

## Análogos de Insulina

ELIZABETH GARRIDO

*Servicio de Endocrinología. Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.*

### RESUMEN

Los análogos de insulina son una nueva familia de fármacos, diseñados para suplir las deficiencias que todavía existen con las insulinas ADNr. Existen los análogos de acción ultrarrápida como la lispro y la insulina aspartato, que evitan la hipoglicemia posprandial y nocturna; los de acción intermedia como la NPL y las mezclas (NPL 25 es la que más se ha estudiado) que unen la duración de acción de la NPH con la rapidez de inicio de acción de los análogos ultrarrápidos; y los de acción prolongada como la insulina glargina que además carecen de pico marcado. En un futuro cercano tendremos además los análogos acilados que pretenden lograr mejores niveles hepáticos que las insulinas y análogos con que se cuenta actualmente. Esta amplia gama de utilidades proporciona nuevas opciones en el tratamiento del paciente diabético, en el propósito de lograr los niveles glicémicos más cercanos a la normalidad, que al final conduzcan a menores riesgos de complicaciones. Esta revisión pretende mostrar lo más saltante de cada uno de estos análogos, las propiedades fisicoquímicas y las aplicaciones terapéuticas posibles, ahora que se encuentran ya en nuestro país.

*Palabras claves: Insulina, análogos & derivados; Diabetes Mellitus Insulino - Dependiente, terapia; Hipoglicemia, terapia.*

### THE INSULINE ANALOGUES SUMMARY

Insulin analogues are a new pharmaceutical family, designed to overcome deficiencies that still exist with the rDNA insulin. There are rapid-acting insulin analogues such as lispro insulin and insulin aspart. They avoid postprandial and nocturnal hypoglycemia. There are also intermediate-acting insulin analogues like NPL and Mix 25 (a mixture between NPL and lispro), which join the neutral protamine insulin length of action and the fast onset of the rapid-acting analogue lispro. Finally, there is a long-acting analog: glargine, showing a 24-hours action and a peakless profile. In the near future we will have acylated analogues, to get better insulin levels into the liver. This large group of novel patterns of insulin activity provides new options in the treatment of diabetic patients, heading for lower complication risks. The main characteristics, chemical properties and therapeutic applications of each analog were reviewed, because all this drug family is with us nowadays.

*Key words: Insulin, analogs; Diabetes Mellitus Insulin - Dependent, therapy; Hypoglycemia, therapy.*

### INTRODUCCIÓN

Desde que en los grandes estudios contemporáneos tales como el DCCT (Diabetes Control Complications Trial), el estudio Kumamoto y el UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) se comprobó que el control intensivo de la glucemia puede disminuir el número y la velocidad de progresión de las

complicaciones microvasculares, el interés en conseguir este objetivo es cada vez mayor.

Existe también evidencia creciente que los períodos de hiperglucemia e hiperlipidemia posprandial guardan estrecha relación con ellas. Sabemos además que el riesgo y el temor a la hipoglicemia, sea provocada por el uso de insulina de acción rápida preprandial, o por una insulina de acción intermedia con un cenit muy marcado, disminuyen la calidad de vida de nuestros pacientes y sus familias.

Tanto los diabéticos tipo 1 como los diabéticos tipo 2 presentan problemas semejantes: en los pacientes con diabetes tipo 2, frecuentemente se requiere manejar períodos agudos de descompensación, o las denominadas fallas secundarias, mediante insulino terapia.

#### Correspondencia:

*Dra. Elizabeth Garrido Carrasco  
Servicio de Endocrinología  
Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins  
E-mail: garridoeal@hotmail.com*

En respuesta a todas estas situaciones clínicas surgen los análogos de insulina; estas moléculas que, gracias a cambios estructurales, modifican la acción y utilidad de la insulina natural. En el ámbito de la investigación, avances sorprendentes se han logrado y otros están por producirse. Esta revisión pretende brindar a quienes la lean, una visión global, de las indicaciones y avances logrados en el campo de la insulino terapia de análogos, así como de los pasos que se han iniciado en la consecución de nuevas insulinas, que unidas en el plasma a proteínas o a ácidos grasos, poseerán tiempos de acción más prolongados, menor pico o mayor acción a nivel hepático, en la mira de optimizar el tratamiento insulínico de los pacientes que lo necesiten.

### GENERALIDADES

La biotecnología descubrió a finales de los '80 una nueva área de investigación con la introducción de los análogos de insulina, que no eran sólo nuevas insulinas, sino nuevas entidades químicas. Las modificaciones aminoacídicas introducidas a la molécula de insulina condujeron a cambios en la estructura tridimensional, y consecuentemente, a cambios en sus propiedades biológicas.

Debido a la inmunogenicidad de las insulinas utilizadas hasta el momento, y su lenta absorción, se hizo necesario idear nuevas formas insulínicas que suplieran estas deficiencias, en el intento de mimetizar la secreción fisiológica de la insulina. La pobre velocidad de absorción ha sido atribuida a la necesidad de disociación de los cristales de insulina hexamérica en dímeros y monómeros que se requiere para la difusión y absorción subcutánea de las insulinas en el espacio intersticial, lo que se asocia a gran variabilidad inter e intraindividual (<sup>2</sup>). Tanto en la célula  $\beta$  como en los viales que los pacientes utilizan la forma predominante es la hexamérica, debida a la alta tendencia de asociación que tiene la insulina. Sin embargo, esto constituye un gran obstáculo para conseguir una rápida acción insulínica tras su aplicación subcutánea (<sup>3</sup>).

El análogo ideal debe cumplir todas estas condiciones: adecuada absorción y distribución, unión sólo a su receptor, acción y depuración específica e inmunogenicidad mínima.

La estructura tridimensional de la insulina en solución (Figura 1) es esencialmente idéntica a la de la insulina en los cristales de cinc romboidales. La disolución de los cristales se realiza mejor en un solvente ácido, ya que por su contenido de cinc los cristales se disuelven muy lentamente en pH neutro o alcalino. La insulina monomérica sólo predomina en solución acuosa en medios muy ácidos o básicos o en soluciones muy diluidas (<sup>4</sup>). La hipótesis que una reducida propensión a la autoasociación podría conducir a una

absorción más veloz y así a una menor duración de acción, fue desarrollada mediante la ingeniería proteica y las técnicas de recombinación.

Las técnicas usadas en la creación de análogos monoméricos de insulina fueron:

- Repulsión de cargas (AspB28; AspB9, GluB27; GluB28, AspA21).
- Disminución de la hidrofobicidad de interfases (GluB16, GluB26).
- Manipulación estérica:  
Tipo I o Hidrancia (Ile B12).  
Tipo II o de Capa B: Por delección (B25-B26) y manipulación reversa (Lys B28, ProB29).

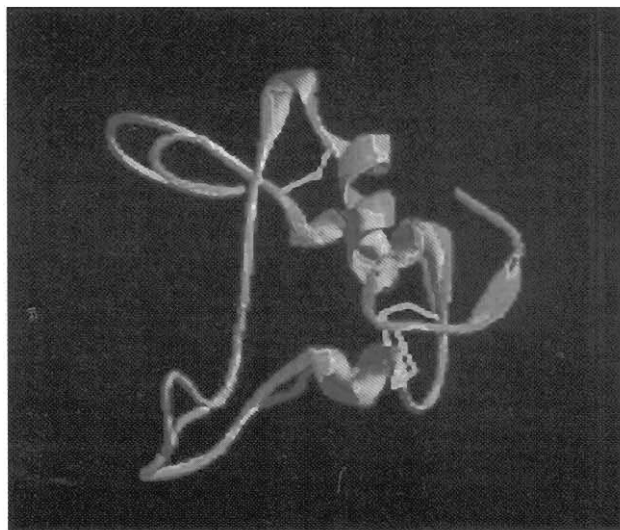


Figura 1.- Conformación tridimensional de la insulina humana recreada por computadora.

Se sabe que los aminoácidos involucrados en la dimerización son los que se encuentran en las posiciones B8, 9, 12, 16, 21, 23-29. Los comprometidos en la unión al receptor –por tanto preservados siempre– son B12, 16, 23-25. Por esta razón, los análogos de insulina AspB28 (o insulina aspartato) y la LysB28, ProB29 (insulina lispro) tienen una pobre tendencia de autoasociación, en las concentraciones usadas en forma terapéutica (<sup>5</sup>). Las características comunes de estas nuevas insulinas radican en la consecución de una mayor y más rápida insulinemia plasmática, y menor duración de acción que la insulina humana. La adición de cinc a ambos análogos ha provocado diferencias en la tasa de absorción o en el perfil de acción-tiempo, hecho que se aprovecha para la creación de los análogos de acción intermedia. Para prolongar

**Tabla 1.- Farmacocinética comparativa de los análogos de insulina.**

Análogos de	Inicio de Acción	Pico	Duración de acción
Insulina lispro	5 a 15 min	50 min a 2 h	3 a 5 h
Insulina regular	30 a 60 min	2 a 4 h	6 a 10 h
Insulina NPH	1 a 2 h	4 a 6 h	10 a 16 h
Insulina NPL	5 a 15 min	1 a 2 h	10 a 16 h
Insulina lenta	1 a 2 h	4 a 6 h	10 a 16 h
Insulina ultralenta	2 a 4 h	Impredecible	< 24 h
Insulina glargina	3 h	No	26 a 30 h

la actividad de la insulina, se adiciona aminoácidos básicos (hidrófobos) logrando la interacción entre hexámeros y la variación de los contactos individuales. Se altera entonces la densidad de los cristales, evitando su disolución.

Se sabe que los análogos sólo son capaces de unirse al receptor de insulina, y que no median directamente ninguna acción posreceptor. Además se debe recordar que el receptor de insulina tiene también la habilidad de estimular el crecimiento, como es conocido clínicamente (síndrome de Mauriac: hipoinsulinismo crónico y nanismo). Existen diferencias en las vías moleculares para la señalización metabólica y mitogénica de los receptores de insulina e IGF-1<sup>(5-7)</sup> (Tabla 1).

## ANÁLOGOS DE ACCIÓN RÁPIDA

### Insulina lispro

Se trata de un análogo de insulina heterodimérico, aprobado para uso clínico en Europa en abril de 1996 y en EE.UU. en junio del mismo año, de estructura similar al IGF-1, que emula a la insulina en su conformación bicatenaria con 2 cadenas: A y B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, con una variación resultante del intercambio recíproco de 2 aminoácidos: la lisina en posición B28 y la prolina en la B29.

