteggere l'insulina dalla degradazione enzimatica

favorendone al contempo il passaggio attraverso il muco e l'epitelio intestinale e determinando un miglioramento significativo dell'assorbimento. Tuttavia numerosi sistemi efficaci nei modelli preclinici non mantengono gli stessi livelli di efficacia e sicurezza negli studi sull'uomo, principalmente a causa della limitata capacità dei modelli animali di riprodurre la fisiologia umana e delle notevoli differenze tra essere umano e modelli murini, che contribuiscono all'elevato tasso di insuccesso già negli studi clinici di fase II. A ciò si aggiungono ulteriori criticità legate agli elevati costi dello sviluppo industriale, alla complessità dell'accesso al mercato globale e a un quadro normativo articolato e in continua evoluzione. Alcuni esempi evidenziano chiaramente tali difficoltà. Diversi esempi evidenziano queste problematiche. ORMD-0801, sviluppata da Oramed Pharmaceuticals, è una formulazione orale gastroresistente contenente insulina miscelata con EDTA, impiegato come promotore dell'assorbimento intestinale, e con un inibitore della tripsina derivato dalla soia, utilizzato per limitarne la degradazione enzimatica. Dopo risultati favorevoli negli studi clinici di fase II, nel 2023 la formulazione non ha raggiunto gli endpoint previsti nello studio di fase III ORA-D-013-1, non mostrando un miglioramento significativo rispetto al placebo né nella variazione dell'HbA1c a 26 settimane (endpoint primario) né nella glicemia a digiuno (endpoint secondario). Un'altra tecnologia promettente è rappresentata dalle *Hepatocyte Directed Vesicles* (HDV), sviluppate da Diasome Pharmaceuticals. Si tratta di nanoparticelle lipidiche modificate con ligandi di superficie diretti agli epatociti, progettate per veicolare selettivamente l'insulina al fegato. Negli studi clinici di fase II condotti in pazienti con diabete mellito di tipo 1, questa tecnologia ha determinato una riduzione significativa della glicemia postprandiale e un miglioramento complessivo del controllo glicemico. Tuttavia, lo sviluppo clinico è stato sospeso poiché l'azienda ha concentrato le proprie attività sulle formulazioni iniettabili basate sulla

stessa tecnologia. Anche Nodlin, sviluppata da NOD Pharmaceuticals, costituita da capsule gastroresistenti rivestite con ftalato di acetato di cellulosa e contenenti nanoparticelle bioadesive di fosfato di calcio caricate con insulina, ha mostrato in studi di fase I nei volontari sani un effetto ipoglicemizzante paragonabile a quello dell'insulina NPH somministrata per via sottocutanea. Tuttavia, è stata evidenziata anche una marcata variabilità interindividuale nell'assorbimento del farmaco. Risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche con Oshadi-Icp, formulazione orale costituita da capsule contenenti nanoparticelle di silice associate in modo non covalente a insulina, proinsulina e peptide C. Negli studi clinici di fase II condotti in pazienti con diabete mellito di tipo 1, la formulazione ha dimostrato un buon profilo di efficacia e sicurezza dopo somministrazioni orali ripetute. Lo sviluppo è stato, tuttavia, interrotto per approfondire i possibili rischi di accumulo a lungo termine delle nanoparticelle di silice. Un ulteriore esempio è rappresentato da I338, un analogo dell'insulina basale formulato in compresse con caprato di sodio come promotore dell'assorbimento intestinale. Negli studi clinici di fase II, il controllo glicemico ottenuto è risultato sovrapponibile a quello dell'insulina glargine somministrata per via sottocutanea. Nonostante ciò, il programma di sviluppo è stato abbandonato poiché la bassa biodisponibilità richiedeva dosi elevate di insulina, rendendo la formulazione economicamente non sostenibile. Nel complesso, questi esempi dimostrano che numerose formulazioni sono in grado di superare le principali barriere fisiologiche del tratto gastrointestinale, tuttavia, il trasferimento nella clinica di queste tecnologie dipende anche dal superamento di criticità non strettamente biologiche, quali la sostenibilità economica, la scalabilità dei processi produttivi e il rispetto dei requisiti regolatori. Pertanto, saranno necessarie ulteriori valutazioni per confermare efficacia e sicurezza nell'uomo e per sviluppare formulazioni

che risultino non solo clinicamente efficaci ma anche industrialmente e commercialmente sostenibili. [1], [49]

5.3.2 Insulina per via inalatoria

La via di somministrazione inalatoria, analogamente a quella orale, rappresenta un ambito di ricerca di grande interesse. L'insulina inalatoria, infatti, rappresenta una modalità innovativa di somministrazione dell'insulina prandiale, caratterizzata da una rapida cinetica di assorbimento e da un profilo farmacocinetico di tipo "*rapid on, rapid off*", come descritto da Cengiz E. et al., che consente una riproduzione più fedele della secrezione endogena di insulina e una riduzione del ritardo nell'azione ipoglicemizzante delle insuline prandiali ad azione rapida e ultrarapida somministrate per via sottocutanea, riducendo potenzialmente l'iperglicemia postprandiale e il rischio di ipoglicemia postprandiale tardiva. Questa via alternativa ha mostrato risultati promettenti in ambito preclinico e clinico tanto da portare allo sviluppo di formulazioni già presenti sul mercato. [40], [50]

I polmoni presentano caratteristiche particolarmente favorevoli per un'efficace somministrazione di farmaci. Infatti, essi sono costituiti da circa 480 milioni di alveoli che forniscono un'ampia superficie di assorbimento altamente vascolarizzata e un sottile epitelio che consente un rapido assorbimento delle sostanze nella circolazione sistemica. Inoltre, la via inalatoria consente di evitare il metabolismo di "primo passaggio", passaggio di degradazione epatica. Nel corso degli anni ci sono stati diversi studi e tentativi volti a sviluppare sistemi per la somministrazione inalatoria di insulina, sia sotto forma di polvere liofilizzata (Exubera, AIR e Technosphere) sia come formulazioni liquide aerosolizzate (AERx e iDMS). Tra questi, Exubera è stata la prima insulina per via inalatoria ad essere approvata dalla FDA nel 2006, e successivamente in Europa, per la

terapia insulinica in pazienti con diabete mellito di tipo 1 e 2. Nonostante l'innovatività della via di somministrazione, la diffusione del farmaco e l'accettazione da parte del paziente sono risultate piuttosto limitate a causa di diversi fattori, quali le preoccupazioni legate ai possibili effetti sulla funzionalità polmonare e al rischio di neoplasie polmonari, il profilo farmacocinetico e farmacodinamico non significativamente diverso da quello degli analoghi ad azione rapida somministrati per via sottocutanea, le dimensioni elevate dell'inalatore e la complessità d'uso. L'insieme di questi elementi ha portato al ritiro dal commercio di questo nuovo prodotto da parte del produttore Pfizer già nel 2007. Questo fallimento ha di seguito determinato l'interruzione di altri programmi di sviluppo di formulazioni inalatorie di insulina con caratteristiche simili, come nel caso dei sistemi AIR e AERx che avevano raggiunto gli studi clinici di fase III. È proseguito, invece, lo sviluppo dell'insulina inalatoria Technosphere la quale ha un profilo farmacocinetico e farmacodinamico unico rispetto alle insuline rapide sottocutanee e alle altre insuline inalatorie grazie all'insorgenza d'azione più rapida e alla durata dell'effetto più breve. Nel 2014 è stato, quindi, approvato dalla FDA per la terapia insulinica prandiale nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 e 2 *Afrezza*, un sistema combinato farmaco-dispositivo, costituito dall'insulina inalatoria Technosphere (TI), un'insulina umana ad azione rapida allo stato monomero sotto forma di polvere secca per inalazione orale, e dall'inalatore Gen2. Tuttavia, la disponibilità commerciale su larga scala in Europa e in Italia è ancora molto limitata. L'insulina Technosphere viene ottenuta tramite tecnologia del DNA ricombinante e in seguito adsorbita su microparticelle, definite tecnosfere, di fumaril dichetopiperazina (FDKP), un eccipiente inerte e biologicamente inattivo, che funge da matrice per veicolare l'insulina nei polmoni. FDKP a pH leggermente acido va incontro a un autoassemblaggio intramolecolare e cristallizza a formare microparticelle con un diametro medio di 2,0-2,5 µm. Le

dimensioni ottimali e regolari delle particelle insieme alla bassa densità apparente contribuiscono a far sì che il rilascio dell'insulina avvenga a livello del polmone profondo. Pertanto, una volta raggiunto il polmone profondo, incontrando il pH fisiologico neutro o basico degli alveoli le microparticelle passano in soluzione rapidamente, consentendo il rilascio e l'assorbimento dell'insulina nella circolazione sistemica. L'eccipiente FDKP una volta assorbito non viene metabolizzato ma viene escreto immutato nelle urine. Oltre al farmaco l'altro elemento essenziale del sistema *Afrezza* è l'inalatore di nuova generazione Gen2 che nel corso del suo sviluppo clinico è stato migliorato per ottimizzare prestazioni e facilità d'utilizzo rendendolo più piccolo, più facile da usare in quanto richiede meno passaggi prima dell'inalazione e poca manutenzione e più efficiente in quanto è necessaria meno polvere per dose e permette di ottenere un rilascio costante e riproducibile di insulina. L'erogazione al paziente di TI avviene aprendo l'inalatore, inserendo la cartuccia e inspirando, grazie allo sforzo inspiratorio le microparticelle si sollevano, deagglomerano e si disperdono nel tratto polmonare depositandosi a livello alveolare in modo da essere assorbite. Per quanto riguarda le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche, nello studio di fase I 177 TI è stata confrontata con un'equivalente dose di insulina lispro in pazienti con diabete mellito di tipo 1 dimostrando un rapido assorbimento, il raggiungimento della C_{max} in tempi significativamente inferiori (circa 10-15 minuti dopo la somministrazione rispetto a circa 50 minuti della lispro), una C_{max} maggiore (51 $\mu\text{U/mL}$ rispetto a 34 $\mu\text{U/mL}$), una biodisponibilità relativa del 33% (solo un terzo dell'insulina viene assorbita a livello polmonare rispetto alla lispro somministrata per via sottocutanea) e un ritorno alle concentrazioni basali pre-dose più rapido (entro 180-240 minuti rispetto a circa 280 minuti). È stata, inoltre, osservata una rapida eliminazione sia dell'insulina sia dell'eccipiente FDKP dal compartimento polmonare, suggerendo un potenziale di accumulo minimo durante la

somministrazione cronica di TI. Il profilo farmacocinetico, riportato nella *Figura 35*, rende TI un'insulina comparabile alle insuline prandiali ultrarapide. [36], [40]

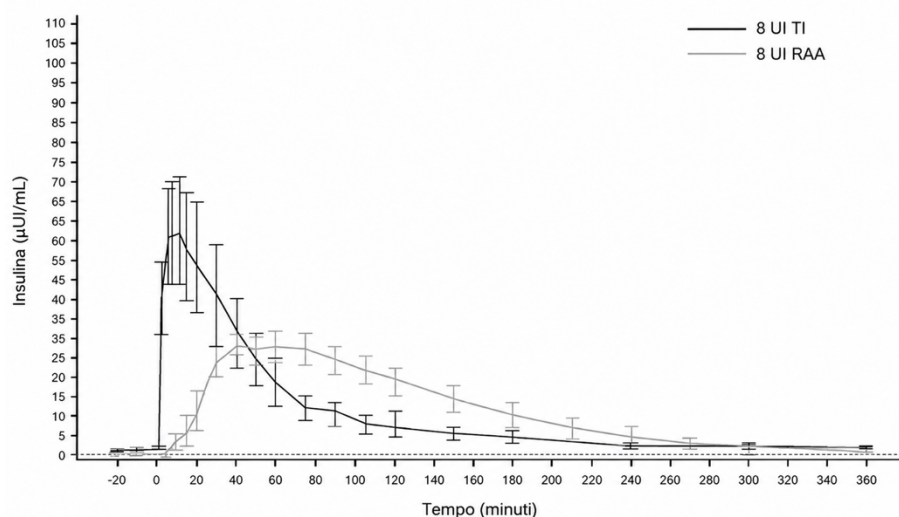


Figura 35. Rappresentazione grafica del profilo farmacocinetico dell'insulina inalatoria Tecnosphere a confronto con l'insulina lispro sottocutanea (adattata da [40])

Nello studio 171 TI è stata confrontata con l'insulina aspart somministrata per via sottocutanea in pazienti adulti affetti da diabete mellito di tipo 1 in trattamento con insulina basale, per una durata complessiva di 24 settimane. I risultati hanno dimostrato che la somministrazione prandiale di TI consente di ottenere una riduzione dell'HbA1c non inferiore rispetto all'insulina aspart. Tuttavia, una percentuale maggiore di pazienti trattati con insulina aspart ha raggiunto gli obiettivi glicemici più stringenti ($HbA1c < 7,0\%$ e $< 6,5\%$) suggerendo una possibile maggiore efficacia di quest'ultima nel conseguimento degli obiettivi metabolici ottimali. Questo dato appare coerente con il profilo farmacocinetico dell'insulina inalatoria, caratterizzato da una rapida insorgenza e una breve durata d'azione, che favorisce un controllo più efficace della glicemia postprandiale ma incide in misura minore sul controllo glicemico globale, riflesso nei valori di HbA1c. [51]

Un'analisi integrata di studi clinici di fase II e III mostra che l'insulina inalatoria è generalmente ben tollerata, con eventi avversi prevalentemente di entità lieve o moderata. L'incidenza complessiva degli eventi avversi respiratori è risultata sovrapponibile a quella osservata con le insuline somministrate per via sottocutanea, fatta eccezione per una maggiore frequenza di tosse che è l'evento avverso più comune, tipicamente di lieve intensità, non produttiva, transitoria e tendente a ridursi nel tempo; altri effetti indesiderati riportati includono infezioni delle vie respiratorie superiori (*Upper Respiratory Tract Infection* URTI), dispnea, cefalea, bronchite e irritazione della gola; sono state, inoltre, riportate modeste riduzioni della funzionalità polmonare rispetto ai valori basali ma tali variazioni si sono dimostrate limitate, non progressive e reversibili nel tempo. Ciò rende necessario il monitoraggio della funzione polmonare prima di iniziare la terapia con TI e nel tempo durante il trattamento. Inoltre, è controindicata in pazienti con malattie polmonari croniche come asma e broncopneumopatie croniche ostruttive (BPCO). Non sono emerse evidenze di alterazioni clinicamente rilevanti a livello radiologico né un aumento significativo del rischio di neoplasie polmonari, pur essendo raccomandato un monitoraggio nel tempo, soprattutto nei soggetti con fattori di rischio. [51], [52]