Gracias a este cambio conformacional, el análogo pierde la atracción entre sus carillas, constituyéndose en un hexámero estable en solución, que se transforma en el tejido celular subcutáneo en monómeros disociados, capaces de formar dímeros debido a su constante de disociación dimérica se ve disminuida en un factor de 300 respecto a la insulina regular. Esto hace su absorción mucho más rápida, y altera sus propiedades farmacocinéticas.

### Acciones biológicas

La afinidad de lispro por el receptor de insulina es similar a la de la insulina puesto que se respetan los

aminoácidos involucrados en esta acción. La afinidad por el receptor de IGF-1 es casi 1½ veces mayor que la insulina regular, pero sólo 0,1% de la afinidad del IGF-1 *per se*: el crecimiento celular es estimulado en la misma extensión por insulina lispro que por insulina regular.

### Farmacocinética

Los estudios en sujetos sanos realizados para estudiar la farmacocinética de la insulina lispro mediante *clamps* euglucémicos demuestran que el pico de concentración de insulina sérica fue significativamente mayor y más precoz al aplicar insulina lispro que insulina regular (116 contra 51 mU/mL y 42 contra 101 min respectivamente). Esto produce un gran estímulo a la acción de las hormonas contrarreguladoras, que se suma a la menor insulinemia que existe al término de su acción, dando lugar a una mayor hiperglucemia poshipoglucemia<sup>(8)</sup>.

El inicio y la duración de acción de la insulina lispro es más corta que la insulina regular<sup>(9)</sup>. El Multicenter Insulin Lispro Study Group, realizó un estudio multinacional, multicéntrico, aleatorizado, abierto y cruzado, aplicado a 1008 pacientes, cuyas elevaciones glucémicas posprandiales fueron significativamente menores en el grupo tratado con lispro, manteniendo iguales niveles de glucosa preprandial e igual frecuencia de hipoglucemias, aún cuando fue necesario aumentar ligeramente las dosis de insulina basal aplicadas. Sin embargo, no registraron mejoras significativas en los niveles de HbA1c, aduciéndose como explicación que, al ser la HbA1c un promedio, se viera afectada por la disminución de episodios hipoglucémicos.

Son muchos los factores que influyen la absorción de la insulina corriente de los sitios de inyección subcutáneos<sup>(10)</sup>. En el caso de la insulina lispro, la velocidad en el inicio de acción disminuye significativamente, aunque seguiría manteniéndose una duración algo mayor (aproximadamente 1 hora) para la aplicación en extremidades. La actividad pico de la

insulina corriente se incrementa al aumentar la dosis aplicada; este fenómeno no ocurre con la insulina lispro: la longitud de tiempo de la actividad pico es independiente de la dosis, atribuyéndose este hecho al carácter monomérico de la lispro, que disminuye la variabilidad de su absorción. Tras la administración endovenosa e intraperitoneal, la farmacocinética de la lispro es semejante a la de la insulina regular.

### Seguridad e inmunogenicidad

No se ha reportado diferencias entre la insulina lispro y la insulina regular con respecto a la probabilidad de reacciones alérgicas, eventos adversos y valores anormales de laboratorio. No existen datos respecto a su uso en gestantes. Respecto a la seguridad de lispro en adolescentes es similar a la insulina regular, aunque no existen datos en niños pequeños. La inmunogenicidad de lispro es similar a la de la insulina regular luego de un año de uso, aunque la presencia de anticuerpos es mayor durante los primeros 6 meses de uso, en forma estadísticamente significativa, no altera los requerimientos totales de insulina (11).

### Ventajas

Las principales ventajas que ofrecen los análogos de corta acción son:

- Su rápida absorción, que disminuye la hiperglucemia e hipertrigliceridemia posprandiales inmediatas, que conducen a la formación de LDL pequeña y densa, factor de riesgo para enfermedad macrovascular, así como el estado de hipercoagulabilidad transitoria, la inducción de endotelina y PDGF, y la expresión de moléculas de adhesión que se presentan en el estado posprandial inmediato, cuando además la hiperglucemia oscilante aumenta también el flujo retinal, y estimula la producción de colágeno en células mesangiales (12,13).
- Mejora la HbA1c llamada "lábil", resultado de la glucemia de pocas horas antes del análisis. El DCCT demostró que aún a niveles iguales de HbA1c, el grupo que estaba en terapia convencional presentó mayor número de complicaciones microvasculares, evidenciando que la mejora en la HbA1c lábil, que se logró al evitar los períodos de hiperglucemia, mejoraría también estas complicaciones.
- Disminuye la frecuencia de hipoglucemias, especialmente las nocturnas, puesto que su acción termina muy rápidamente, y de esta forma, disminuiría el *unawareness of hypoglycemia* y la falla en el mecanismo de contrarregulación que se produciría secundariamente a esta alteración.

Por todo lo mencionado, estos análogos mejorarían la calidad de vida de los pacientes que la reciben.

### Aplicaciones clínicas

#### Uso posprandial de insulina lispro:

Con la insulina corriente aplicada en el mejor de los casos 30 minutos antes de los alimentos, existe frecuentemente el riesgo de hipoglucemia temprana posprandial, mientras que una inyección aplicada inmediatamente antes del alimento incrementa el número de hipoglucemias posprandiales tardías, y conduce a controles posprandiales inmediatos subóptimos. Con insulina lispro, no existe esta posibilidad dadas sus propiedades farmacocinéticas. La posibilidad del uso posprandial fue confirmada por Scherthaner *et al.* en 18 diabéticos tipo 1, que fueron expuestos a una carga posprandial estándar, a quienes se evaluó las excursiones posprandiales con diferentes terapias y momentos de aplicación, observándose que las áreas bajo la curva (ABC) correspondientes a lispro -20' y lispro 0' fueron significativamente menores que la de insulina corriente ( $p < 0,001$ ). El ABC de lispro +15' no tuvo diferencia estadísticamente significativa con ninguno de los grupos que recibieron insulina corriente. Así, además de confirmar que el momento más apropiado para la aplicación de insulina regular es por lo menos 20 minutos antes de la ingesta, fue evidente que la insulina lispro tiene mejor excursión glucémica posprandial, sin incrementar el riesgo de hipoglucemia cuando se aplica inmediatamente antes de los alimentos, y que aún 15 minutos después de iniciado el alimento, la curva glucémica no es peor que ningún tipo de aplicación de la insulina cristalina (14).

Autores como Brunelle y Vignati, quienes han publicado varios estudios sobre este tema, proponen incluso la mejora del control glucémico cuando se usa con NPH, sin aumentar la tasa de hipoglucemia (15). Por supuesto, si el contenido de carbohidratos ingeridos es bajo, el riesgo de hipoglucemia posprandial aumenta, manteniéndose la recomendación de 50% del valor calórico total para los carbohidratos ingeridos (16).

#### Reducción de breaks:

Sabemos que la composición alimentaria es una determinante importante en el efecto hipoglucemiante de la lispro. Los *breaks* se han usado al asumirse que sin ellos existe un considerable riesgo de hipoglucemias. Ronemaa (17) llevó a cabo un estudio en 141 pacientes diabéticos tipo 1, verificando que al disminuir apropiadamente las colaciones (50% del aporte calórico fue transferido a las principales comidas), se logra una reducción de 0,25% en la HbA1c ( $p = 0,014$ ) (Figura 2), con menor número de hipoglucemias y aunque no fue el objetivo del estudio, se observó también disminución estadísticamente significativa del peso (17).

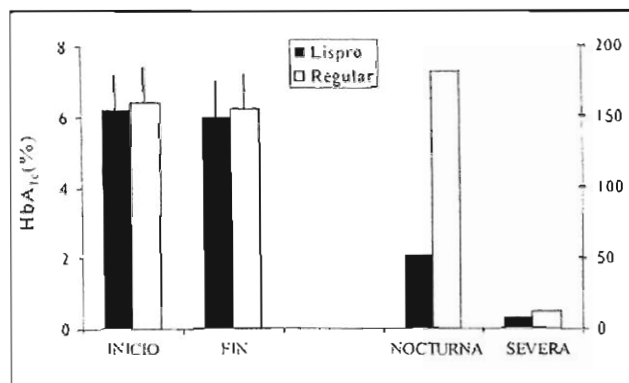


Figura 2.- HbA<sub>1c</sub> e hipoglucemias severas y nocturnas, durante el periodo de estudio ( $p < 0,01$ ) (17).

#### Bombas de insulina:

La insulina lispro parecería ser la insulina ideal para las bombas de Infusión Insulinica Subcutánea Continua (CSII, *Continuous Subcutaneous Insulin Infusion*) (18). La bomba CSII es muchas veces la mejor alternativa terapéutica para pacientes con Diabetes Inestable, y para aquellos cuya actividad los obliga a gran flexibilidad en el horario de ingestas. Sin embargo, aun con la bomba la flexibilidad se encuentra limitada respecto al momento de ingesta una vez realizado el bolo de insulina preprandial, así como también se limita la conformación de la ingesta (19). Al comparar el uso de insulina lispro con insulina corriente, las excursiones glucémicas posprandiales estuvieron significativamente reducidas durante el tratamiento con lispro ( $p < 0,001$ ) en la bomba. Al comparar la frecuencia de cetoacidosis en pacientes usuarios de CSII 5 horas después de la suspensión de la bomba infusora subcutánea, se observó que la glucemia se elevó a mayores niveles en el grupo lispro, al reinstaurarse la bomba, estos cambios fueron revertidos mucho más rápidamente con lispro que con insulina cristalina (20,21). Zinman *et al.* investigó en 30 diabéticos tipo 1 el papel de la bomba CSII con lispro en la mejora de la HbA<sub>1c</sub>, comparándola con insulina corriente. La reducción en la HbA<sub>1c</sub> con lispro fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ). Los efectos adversos de importancia fueron cetosis (4.5% con lispro y 3.7% con insulina cristalina) y oclusión de catéter subcutáneo. El estudio de satisfacción de los pacientes preferenció a insulina lispro ( $p < 0,001$ ) (18,22). La hiperglucemia aguda y la cetosis son ocurrencias comunes en pacientes diabéticos tipo 1. Tales "días enfermos" (*sick days*), son generalmente manejados en el hogar, mediante inyecciones subcutáneas de insulina cristalina cada 2 a 4 horas; en estos casos lispro pare-

cería ser más adecuada por su mayor velocidad de acción, con caídas más rápidas de glucemia y cetonemia (21,23).