Un ulteriore studio di fase III condotto su pazienti con diabete mellito di tipo 1 ha mostrato che i tassi di eventi ipoglicemici postprandiali entro le prime 2 ore dal pasto sono risultati comparabili tra l'insulina inalatoria e aspart mentre nell'intervallo successivo (2-5 ore) sono risultati 2-3 volte inferiori per l'insulina inalatoria, presumibilmente per la sua breve durata d'azione. Pertanto, l'uso appropriato di TI ai pasti consente un efficace controllo delle escursioni glicemiche postprandiali e un ridotto rischio di ipoglicemia postprandiale tardiva, d'altra parte l'effetto metabolico di TI potrebbe mantenersi non sufficientemente a lungo termine, rendendo

necessaria l'introduzione di dosi supplementari nel periodo postprandiale per la gestione dell'iperglicemia postprandiale prolungata. [40]

L'efficacia dell'insulina inalatoria risulta strettamente dipendente anche da fattori pratici legati alla modalità di somministrazione. Infatti, per garantire una deposizione ottimale del farmaco a livello alveolare e una risposta terapeutica riproducibile è fondamentale la collaborazione del paziente e un'adeguata tecnica inalatoria basata su inspirazioni lente e profonde. Al contrario, inspirazioni rapide e superficiali possono causare perdite significative di farmaco a livello orofaringeo e delle vie aeree superiori, oltre che all'interno del dispositivo, riducendo la biodisponibilità. A ciò si aggiunge un ulteriore limite dell'insulina inalatoria rappresentato dal costo che è significativamente più elevato rispetto a quello dell'insulina sottocutanea poiché è necessario inalare una maggiore quantità di farmaco per ottenere un controllo glicemico paragonabile. Nonostante tali criticità, il miglioramento dell'aderenza alla terapia e il conseguente impatto positivo sugli esiti clinici determinano un rapporto costo-beneficio complessivamente favorevole, in termini di benefici clinici ma anche di miglioramento della qualità di vita. [40]

Ulteriori evidenze cliniche interessanti emergono dallo studio clinico STAT (in aperto, multicentrico) del 2017 che valuta il TIR (70-180 mg/dL) e le escursioni glicemiche postprandiali (PPGE) entro le prime 4 ore dalla somministrazione di TI rispetto ad aspart in 60 pazienti adulti (tra i 18 e i 70 anni) con diabete mellito di tipo 1 sottoposti a iniezioni multiple giornaliere. I risultati ottenuti complessivamente sono che i pazienti trattati con TI hanno ottenuto un TIR comparabile a quelli trattati con aspart ma hanno trascorso un tempo inferiore in ipoglicemia (al di sotto di 50-60 mg/dL). Anche la glicemia postprandiale è stata significativamente inferiore nella coorte TI a 60 e 90 minuti dopo i pasti. In questo studio, oltre al confronto diretto con l'insulina aspart, è stata valutata una strategia

di somministrazione più flessibile di TI che prevedeva l'eventuale utilizzo di dosi supplementari nel periodo postprandiale. Infatti, a tutti i pazienti del gruppo TI è stato consigliato di assumere inalazioni supplementari 1 e 2 ore dopo i pasti, se indicato in base ai valori di glicemia postprandiale (PPG) e 15 soggetti hanno aderito alle dosi supplementari di TI per almeno il 90% delle volte (sottogruppo TI-compliant). I risultati ottenuti nel sottogruppo TI-compliant risultano particolarmente significativi: si osserva un miglioramento del TIR (circa 62% rispetto a circa il 54%), una riduzione del tempo trascorso in iperglicemia, maggiore di 180 mg/dL (circa 34% rispetto a circa 41%) e un controllo più efficace delle PPGE nelle prime 4 ore dai pasti rispetto al gruppo aspart. [53]

Questi risultati evidenziano come l'efficacia dell'insulina inalatoria sia influenzata dalla modalità di somministrazione e dall'ottimizzazione della strategia posologica, in linea con l'attuale direzione della ricerca in questo ambito. Attualmente, infatti, la ricerca nel campo delle insuline inalatorie appare orientata prevalentemente verso il miglioramento e l'ottimizzazione delle formulazioni esistenti, in particolare di TI, piuttosto che verso lo sviluppo di nuove molecole innovative. Tale approccio è in parte incentivato dalla limitata prescrizione e utilizzo clinico della terapia insulinica inalatoria, nonostante l'approvazione da parte della FDA del sistema *Afrezza* oltre un decennio fa. La sua diffusione risulta, infatti, ancora contenuta, probabilmente a causa della limitata disponibilità di dati relativi all'impiego di dosi maggiori rispetto a quella raccomandata nell'etichetta FDA e all'utilizzo di regimi combinati con un'insulina basale. A tal proposito, un'analisi post hoc di uno studio della durata di 90 giorni condotto nel 2022 su pazienti adulti con diabete mellito di tipo 1 ha valutato proprio l'ottimizzazione del dosaggio di TI. In particolare, sono state confrontate due differenti strategie di conversione della dose rispetto agli analoghi dell'insulina ad azione rapida somministrati per via sottocutanea: una dose secondo le indicazioni standard e una dose

aumentata. I risultati hanno dimostrato che la dose maggiore è associata a un controllo glicemico postprandiale più efficace, caratterizzato da una riduzione significativamente più marcata della glicemia postprandiale e delle PPGE e da una risposta insulinica più rapida, evidenziati da un picco glicemico più basso e anticipato (30 minuti prima, a 60 minuti dal pasto rispetto a 90), come mostrato nella *Figura 36*, senza l'emergere di nuovi problemi di sicurezza. Tali evidenze, pur richiedendo conferma in studi su popolazioni più ampie, suggeriscono che un incremento della dose potrebbe contribuire a un ulteriore miglioramento del controllo dell'iperglicemia postprandiale. [54], [55]

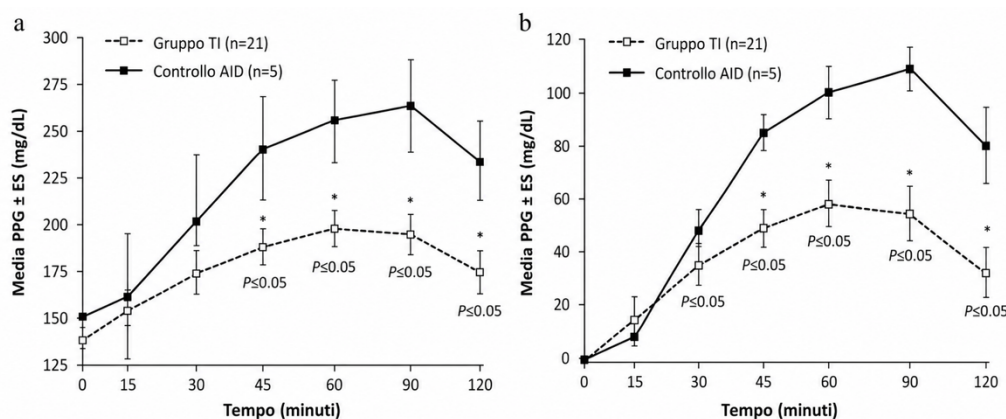


Figura 36. Rappresentazione grafica della glicemia postprandiale media (A) e delle PPGE (B) nelle 2 ore successive al pasto in seguito a somministrazione di TI rispetto al gruppo di controllo (adattata da [55])

Un ulteriore esempio dell'interesse attuale della ricerca verso l'ottimizzazione delle formulazioni già disponibili è rappresentato dagli studi clinici che valutano l'integrazione di TI in regimi basati su insuline basali. Uno studio clinico randomizzato controllato della durata di 17 settimane, condotto nel 2023 su pazienti adulti con diabete mellito di tipo 1, ha confrontato l'impiego di un regime combinato di TI e insulina degludec con la terapia convenzionale basata su iniezioni multiple giornaliere. I risultati hanno mostrato che il trattamento con TI ha un'efficacia non inferiore alla terapia convenzionale in termini di riduzione dell'HbA1c, pur evidenziando una maggiore variabilità interindividuale della risposta glicemica, con una quota più elevata di

pazienti che raggiungono l'obiettivo terapeutico ma anche che presentano un peggioramento del controllo glicemico. Le analisi basate sul monitoraggio continuo del glucosio hanno, inoltre, evidenziato che il tempo trascorso in ipoglicemia (con livelli glicemici <54 mg/dL e <70 mg/dL) è rimasto basso e sostanzialmente invariato in entrambi i gruppi, senza differenze significative. Analogamente, la percentuale di TIR non ha mostrato variazioni rilevanti tra i gruppi a 17 settimane. Per quanto riguarda il profilo di sicurezza, il trattamento con TI e degludec è stato associato a una maggiore incidenza di eventi avversi rispetto alla terapia convenzionale, principalmente tosse e dispnea, generalmente lievi e transitori. Tuttavia, non sono emerse differenze rilevanti in termini di eventi avversi gravi né evidenze di compromissione clinicamente significativa della funzione polmonare nel breve periodo, sebbene una quota di pazienti abbia interrotto il trattamento a causa di effetti collaterali.

[54]

Capitolo 6 Le terapie adiuvanti

6.1 Introduzione

Negli ultimi decenni, la ricerca di strategie terapeutiche innovative nel diabete mellito di tipo 1 ha identificato dei potenziali benefici nell'impiego di terapie adiuvanti, ovvero farmaci non insulinici utilizzati in aggiunta alla terapia insulinica. La maggior parte di questi agenti terapeutici sono farmaci approvati per il trattamento del diabete mellito di tipo 2, sebbene vi siano alcune eccezioni, come il verapamil, noto farmaco antiipertensivo. Il crescente interesse verso queste strategie terapeutiche deriva dalla consapevolezza che, nonostante i notevoli progressi ottenuti nella terapia insulinica e la conferma del suo ruolo imprescindibile nel trattamento del diabete mellito di tipo 1, permangono alcune problematiche che rendono difficile il raggiungimento di un controllo metabolico ottimale e duraturo in tutti i pazienti. Inoltre, l'intensificazione del trattamento insulinico, a volte necessaria per migliorare il controllo glicemico, può essere associata a un aumento del rischio di episodi ipoglicemici e a un incremento del peso corporeo. In tale contesto, l'aggiunta di farmaci non insulinici alla terapia insulinica convenzionale potrebbe determinare diversi benefici clinici, tra cui il miglioramento del controllo glicemico, la riduzione del fabbisogno insulinico giornaliero e la mitigazione di alcuni effetti indesiderati correlati all'uso di insulina, come l'aumento di peso e l'ipoglicemia. Inoltre, alcune di queste molecole potrebbero contribuire a ridurre il rischio di complicanze cardiovascolari, ampliando le prospettive terapeutiche nella gestione del diabete mellito di tipo 1. [5], [56]

6.2 Metformina

La metformina è un farmaco ipoglicemizzante orale appartenente alla classe delle biguanidi ed è considerata il trattamento di prima linea nel

diabete mellito di tipo 2. Il suo meccanismo d'azione si basa principalmente sulla riduzione della produzione epatica di glucosio e sul miglioramento della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. Inoltre, la metformina favorisce il mantenimento o un moderato calo del peso corporeo ed è associata a effetti benefici cardiovascolari. Questi aspetti, insieme al consolidato profilo di sicurezza osservato nei pazienti con diabete mellito di tipo 2, rappresentano il razionale per la valutazione del suo impiego come terapia aggiuntiva all'insulina nei pazienti con diabete mellito di tipo 1, in particolare in presenza di sovrappeso, obesità o insulino-resistenza. Numerosi studi clinici randomizzati controllati hanno confrontato gli effetti della terapia combinata di metformina con insulina per almeno 3 mesi con quelli della sola terapia insulinica. Una recente meta-analisi comprendente 19 studi e 1540 pazienti con diabete mellito di tipo 1 ha evidenziato come l'aggiunta della metformina sia associata a un miglioramento di diversi parametri metabolici e cardiovascolari. Sebbene sia stata osservata una tendenza alla riduzione dei valori di HbA1c, tale beneficio non è risultato costantemente significativo rispetto alla terapia insulinica da sola. Analogamente, il miglioramento della sensibilità insulinica, pur presente, non ha mostrato differenze significative in tutti gli studi considerati. Risultati più consistenti sono stati, invece, ottenuti a proposito della riduzione della glicemia a digiuno, postprandiale e dei valori glicemici medi, determinando una diminuzione del fabbisogno insulinico giornaliero. Parallelamente, sono stati osservati effetti benefici sui fattori di rischio di malattie cardiovascolari, tra cui la riduzione dello spessore medio massimo dell'intima-media carotidea, considerato un marker precoce di aterosclerosi, la diminuzione dei livelli di colesterolo

LDL⁴ e non-HDL⁵ e la riduzione della pressione sanguigna diastolica. Non sono, invece, emerse variazioni significative nei livelli di colesterolo HDL⁶ né nei valori di pressione sanguigna sistolica. Un ulteriore aspetto rilevante riguarda il controllo del peso corporeo. Diversi studi, infatti, hanno dimostrato una riduzione significativa del peso corporeo nei pazienti sovrappeso o obesi trattati con metformina in aggiunta all'insulina, suggerendo un potenziale ruolo di tale terapia adiuvante nel contrastare l'aumento ponderale frequentemente associato alla terapia insulinica intensiva. Per quanto riguarda la sicurezza, la metformina ha mostrato un profilo generalmente favorevole ma con una maggiore incidenza di effetti avversi gastrointestinali, tra cui nausea, diarrea e dolore addominale. Al contrario, non è stato osservato un incremento significativo del rischio di ipoglicemia grave e chetoacidosi diabetica rispetto alla sola terapia insulinica. Nel complesso, le evidenze attualmente disponibili suggeriscono che l'utilizzo della metformina come terapia aggiuntiva all'insulina rappresenta una potenziale strategia terapeutica per la riduzione del fabbisogno insulinico, il miglioramento di parametri metabolici e cardiovascolari e il contenimento dell'aumento ponderale, mantenendo un profilo di sicurezza accettabile. Tuttavia, nonostante i risultati promettenti, le prove disponibili non consentono ancora di dimostrare un beneficio certo sugli esiti clinici cardiovascolari a lungo termine. Pertanto, sono necessari ulteriori studi prospettici di lunga

⁴ LDL (*Low-Density Lipoprotein*): lipoproteine a bassa densità responsabili del trasporto del colesterolo dal fegato ai tessuti periferici. Livelli elevati di LDL sono associati a un aumentato rischio aterosclerotico.

⁵ Il colesterolo non-HDL rappresenta l'insieme delle lipoproteine aterogene circolanti, comprese LDL ma anche VLDL (*Very Low-Density Lipoprotein*) e lipoproteine a densità intermedia.

⁶ HDL (*High-Density Lipoprotein*): lipoproteine ad alta densità coinvolte nel trasporto del colesterolo dai tessuti periferici al fegato. Sono considerate protettive nei confronti delle malattie cardiovascolari

durata per definire con maggiore precisione il ruolo della metformina nella pratica clinica. [57]

6.3 Agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone

Gli agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1) sono farmaci antidiabetici utilizzati nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 che mimano l'azione del GLP-1, un ormone endogeno incretinico secreto dalle cellule L intestinali in risposta all'assunzione di cibo. Essi legandosi al recettore del GLP-1 ne potenziano gli effetti fisiologici, stimolando la secrezione di insulina glucosio-dipendente, inibendo il rilascio di glucagone, rallentando lo svuotamento gastrico, aumentando il senso di sazietà, inducendo la proliferazione delle cellule β pancreatiche e riducendone l'apoptosi. Tali proprietà hanno portato a valutarne l'impiego come terapia adiuvante all'insulina nei pazienti con diabete mellito di tipo 1, in particolare nei soggetti con sovrappeso, obesità o caratteristiche di insulino-resistenza. Una recente meta-analisi comprendente 24 studi clinici randomizzati controllati e 3377 pazienti con diabete mellito di tipo 1 ha valutato l'efficacia e la sicurezza degli agonisti del recettore del GLP-1 in associazione alla terapia insulinica. I risultati hanno evidenziato che il principale beneficio terapeutico dell'aggiunta di tali farmaci non sia rappresentato dall'effetto sul controllo glicemico che è risultato modesto con una riduzione dell'HbA1c misurata inferiore allo 0,3% ma piuttosto dalla perdita di peso e dalla riduzione del fabbisogno insulinico giornaliero. In particolare, la liraglutide, farmaco maggiormente rappresentato negli studi inclusi, ha determinato una significativa riduzione del peso corporeo con un effetto dose-dipendente accompagnata da una diminuzione della dose totale giornaliera di insulina necessaria per il mantenimento del controllo metabolico. Benefici analoghi, sebbene meno documentati, sono stati osservati anche con altri agonisti del

recettore del GLP-1, come exenatide. Inoltre, nei soggetti con funzione residua delle cellule β pancreatiche è stata osservata una maggiore riduzione dell'HbA1c rispetto ai pazienti privi di secrezione insulinica residua. Per quanto riguarda la sicurezza, l'utilizzo degli agonisti del recettore del GLP-1 è risultato associato a un aumento del tasso degli eventi avversi gastrointestinali, quali nausea, vomito, diarrea e riduzione dell'appetito, e da un lieve incremento del rischio di chetoacidosi diabetica. Al contrario, non è emerso un aumento significativo del rischio di ipoglicemia grave. Nel complesso, nonostante gli agonisti del recettore del GLP-1 rappresentino una promettente strategia terapeutica adiuvante nel diabete mellito di tipo 1 le evidenze disponibili non sono ancora sufficienti a raccomandarne l'impiego nella pratica clinica e rendono necessari ulteriori studi a lungo termine per definirne con maggiore precisione il profilo rischio-beneficio. [58]

6.4 Inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio (SGLT)

Il cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT-2) è una proteina espressa a livello del tubulo contorto prossimale renale responsabile del riassorbimento della maggior parte del glucosio filtrato dal glomerulo renale. Gli inibitori di SGLT-2 riducono il riassorbimento renale del glucosio aumentandone l'escrezione tramite le urine, determinando così un abbassamento della glicemia indipendente dall'azione insulinica. Negli ultimi anni questa classe farmacologica ha suscitato grande interesse come terapia adiuvante poiché numerosi studi clinici su diversi inibitori di SGLT-2 hanno dimostrato miglioramenti nel controllo glicemico associati a una riduzione delle dosi giornaliere di insulina e del peso corporeo. Tuttavia, nonostante i risultati promettenti è stato osservato un aumento del rischio di chetoacidosi diabetica che desta importanti preoccupazioni e rappresenta il principale limite alla diffusione di questi farmaci

nell'ambito del diabete mellito di tipo 1. Nello studio multicentrico, randomizzato e controllato con placebo di fase III inTandem3, è stata valutata l'aggiunta di sotagliflozin alla terapia insulinica. Sotagliflozin agisce sia a livello renale riducendo il riassorbimento del glucosio attraverso l'inibizione di SGLT-2 sia a livello intestinale rallentando l'assorbimento del glucosio e attenuando l'iperglicemia postprandiale attraverso l'inibizione di SGLT-1. I risultati hanno mostrato una percentuale significativamente maggiore di pazienti con diabete mellito di tipo 1 che ha raggiunto valori di Hb1Ac inferiori al 7,0% senza eventi di ipoglicemia grave o chetoacidosi diabetica dopo 24 settimane di trattamento. Oltre al miglioramento del controllo glicemico il farmaco ha determinato una riduzione significativa del peso corporeo, della pressione arteriosa sistolica e del fabbisogno insulinico giornaliero, senza incrementare il rischio di episodi ipoglicemici gravi. La concomitante azione favorevole su questi diversi parametri metabolici rappresenta uno degli aspetti più interessanti emersi dagli studi con sotagliflozin, distinguendolo da altre terapie adiuvanti, come metformina e agonisti del recettore del GLP-1, che hanno generalmente mostrato benefici più limitati o non altrettanto consistenti sui diversi outcome metabolici. Tali benefici sono stati, tuttavia, accompagnati da un aumento significativo del tasso di chetoacidosi diabetica, confermando come questo evento avverso rappresenti la principale criticità degli inibitori di SGLT nel diabete mellito di tipo 1. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche con altri farmaci della stessa classe, quali dapagliflozin ed empagliflozin. Alla luce del rapporto tra benefici metabolici e rischio di chetoacidosi l'impiego degli inibitori di SGLT nel diabete mellito di tipo 1 rimane limitato e richiede un'attenta selezione dei pazienti e un adeguato monitoraggio. In Europa le indicazioni per l'utilizzo di dapagliflozin e sotagliflozin nel diabete mellito di tipo 1, inizialmente approvate, sono state successivamente ritirate volontariamente dai rispettivi produttori nel 2021 e nel 2022.

Attualmente, quindi, il Giappone rappresenta l'unico paese in cui gli inibitori di SGLT sono approvati come terapia adiuvante nel diabete mellito di tipo 1. [5], [59]

6.5 Amilina e pramlintide

L'amilina è un ormone peptidico neuroendocrino co-secreto con l'insulina dalle cellule β del pancreas in risposta ai pasti e, analogamente all'insulina, risulta pressoché assente nei soggetti con diabete mellito di tipo 1 a causa della distruzione immunomediata delle cellule β . Questo ormone svolge un importante ruolo nella regolazione dell'omeostasi glicemica, rallentando lo svuotamento gastrico, sopprimendo la secrezione di glucagone e promuovendo il senso di sazietà, contribuendo così alla riduzione delle escursioni glicemiche postprandiali e al controllo del peso corporeo. Sulla base di queste proprietà fisiologiche è stato sviluppato pramlintide, un analogo sintetico iniettabile dell'amilina commercializzato come *Symlin*, che è stato approvato negli Stati Uniti come terapia adiuvante all'insulina nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2). Diversi studi clinici hanno valutato l'efficacia di questa strategia terapeutica. In particolare, uno studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo e della durata di 52 settimane, condotto su 651 pazienti con diabete mellito di tipo 1 ha dimostrato che l'aggiunta di pramlintide all'insulina determina una riduzione sostenuta dei livelli di HbA1c significativamente maggiore rispetto al gruppo placebo e una maggiore probabilità di raggiungere livelli di HbA1c inferiori al 7,0%. Tale beneficio si è associato a una riduzione del fabbisogno insulinico giornaliero, delle escursioni glicemiche postprandiali e del peso corporeo che, invece, tendeva ad aumentare nel gruppo placebo. Complessivamente, gli studi disponibili indicano che la terapia con pramlintide produce miglioramenti modesti ma clinicamente

significativi del controllo metabolico associati a una minore tendenza all'aumento di peso rispetto alla sola terapia insulinica. Per quanto riguarda il profilo di sicurezza, non sono emerse evidenze di eventi avversi cardiovascolari, epatici o renali correlati al trattamento con pramlintide. Gli eventi avversi più frequentemente riportati sono stati nausea, vomito e anoressia, generalmente transitori e di entità lieve o moderata, e vi è stato un aumento dei tassi di ipoglicemia grave nelle prime settimane. La comparsa di questi eventi avversi, insieme alla necessità di ulteriori iniezioni ai pasti, ha limitato la diffusione del pramlintide nella pratica clinica. [56], [60]

Capitolo 7 Terapie innovative alternative all'insulina

7.1 Introduzione

Accanto all'ampio sviluppo di terapie insuliniche innovative efficaci e sicure, trattato nel capitolo precedente, la ricerca degli ultimi decenni si è progressivamente orientata verso una più approfondita comprensione dei meccanismi genetici e immunologici alla base del diabete mellito di tipo 1. Tale progresso ha favorito l'elaborazione di strategie terapeutiche innovative finalizzate, da un lato, al ripristino della secrezione endogena di insulina, riducendo o addirittura eliminando la necessità della sua somministrazione esogena, e, dall'altro, alla preservazione della funzionalità residua delle cellule β pancreatiche. In questo contesto si inseriscono numerose terapie avanzate tra cui il trapianto di pancreas e di isole pancreatiche, l'impiego di cellule staminali e le più recenti applicazioni dell'immunoterapia (Figura 37). [5]

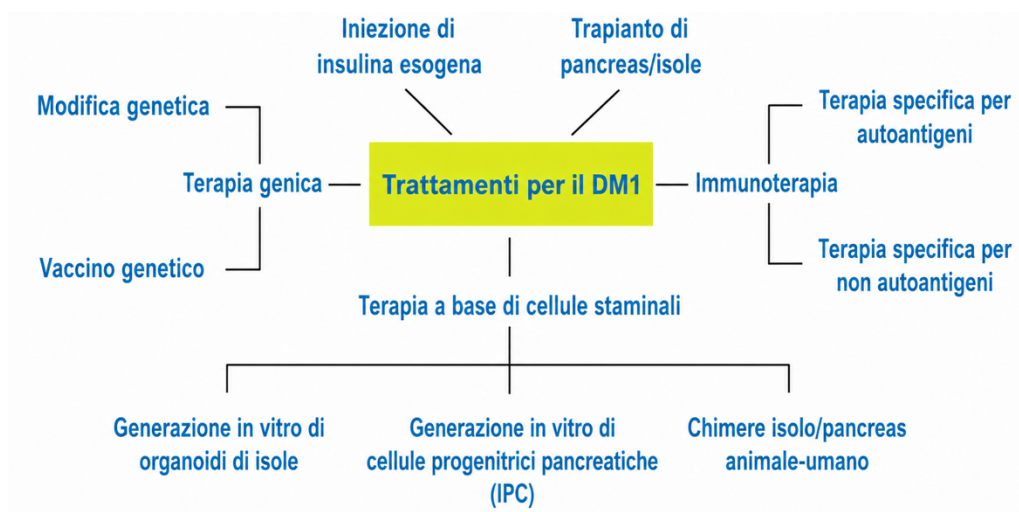


Figura 37. Illustrazione schematica delle alternative di trattamento del diabete mellito di tipo 1 attualmente approvate e in fase di studio (adattata da [61])

7.2 Trapianto di pancreas

Il trapianto di pancreas intero da donatore deceduto, eseguito per la prima volta nel 1966 presso l'Università del Minnesota, rappresenta attualmente

l'unico approccio terapeutico definitivo in grado di garantire, nel lungo termine, in modo sicuro ed efficace un controllo glicemico stabile nei soggetti affetti da diabete mellito di tipo 1. I risultati emersi dagli studi più recenti hanno evidenziato come tale trattamento consenta il raggiungimento e mantenimento dell'euglicemia, la stabilizzazione dei livelli di HbA1c e l'ottimizzazione del tempo trascorso nel range glicemico target, riducendo al contempo il rischio di ipoglicemia e chetoacidosi. Nella maggior parte dei pazienti, il trapianto permette, inoltre, di ottenere l'indipendenza dalla somministrazione insulinica e dal monitoraggio glicemico giornaliero, con un conseguente miglioramento della qualità di vita, una riduzione del carico legato alla gestione della malattia e una stabilizzazione delle complicanze diabetiche. Oltre al ripristino della secrezione endogena di insulina, il trapianto di pancreas consente anche il recupero della produzione di ormoni controregolatori e della funzione esocrina pancreatica. Tuttavia, tale procedura comporta la necessità di un complesso intervento chirurgico addominale e di una terapia immunosoppressiva cronica per la prevenzione del rigetto, oltre a dipendere dalla disponibilità di organi da donatori. Per questi motivi, il trapianto di pancreas, nonostante l'elevata probabilità di rendere il paziente euglicemico indipendentemente dall'insulina, è riservato a pazienti diabetici accuratamente selezionati, in particolare soggetti con gravi complicanze metaboliche, quali ipoglicemia asintomatica o episodi ricorrenti di chetoacidosi, oppure già sottoposti a immunosoppressione per altre condizioni, come nel caso del trapianto renale per nefropatia diabetica in fase terminale. Infatti, il trapianto di pancreas può essere eseguito come procedura isolata (*pancreas transplant alone PTA*) ma più frequentemente viene associato al trapianto di rene, simultaneamente (*simultaneous pancreas-kidney transplant SPKT*) oppure in sequenza (*pancreas after kidney transplant PAKT*). Nonostante i miglioramenti significativi delle tecniche chirurgiche, della gestione perioperatoria e dei

protocolli immunosoppressivi che hanno determinato elevati tassi di sopravvivenza sia del paziente (circa il 96-98% a 1 anno e circa il 90% a 5 anni per tutte e tre le tipologie) sia dell'innesto (circa il 91%, 86% e 87% a 1 anno rispettivamente nei riceventi di trapianto SPK, PAK e PTA e 80%, 67% e 62% a 5 anni), negli ultimi decenni in tutto il mondo si sta assistendo a un costante declino del numero di trapianti di pancreas eseguiti. Tale fenomeno sembra essere correlato a diversi fattori, tra cui la limitata consapevolezza dei benefici di tale trattamento, l'assenza di linee guida pratiche validate e di percorsi standardizzati per la selezione dei candidati, la disponibilità ridotta di centri altamente specializzati e la persistente errata percezione, anche dei medici, del trapianto come intervento ad elevato rischio. [62]