#### Efectos inmunológicos:

Fineberg estudio la capacidad inmunogénica de la insulina lispro en diabéticos tipo 1 y 2, demostrando que no existe evidencia de una mayor frecuencia en la aparición de anticuerpos después de un año de uso (aunque sí durante las primeras 6 semanas de uso). No existe aumento en la incidencia de alergias insulínicas, aunque en todos los diabéticos tipo 1 se encontró un mayor dosaje de anticuerpos que en los tipo 2 ( $p > 0,05$ ) (11,24).

#### Riesgo de hipoglucemia:

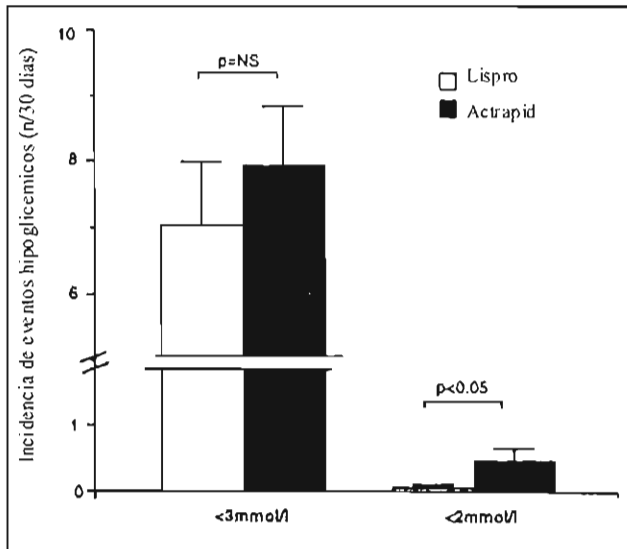
Trescientos treinta y seis pacientes con DM1 fueron estudiados por Brunelle *et al.* (25) en forma aleatorizada con lispro e insulina corriente. Los pacientes con insulina corriente tuvieron una tasa mayor de hipoglucemia con iguales valores de HbA<sub>1c</sub> (con HbA<sub>1c</sub> = 7%, 76,7% contra 50%). Sobre la hipoglucemia nocturna, en el Reino Unido se compararon 135 pacientes, encontrándose 3% de episodios severos con insulina lispro y 9% para la insulina corriente; sin embargo, sólo se observó un valor  $p$  significativo al comparar las hipoglucemias ocurridas entre las 12 y 6 am (26) (Figura 3).

#### Tratamiento insulínico intensificado:

El denominado esquema FIT (*Functional Insulin Treatment*) discrimina el uso basal de insulina, el relacionado a los alimentos y el uso correctivo. El análogo lispro logra mejoras glucémicas y de las hipoglucemias (26). Ebeling, Bolli *et al.* realizaron una evaluación similar, en que participaron 66 pacientes diabéticos tipo 1 en diferentes hospitales de Finlandia, Suecia e Italia, donde corroboraron lo descrito, detectando una mejora estadísticamente significativa en la HbA<sub>1c</sub> (29).

#### Esquema combinado con aplicaciones frecuentes de insulina NPH:

La insulina lispro mejora el período posprandial de 2 horas, reduciendo la frecuencia de hipoglucemias tardías. A pesar de ello, la sustitución a largo plazo con análogos de corta acción (insulina lispro o aspartato B28), no ha resultado en un mejor control glucémico, debido justamente a la caída en la insulinemia que se produce en el período posprandial tardío. Por esta razón se planteó la adición de pocas unidades de insulina NPH a la lispro en cada alimento, con NPH al momento de acostarse, infiriendo además que este régimen protegería contra el *unawareness* de hipoglucemia. Bolli (30) realizó un estudio en 24 diabéticos tipo 1, con diferentes esquemas de tratamien-



**Figura 3.-** Incidencia de eventos hipoglucémicos (Glucemia <3 mmol/L y <2 mmol/L) durante los últimos 30 días de un período de tratamiento de 3 meses en pacientes tratados con lispro e insulina corriente (27).

to durante 3 meses, a los que dividió según su tratamiento: insulina C + NPH al acostarse, insulina lispro + NPH al acostarse, e insulina lispro + NPH en las comidas y al acostarse. Las dosis de NPH a administrar con las comidas fueron entre 20% y 30% del total de dosis de insulina en el desayuno, casi 40% de la dosis total en el almuerzo y entre 10 y 20% de la dosis total en la cena. No obtuvo diferencias significativas en los requerimientos insulínicos diarios. El grupo de insulina lispro + NPH en 4 dosis logró HbA1c menores que los otros 2 grupos ( $p < 0,05$ ), con un ABC (Área Bajo la Curva) de glucemia durante las 24 horas menor que los otros dos grupos ( $p < 0,05$ ), tanto en el período posprandial inmediato (comparándolo con el grupo de insulina cristalina + NPH al acostarse), como en el posabsortivo tardío (en comparación con el grupo de insulina lispro + NPH al acostarse). A pesar de estas ventajas, la dosis nocturna de NPH resultó en cantidades mayores que las aplicadas con las comidas, aumentando el riesgo de hipoglucemias nocturnas y el efecto Somogyi resultante. En estos casos probablemente sería útil la bomba CSII nocturna, o la otra medida alternativa, el análogo de insulina lenta, la insulina glargina (31).

En el caso de lispro, debería darse una mayor dosis de NPH para compensar su corta duración al desayuno y al almuerzo (30). En otro estudio aplicando diversos esquemas, el grupo de insulina corriente mos-

tró un pico glucémico hacia los 135 minutos posprandiales, disminuyendo transitoriamente hasta los 225 minutos, y elevándose posteriormente en forma progresiva. En el grupo de insulina corriente + NPH, el nivel de glucosa no mostró diferencia estadística con el del grupo de insulina corriente sola, excepto a los 135 minutos. Finalmente, en el grupo de insulina lispro + NPH, la glucemia posprandial fue consistentemente menor que en los demás grupos, especialmente desde los 210 hasta los 420 minutos ( $p < 0,05$ ) (32).

Un gran depósito subcutáneo de insulina incrementa la variabilidad de la absorción de insulina y el riesgo de hipoglucemia posprandial. Por ello, se plantea la opción alterna de usar pequeñas dosis de NPH (0,07 U/Kg), mezclada con el análogo lispro en cada alimento (33) (Figura 4 y 5).

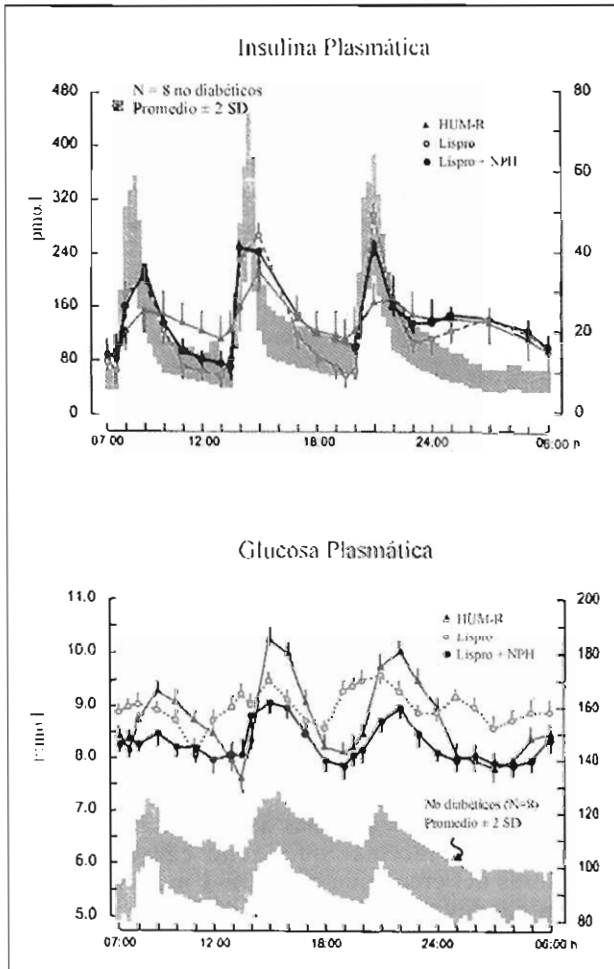
Esto demuestra: (a) que el uso de insulina lispro preprandial mejora el control glucídico a largo plazo sólo si la insulinemia basal es óptimamente reemplazada, (b) que dicha mejora es debida a lispro y no a la NPH extra administrada, (c) que la mejora del control no está asociada a mayor frecuencia en hipoglucemias, y (d) que los efectos benéficos de lispro sobre la HbA1c pueden ser mayores en quienes no cumplen normalmente los intervalos recomendados para la aplicación insulínica en relación a la ingesta. Con sólo un decremento de HbA1c de -0,04% disminuye el riesgo de progresión de complicaciones microangiopáticas (29).

#### Uso en pacientes con función de célula $\beta$ residual:

En los diabéticos tipo 1 de reciente inicio, el mantener glucemias casi normales favorece la remisión de su diabetes, que hace más fácil el mantener normoglucemias por más tiempo, contribuyendo así a la estabilidad glucémica.

En estos pacientes, se instalaron insulinas de acción rápida con los alimentos en un intento de lograr esta meta, aún ante el riesgo de hipoglucemia posprandial tardía, ya que a pesar de contar con función residual de célula beta, han perdido la apropiada respuesta insulínica a alimentos (1<sup>er</sup> pico de respuesta insulínica), manteniendo en alguna medida la secreción insulínica basal entre comidas.