7.3 Trapianto di isole pancreatiche

Un'ulteriore strategia terapeutica alternativa alla terapia insulinica è rappresentata dal trapianto allogenico di isole pancreatiche, eseguito per la prima volta nel 1974. Tale procedura prevede il prelievo del pancreas da uno o più donatori deceduti non diabetici, seguito dall'isolamento delle isole pancreatiche mediante digestione enzimatica con collagenasi e purificazione attraverso centrifugazione. Le cellule ottenute vengono poi coltivate e infuse nel ricevente tramite la vena porta, con attecchimento prevalente a livello epatico (*Figura 38*). Il trapianto intraepatico di isole pancreatiche consente il ripristino della secrezione endogena di insulina e dell'omeostasi del glucosio, infatti, le isole pancreatiche trapiantate sono micro-organismi complessi costituiti da diversi tipi cellulari, non solo le cellule β che secernono l'insulina ma anche le cellule α che secernono il glucagone per contrastare l'ipoglicemia, le cellule δ che producono somatostatina per modulare il rilascio di insulina e glucagone e le cellule ϵ e PP che secernono polipeptide pancreatico e grelina influenzando la

funzione delle isole oltre alla digestione e all'appetito. Inoltre, tale approccio favorisce il controllo dell'iperglicemia e contribuisce alla normalizzazione del metabolismo degli acidi grassi liberi e al miglioramento della sensibilità all'insulina, oltre ad essere associato a una marcata riduzione del rischio di ipoglicemia e a un parziale recupero della secrezione degli ormoni controregolatori, in particolare del glucagone. [61], [63], [64]

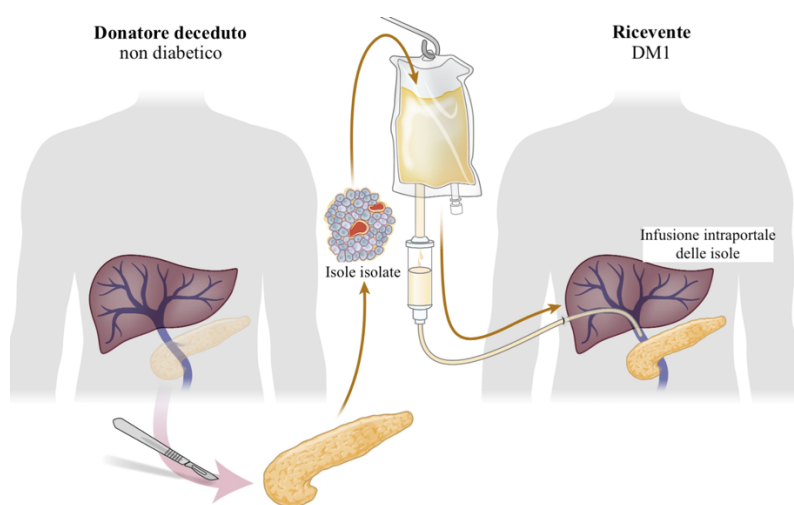


Figura 38. Rappresentazione schematica della procedura di trapianto allogenico di isole pancreatiche (adattata da [63])

Negli ultimi due decenni sono stati compiuti significativi progressi sia nelle tecniche di isolamento delle cellule insulari sia nei protocolli di immunosoppressione, con un conseguente miglioramento degli outcome clinici, tra cui il raggiungimento dell'indipendenza dall'insulina esogena a 5 anni dal trapianto in una quota significativa di pazienti, circa il 60%. Rispetto al trapianto di pancreas intero, il trapianto di isole pancreatiche presenta il vantaggio di richiedere un intervento chirurgico meno invasivo e associato a un rischio minore di morbidità, tuttavia, l'efficacia a lungo termine nel mantenimento dell'indipendenza insulinica a 5 anni risulta inferiore. Un ulteriore limite di questa strategia è rappresentato dal possibile sviluppo di autoimmunità contro le cellule β trapiantate che può determinare una progressiva perdita della funzionalità dell'innesto,

sebbene i moderni protocolli immunosoppressivi abbiano confinato tale eventualità a una minoranza di soggetti. Anche in questa procedura, analogamente al trapianto di pancreas intero, vi sono problematiche legate alla limitata disponibilità di donatori, necessità di una terapia immunosoppressiva a vita e quantità notevolmente ridotta di cellule β insulari che sopravvivono dopo l'impianto, spesso appena sufficiente a evitare l'iperglicemia e causa dell'eventuale ritorno alla somministrazione insulinica. Per tali ragioni, la ricerca attuale è orientata verso l'individuazione di fonti alternative e potenzialmente illimitate di isole pancreatiche da destinare al trapianto rivolgendo particolare interesse all'utilizzo di isole pancreatiche di origine suina e di cellule staminali umane, entrambe già oggetto di studi clinici. [61], [63]

7.4 Lantidra

Lantidra (nome commerciale di donislecel) rappresenta una delle innovazioni più rilevanti nell'ambito delle terapie avanzate per il diabete mellito di tipo 1. Come affermato da Erbasan E. et al., questa terapia costituisce una “pietra miliare” nel trattamento del diabete mellito di tipo 1, essendo la prima terapia a base di isole pancreatiche allogeniche approvata dalla FDA nel 2023. L'indicazione è rivolta a pazienti adulti con diabete mellito di tipo 1 altamente selezionati, caratterizzati da un controllo glicemico non ottimale nonostante la terapia insulinica intensiva ed episodi ipoglicemici gravi e ricorrenti. La produzione di Lantidra, mostrata nella *Figura 39*, prevede il prelievo del pancreas da un donatore deceduto non diabetico che viene sottoposto a digestione enzimatica tramite collagenasi, processo che consente la degradazione della matrice extracellulare e la separazione delle isole pancreatiche dalla componente esocrina circostante. Successivamente le isole vengono purificate tramite procedure di centrifugazione volte a selezionare e isolare le cellule

funzionali e a eliminare le impurità residue. Queste isole allogeniche, altamente purificate e vitali, costituiscono Lantidra. Prima del trapianto, ogni lotto di Lantidra viene sottoposto a rigorosi controlli di qualità finalizzati a garantire identità, qualità, quantità, vitalità, purezza, sterilità e potenza. A questo punto dopo una fase di incubazione che dura fino a 48 ore prima della preparazione finale, Lantidra viene infuso nel ricevente attraverso la vena porta. Una volta attecchite a livello epatico, le isole trapiantate, costituite da cellule α , β , δ , ϵ e PP, sono in grado di ripristinare la secrezione fisiologica insulinica glucosio-dipendente e l'omeostasi del glucosio, riducendo significativamente, o addirittura eliminando completamente, la necessità di somministrazione di insulina esogena. [64]

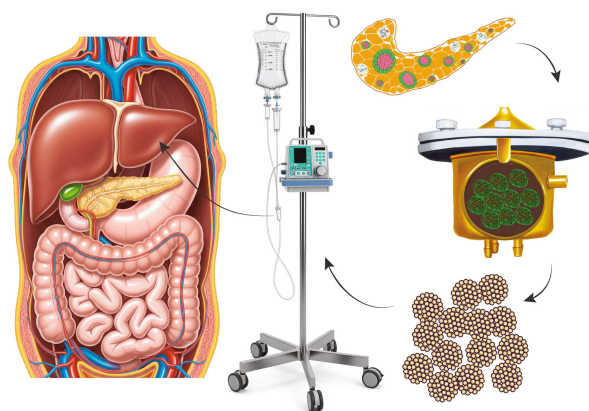


Figura 39. Illustrazione schematica del percorso di Lantidra dal pancreas del donatore al ricevente (riprodotta da [64])

Lo sviluppo clinico e l'ottenimento dell'approvazione di Lantidra sono fondati principalmente su due studi clinici condotti presso l'Università dell'Illinois di Chicago che hanno coinvolto complessivamente 30 pazienti adulti con diabete mellito di tipo 1 caratterizzato da ipoglicemia problematica, definita come incapacità di riconoscere i sintomi dell'ipoglicemia e presenza di ricorrenti episodi ipoglicemici gravi nonostante la terapia insulinica intensiva. I risultati hanno mostrato che 21 soggetti hanno mantenuto l'indipendenza dalla terapia insulinica per almeno un anno dopo il trapianto, 11 dei quali hanno conservato tale beneficio fino a cinque anni. Tali dati sono stati considerati dalla FDA una

dimostrazione sostanziale dell'efficacia terapeutica di Lantidra. Anche nei casi in cui non è stata raggiunta la completa indipendenza dall'insulina il trapianto ha apportato benefici clinicamente significativi, tra cui una riduzione del fabbisogno insulinico giornaliero, una maggiore stabilità dei valori glicemici e una diminuzione del rischio di eventi ipoglicemici gravi grazie a un miglioramento complessivo della regolazione della glicemia. Inoltre, a un anno dall'infusione di Lantidra è stato osservato un miglioramento dei principali parametri metabolici: l'HbA1c si è ridotta da 7,38% a 6,01%, la glicemia a digiuno da 9,2 mmol/L a 6,0 mmol/L e la glicemia postprandiale a 90 minuti da 19,6 mmol/L a 8,7 mmol/L. Nonostante i risultati incoraggianti, la terapia presenta ancora importanti limitazioni sulla sicurezza e tollerabilità. Un'altra importante criticità è rappresentata dalla necessità di immunosoppressione a vita per prevenire il rigetto delle isole trapiantate. A ciò si aggiungono i rischi associati all'intervento chirurgico, tra cui sanguinamento e trombosi della vena porta, nonché la possibilità di una progressiva perdita della funzionalità dell'innesto con conseguente ritorno alla terapia insulinica. Durante un follow up medio di 6,5 anni quasi tutti i partecipanti agli studi clinici hanno riportato almeno un evento avverso grave (*serious adverse event SAE*) e gli effetti collaterali più frequenti sono stati nausea, diarrea, cefalea, astenia, iponatriemia, aumento delle transaminasi, infezioni delle vie respiratorie superiori e del tratto urinario, mialgia, diminuzione dell'emoglobina e ipercolesterolemia. Tali manifestazioni risultano attribuibili non solo al prodotto Lantidra ma anche e soprattutto ai farmaci immunosoppressori. Sono stati, inoltre, segnalati due decessi le cui cause sono correlate principalmente all'immunosoppressione a lungo termine e alle comorbilità. Alla luce di tali evidenze, il profilo di sicurezza di Lantidra indica l'assoluta necessità di valutare accuratamente caso per caso il potenziale beneficio di tale terapia derivante dalla prevenzione delle ipoglicemie gravi e dal miglioramento del controllo glicemico

rispetto ai rischi connessi all'intervento e all'immunosoppressione cronica. Nonostante queste limitazioni, l'introduzione sul mercato di Lantidra rappresenta un importante passo in avanti nel campo del trapianto di isole pancreatiche e apre nuove prospettive di ricerca volte a superare gli attuali limiti, migliorare la sopravvivenza dell'innesto, individuare siti di trapianto alternativi all'infusione intraportale e sviluppare strategie che rendano questa opzione terapeutica più sicura, efficace e accessibile. [64]

7.5 Terapie basate sulle cellule staminali

La limitata disponibilità di donatori idonei di pancreas e isole pancreatiche ha spinto i ricercatori e scienziati a sviluppare delle strategie terapeutiche alternative basate sull'impiego di cellule staminali, considerate una potenziale fonte illimitata di cellule β funzionali. L'obiettivo di tale approccio analogamente a quello dei trapianti sopra discussi è il ripristino della funzione fisiologica di rilascio dell'insulina e il conseguente controllo dell'iperglicemia senza ricorso alla terapia insulinica esogena, attraverso la secrezione di quantità sufficienti di questo ormone in risposta al glucosio nel plasma. Le principali strategie attualmente studiate prevedono la generazione in vitro di cellule progenitrici pancreatiche (IPC) e di organoidi di isole pancreatiche a partire da diverse tipologie di cellule staminali, tra cui cellule staminali embrionali umane (hESC), cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) e, in misura minore, cellule staminali adulte. Le hESC sono cellule pluripotenti derivanti dalla massa cellulare interna della blastocisti⁷ che possiedono un'elevata capacità di proliferazione, autorinnovamento e differenziamento verso molteplici tipi cellulari. Le hiPSC, invece, vengono ottenute mediante riprogrammazione di cellule somatiche umane adulte verso uno stato