En 12 personas, diabéticos tipo 1 y no diabéticos, se estudiaron las acciones de insulina corriente y lispro. En el grupo de insulina corriente (-30 minutos), la glucemia disminuyó de 7 a 6,5 mmol/L a los 0 minutos, y luego del nadir a los 15 minutos posingesta, se incrementó progresivamente hasta 8,1, terminando con 7,6 mmol/L al final del estudio. En el grupo de insulina lispro, la glucemia aumentó de 7,3 a 8,8 mmol/L a los 30 minutos, y disminuyó a un nadir de 5,6 a los 120 minutos, y fue 6,7 al final del estudio. Los nive-



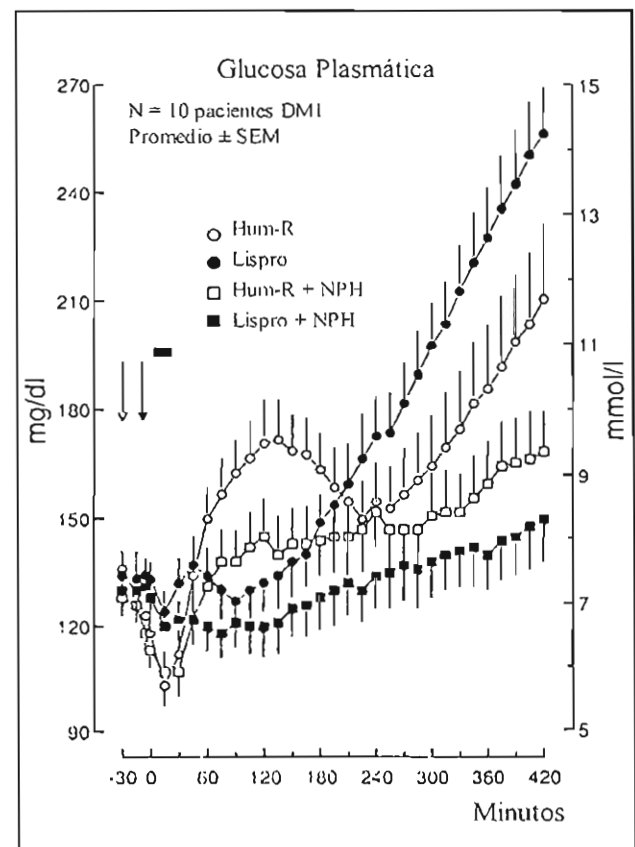
**Figura 4.-** Insulinemia y glucemia según esquemas de tratamiento en grupos de pacientes diabéticos tipo 1. *Superior:* el grupo 1 recibió Hum-R con cada alimento, el 2 recibió lispro, el 3 recibió Lispro + NPH en proporciones variables. La NPH fue mantenida en los 3 grupos. Valores de 8 sujetos no diabéticos son mostrados en el área sombreada ( $X \pm 2 DE$ ). *Inferior:* glucemia en los 3 grupos de pacientes diabéticos tipo 1 (<sup>30</sup>).

les de insulina periférica en los sujetos no diabéticos llegaron a un pico posprandial de 295 pmol/L a los 90 minutos, sobrepasado largamente por la insulina lispro a los 30 minutos (340 pmol/L), y mayor que la meseta lograda por la insulina corriente (200 pmol/L) a los 90 minutos. La diferencia encontrada fue estadísticamente significativa. Los niveles de insulinemia portal basal no fueron diferentes, como sí lo fueron después de la ingesta, en que se incrementaron a 453 pmol/L

en los usuarios de insulina lispro. En los usuarios de insulina corriente alcanzaron un valor de 335 pmol/L, siendo ambos niveles menores que los de los no diabéticos (pico 912 pmol/L a los 90 minutos). Esto es importante, ya que sustenta el incremento de glucemias posprandiales de los diabéticos aún en los tratados con insulina lispro, como resultado de una subinsulinización portal (<sup>34</sup>).

**Resistencia severa a insulina:**

La resistencia inmunológica a la insulina puede ser tratada exitosamente con análogos de corta acción: la formación de anticuerpos antiinsulina era frecuente cuando se usaban insulinas de origen animal, y más del 95% de pacientes diabéticos presentaban



**Figura 5.-** Concentraciones plasmáticas de glucosa en un grupo de pacientes diabéticos tipo 1 con péptido C negativo estudiados en 4 ocasiones diferentes después de una inyección subcutánea de lispro e insulina regular (Hum-R) solas, o lispro o Hum-R mezcladas con 0,07 U/Kg de NPH. Lispro fue aplicada 5 min antes del alimento, y Hum-R 30 min antes (<sup>32</sup>).

anticuerpos. El uso de insulinas purificadas y humanas redujo la incidencia a 40-60%. El significado clínico de esta respuesta inmune permanece controversial, y se ha asociado a cambios en la cinética de la insulina aplicada, lipodistrofia y pobre control metabólico. Sólo las bombas endovenosas o intramusculares se ha reportado son efectivas para prevenir la cetoacidosis en esta rara condición (frecuencia <0,1%). Ya que la insulina monomérica puede absorberse mucho más rápido en el tejido subcutáneo que la insulina hexamérica, se sospecha que así puede "escapar" de los procesos de destrucción responsables de la inefectividad de la insulina subcutánea (35). En un caso, lispro produjo incremento de 27,8 veces el nivel basal de insulina a los 30 minutos de su aplicación, en contraste con las 4,8 veces de ascenso logradas por la insulina C; en otro caso la dosis requerida de insulina se redujo de 300 a 58 U/día, y los anticuerpos bajaron de 8057 a 1860 nU/mL. Inclusive se ha descrito la disminución de 53% en los valores de insulina requeridos. La insulina lispro constituye una nueva opción terapéutica en casos de severa resistencia a la insulina subcutánea (36-38).

#### *Acción lipolítica y en la composición de VLDL:*

El estado posprandial se caracteriza en los diabéticos por intolerancia a la glucosa, pero también por intolerancia lipídica. Ya que la acción de la insulina no está presente o es insuficiente, la enzima lipoproteína lipasa (LPL) no es activada, por lo que se eleva la concentración plasmática de los lípidos ricos en triglicéridos, que debieran ser degradados por ella. La hiperlipemia posprandial conduce a la formación de LDL pequeña y densa, que está a su vez asociada con HDL disminuida. Se sabe que esta hiperlipemia posprandial es un factor de riesgo independiente para macroangiopatía. El efecto insulínico sobre LPL, lipasa hepática y la composición de VLDL del análogo no varía respecto a otras insulinas (39).

#### *Hipoglucemia inducida por ejercicio:*

Mientras en los sujetos normales la insulinemia cae durante el ejercicio, los diabéticos tipo I tienen niveles circulantes según la insulina aplicada. El ejercicio mejora la absorción insulínica del sitio de aplicación, y tanto el músculo *per se* como la insulina incrementan el uso periférico de glucosa y abolen la gluconeogénesis hepática, aún durante el ejercicio. Todo esto aumenta el riesgo de hipoglucemias durante el ejercicio en este tipo de pacientes. Se realizó un estudio para evaluar la respuesta glucémica ante el ejercicio. La hipoglucemia inducida por el ejercicio es fuertemente dependiente del intervalo entre su realización y la aplicación del análogo (40,41); el ejercicio debe realizarse en el período posprandial tardío, cuando las concentraciones de lispro están en disminución.

#### *Calidad de vida:*

Quizás la más importante contribución de la insulina lispro, sea la mejora en la calidad de vida de los pacientes. En un estudio publicado sobre percepción de la terapia insulínica en dos períodos de un estudio cruzado, con el uso de lispro los pacientes refirieron las siguientes ventajas:

- Poder comer inmediatamente después de una inyección 49%
- Mejor control 27%
- Mayor libertad y sensación de bienestar 29%

En este estudio, 76% de los pacientes eligieron permanecer con insulina lispro al terminar el estudio (42).

#### *Asociación con retinopatía de riesgo:*

Existen tres situaciones que provocan, debido a la elevada concentración de hormonas promotoras de crecimiento, el incremento del riesgo para el deterioro de la retinopatía diabética: la pubertad, el embarazo y la acromegalia. Se hipotetiza que cuando el nivel de glucosa es disminuido rápidamente, aparece una extravasación retinal de proteínas séricas, que agregada a un aumento de factores promotores de crecimiento y una retina predispuesta, provocaría el agravamiento de dicha retinopatía. Durante el embarazo existen potentes factores mitogénicos y angiogénicos placentarios, dosables desde la semana 14, y cuyo pico está entre las 22 y 32 semanas de gestación (43). Existe también prolactina, que tiene características promotoras del crecimiento, e IGF-1 materno el cual también se eleva. Debido a esta última acción, y la semejanza del análogo con la IGF-1, algunos investigadores han sugerido que la insulina lispro podría jugar un papel adverso en el rápido deterioro de la retinopatía en diabéticas gestantes (44).

Lispro tiene una leve mayor afinidad por las membranas placentarias al compararse con la insulina humana, la cual en términos absolutos es extremadamente baja. Se requiere concentraciones mayores a 1000 veces lo normal para lograr 50% de unión al receptor de IGF-1. La molécula de IGF-1 es una cadena protéica mucho mayor que la insulina, con un 49% de homología con la insulina humana. Con lispro tal homología llega al 51%. La progresión de la retinopatía que ha sido observada durante el tratamiento con lispro en diabéticas gestantes, se cree que ocurre cuando las correcciones glucémicas son muy aceleradas, y no por la característica afinidad por el receptor de IGF-1 que demuestra lispro. En el rubro de diabetes gestacional, Louis Jovanovic es una de las mayores investigadoras, y desmiente la posibilidad de la asociación con retinopatía, señalando la ausencia de progresión si se evitan los factores consignados para el desarrollo o



deterioro de la retinopatía en el *Diabetes in Early Pregnancy Study* (<sup>45</sup>): HbA1c elevadas antes del inicio de la gestación, y duración de la diabetes de más de 6 años de duración.