⁷ Stadio precoce dell'embrione mammifero che precede l'impianto nell'utero

pluripotente simile a quello embrionale, mantenendo analoghe potenzialità proliferative e differenziative. Per quanto riguarda le cellule staminali adulte, sebbene sia stata descritta la loro presenza nel tessuto pancreatico di uomo e animale adulti, il loro effettivo contributo ai processi di rigenerazione delle cellule β rimane ancora oggetto di dibattito. A partire dai primi due tipi di cellule staminali sopra citati, attraverso protocolli di differenziamento in vitro che ripercorrono le fasi dello sviluppo embrionale pancreatico, mediante l'impiego di fattori di crescita, citochine e modulatori di segnalazione, come mostrato nella *Figura 40*, è possibile ottenere le IPC che sono cellule progenitrici immature le quali, una volta impiantate nel paziente diabetico, possono completare la maturazione in vivo fino a cellule β funzionali, capaci di secernere insulina in risposta agli stimoli glicemici. [61]

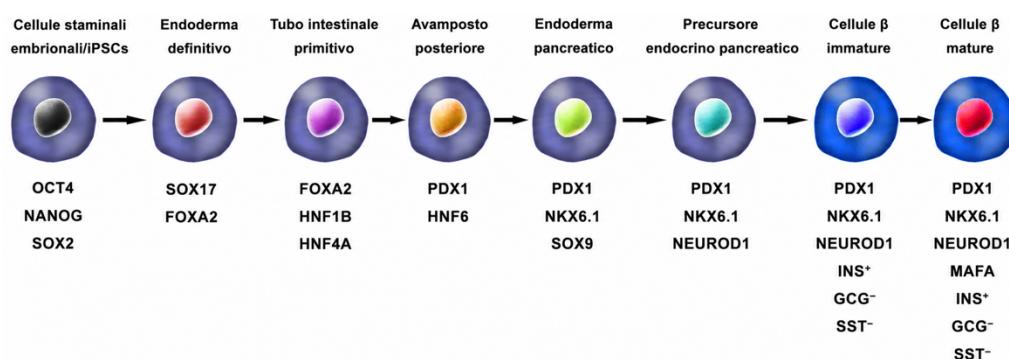


Figura 40. Illustrazione schematica della differenziazione delle hESC e hiPSC in cellule β mature con indicazione delle molecole chiave nelle fasi di sviluppo (adattata da [61])

Tuttavia, gli studi disponibili evidenziano che l'efficienza di differenziamento e di maturazione delle IPC in cellule β funzionali rimane ancora ridotta. In modelli sperimentali animali è stata osservata la capacità di tali cellule di secernere insulina e di invertire l'iperglicemia, sebbene con caratteristiche funzionali non completamente sovrapponibili a quelle delle cellule β umane mature. Inoltre, l'ambiente in vivo del paziente trapiantato sembra svolgere un ruolo determinante nell'influenzare e promuovere la maturazione e differenziamento delle IPC, aspetto che

richiede ulteriori approfondimenti per poter utilizzare in clinica queste cellule. Un ulteriore sviluppo riguarda la possibilità di differenziamento delle hESC e hiPSC non solo in popolazioni cellulari di tipo β ma in veri e propri organoidi insulari pancreatici, costituiti dai diversi tipi di cellule insulari (α , β , δ , ϵ e PP), in grado di riprodurre le interazioni tra le diverse componenti contribuendo in modo più fisiologico al mantenimento dell'omeostasi del glucosio. Gli organoidi di isole pancreatiche sono colture tridimensionali in vitro contenenti i diversi tipi cellulari pancreatici in grado di riprodurre, almeno parzialmente, la morfologia in vivo, l'architettura cellulare e la funzionalità organo-specifica. In diversi studi preclinici gli organoidi hanno mostrato un'azione di secrezione insulinica in risposta al glucosio in vitro e in vivo e una maggiore sensibilità al glucosio, oltre al raggiungimento entro pochi giorni della normoglicemia in topi diabetici. Una delle principali problematiche che si ripresenta anche nel caso delle terapie basate sull'utilizzo di cellule staminali è la necessità di una terapia immunosoppressiva per tutta la vita per prevenire il rigetto delle cellule trapiantate a causa del riconoscimento da parte del sistema immunitario di queste come *non self* e il conseguente attacco per distruggerle. Per eliminare la necessità di immunosoppressione particolare interesse è stato rivolto alla tecnica di incapsulamento, sia delle isole pancreatiche provenienti da donatore umano sia delle cellule pancreatiche ottenute dalle cellule staminali, attualmente in fase di sperimentazione clinica. Questa strategia si basa sull'utilizzo di matrici biocompatibili semipermeabili che racchiudono le cellule in nanosfere (di spessore < 100 nm), microsfele (di diametro compreso tra 500 e $1000\ \mu\text{m}$) o macrosfele (di diametro > 1 mm) isolandole immunologicamente per impedire la reazione del sistema immunitario ma al contempo consentendo un adatto flusso sanguigno, il passaggio di nutrienti, ossigeno e molecole di segnalazione e il rilascio nell'ambiente biologico dell'insulina secreta. Tra

i materiali studiati, l'alginato purificato, un polisaccaride prodotto dalle alghe brune, tal quale o modificato, si è dimostrato particolarmente promettente per la sua biocompatibilità, bassa tossicità, facilità di preparazione e capacità di preservare la vitalità e funzionalità delle cellule β derivate da cellule staminali. Questo polisaccaride, in presenza di cationi bivalenti come Ca^{2+} o Ba^{2+} , gelifica grazie alla formazione di legami ionici crociati creando così le microsfeere o microgel. In conclusione, le terapie basate su cellule staminali rappresentano un approccio molto promettente per il trattamento del diabete mellito di tipo 1, attualmente in una fase di transizione tra sperimentazione clinica e approvazione delle prime terapie, con risultati che offrono una concreta speranza per il futuro del trattamento di tale patologia. Sono necessari, però, ulteriori studi a causa delle numerose questioni oggetto di dibattito rimaste ancora aperte, in particolare il miglioramento dell'efficienza di differenziamento e maturazione cellulare, la protezione delle cellule impiantate dal sistema immunitario e il raggiungimento di una reale indipendenza dall'insulina esogena. [61]

7.6 Immunoterapia

Anche nel caso del diabete mellito di tipo 1, come per svariate malattie autoimmuni, trovano spazio anche le immunoterapie, cioè terapie mirate ai linfociti T, linfociti B e citochine, attori del sistema immunitario, con lo scopo di prevenire o ritardare la perdita di massa funzionale delle cellule β . Infatti, i pazienti con diabete mellito di tipo 1 di recente diagnosi presentano una funzione residua delle cellule β che offre l'opportunità di sviluppare interventi mirati in grado di preservare la funzione delle cellule insulari per anni o decenni dopo la diagnosi. In particolare, poiché la patogenesi del diabete di tipo 1 viene attribuita ai linfociti T autoreattivi che sfuggono alla selezione timica e migrano in periferia distruggendo le

isole di Langerhans le ricerche recenti si sono concentrate su interventi che hanno come target proprio i linfociti T con ancora molti agenti in fase di sviluppo attivo. Tuttavia, finora questi approcci hanno avuto solo un successo parziale, motivo per cui è subentrata un'ulteriore ipotesi che sostiene che la cellula β stessa contribuisca alla sua distruzione esponendo determinanti antigenici che ne consentono il riconoscimento da parte del sistema immunitario. Per quanto riguarda gli interventi mirati alle cellule immunitarie, molte strategie terapeutiche sono incentrate su anticorpi diretti verso le cellule T effettrici, come teplizumab e oteelixizumab, i quali sono anticorpi anti-CD3 che hanno mostrato un'attenuazione della perdita di massa funzionale di cellule β . [14], [65]

Teplizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato appartenente alla classe delle immunoglobuline G1 (IgG1), diretto contro il recettore CD3 espresso sui linfociti T. Questa molecola deriva dall'anticorpo murino OKT3, impiegato per la prevenzione del rigetto dei trapianti d'organo, del quale vengono mantenute le regioni determinanti la complementarità (CDR), responsabili del riconoscimento antigenico. Rispetto all'anticorpo originario, teplizumab presenta delle modifiche strutturali nella porzione Fc che consistono nella sostituzione di due residui di leucina con alanina. Tali modifiche riducono l'interazione con i recettori Fc, determinando una significativa attenuazione dell'attivazione dei linfociti T e del conseguente rilascio di citochine proinfiammatorie. Dopo un lungo percorso di sviluppo durato diversi decenni, comprendente numerosi studi preclinici e sei studi clinici, nel novembre 2022 teplizumab ha ottenuto l'approvazione da parte della FDA per ritardare l'insorgenza del diabete mellito di tipo 1 di stadio 3 negli adulti e bambini di età pari o superiore a 8 anni con diabete di stadio 2. Tale approvazione rappresenta un traguardo significativo, poiché teplizumab rappresenta il primo farmaco approvato in grado di modificare il decorso di una malattia autoimmune prima della sua

insorgenza clinica. Dei sei studi clinici condotti, cinque hanno valutato sicurezza, tollerabilità ed efficacia di teplizumab in soggetti con diabete di tipo 1 di stadio 3, somministrato tramite infusione endovenosa secondo differenti schemi terapeutici: un singolo ciclo di 12 o 14 giorni (studio 1), un secondo ciclo dopo un anno (studio AbATE), due cicli a differenti dosaggi distanziati di 6 mesi (studio Protégé ed Encore) e in pazienti arruolati tra 4 e 12 mesi dalla diagnosi (studio Delay). Complessivamente, questi studi hanno evidenziato la preservazione della funzione delle cellule β pancreatiche, valutata come mantenimento dei livelli di peptide C rispetto ai gruppi di controllo. Tale effetto è risultato di maggiore entità nei soggetti trattati nelle fasi più precoci della malattia, in particolare entro 6 settimane dalla diagnosi. La preservazione della funzione delle cellule insulari si è associata a una riduzione significativa del fabbisogno di insulina esogena durante il follow up a uno e due anni, in alcuni casi è stata osservata addirittura una temporanea assenza della necessità della terapia insulinica. Il trattamento con teplizumab è associato a diversi effetti avversi, come aumento degli enzimi epatici, aumento del rischio di infezioni, sindrome da rilascio di citochine (CRS), reazioni di ipersensibilità (tra cui rash cutaneo, orticaria ed edema periferico) e disturbi ematologici e linfatici (come neutropenia, linfopenia transitoria e anemia). Nel complesso, il profilo di sicurezza osservato negli studi clinici è risultato comunque favorevole e compatibile con l'impiego del farmaco nei soggetti selezionati. [66]

Il sesto studio clinico, uno studio di fase II randomizzato e controllato con placebo, è stato condotto su soggetti affetti da diabete mellito di tipo 1 di stadio 2 con l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'intervento immunomodulante precoce con teplizumab nel ritardare la progressione della malattia verso la fase clinicamente manifesta. I risultati hanno dimostrato che un singolo ciclo di 14 giorni di infusioni endovenose

giornaliere di teplizumab ha ritardato significativamente l'insorgenza del diabete di tipo 1 in stadio 3. Durante il periodo di follow up, infatti, la diagnosi di diabete è stata ricevuta dal 43% dei soggetti trattati con teplizumab rispetto al 72% dei soggetti appartenenti al gruppo placebo. Inoltre, il tempo mediano della progressione verso il diabete clinico di stadio 3 è risultato significativamente più lungo nel gruppo trattato, con un ritardo dell'insorgenza clinica di circa due anni rispetto ai controlli. Questi risultati hanno fornito la prima evidenza che un trattamento immunomodulante può modificare la storia naturale del diabete mellito di tipo 1 nelle sue fasi precliniche. [66]

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione immunologico, si ritiene che teplizumab eserciti il proprio effetto terapeutico inducendo uno stato di anergia, inattivazione funzionale ed esaurimento dei linfociti T CD8⁺ autoreattivi che sono cellule chiave che mediano la distruzione autoimmune delle cellule β pancreatiche. In seguito al trattamento con teplizumab, queste cellule perdono progressivamente la capacità di proliferare e di rilasciare citochine proinfiammatorie, tra cui il TNF α (fattore di necrosi tumorale α) e l'interferone γ , con la conseguente attenuazione del danno autoimmune a carico delle cellule β . Inoltre, teplizumab promuove l'espansione di specifiche sottopopolazioni di linfociti T CD8⁺ caratterizzati da un fenotipo di esaurimento funzionale associato a una minore attività citotossica nei confronti delle cellule β , tra cui i linfociti T CD8⁺ che esprimono marcatori come TIGIT e KLRG1. Questi aspetti, insieme alla preservazione dei linfociti T regolatori, favoriscono l'instaurarsi di un microambiente favorevole alla tolleranza immunitaria e un controllo maggiore della risposta immunitaria. [66]

Un ulteriore approccio immunoterapico che ha mostrato risultati interessanti negli studi clinici condotti sia in età pediatrica sia in soggetti adulti con diabete mellito di tipo 1 è rappresentato dalla globulina

antitimocitaria (ATG), comunemente impiegata per il trattamento del rigetto nei trapianti d'organo. Nel contesto del diabete autoimmune, l'ATG è stata valutata in pazienti con diabete mellito di tipo 1 di nuova insorgenza a basso dosaggio, in modo da ridurre gli effetti avversi associati alla CRS. I risultati ottenuti dimostrano che tale trattamento è in grado di preservare a lungo termine la funzione delle cellule β , valutata mediante la secrezione di peptide C, e di contribuire a un miglioramento del controllo glicemico, evidenziato dalla riduzione dei livelli di HbA1c. Dal punto di vista immunologico, infatti, l'ATG determina una profonda modulazione del compartimento linfocitario, caratterizzata dalla deplezione selettiva dei linfociti T CD4⁺ e da un effetto meno marcato sui linfociti T CD8⁺, con conseguente alterazione del rapporto CD4/CD8. Un altro aspetto rilevante è l'alterazione del bilanciamento tra linfociti T regolatori (Treg) e linfociti T convenzionali (Tconv). In particolare, l'ATG induce una riduzione significativa dei linfociti Tconv, considerati i principali effettori della risposta autoimmune, mentre la diminuzione dei linfociti Treg risulta meno accentuata. Ne consegue un incremento del rapporto Treg/Tconv, responsabile dei meccanismi di tolleranza immunitaria e soppressione delle risposte autoimmuni. Inoltre, è stato osservato un aumento della quota di linfociti Treg che esprimono TIGIT, una molecola in grado di inibire le risposte infiammatorie mediate dai linfociti T helper di tipo 1 e 17, frequentemente riscontrate nei pazienti con diabete di tipo 1. Nel complesso, tali alterazioni della composizione linfocitaria conducono alla creazione di un ambiente potenzialmente tollerogenico, ovvero una condizione in cui prevalgono i meccanismi di controllo della risposta immunitaria rispetto ai meccanismi effettori, con conseguente riduzione dell'attacco autoimmune delle cellule β pancreatiche. È stato anche studiato l'utilizzo in combinazione di ATG a basso dosaggio con il fattore stimolante le colonie granulocitarie (GCSF), ipotizzando un potenziale effetto sinergico. Tale strategia ha dimostrato risultati promettenti in

modelli preclinici, in particolare nei topi NOD, tuttavia i dati derivanti dagli studi clinici non hanno riportato benefici significativi di tale combinazione rispetto alla monoterapia con ATG a basso dosaggio in termini di preservazione della secrezione di peptide C. [67]