#### *Diabetes gestacional:*

Se sabe que para lograr el parto de un niño saludable, las mujeres diabéticas deben obtener concentraciones glucémicas lo más cercanas a la normalidad. Se ha sugerido que la morbilidad neonatal es secundaria a la variabilidad de la glucosa materna y a la presencia de anticuerpos antiinsulina. Los niveles de anticuerpos transferidos al feto son proporcionales a la concentración de complejos insulina-antiinsulina medidos en la madre y son independientes de la glucemia materna (<sup>46</sup>). Basándose en este razonamiento se compararon los efectos inmunológicos en 41 pacientes con diabetes gestacional tratadas con insulina corriente e insulina lispro, con dosajes de anticuerpos específicos para lispro, para insulina corriente y anticuerpos cruzados. Todas las pacientes tuvieron menores niveles de glucosa plasmática, insulina sérica y péptido C que las usuarias de insulina corriente, no detectándose anticuerpos antiinsulina lispro en la sangre del cordón umbilical. Se sabe que la prevalencia de macrosomía en niños de madres diabéticas guarda relación positiva con el nivel glucémico posprandial materno y de HbA1c, y también que el pronóstico de cesáreas, macrosomía e hipoglucemias mejora con el control de una hora posprandial, antes que con el valor preprandial (<sup>43</sup>). Puesto que lispro suprarregula los receptores de insulina, podría ser usada en diabetes gestacional con beneficios comparables a los de la insulina regular.

#### *Uso en diabetes tipo 2:*

Un tercio de pacientes diabéticos tipo 2 tienen pobre respuesta a las indicaciones de ejercicio, dieta e hipoglucemiantes orales. La frecuencia de falla de tratamiento entre los 2/3 restantes es 5% anual. Lispro es igualmente efectiva en la diabetes tipo 1 como 2 respecto a las disminuciones posprandiales inducidas tanto en la 1<sup>a</sup> como 2<sup>a</sup> hora posprandial, y logra disminuir en 36% el número de episodios hipoglucémicos especialmente durante la noche (0 a 6 am) (<sup>47</sup>).

#### *Diabetes lipotrófica:*

Se han descrito casos de síndromes de insulinoresistencia severa en que mejoran los requerimientos de insulina al utilizar lispro (<sup>48</sup>). No se observaron sin embargo mejoras en las hipertrigliceridemias asociadas.

#### *Pacientes dialíticos crónicos:*

La falla renal crónica incrementa considerablemente el tiempo de vida media de la insulina, debido a la restricción en la degradación debido a la enfermedad

renal (falta de insulinasa renal). En estadios más avanzados de la insuficiencia renal, este efecto es antagonizado por la resistencia insulínica, que se origina por los trastornos asociados a esta patología, tales como el hiperparatiroidismo, la presencia de inhibidores de la captación de glucosa, etc. Por ello no es posible predecir los requerimientos insulínicos de los pacientes diabéticos en diálisis. Aisenpreis, de la Universidad de Berlín, realizó un estudio en 8 pacientes diabéticos tipo 1 y 2 hemodializados, a quienes dosó glucemias e insulinemias a los 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos tras la aplicación de insulina 5 minutos después de iniciar la hemodíalisis. Encontró que la absorción fue más rápida para insulina lispro (30 minutos posaplicación contra 51 minutos para la insulina corriente), con concentraciones pico mayores (146 mU/mL contra 88 mU/mL), y un retorno al basal también más rápido. No fue diferente el tiempo medio de eliminación ( $43 \pm 21$  contra  $40 \pm 9$  minutos), ni el volumen de distribución ( $61 \pm 54$  contra  $75 \pm 49$  L). El perfil farmacocinético de la lispro podría facilitar las correcciones hiperglucémicas sin aumentar el riesgo de hipoglucemia tardía en pacientes diabéticos hemodializados (<sup>49</sup>).

#### **Insulina aspartato (Asp B28)**

Para la creación de este análogo monomérico se realizó un cambio en la secuencia de aminoácidos en la composición de la cadena B de la molécula de insulina, la prolina en posición B28 se reemplazó por ácido aspártico, introduciendo la "hidrancia estérica" o repulsión de cargas eléctricas entre las interfases de contacto, que removió los sitios de unión a metales. Al igual que con otros análogos monoméricos (AspB9, GluB27, AspB10), se midió la curva de desaparición mediante centelleografía con I<sup>127</sup>, marcando los residuos tirosina en posición A14, observándose que desaparecía del sitio de inyección en forma lineal las primeras 2 horas posaplicación. La tasa de absorción inicial fue  $50,6 \pm 3,9\%$  a la primera hora. La absorción fue similar a la del AspB10 y AspB9. Al comparar las tasas de absorción de cualquiera de estos análogos con los dimericos y los hexaméricos se confirmó que el análogo monomérico fue absorbido tres veces más rápido que el hexámero no disociado. Esto también explica porqué el volumen, la concentración y el flujo sanguíneo logrados en la zona de aplicación varían la tasa de dilución y así la disociación en monómeros. Logrando una más rápida absorción también se consiguen picos más tempranos y mayores de insulinemia que retornan al basal dentro de 4 a 5 horas.

Respecto a su unión al receptor de insulina se ha estudiado en células HepG2 (células de hepatoma humano intacto): las delecciones consecutivas de los aminoácidos del C-terminal de la cadena B no tienen

influencia sobre la afinidad por el receptor de insulina, y así lo confirma el porcentaje de afinidad de la insulina AspB28 (101% *in vitro*). No hay que olvidar que las células HepG2 expresan sólo la isoforma del receptor de insulina-exon 111+. Por esta razón, se ha realizado estudios en células BHK que expresa ambas formas del receptor, demostrando relativamente la misma afinidad.

La insulina aspartato inicia su acción entre los 10 y 20 minutos, y llega a su máxima concentración aproximadamente a los 45 minutos. En el estudio de Raskin (Southwestern Medical Center of Dallas), que evaluó 882 pacientes diabéticos tipo 1 que usaron insulina aspartato e insulina corriente, se observó niveles de HbA1c significativamente menores en el grupo tratado con insulina AspB28 ( $7,78 \pm 0,04$  contra  $7,91 \pm 0,06$ ;  $p = 0,046$ ) a los 12 meses, sin aumento en la frecuencia de hipoglucemias, aunque se tuvo que realizar incrementos de insulina NPH (<sup>50</sup>). La aparición de anticuerpos antiinsulina se produjo dentro de los primeros 3 meses de tratamiento, luego de los cuales los niveles retornaron gradualmente a lo normal.

#### **Farmacocinética**

La farmacocinética de la insulina aspartato difiere significativamente de la insulina humana, pues duplica la concentración máxima y requiere un tiempo 2 veces menor para lograr dicha concentración (con  $p < 0,001$  y  $p < 0,002$  respectivamente). La biodisponibilidad no difiere de la insulina humana.

#### **Seguridad**

Los eventos adversos que han sido descritos con este análogo no difieren de los descritos para la insulina lispro. La severidad de eventos hipoglucémicos y respuestas contrarreguladoras que se presentaron con insulina aspartato e insulina corriente fueron semejantes. No se ha descrito anomalías clínicas significativas en los perfiles hematológicos o bioquímicos (<sup>51</sup>).

#### **Mejora glucémica posprandial:**

Al igual que con lispro, la excursión posprandial glucémica fue menor con insulina aspartato que con insulina humana corriente aplicada 30 minutos antes de la ingesta. Aún en el caso de aplicar insulina aspartato inmediatamente antes de las comidas, es decir inadecuadamente, éste análogo demuestra diferencias estadísticamente significativas a su favor. La excursión glucémica es un Área Bajo la Curva (ABC) corregida al nivel basal, que evita la variación día a día. La diferencia entre el ABC las primeras 6 horas posaplicación al comparar insulina aspartato e insulina corriente a los 0 minutos, y -30 minutos antes de la ingesta, se estimó en 33% y 23% a favor de la insulina aspartato. Al traspasar estos datos al infinito estadísti-

co, se comprueba sin embargo la similaridad de ambas ABC para las clases de insulinas evaluadas, lo que avala la igualdad de sus biodisponibilidades ante similares depuraciones renales (<sup>52</sup>).

### **INSULINAS DE ACCIÓN INTERMEDIA**

#### **Insulina NPL**

Cuando la insulina lispro y la NPH permanecen en contacto por tiempo prolongado (semanas o meses) dentro de una mezcla, tiene lugar un intercambio entre la insulina lispro soluble y la insulina humana unida a protamina, resultando una mezcla de insulina lispro unida a protamina e insulina humana. Para evitar este problema se desarrolló una nueva formulación: la insulina NPL o insulina lispro-protamina-neutra, que es un análogo del complejo insulina NPH.

La insulina NPL ha sido elegida como el componente de acción intermedia en mezclas manufacturadas de insulina lispro y análogos de acción intermedia (Insulina Mix 25, Mix 50, Mix 75).

#### **Mezclas de análogos**

La mezcla de insulina NPH e insulina lispro no constituye una mezcla estable, razón por la que se trabajó formulaciones premezcladas de ambas insulinas, donde tiene lugar un intercambio parcial. Se desarrolló como alternativa a los esquemas de mezcla fija, y consiste en la unión de el análogo NPL (*neutral-protamine-lispro*) y la insulina análoga lispro. Se han formulado mezclas estables de insulina lispro y su contraparte unida a protamina:

- Mezcla baja o 25/75
- Mezcla media o 50/50
- Mezcla alta o 75/25.

Al evaluar las propiedades farmacocinéticas de estas mezclas y compararlas con la insulina lispro y la NPL cada una por separado, se confirma que independientemente de la proporción de insulina lispro en las mezclas, la actividad metabólica máxima se presenta 2 horas después de la aplicación, y que a mayor proporción de lispro, mayor incremento en el pico máximo. A mayor proporción de NPL, mayor duración del efecto, declinando éste de manera lineal según la concentración del análogo de acción intermedia. Así, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la insulina lispro están preservadas en mezclas estables. Esto se ha demostrado tanto en sujetos sanos como en diabéticos, salvando la distancia respecto a la insulinoresistencia propia de la diabetes.

Las formulaciones premezcladas en razones fijas de insulina regular y NPH son usadas regularmente en inyecciones múltiples en pacientes con diabetes tipo 2, llegando a representar hasta un 40% de la insulina usada en el mundo. Este tipo de formulación

tendrá sin duda aplicación importante en este grupo de pacientes, tal como se describirá más adelante.

### Insulina Mix 25

El Humalog Mix 25 Study Group publicó un estudio realizado en 89 individuos diabéticos tipo 2, comparando Mix 25 con mezclas de insulina NPH y cristalina en regímenes de 2 dosis, observándose que poseen semejante perfil de acción, con 2 ventajas: la aplicabilidad periprandial, y la poca elevación de la glucemia posprandial después de aplicada, sin incremento de la frecuencia de hipoglucemias (<sup>53</sup>).