Analogamente a quanto osservato in altre patologie autoimmuni, anche nel diabete mellito di tipo 1 svolgono un ruolo rilevante nel mantenimento della risposta autoimmune i linfociti T della memoria effettrice. In particolare, i linfociti T effettori, soprattutto le sottopopolazioni $CD4^+$ e $CD8^+$, sono considerati i principali mediatori del danno a carico delle cellule β pancreatiche. Una quota di tali cellule, una volta attivata, può differenziarsi in linfociti T della memoria, sia effettrice (Tem) sia centrale (Tcm), contribuendo alla persistenza e cronicizzazione del processo autoimmune grazie alla loro capacità di rapida riattivazione in caso di successive esposizioni antigeniche. In questo contesto si inserisce lo studio T1DAL (*Inducing Remission in New-Onset T1DM with Alefacept*), che ha valutato l'efficacia di Alefacept in adolescenti e giovani adulti con diabete mellito di tipo 1 di nuova insorgenza. Alefacept è una proteina di fusione costituita dal dominio extracellulare del recettore umano LFA-3 legato alla porzione Fc di IgG1, progettata per legarsi a CD2 che è espresso prevalentemente sui linfociti T della memoria effettrice $CD4^+$ e $CD8^+$ e sui linfociti T della memoria centrale. Il legame con CD2 interferisce con i segnali di costimolazione necessari all'attivazione e proliferazione delle cellule Tem e Tcm, determinandone così una riduzione, come mostrato nella *Figura 41*. In particolare, il trattamento con alefacept è associato a una deplezione più marcata dei linfociti T della memoria effettrice e centrale rispetto al placebo e al contempo a una preservazione dei linfociti Treg, con conseguente incremento del rapporto linfociti Treg/linfociti Tem e Tcm. Questo intervento immunitario mirato e ben tollerato nella fase di recente insorgenza ha dimostrato benefici clinici e metabolici duraturi

grazie al rimodellamento del compartimento linfocitario, quali la significativa preservazione della funzione β -cellulare residua che si traduce in una più lenta riduzione della secrezione insulinica endogena rispetto al gruppo placebo, il ridotto fabbisogno di somministrazione di insulina esogena e il minore rischio di eventi ipoglicemici. Al contrario, i livelli di HbA1c non mostrano differenze significative tra i due gruppi, verosimilmente per l'effetto compensatorio della terapia insulinica intensiva, che può mascherare differenze nella funzione β -cellulare residua. [65]

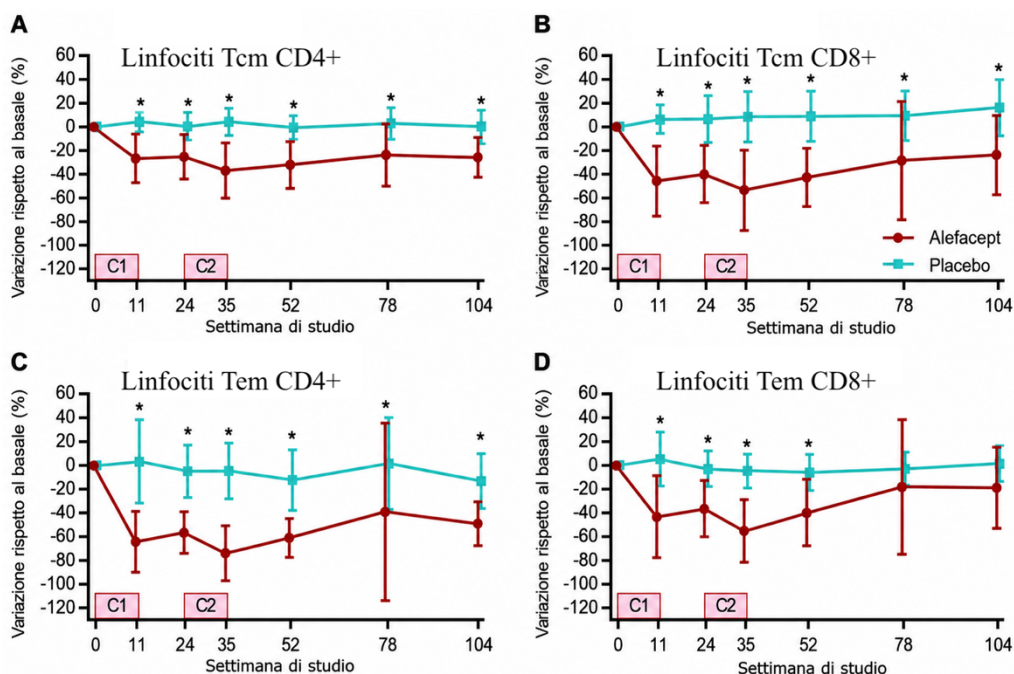


Figura 41. Illustrazione grafica dell'alterazione delle cellule T della memoria centrale (A e B) ed effettrice (C e D) durante i 24 mesi dello studio T1DAL nei partecipanti trattati con Alefacept e con placebo (adattata da [65])

Sebbene il ruolo centrale dei linfociti T autoreattivi nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1 sia ampiamente riconosciuto e abbia rappresentato il principale target degli interventi immunoterapici sviluppati finora, numerose evidenze suggeriscono il coinvolgimento anche dei linfociti B nel processo autoimmune. Tale ipotesi è supportata dalla presenza, fin

dalle fasi iniziali precliniche e asintomatiche della malattia, di autoanticorpi diretti contro antigeni specifici delle cellule β , tra cui l'insulina, GAD65, ZnT8 e IA2. Oltre alla produzione di autoanticorpi, si ritiene che i linfociti B partecipino attivamente alla patogenesi del diabete mellito di tipo 1 attraverso la presentazione dell'antigene ai linfociti T e il mantenimento e amplificazione della risposta autoimmune, contribuendo anch'essi alla progressiva distruzione delle cellule β pancreatiche. Queste osservazioni hanno portato allo sviluppo di strategie immunoterapiche mirate alla deplezione selettiva dei linfociti B, tra cui rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico, costituito da regioni variabili murine e regioni costanti umane, diretto contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie dei linfociti B. Gli studi preclinici, in particolare quelli condotti su topi NOD geneticamente modificati per esprimere il CD20 umano, hanno fornito risultati incoraggianti sul possibile ruolo della deplezione dei linfociti B nel ritardare la progressione del diabete mellito di tipo 1. Anche negli studi clinici condotti su soggetti con diabete mellito di tipo 1 di recente insorgenza, rituximab ha determinato un rallentamento del declino della funzione delle cellule β , supportato dal mantenimento di livelli più elevati di peptide C e da una maggiore secrezione di insulina rispetto ai controlli. Tuttavia, tali benefici si sono rivelati transitori e limitati nel tempo, essendo evidenti durante il primo anno di follow up ma tendendo ad affievolirsi progressivamente già dal secondo anno di osservazione. Pertanto, i risultati ottenuti dagli studi su rituximab suggeriscono che la sola terapia immunomodulante mirata alla deplezione selettiva dei linfociti B non sia in grado di ritardare o arrestare il processo autoimmune in maniera stabile e duratura ma confermano comunque l'importanza di queste cellule nella patogenesi della malattia, fornendo così il razionale per lo sviluppo di ulteriori approcci terapeutici, come la somministrazione prolungata o ripetuta di rituximab e strategie

terapeutiche combinate, ad esempio con la liraglutide, un agonista del recettore GLP-1. [14], [68]

In alternativa alle strategie terapeutiche dirette contro le cellule immunitarie, sono stati sviluppati approcci immunomodulanti finalizzati all'inibizione di specifiche citochine proinfiammatorie coinvolte nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1, come l'interleuchina 21 (IL-21), l'interleuchina 6 (IL-6) e il TNF α . Tra queste, di particolare interesse è il TNF α che rappresenta uno dei principali mediatori dell'infiammazione autoimmune. Questa citochina è presente a concentrazioni elevate nel siero dei soggetti con diabete mellito di tipo 1 di recente insorgenza e numerose evidenze in modelli murini ne suggeriscono un ruolo nel promuovere i processi infiammatori coinvolti nello sviluppo della malattia. Per tali motivi è stato identificato come potenziale bersaglio terapeutico e sono stati valutati diversi farmaci anti-TNF α , tra cui infliximab, adalimumab, etanercept e golimumab. [14]

I risultati più promettenti sono stati ottenuti con golimumab, un anticorpo monoclonale umano appartenente alla classe delle IgG1 che ha come target selettivo il TNF α e ne neutralizza l'attività biologica. L'efficacia di golimumab è stata valutata nello studio T1GER, uno studio multicentrico di fase II, randomizzato e controllato con placebo, condotto su bambini e giovani adulti di età compresa tra i 6 e 21 anni con diabete mellito di tipo 1 di stadio 3 di recente diagnosi. Il trattamento, somministrato per via sottocutanea per 52 settimane, ha dimostrato una significativa capacità di preservare la funzione residua delle cellule β pancreatiche, valutata mediante i livelli di peptide C, associata a un minore fabbisogno di insulina esogena e una maggiore probabilità di raggiungere una fase di remissione parziale della malattia, definita "*honeymoon phase*", rispetto al gruppo placebo. Per quanto riguarda la sicurezza, golimumab è risultato generalmente ben tollerato. La frequenza degli eventi avversi è stata

complessivamente sovrapponibile a quella osservata nel gruppo placebo e non sono emersi nuovi segnali di sicurezza rilevanti. Sebbene i risultati dello studio T1GER supportino il potenziale ruolo dell'inibizione del TNF α come strategia terapeutica nel diabete mellito di tipo 1 di recente insorgenza, il numero relativamente limitato di partecipanti e la durata del follow up non consentono di trarre conclusioni definitive sull'efficacia a lungo termine del trattamento. Pertanto, saranno necessari ulteriori studi clinici di più ampia scala e con periodi di osservazione prolungati per confermare tali evidenze e definire il ruolo di golimumab nella pratica clinica. [69]

Nel complesso, gli interventi immunoterapici sopra discussi hanno fornito incoraggianti evidenze della possibilità di modificare, almeno parzialmente, il decorso del diabete mellito di tipo 1. Sebbene tali strategie agiscano su differenti componenti della risposta autoimmune, quali i linfociti T, i linfociti B e le citochine proinfiammatorie, tutte hanno dimostrato la capacità di preservare, almeno temporaneamente, la funzione residua delle cellule β pancreatiche e di rallentare la progressione della malattia. Tuttavia, i benefici osservati tendono generalmente ad attenuarsi nel tempo e attualmente nessuno di questi approcci si è dimostrato da solo in grado di prevenire o ritardare la progressione della patologia in modo permanente e di garantire un controllo duraturo del processo autoimmune. Queste osservazioni evidenziano la complessità del diabete mellito di tipo 1, una malattia autoimmune eterogenea, caratterizzata da diversi stadi, variabilità nell'età d'insorgenza e nella velocità di progressione, nonché dal coinvolgimento di molteplici componenti del sistema immunitario che interagiscono tra di loro. Ne consegue che interventi mirati a un singolo meccanismo patogenetico non sono sufficienti a ottenere un beneficio clinico duraturo. [14]

Alla luce dei limiti delle attuali strategie immunomodulanti, la ricerca attuale nel campo dell'immunoterapia del diabete mellito di tipo 1 si sta progressivamente orientando verso approcci innovativi basati sia sulla combinazione di trattamenti diretti contro differenti bersagli immunologici sia sul ripristino della tolleranza immunologica nei confronti degli autoantigeni pancreatici. In questo contesto, le immunoterapie antigene-specifiche rappresentano una delle aree di maggiore interesse. Esse si fondano sull'ipotesi che la perdita di tolleranza verso gli antigeni espressi dalle cellule β pancreatiche rappresenti uno degli eventi chiave della patogenesi del diabete mellito di tipo 1. L'obiettivo delle immunoterapie antigene-specifiche è pertanto quello di indurre una tolleranza selettiva verso gli autoantigeni espressi dalle cellule β ripristinando l'omeostasi immunitaria in modo da favorire il riconoscimento da parte del sistema immunitario di tali antigeni come componenti proprie dell'organismo e limitare l'attacco delle cellule, senza però determinare un'immunosoppressione generalizzata. Tra le strategie maggiormente studiate rientra la vaccinazione antigenica, che prevede la somministrazione di autoantigeni completi, quali l'insulina, GAD65, IA2 e ZnT8, oppure di peptidi derivati da tali antigeni, come ligandi peptidici derivati da epitopi insulinici e sequenze peptidiche derivate dalla proinsulina. Nonostante il solido razionale biologico e i favorevoli profili di sicurezza osservati negli studi clinici e oggetto di indagine attiva, l'efficacia di tali strategie nell'uomo non è stata ancora definitivamente dimostrata. In particolare, la somministrazione orale di insulina non ha mostrato risultati sufficientemente convincenti nel prevenire o ritardare l'insorgenza della malattia in bambini a rischio, così come gli studi condotti con GAD65 non hanno evidenziato benefici clinici significativi nei giovani adulti. [14]