Se comparó también la mezcla Mix 25 y la mezcla de insulina 70/30, y tras evaluar su acción en 37 diabéticos tipo 1 y 63 diabéticos tipo 2, se determinó que la mezcla de análogos logra menores excursiones glucémicas posprandiales, con similar control glucémico total y con menor número de hipoglucemias nocturnas (<sup>54,55</sup>).

## INSULINAS DE ACCIÓN PROLONGADA

### Insulina novosol basal

Ante la necesidad de una insulina que semeje la secreción basal diaria de insulina, se creó este análogo intentando que cumpliera con las siguientes características:

- Aplicación sólo una vez diaria,
- Concentración estable de insulinemia,
- Reproducibilidad durante las 24 horas,
- Gran solubilidad,
- Pobre variación intraindividual en su absorción.

El primero en estudiar este análogo, que fue el primero de larga acción que se desarrolló, fue el grupo de Jorgensen de Dinamarca (<sup>56</sup>). Por desgracia, quedaba durante mucho tiempo en el tejido celular subcutáneo y se reportó crecientes requerimientos de dosis y muchas reacciones locales inflamatorias, lo que condujo a su discontinuación. A pesar de ello, sirvió de base para los avances farmacodinámicos que se produjeron a partir de entonces.

### Insulina glargina

Se requería una insulina nueva que mimetice la secreción pancreática basal de insulina, que cumpliera con los criterios ya descritos para un buen análogo, de fácil manejo (inyecciones en diferentes sitios, a diferentes tiempos, no necesidad de mezclar) y con alta satisfacción y aceptación por parte de los pacientes.

La insulina glargina, HOE-901 o insulina humana 21-Gly-30Ba-L-Arg-30Bb-L-Arg, es un análogo de la insulina humana producido por tecnología ADNr que se caracteriza por su acción prolongada y sin pico. Es un análogo de larga acción producido para uso clínico.

co. Resulta de 2 modificaciones en la insulina humana, que buscan reducir la solubilidad de los hexámeros, estabilizando los cristales insulínicos. Tales modificaciones son:

- Se añaden dos cargas positivas (2 residuos de arginina) en el carboxilo terminal de la cadena B. Esto da como resultado una desviación del punto isoeléctrico del pH nativo 5,4 al  $6,7 \pm 0,2$ , haciendo a la molécula más soluble a un pH levemente ácido y menos soluble al pH fisiológico del tejido subcutáneo.
- Se requiere una segunda modificación para evitar la deamidación y dimerización que ocurre ante ese pH ácido. Esto se consigue cambiando el residuo de asparagina sensible a pH ácido que se encuentra en la posición 21 de la cadena A, y reemplazándolo por glicina cuya carga es neutral y se asocia con buena estabilidad (<sup>57</sup>). La información genética de esta secuencia es incorporada en la *Escherichia coli* K12 vía plásmido.

Estos cambios estructurales hacen difícil disolver la molécula a pH fisiológico, y causan también precipitación subcutánea, que ententece y prolonga la absorción de la insulina análoga.

Al tratarse de una solución clara, no puede ser mezclada con insulina rápida, la cual es formulada como tal a pH neutro, puesto que provocaría la precipitación de la glargina.

### Farmacocinética y farmacodinamia

Tiene marcadas diferencias con la insulina NPH. Su absorción es dependiente de cinc. La insulina glargina tiene menor pico (50% de la insulina NPH), y la duración es el doble que la NPH (<sup>59</sup>). Heinemann demuestra que la insulina glargina provee un "perfil sin pico", cuyo inicio de acción es 2 a 4 horas, con duración mayor a las 24 horas (<sup>58</sup>).

El US Study Group of Insulina Glargine in Type 1 Diabetes comparó la eficacia clínica de la insulina glargina con la NPH. Allí, la glargina mostró una gran disminución en los niveles glucémicos en ayunas, sin incrementar el número de hipoglucemias nocturnas, aunque no mejoró la HbA1c.

Los estudios realizados han caracterizado el perfil de actividad de la insulina glargina como una insulina con concentraciones plasmáticas relativamente planas (<sup>59</sup>).

Al comparar su absorción (medida a través de la radioactividad residual de I<sup>125</sup>), se observó la persistencia *in situ* mucho más prolongada que la insulina NPH ( $p < 0,0001$ ) (<sup>60,61</sup>). Además, en las primeras 6 horas posaplicación, la glucemia fue significativamente menor para la insulina NPH, y entre las 6 y 24 horas

del estudio, la glucemia no fue diferente entre ambas insulinas. Existe también evidencia que la absorción de la insulina glargina no se modifica por los lugares de absorción, ya sean estos pared abdominal, región deltoidea o muslos.

En el European Study Group of HOE-901 in Type 1 Diabetes se comparó la eficacia de la insulina glargina observando una mejora en la HbA1c de  $-0,14\%$  a la lograda con NPH. De esta forma, la insulina glargina administrada una vez por día al acostarse fue más efectiva que la insulina NPH aplicada una o dos veces por día. No se observó diferencias en el número de hipoglucemias y reacciones cutáneas, ni en la generación de anticuerpos antianálogos, ni con la señalización posglargina para IGF-1.

Otro fenómeno que contribuiría a prolongar la actividad del HOE901 es el hecho de unir 7 en lugar de 6 moléculas fenólicas al hexámero en los aminoácidos A21Gli-B31Arg 2 de la insulina, que actuarían como efectores alostéricos <sup>(62)</sup>.

#### Control glucémico nocturno

Se estudió este ítem en niños diabéticos tipo 1 como parte de un régimen de 3 inyecciones, sabiendo que el pico insulínico es uno de los más importantes factores de riesgo para el desarrollo de hipoglucemia nocturna, presentándose generalmente esta sobreinsulinización durante la parte inicial de la noche. La HOE-901 sin pico, mejoró esta situación disminuyendo el número de episodios hipoglucémicos que al usar insulina NPH <sup>(58)</sup> (Figura 6).

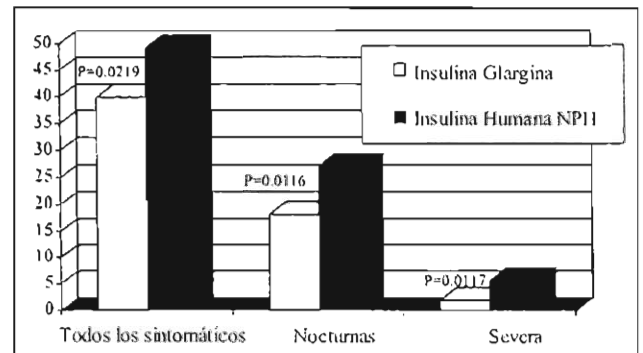
#### Hipoglucemia

Al insistir en acercarnos a la normoglucemia, nos exponemos al incremento del riesgo de hipoglucemia. La insulina ultralenta, que fue formulada como alternativa para evitar este fenómeno, presenta gran variabilidad, tanto intra como interindividual; la insulina NPH está limitada además por el riesgo de hipoglucemia durante sus concentraciones pico, que frecuentemente ocurren durante la noche.

La insulina glargina es una buena posibilidad terapéutica. Se realizó un estudio a 12 semanas comparando los efectos de la insulina glargina y la NPH en 534 pacientes diabéticos tipo 1, tanto en el control glucémico como en la incidencia de hipoglucemias, encontrándose igual control glucémico con ambos esquemas, ocurrieron menos eventos de hipoglucemias severas ( $p < 0,005$ ), siendo ambas modalidades terapéuticas similares en la tolerancia obtenida.

### FUTUROS ANÁLOGOS

El patrón no fisiológico de la insulina, que conlleva una excesiva variabilidad en su absorción, triplica



**Figura 6.-** Hipoglucemia según insulino terapia. Porcentaje de sujetos que reportaron por lo menos un episodio de hipoglucemia sintomática, o nocturna o severa, confirmada por nivel glucémico  $< 2,0$  mmol/L <sup>(63)</sup>.

el riesgo de hipoglucemia severa. Una parte de la variabilidad de dicha absorción se asocia a la naturaleza insoluble de la molécula, y a las mezclas que muchas veces se realizan en forma artesanal. La lenta disolución del material cristalino en el sitio de aplicación prolonga su tiempo de acción. Además, como la absorción de la insulina depende también del flujo sanguíneo, los cambios normales en éste pueden potencialmente alterar el perfil de absorción.

Grandes esfuerzos se han dedicado al desarrollo de análogos de insulina que posean una acción más prolongada y reproducible. Un avance posible en la mejora de estas limitaciones es la ingeniería de insulinas aciladas con ácidos grasos, que tienen una sustancial afinidad por la albúmina, el medio para obtener una insulina soluble de larga acción. Está bien establecido que el tiempo de vida medio de numerosas hormonas se prolonga mediante su unión a proteínas transportadoras específicas.

Otra posible utilidad de estos análogos acilados está en relación con el acceso de los análogos a tejidos periféricos e hígado. En los diabéticos tipo 1 el balance entre la periferie y el hígado se altera, dejando de ser 60:40, como normalmente ocurre, para igualarse entre ellos y provocar un menor efecto en la gluconeogénesis hepática. El tamaño de los dímeros de insulina impide que llegue a nivel hepático a una concentración adecuada, que sí se lograría al unirse a la albúmina.

#### Complejos insulina-tiroxilo

Como parte de los análogos "hepatoselectivos", que serían más activos a nivel hepático que sistémico, se encuentra también el análogo insulina-tiroxilo. Este péptido similar a la insulina tiene la capacidad de unirse al receptor de insulina y gracias a su unión tiroxilo,

se liga a proteínas transportadoras de T4, y puede permanecer en los sinusoides hepáticos, por lo que su acción es menor, siendo necesario aplicar grandes volúmenes, hecho que limita su uso. Además, el gran tamaño de la molécula podría obstaculizar la unión del análogo al receptor de insulina, por lo que se ha creado un "brazo espaciador", dando lugar al análogo insulina B1 T4 AHA, que está actualmente en estudio (<sup>64</sup>).