Risultati più promettenti sono, invece, emersi dagli studi condotti su IMCY-0098, un peptide sintetico costituito da un epitopo derivato dalla proinsulina (C20-A1) associato a un motivo tioredox⁸. Tale struttura è stata progettata per limitare la progressione del processo autoimmune tramite l'induzione di linfociti T CD4⁺ con attività citolitica in grado di eliminare selettivamente le cellule presentanti l'antigene (APC) coinvolte nell'attivazione della risposta autoimmune e di limitare, indirettamente, l'espansione dei linfociti T autoreattivi. Il primo studio sull'uomo, uno studio di fase 1 randomizzato, controllato con placebo e a dosi crescenti, ha coinvolto pazienti con diabete mellito di tipo 1 di recente insorgenza con l'obiettivo principale di valutare la sicurezza e tollerabilità del trattamento con IMCY-0098. I risultati ottenuti hanno evidenziato un profilo di sicurezza favorevole, senza reazioni sistemiche rilevanti né eventi avversi gravi correlati al trattamento. Inoltre, durante il periodo di follow up non è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di peptide C, suggerendo una possibile preservazione della funzione residua delle cellule β , che necessita, tuttavia, di conferma in studi di dimensioni maggiori. [70]

Ulteriori informazioni sono emerse da una successiva analisi esplorativa dei biomarcatori immunologici, che ha mostrato, soprattutto alle dosi più elevate di IMCY-0098, un aumento dei linfociti T CD4⁺ ad attività citolitica specifici per l'epitopo contenuto nel vaccino e una riduzione dei linfociti T CD8⁺ autoreattivi coinvolti nel processo autoimmune. È stata, inoltre, osservata una possibile maggiore risposta terapeutica nei soggetti portatori dell'allele HLA-DR4, suggerendo l'esistenza di sottogruppi di pazienti potenzialmente più suscettibili al trattamento. Sebbene tali

⁸ Il motivo tioredox è una sequenza peptidica derivata dalla tioredossina, una proteina coinvolta nella regolazione dei processi di ossidoriduzione. Esso all'interno di IMCY-0098 ha la funzione di contribuire all'attivazione dei linfociti T CD4⁺ citolitici e indurre una risposta immunitaria di tipo regolatorio. [70]

risultati debbano essere interpretati con cautela a causa della natura esplorativa dello studio e della limitata numerosità del campione, essi supportano il proseguimento dello sviluppo clinico di IMCY-0098 e hanno fornito il razionale per l'avvio di studi di fase successiva volti a confermarne l'efficacia clinica. [71]

Capitolo 8 Conclusione e approccio critico

A oltre un secolo dalla scoperta dell'insulina, il diabete mellito di tipo 1 continua a rappresentare una delle principali sfide della medicina e della ricerca farmacologica. Nonostante i notevoli progressi compiuti sia nella comprensione dei meccanismi immunopatogenetici della malattia sia nello sviluppo di nuove opzioni terapeutiche, la sua gestione clinica rimane complessa e caratterizzata dalla difficoltà di riprodurre fedelmente la fisiologica secrezione insulinica pancreatica con conseguenti problematiche nel raggiungere un controllo glicemico ottimale e il persistente rischio di eventi ipoglicemici. Nella presente tesi sono stati inizialmente analizzati i principali meccanismi eziopatogenetici e fisiopatologici del diabete mellito di tipo 1, evidenziando come la complessa interazione tra predisposizione genetica, fattori ambientali e alterazioni della risposta immunitaria determini la distruzione progressiva delle cellule β pancreatiche. La crescente comprensione dei meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia ha, infatti, aperto la strada allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche sempre più precise e sofisticate, orientate non soltanto alla correzione delle alterazioni metaboliche conseguenti alla carenza insulinica ma anche all'intervento sui processi biologici che ne sono alla base. L'analisi delle terapie insuliniche attualmente disponibili ha mostrato come lo sviluppo di analoghi insulinici prandiali e basali di nuova generazione ha consentito di ottenere dei profili farmacocinetici e farmacodinamici ottimizzati, più vicini alla fisiologia rispetto all'insulina umana. Tuttavia, permangono limitazioni rilevanti: gli analoghi prandiali, pur riducendo il rischio di ipoglicemia tardiva grazie alla loro breve durata d'azione, non riescono ancora a contrastare completamente le escursioni glicemiche postprandiali a causa di una velocità di assorbimento non pienamente sovrapponibile alla secrezione fisiologica, analogamente il controllo glicemico ottimale rimane difficile

da raggiungere e mantenere in una quota significativa di pazienti, a ciò si aggiungono il notevole peso gestionale della malattia, la necessità di numerose iniezioni sottocutanee giornaliere, la scarsa accettazione della terapia e via di somministrazione da parte del paziente e gli effetti indesiderati locali e sistemici associati alla somministrazione insulinica. Tali aspetti influenzano inevitabilmente l'aderenza terapeutica e dimostrano come, pur essendo indispensabile per la sopravvivenza del paziente, la terapia insulinica non possa essere considerata una soluzione definitiva e pienamente soddisfacente. In questo contesto, si inseriscono le innovazioni terapeutiche analizzate nel corso della tesi che hanno determinato il delineamento negli ultimi anni di un panorama terapeutico piuttosto articolato. Lo sviluppo di insuline basali settimanali con un'emivita prolungata, come icodec ed efsitora alfa, e di formulazioni innovative che combinano un'insulina prandiale e una basale, come BioChaperone glargine lispro, nasce dall'esigenza di semplificare la gestione terapeutica riducendo il numero delle somministrazioni e migliorando l'aderenza al trattamento. Parallelamente, nuove formulazioni ultrarapide, come BioChaperone lispro, mirano a riprodurre più fedelmente la fisiologica risposta insulinica postprandiale, mentre molecole innovative quali NNC2215 introducono il concetto di un'attività insulinica in grado di modularsi in base ai livelli glicemici, con il potenziale di ridurre il rischio ipoglicemico, storicamente uno dei principali limiti della terapia insulinica. Un ulteriore filone di ricerca riguarda lo sviluppo di vie di somministrazione alternative, in particolare quella orale e inalatoria, con l'obiettivo di migliorare l'accettazione della terapia da parte del paziente e mimare maggiormente il percorso fisiologico dell'insulina dalla sua secrezione all'attività biologica. In particolare, la somministrazione orale rappresenta da decenni uno degli obiettivi più perseguiti e più ambiziosi della ricerca ma sebbene i risultati ottenuti finora siano incoraggianti i numerosi ostacoli biologici e

tecnologici confinano tali strategie prevalentemente all'ambito sperimentale. In generale, ad eccezione di pochi agenti terapeutici innovativi già approvati, la maggior parte delle innovazioni analizzate risultano promettenti ma richiedono ulteriori conferme e approfondimenti attraverso studi clinici di maggiore durata e condotti su popolazioni più ampie prima di poter essere integrate nella pratica clinica. Particolare interesse rivestono, inoltre, le terapie adiuvanti non insuliniche che evidenziano come il panorama terapeutico del diabete mellito di tipo 1 stia progressivamente superando la visione esclusivamente insulinocentrica. Farmaci originariamente sviluppati per altre indicazioni terapeutiche, quali metformina e agonisti del recettore del GLP-1, hanno mostrato la capacità di contribuire alla riduzione del fabbisogno insulinico e del peso corporeo. Tuttavia, dall'analisi critica della letteratura emerge che i benefici ottenuti sono spesso modesti e talvolta controbilanciati dalla comparsa di eventi avversi rilevanti, come chetoacidosi diabetica o disturbi gastrointestinali. Di conseguenza, il loro ruolo nella pratica clinica rimane ancora oggetto di dibattito e richiede ulteriori studi per valutarne il rapporto rischio-beneficio. L'aspetto più innovativo e che presumibilmente caratterizzerà la ricerca contemporanea e futura emerso dall'analisi della letteratura riguarda però il progressivo passaggio da terapie finalizzate esclusivamente al controllo metabolico della malattia a strategie potenzialmente in grado di intervenire sui meccanismi eziopatogenetici alla base del diabete mellito di tipo 1. In tale prospettiva, si collocano il trapianto di pancreas e di isole pancreatiche, le terapie cellulari basate sull'impiego di cellule staminali e gli approcci immunoterapici i quali rappresentano i tentativi più ambiziosi e al tempo stesso più promettenti, con l'obiettivo di preservare, sostituire o ripristinare la funzionalità delle cellule β pancreatiche. Sebbene tali strategie abbiano mostrato risultati incoraggianti, la loro applicazione clinica è ancora limitata da problematiche quali la disponibilità di

donatori, costi elevati, necessità di immunosoppressione cronica e le incertezze relative alla durata dell'efficacia terapeutica.

Da una prospettiva critica, emerge come nessuna delle strategie terapeutiche innovative già disponibili o in fase di sviluppo sia in grado, singolarmente, di sostituire completamente la terapia insulinica o di risolvere tutte le problematiche associate al diabete mellito di tipo 1. Il futuro della gestione del diabete mellito di tipo 1 sembra, quindi, orientarsi verso un approccio integrato e personalizzato, basato sulla combinazione di differenti strategie terapeutiche e tecnologiche adattate alle caratteristiche del singolo paziente. In conclusione, il percorso evolutivo delle terapie per il diabete mellito di tipo 1 dimostra come la ricerca scientifica in tale ambito abbia compiuto progressi straordinari, trasformando una patologia un tempo rapidamente fatale in una condizione cronica gestibile e compatibile con lunghe aspettative di vita. Tuttavia, le evidenze attualmente disponibili suggeriscono che il vero traguardo non sia ancora stato raggiunto. La sfida dei prossimi anni non sarà soltanto sviluppare insuline sempre più efficaci o tecnologie sempre più avanzate, ma individuare strategie capaci di intervenire sui meccanismi patogenetici della malattia, con l'obiettivo ultimo di prevenire la perdita delle cellule β pancreatiche o di ripristinarne stabilmente la funzione.

Bibliografia

- [1] G. Fontana, G. Innamorati, e L. Giacomello, «Nanoparticle-Based Oral Insulin Delivery: Challenges, Advances, and Future Directions», *Pharmaceutics*, vol. 17, fasc. 12, p. 1563, dic. 2025, doi: 10.3390/pharmaceutics17121563.
- [2] Y. Ingrasciotta, G. Vitturi, e G. Trifirò, «Pharmacological and Benefit-Risk Profile of Once-Weekly Basal Insulin Administration (Icodec): Addressing Patients' Unmet Needs and Exploring Future Applications», *J. Clin. Med.*, vol. 13, fasc. 7, p. 2113, gen. 2024, doi: 10.3390/jcm13072113.
- [3] American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes*, «2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2026», *Diabetes Care*, vol. 49, fasc. Supplement_1, pp. S27–S49, dic. 2025, doi: 10.2337/dc26-S002.
- [4] Z.-X. He *et al.*, «Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus», *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 42, fasc. 2, pp. 125–138, 2015, doi: 10.1111/1440-1681.12332.
- [5] S. Subramanian, F. Khan, e I. B. Hirsch, «New advances in type 1 diabetes», *BMJ*, vol. 384, p. e075681, gen. 2024, doi: 10.1136/bmj-2023-075681.
- [6] K. K. Dhatariya, «Defining and characterising diabetic ketoacidosis in adults», *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 155, p. 107797, set. 2019, doi: 10.1016/j.diabres.2019.107797.
- [7] American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes*, «6. Glycemic Goals, Hypoglycemia, and Hyperglycemic Crises: Standards of Care in Diabetes—2026», *Diabetes Care*, vol. 49, fasc. Supplement_1, pp. S132–S149, dic. 2025, doi: 10.2337/dc26-S006.
- [8] M. Brownlee, «The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism», *Diabetes*, vol. 54, fasc. 6, pp. 1615–1625, giu. 2005, doi: 10.2337/diabetes.54.6.1615.
- [9] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, «The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus», *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, fasc. 14, pp. 977–986, set. 1993, doi: 10.1056/NEJM199309303291401.
- [10] The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group, «Effect of Intensive Diabetes Therapy on the Progression of Diabetic Retinopathy in Patients With Type 1 Diabetes: 18 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC», *Diabetes*, vol. 64, fasc. 2, pp. 631–642, feb. 2015, doi: 10.2337/db14-0930.
- [11] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, «Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)», *The Lancet*, vol. 352, fasc. 9131, pp. 837–853, set. 1998, doi: 10.1016/S0140-6736(98)07019-6.

- [12] American Diabetes Association Professional Practice Committee, «10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Care in Diabetes—2024», *Diabetes Care*, vol. 47, fasc. Supplement_1, pp. S179–S218, dic. 2023, doi: 10.2337/dc24-S010.
- [13] J. Schofield, J. Ho, e H. Soran, «Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus», *Diabetes Ther.*, vol. 10, fasc. 3, pp. 773–789, giu. 2019, doi: 10.1007/s13300-019-0612-8.
- [14] B. J. von Scholten, F. F. Kreiner, S. C. L. Gough, e M. von Herrath, «Current and future therapies for type 1 diabetes», *Diabetologia*, vol. 64, fasc. 5, pp. 1037–1048, 2021, doi: 10.1007/s00125-021-05398-3.
- [15] J. Ware e R. Hovorka, «Recent advances in closed-loop insulin delivery», *Metabolism*, vol. 127, p. 154953, feb. 2022, doi: 10.1016/j.metabol.2021.154953.
- [16] F. Pociot e Å. Lernmark, «Genetic risk factors for type 1 diabetes», *The Lancet*, vol. 387, fasc. 10035, pp. 2331–2339, giu. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30582-7.
- [17] N. Easa, R. G. Alany, M. Carew, e A. Vangala, «A review of non-invasive insulin delivery systems for diabetes therapy in clinical trials over the past decade», *Drug Discov. Today*, vol. 24, fasc. 2, pp. 440–451, feb. 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.11.010.
- [18] R. A. Insel *et al.*, «Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association», *Diabetes Care*, vol. 38, fasc. 10, pp. 1964–1974, set. 2015, doi: 10.2337/dc15-1419.
- [19] T. Rodriguez-Calvo, S. Sabouri, F. Anquetil, e M. G. von Herrath, «The viral paradigm in type 1 diabetes: Who are the main suspects?», *Autoimmun. Rev.*, vol. 15, fasc. 10, pp. 964–969, ott. 2016, doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.019.
- [20] C. Ferrara-Cook *et al.*, «Excess BMI Accelerates Islet Autoimmunity in Older Children and Adolescents», *Diabetes Care*, vol. 43, fasc. 3, pp. 580–587, mar. 2020, doi: 10.2337/dc19-1167.
- [21] S. Dedrick *et al.*, «The Role of Gut Microbiota and Environmental Factors in Type 1 Diabetes Pathogenesis», *Front. Endocrinol.*, vol. 11, feb. 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00078.
- [22] L. M. Quinn, F. S. Wong, e P. Narendran, «Environmental Determinants of Type 1 Diabetes: From Association to Proving Causality», *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 737964, ott. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.737964.
- [23] C. R. Cardwell *et al.*, «Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies», *Diabetologia*, vol. 51, fasc. 5, pp. 726–735, mag. 2008, doi: 10.1007/s00125-008-0941-z.
- [24] S. Joshi, V. Jayanth, S. Loganathan, V. K. Sambandamurthy, e S. N. Athalye, «Insulin Tregopil: An Ultra-Fast Oral Recombinant Human Insulin

Analog: Preclinical and Clinical Development in Diabetes Mellitus», *Drugs*, vol. 83, fasc. 13, pp. 1161–1178, set. 2023, doi: 10.1007/s40265-023-01925-1.