#### Acilación con ácido palmítico

La insulina se une a una proteína sérica acilándola en el grupo e-amino de la Lis B29 con ácido palmítico, para promover su unión a proteínas. La albúmina fue elegida como proteína transportadora porque sus niveles circulatorios son altos y razonablemente constantes, su capacidad de unión a ácidos grasos es bien conocida y se conoce la forma de unir la insulina a los ácidos grasos. El análogo insulina humana Ne-Palmitoil Lis (B29) se obtiene por la rápida adición de N-Hidroxi-succinimidil-palmitato a 20  $\mu\text{mol}$  de insulina (<sup>65</sup>).

Se ha realizado estudios sugiriendo la formación de un complejo estable albúmina-insulina humana Ne-palmitoil Lis (B29). También se ha determinado su tiempo de acción y actividad, tanto posadministración endovenosa (para determinar el tiempo de acción y actividad independientes del sitio de aplicación), como posadministración subcutánea.

El análogo resultó ser tan potente como la insulina humana no modificada, con una duración por lo menos 70% más larga que la insulina humana L, debido a la prolongación de 6 veces el tiempo de vida media. Así, la unión del análogo a la albúmina brinda un entrecimiento de la respuesta fisiológica, con incremento de la duración de la acción y un tiempo de permanencia prolongado en el compartimiento vascular.

Las concentraciones plasmáticas logradas fueron sustancialmente mayores (20 a 30 veces mayor) que los de la insulina humana. Esto indicaría una disminución de la depuración del complejo albúmina-análogo.

Respecto a su farmacocinética, la acilación puede disminuir significativamente la depuración de insulina tal como se ha mencionado, incrementando su vida media y su tiempo de acción. Existen diferencias en la farmacocinética después de la administración IV o SC, sugiriendo que por lo menos una parte de la prolongación del tiempo de acción se debe a la retención del análogo en el TCSC, aparentemente debido a la unión de éste a la albúmina tisular.

#### NN304

Se trata de otro análogo acilado de insulina, en el que el ácido mirístico (ácido graso de 14 carbonos), se ha unido covalentemente con el residuo Lis(B29), logrando así la mayor afinidad de unión posible de

todos los compuestos acilados hacia la albúmina, formando la insulina humana LysB29-tetradecacoil, des-(B30), o NN304 (<sup>66</sup>).

Además, al unirse con la albúmina, se hace al análogo presumiblemente inaccesible al receptor hepático de insulina, disminuyendo su depuración. Si bien la concentración plasmática de este análogo es 6 a 10 veces la de la insulina humana, esto no ocurre en el tejido intersticial, donde las concentraciones totales son más similares (NN304: 163 pmol/L contra insulina humana: 106 pmol/L).

De una u otra forma, la captación y acción celular del NN304 probablemente sería una función de la tasa de disociación del complejo NN304-albúmina y la unión al receptor de insulina, más que de las concentraciones intersticiales de NN304, tanto en su forma unida como libre.

Heinemann (<sup>67</sup>) demostró en un estudio realizado en sujetos sanos con clamps euglucémicos que tanto con NN304 como con insulina NPH la respuesta metabólica no muestra un pico pronunciado, aunque sí tuvo un lento inicio de acción ( $446 \pm 162$  min contra  $359 \pm 174$  min). Sin embargo, no fue posible demostrar una relación dosis-respuesta clara en el efecto metabólico.

#### Análogo acilado con ácido $\alpha$ -aminobutírico por A13Leu-A14Tir

Un análogo insulínico en la cadena A, la cadena A13-14 GABA, A21 Ala, en el cual el dipéptido Leu-Tir de las posiciones A13-A14 fue sustituido por el aminoácido no codificado GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) y el AspA21 por alanina, fue preparado con la cadena B de la insulina porcina, produciéndose un análogo insulínico, la insulina porcina A13-14 GABA, A21 Ala, o insulina sustituida con GABA. Este análogo retiene 50% de su actividad biológica *in vivo* y 59% de su capacidad de unión al receptor. Está aún en investigación si el reemplazo de un puente peptídico normal N-C por uno no natural C-C puede representar un cambio en la estructura y función de ésta y otras proteínas (<sup>68</sup>).

#### CONCLUSIONES

Los análogos insulínicos constituyen una nueva arma terapéutica para el tratamiento de la diabetes. Esta familia de fármacos suple varias deficiencias farmacocinéticas y farmacodinámicas de las insulinas conocidas hasta el momento. El estudio y la síntesis de la molécula de insulina permitió el desarrollo de la Ingeniería de Proteínas, de la Ingeniería Molecular y la Bioingeniería, bases de la investigación actual. Respecto a la duración de acción tenemos los análogos de acción rápida, con los análogos lispro y aspartato B28, los de acción intermedia como el análogo NPL y el

Mix en sus diferentes concentraciones y los de acción prolongada, como la glargina. La insulina lispro es la más estudiada, comparte sus propiedades con la insulina aspartato. Cuentan con rápido inicio de acción, mayor pico y menor frecuencia de hipoglucemias entre sus ventajas. No han demostrado mejorar la HbA1c. El análogo NPL en mezcla y la insulina Mix 25 pueden ser utilizados en los mismos casos que las mezclas fijas de insulinas. El análogo glargina representa la posibilidad de suplir la insulinemia basal, pues no tiene pico marcado, su tiempo de acción es bastante prolongado y tiene poca variabilidad. Existen múltiples investigaciones en marcha para obtener análogos de acción prolongada, con hepatoselectividad y similar concentración insulínica tisular. En la diabetes gestacional los análogos de acción rápida son tan eficaces como la insulina corriente. No está aprobado su uso para diabetes pregestacional. Los estudios prospectivos a largo plazo que evalúen el impacto de la mejora de la glucemia posprandial a pesar de iguales valores de HbA1c nos darán la respuesta respecto al verdadero papel que cumplen los análogos en el tratamiento de la diabetes.

#### COMENTARIO

El papel de los análogos para cimentarse en la escala terapéutica de los pacientes diabéticos requiere, como todo en medicina, tiempo para adquirir experiencia con ellos. La utilidad de cada tipo de análogos y su papel específico está aún en investigación. Estas nuevas moléculas se han producido para dar respuesta a algunas de las deficiencias terapéuticas que presentan las insulinas convencionales, aún las producidas por ADNr. Además, las posibilidades a futuro son increíblemente valiosas y aplicables; pese a todo esto, el uso de análogos resulta todavía insatisfactorio. No se ha demostrado su capacidad de disminuir la HbA1c y, por ende, tampoco las complicaciones crónicas dependientes de su alteración. Algunos análogos tienen tan poco tiempo en uso que sólo son capaces de fundamentar una ventaja de flexibilidad, no mejor que las insulinas más comunes, y en ciertos casos, como el embarazo, su utilización no ha demostrado no ser perjudicial.

Los futuros análogos, con múltiples blancos metabólicos, de seguro proveerán a los pacientes modos más coherentes de tratamiento. Lamentablemente, falta mucho para reinstalar el sutil equilibrio glucémico que se altera con la diabetes aún invencible.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Brange J.** Insulin preparations. En: Galenius of insulin. Berlin, Alemania. Spring-Verlag, 1987; pág. 17-73.
- 2) **Barnett A, Owens D.** Insulin analogues. *The Lancet* 1997; 349: 47-51.
- 3) **Holleman F, Koestra J.** Insulin lispro. *New Engl J Med* 1997; 337: 176-183.
- 4) **Kang S, Brange J, Burch A.** Subcutaneous insulin Absortion explained by insulin's physicochemical properties. *Diabetes Care* 1991; 14: 942-7.
- 5) **Bolli G, Di Marchi R, Koivisto V y col.** Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42: 1151-67.
- 6) **Dreyer K.** The bioactivity of Insulin Analogues from in vitro Receptor Binding to *in vivo* glucose uptake. *Diabetes Metabol Rev* 1992; 8: 259-286.
- 7) **Wolpert H, Sliker L, Sundell K, King G.** Identification of an insulin analog with enhanced growth effect in aortic smooth muscle cells. *Diabetes* 1990; 39 [Supl 1]: 140A.
- 8) **Torlone E, Fanelli C, Bolli G.** Pharmacokinetics, pharmacodynamics and glucose counterregulation following subcutaneous injection of the monomeric insulin analogue [ Lys (B28), Pro (B29)] in IDDM. *Diabetologia* 1994; 37: 713-20.
- 9) **Anderson J, Brunelle R, Koivisto V, Vignati L, and the Multicenter Insulin Lispro Study Group.** Reduction of postprandial hyperglycemia and frequency of hypoglycemia in IDDM patients on Insulin-analog treatment. *Diabetes* 1997; 46: 265-70.
- 10) **Braak E, Woodworth J, Kurts D, y col.** Injection site effects on the pharmacokinetics and glucodynamics of insulin lispro and regular insulin. *Diabetes Care* 1996; 19: 1437-1440.
- 11) **Fineberg N, Fineberg S, Anderson J, Hufferd S.** Immunologic effects of insulin lispro [Lys(B28), Pro (B29) Human Insulin] in IDDM and NIDDM patients previously treated with insulin. *Diabetes* 1996; 45: 1750-4.
- 12) **Takewii A, Throckmorton DC, y col.** Periodic high extracellular glucose enhances production of collagens III and IV by mesangial cells. *Am J Physiol* 1995; 268: F13-F19.
- 13) **Grunwald JE, BrucknerAJ, y col.** Diabetic glycemic control and retinal blood flow. *Diabetes* 1999; 39: 602-7.
- 14) **Scherthaner G, Wein W, Birkett M.** Postprandial insulin lispro. A new therapeutic option for type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998; 21: 570-3.
- 15) **Burge M, Castillo K, Schade D.** Meal composition in a determinant of lispro-induced hypoglycemia in DIIM. *Diabetes Care* 1997; 20: 152-5.
- 16) **Vignati L, Anderson J, Brunelle R, Jefferson F.** Improvement of glycemic control with the rapidly absorbed lispro insulin analog in type I diabetes. *Diabetologia* 1994; 37 [Supl 1]: 301.
- 17) **Ronemaa T, Viikarii J.** Reducing snacks when switching from conventional soluble to lispro insulin treatment: effects on glycemic control and hypoglycaemia. *Diabetic Med* 1998; 15: 601-7.
- 18) **Renner R, Peutzner A, Trautman M, Harzer O.** Use of insulin lispro in continuous subcutaneous insulin infusion treatment. *Diabetes Care* 1999; 22: 784-7.