- [25] G. B. Bolli, F. Porcellati, P. Lucidi, C. G. Fanelli, e D. R. Owens, «One-hundred year evolution of prandial insulin preparations: From animal pancreas extracts to rapid-acting analogs», *Metabolism*, vol. 126, p. 154935, gen. 2022, doi: 10.1016/j.metabol.2021.154935.
- [26] J. Rosenstock e S. Del Prato, «Basal weekly insulins: the way of the future!», *Metabolism*, vol. 126, p. 154924, gen. 2022, doi: 10.1016/j.metabol.2021.154924.
- [27] D. R. Owens e G. B. Bolli, «The continuing quest for better subcutaneously administered prandial insulins: a review of recent developments and potential clinical implications», *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 22, fasc. 5, pp. 743–754, mag. 2020, doi: 10.1111/dom.13963.
- [28] M. Wang *et al.*, «Versatile Oral Insulin Delivery Nanosystems: From Materials to Nanostructures», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, fasc. 6, p. 3362, 2022, doi: 10.3390/ijms23063362.
- [29] E. Nishimura *et al.*, «Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal insulin analog designed for once-weekly dosing», *BMJ Open Diabetes Res. Care*, vol. 9, fasc. 1, ago. 2021, doi: 10.1136/bmjdr-2021-002301.
- [30] R. Trevisan, M. Conti, e S. Ciardullo, «Once-weekly insulins: a promising approach to reduce the treatment burden in people with diabetes», *Diabetologia*, vol. 67, fasc. 8, pp. 1480–1492, ago. 2024, doi: 10.1007/s00125-024-06158-9.
- [31] J. S. Moyers *et al.*, «Preclinical Characterization of LY3209590, a Novel Weekly Basal Insulin Fc-Fusion Protein», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 382, fasc. 3, pp. 346–355, set. 2022, doi: 10.1124/jpet.122.001105.
- [32] A. Philis-Tsimikas *et al.*, «Once-weekly insulin efsitora alfa versus once-daily insulin degludec in adults with type 2 diabetes currently treated with basal insulin (QWINT-3): a phase 3, randomised, non-inferiority trial», *The Lancet*, vol. 405, fasc. 10497, pp. 2279–2289, giu. 2025, doi: 10.1016/S0140-6736(25)01044-X.
- [33] T. Blevins *et al.*, «Once-weekly insulin efsitora alfa versus once-daily insulin glargine U100 in adults with type 2 diabetes treated with basal and prandial insulin (QWINT-4): a phase 3, randomised, non-inferiority trial», *The Lancet*, vol. 405, fasc. 10497, pp. 2290–2301, giu. 2025, doi: 10.1016/S0140-6736(25)01069-4.
- [34] R. M. Bergenstal *et al.*, «Once-weekly insulin efsitora alfa versus once-daily insulin degludec in adults with type 1 diabetes (QWINT-5): a phase 3 randomised non-inferiority trial», *The Lancet*, vol. 404, fasc. 10458, pp. 1132–1142, set. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(24)01804-X.

- [35] M. Meier, J. Hagans, e C. Brackett, «Once-weekly basal insulin therapy in type 1 diabetes: A paradigm shift or a work in progress?», *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, vol. 82, fasc. 22, pp. 1220–1227, nov. 2025, doi: 10.1093/ajhp/zxaf169.
- [36] T. Hoeg-Jensen *et al.*, «Glucose-sensitive insulin with attenuation of hypoglycaemia», *Nature*, vol. 634, fasc. 8035, pp. 944–951, ott. 2024, doi: 10.1038/s41586-024-08042-3.
- [37] T. Heise *et al.*, «BioChaperone Lispro versus faster aspart and insulin aspart in patients with type 1 diabetes using continuous subcutaneous insulin infusion: A randomized euglycemic clamp study», *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 21, fasc. 4, pp. 1066–1070, 2019, doi: 10.1111/dom.13621.
- [38] G. Andersen *et al.*, «Ultra-rapid BioChaperone Lispro improves postprandial blood glucose excursions vs insulin lispro in a 14-day crossover treatment study in people with type 1 diabetes», *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 20, fasc. 11, pp. 2627–2632, nov. 2018, doi: 10.1111/dom.13442.
- [39] G. Meiffren *et al.*, «Better glycaemic control with BioChaperone glargine lispro co-formulation than with insulin lispro Mix25 or separate glargine and lispro administrations after a test meal in people with type 2 diabetes», *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 21, fasc. 7, pp. 1570–1575, lug. 2019, doi: 10.1111/dom.13685.
- [40] L. Heinemann, R. Baughman, A. Boss, e M. Hompesch, «Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of a Novel Inhaled Insulin», *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 11, fasc. 1, pp. 148–156, gen. 2017, doi: 10.1177/1932296816658055.
- [41] M. J. Ansari *et al.*, «Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats», *Drug Deliv.*, vol. 23, fasc. 6, pp. 1972–1979, lug. 2016, doi: 10.3109/10717544.2015.1039666.
- [42] F. Hubálek *et al.*, «Molecular engineering of safe and efficacious oral basal insulin», *Nat. Commun.*, vol. 11, fasc. 1, p. 3746, lug. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17487-9.
- [43] A. Muheem *et al.*, «A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives», *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, fasc. 4, pp. 413–428, lug. 2016, doi: 10.1016/j.jsps.2014.06.004.
- [44] Y. Han, J. Spicer, Y. Huang, C. Bunt, M. Liu, e J. Wen, «Advancements in oral insulin: A century of research and the emergence of targeted nanoparticle strategies», *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 126, fasc. 7, p. 2300271, lug. 2024, doi: 10.1002/ejlt.202300271.
- [45] M. Boushra *et al.*, «Development and evaluation of viscosity-enhanced nanocarrier (VEN) for oral insulin delivery», *Int. J. Pharm.*, vol. 511, fasc. 1, pp. 462–472, set. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.016.
- [46] F. Yu *et al.*, «Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of

insulin», *Int. J. Pharm.*, vol. 484, fasc. 1, pp. 181–191, apr. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.055.

- [47] K. Liu, Y. Chen, Z. Yang, e J. Jin, «zwitterionic Pluronic analog-coated PLGA nanoparticles for oral insulin delivery», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 236, p. 123870, mag. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123870.
- [48] Mingming Song *et al.*, «Oral insulin delivery by carboxymethyl- β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles for improving diabetic treatment», *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, pp. 774–782, 2018, doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1511575>.
- [49] «Oramed Announces Top-line Results from Phase 3 Trial of ORMD-0801 for the Treatment of Type 2 Diabetes - Oramed Pharmaceuticals», <https://oramed.com/>. Consultato: 24 aprile 2026. [Online]. Disponibile su: <https://oramed.com/oramed-announces-top-line-results-from-phase-3-trial-of-ormd-0801-for-the-treatment-of-type-2-diabetes/>
- [50] E. Cengiz e R. W. Beck, «Use of Inhaled Insulin with Automated Insulin Delivery Systems», *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 28, fasc. 1_suppl, pp. 38S–42S, feb. 2026, doi: 10.1177/15209156251407710.
- [51] E. S. Kim e G. L. Plosker, «AFREZZA® (insulin human) Inhalation Powder: A Review in Diabetes Mellitus», *Drugs*, vol. 75, fasc. 14, pp. 1679–1686, set. 2015, doi: 10.1007/s40265-015-0472-0.
- [52] J. B. McGill *et al.*, «Comprehensive Pulmonary Safety Review of Inhaled Technosphere® Insulin in Patients with Diabetes Mellitus», *Clin. Drug Investig.*, vol. 40, fasc. 10, pp. 973–983, 2020, doi: 10.1007/s40261-020-00958-8.
- [53] H. K. Akturk *et al.*, «Improved Postprandial Glucose with Inhaled Technosphere Insulin Compared with Insulin Aspart in Patients with Type 1 Diabetes on Multiple Daily Injections: The STAT Study», *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 20, fasc. 10, pp. 639–647, ott. 2018, doi: 10.1089/dia.2018.0200.
- [54] I. B. Hirsch *et al.*, «A Randomized Trial Comparing Inhaled Insulin Plus Basal Insulin Versus Usual Care in Adults With Type 1 Diabetes», *Diabetes Care*, vol. 48, fasc. 3, pp. 353–360, dic. 2024, doi: 10.2337/dc24-1832.
- [55] C. Jacobson *et al.*, «Safety and Efficacy of Inhaled Technosphere® Insulin in the Postprandial Period With Modified Initial Dose Conversion», *Diabetes Ther.*, vol. 16, fasc. 8, pp. 1695–1705, ago. 2025, doi: 10.1007/s13300-025-01760-5.
- [56] R. E. Ratner *et al.*, «Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial», *Diabet. Med.*, vol. 21, fasc. 11, pp. 1204–1212, nov. 2004, doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01319.x.
- [57] Y.-S. Liu, C.-N. Chen, Z.-G. Chen, Y. Peng, X.-P. Lin, e L.-L. Xu, «Vascular and metabolic effects of metformin added to insulin therapy in patients with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis»,

Diabetes Metab. Res. Rev., vol. 36, fasc. 6, p. e3334, set. 2020, doi: 10.1002/dmrr.3334.

- [58] J. Park *et al.*, «Glucagon-Like Peptide 1 Analogues as Adjunctive Therapy for Patients With Type 1 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 109, fasc. 1, pp. 279–292, gen. 2024, doi: 10.1210/clinem/dgad471.
- [59] S. K. Garg *et al.*, «Effects of Sotagliflozin Added to Insulin in Patients with Type 1 Diabetes», *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, fasc. 24, pp. 2337–2348, dic. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1708337.
- [60] G. Ryan, L. Jobe, e R. Martin, «Pramlintide in the Treatment of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus», *Clin. Ther.*, vol. 27, fasc. 10, pp. 1500–1512, ott. 2005.
- [61] S. Chen, K. Du, e C. Zou, «Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus», *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, fasc. 1, p. 275, lug. 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01793-6.
- [62] J. A. Fridell, R. J. Stratta, e A. C. Gruessner, «Pancreas Transplantation: Current Challenges, Considerations, and Controversies», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 108, fasc. 3, pp. 614–623, mar. 2023, doi: 10.1210/clinem/dgac644.
- [63] M. R. Rickels e R. P. Robertson, «Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions», *Endocr. Rev.*, vol. 40, fasc. 2, pp. 631–668, apr. 2019, doi: 10.1210/er.2018-00154.
- [64] E. Erbasan, M. Aliciaslan, F. Erendor, O. Dandin, e S. Sanlioglu, «Lantidra (donislecel) in type 1 diabetes: An in-depth analysis of pharmacology, clinical effectiveness, safety, and the therapeutic role of the first FDA-approved allogeneic islet cell therapy», *Diabet. Med.*, vol. 43, fasc. 1, p. e70168, gen. 2026, doi: 10.1111/dme.70168.
- [65] M. R. Rigby *et al.*, «Alefacept provides sustained clinical and immunological effects in new-onset type 1 diabetes patients», *J. Clin. Invest.*, vol. 125, fasc. 8, pp. 3285–3296, ago. 2015, doi: 10.1172/JCI81722.
- [66] K. C. Herold, S. E. Gitelman, P. A. Gottlieb, L. A. Knecht, R. Raymond, e E. L. Ramos, «Teplizumab: A Disease-Modifying Therapy for Type 1 Diabetes That Preserves β -Cell Function», *Diabetes Care*, vol. 46, fasc. 10, pp. 1848–1856, ott. 2023, doi: 10.2337/dc23-0675.
- [67] M. J. Haller *et al.*, «Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA1c, and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data», *Diabetes*, vol. 68, fasc. 6, pp. 1267–1276, giu. 2019, doi: 10.2337/db19-0057.
- [68] M. D. Pescovitz *et al.*, «B-Lymphocyte Depletion With Rituximab and β -Cell Function: Two-Year Results», *Diabetes Care*, vol. 37, fasc. 2, pp. 453–459, gen. 2014, doi: 10.2337/dc13-0626.

- [69] T. Quattrin *et al.*, «Golimumab and Beta-Cell Function in Youth with New-Onset Type 1 Diabetes», *N. Engl. J. Med.*, vol. 383, fasc. 21, pp. 2007–2017, nov. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2006136.
- [70] J. Van Rampelbergh *et al.*, «First-in-human, double-blind, randomized phase 1b study of peptide immunotherapy IMCY-0098 in new-onset type 1 diabetes», *BMC Med.*, vol. 21, p. 190, mag. 2023, doi: 10.1186/s12916-023-02900-z.
- [71] J. Van Rampelbergh *et al.*, «First-in-human, double-blind, randomized phase 1b study of peptide immunotherapy IMCY-0098 in new-onset type 1 diabetes: an exploratory analysis of immune biomarkers», *BMC Med.*, vol. 22, fasc. 1, p. 259, giu. 2024, doi: 10.1186/s12916-024-03476-y.