- 19) Schmau S, König A, Landgraf R. Human insulin analogue[Lys (B28), Pro (B29)]: The ideal pump insulin? *Diabetic Med* 1998; 15: 247-49.
- 20) Guerci B, Meyer L, Salle A, Charrie A, Drouin P. Comparison of metabolic deterioration between insulin analog and regular insulin after a 5-hour interruption of a continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84: 2673-8.
- 21) Attia N, Jones T, Holcombe J, Tamborlane W. Comparison of human regular and lispro insulins after interruption of continuous subcutaneous insulin infusion and in the treatment of acutely decompensated IDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 817-21.
- 22) Zinman B, Tildesley H, Chiasson J, Tsui E, Strack T. Insulin lispro in CSII. *Diabetes* 1997; 46: 440-3.
- 23) Ooi Ch, Mullen P, Williams G. Insulin lispro. The ideal pump insulin for patients with severe hypoglycemic unawareness? *Diabetes Care* 1999; 22: 1598-9.
- 24) Fineberg S, Fineberg N, Anderson Hufferd S. Comparative immunogenicity fo lyspro (B28,29) human insulin analog between type 1 and type 2 patients. *Diabetologia* 1994; 37 [Supl. 1]: 646.
- 25) Brunelle R, Anderson J, Vignati L. Decreased rate of hypoglycemia in association with improved metabolic control. *Diabetologia* 1994; 37 [Supl. 1]: 300.
- 26) Heller S, Amiel S, Mansell P. Effect of the fast-acting insulin analog lispro on the risk of nocturnal hypoglycemiaduring intensified insulin therapy. *Diabetes Care* 1999; 22: 1607-11.
- 27) Melki V, Renard E, Tauber J. Improvement of HbA1c and blood glucose stability in IDDM patients treated with lispro insulin analog in external pumps. *Diabetes Care* 1998; 21: 977-82.
- 28) Howorka K, Schulsche C. Algorithm adaptation under functional insulin treatment during transfer from regular to insulin lispro. *Diabetes, Nutr Metabol*1998; 11: 266-72.
- 29) Ebeling P, Bolli G, Koivisto V, y col. Long term intensive treatment of type 1 diabetes with the short-acting insulin analog lispro in variable combination with NPH insuline at mealtime. *Diabetes Care* 1999; 22: 468-77.
- 30) Lalli C, Ciofetta M, Del Sindaco P, Torlone E, Bolli G, y col. Long term intensive treatment of type 1 diabetes with the short-acting insulin analog lispro in variable combination with NPH insuline at meal-time. *Diabetes care* 1999; 22: 468-77.
- 31) Ciofetta M, Lalli C, Del Sindaco P, Bolli G. Contribution of postprandial vs interprandial blood pressure to HbA1c in type 1 diabetes on physiologic intensive therapy with lispro insulin at mealtime. *Diabetes Care* 1999; 22: 795-9.
- 32) Torlone E, Pampanelli S, Bolli G. Effects of the short-acting insulin analog [Lys (B28), Pro (B29)] on postprandial blood glucose control in IDDM. *Diabetes Care* 1996; 19: 945-52.
- 33) Del Sindaco P, Ciofetta M, Bolli G. Use of the short-acting insulin analogue lispro in intensive treatment of type 1 diabetes mellitus: importance of appropriate replacement of basal insulin and time-interval injection-meal. *Diabetic Med* 1998; 15: 592-600.
- 34) Pampanelli S, Torlone E, Bolli G. Improved postprandial metabolic control after subcutaneous injection of a short-acting insulin analog in IDDM of short duration with residual pancreatic  $\beta$ -cell function. *Diabetes Care* 1995; 18: 1452-9.
- 35) Lahtela, Kuip M, Salmi J. Severe antibody-mediated human insulin resistance: successful treatment with the insulin analog lispro. *Diabetes Care* 1997; 20: 71-73.
- 36) Abraham M, Sharafi B, Khardori R. Lispro in the treatment of insulin allergy. *Diabetes Care* 1999; 22: 1916-7.
- 37) Henrichs H, Unger H, Trautmann. Treatment of a case of severe subcutaneous insulin resistance using the insulin analogue Lys (B28) Pro (B29) for facilitated subcutaneous absorpiion. *Diabetologia* 1994; 37[ Sup 1]: 647.
- 38) Henrichs H, Unger H, Trautmann M. Severe insulin resistance treated with insulin lispro. *The Lancet* 1996; 348:1248.
- 39) Perez A, Caixas A, De Leiva A. Insulin lispro and regular insulin have a similar effect on lypolitic activities and VLDL composition in NIDDM. *Diabetologia* 1994; 37 [Sup 1]: 649.
- 40) Nielsen F, Jorgensen L, Parving H. Long term comparison of human insulin analogue B10Asp and soluble human insulin in IDDM patients on a basal/bolus insulin regimen. *Diabetologia* 1995; 38: 592-8.
- 41) Tuominen J, Karonen S, Bolli G. Exercise-induced hypoglycaemia in IDDM patients treated with a short-acting insulin analogue. *Diabetologia* 1995; 38: 106-11.
- 42) Letiexhe M, Rutters A, Schmitt H. (Lys (B28), Pro (B29)) Human insulin: patiens treated with lyspro vs human insulin: quality of life assessment. *Diabetologia* 1994; 37 [Supl. 1]: 648.
- 43) Jovanovic L. Retinopathy risk: what is responsible? Hormones, hyperglycemia, or humalog? *Diabetes Care* 1999; 22: 846-7.
- 44) Bhattacharyya A, Vice P. Insulin lispro, pregnancy and retinopathy. *Diabetes Care* 1999; 22: 2101-2.
- 45) Chew EY, Mills JL, Metzger BE, Remaley NA, Jovanovic-Peterson L, y col. National institute of child health and human development diabetes in early pregnancy study: Metabolic control and progression of retinopathy: The diabetes in early pregnancy study. *Diabetes Care* 1995; 18: 631-37.
- 46) Jovanovic L, Ilic S, Bastyr E. Metabolic and immunologic effects of insulin lispro in gestational diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1422-7.
- 47) Anderson J, Brunelle R, Di Marchi R. Mealtime Treatment with insulin analog improves postprandial hyperglycemia and hypoglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1250-5.
- 48) Vantghem M, Vigouroux C, Capeau J. Late-onset lipoatrophic diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1374-6.
- 49) Aisenpreis U, Pfutzner A, Jehle PM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin lispro compared with re-

- gular insulin in haemodialysis patients with diabetes mellitus. *Nephrol Dialysis Transpl* 1999; 14 [Supl 4]: 5-6.
- 50) **Raskin P, Guthrie R, Jovanovic L.** Use of insulin aspart, a fast-acting insulin analog, as the mealtime insulin in the management of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 583-7.
- 51) **Frier BM, Ewing FM, Lindholm A, Hylleberg B, Kanc K.** Symptomatic and counterregulatory hormonal responses to acute hypoglycaemia induced by insulin aspart and soluble human insulin in type 1 diabetes. *Diabetes Metabol Res Rev* 2000; 16: 262-8.
- 52) **Lindholm A, Mc Ewen J, Rus A.** Improved postprandial glycemic control with insulin aspart. *Diabetes Care* 1999; 22: 801-5.
- 53) **Roach P, Yue L.** The humalog Mix 25 study group improved postprandial glycemic control during treatment with humalog Mix 25, a novel protamine-based insulin lispro formulation. *Diabetes Care* 1999; 22: 1258-61.
- 54) **Heise T, Weyer C, Heinemann I.** Time-action profiles of novel premixed preparations of insulin lispro and NPL insulin. *Diabetes Care* 1998; 21: 800-3.
- 55) **Rave K, Heinemann L, Heise T.** Premixed formulations of insulin lispro: Activity profiles in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 865-6.
- 56) **Jorgensen S, Vaag A, Markussen J.** NovoSol basal: pharmacokinetics of a novel soluble long acting insulin analogue. *BMJ* 1989; 299: 415-9.
- 57) **Buse J.** Insulin glargine (HOE 901) first responsibilities: understanding the data and ensuring safety. *Diabetes Care* 2000; 23: 576-8.
- 58) **Mohn A, Strang S, Dunger D.** Nocturnal glucose control and free insulin levels in children with type 1 diabetes by use of long-acting insulin HOE 901 as part of a three-injection regimen. *Diabetes Care* 2000; 23: 557-9.
- 59) **Dreyer M, Pein M, Schmidh CHR.** Heidtmann comparison of the pharmacokinetics & dynamics of Gly (A21)-Arg(B31, B32)-human insulin (HOE 71GT) with NPH-insulin following subcutaneous injection by using euglycaemic clamp technique. *Diabetologia* 1994; 37 [Supl. 1]: 303.
- 60) **Owens D, Coates P, Kurzhals R.** Pharmacokinetics of I125-labeled insulin glargine (HOE 901) in healthy men. *Diabetes Care* 2000; 23: 813-9.
- 61) **Pieber T, Jolchine I, Derobert E.** The european study group of HOE 901 in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 157-62.
- 62) **Berchtold H, Hilgenfeld R.** Binding of phenol to R6 insulin hexamers. *Biopolymers* 1999; 51: 165-72.
- 63) **Ratner R, Hirsch I, Wilson C.** U.S. Study group of insulin glargine in type 1 diabetes. Less hypoglycemia with insulin glargine in intensive insulin therapy for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 639-43.
- 64) **Shojaee-Moradie F, Eckey H, Jones R.** Novel hepatoselective insulin analogues: studies with covalently linked thyroxyl-insulin complexes. *Diabetic Med* 1998; 15: 928-36.
- 65) **Thyers S, Yakubu F, Chen V.** Acylation of human insulin with palmitic acid extends the time action of human insulin in diabetic dogs. *Diabetes* 1997; 46: 637-42.
- 66) **Hamilton-Wessler M, Ader M, Bergman R.** Mechanism of protected metabolic effects of fatty acid acylated insulin NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin. *Diabetologia* 1999; 42: 1254-63.
- 67) **Heinemann L, Sinha K, Weyer C.** Time section profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin. *Diabetic Med* 1999; 16: 332-8.
- 68) **Huang YD, Yang SZ, Feng YJ.** An insulin analogue with gamma-amino butyric acid substitution for A13 Leu-A14 Tyr. *Peptide Research* 1999; 54: 18-22.