



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS DE BIOTECNOLOGIA NA FARMÁCIA
COMUNITÁRIA – O CASO DA INSULINA**

Olga Maranhão da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Mónica Sofia Leal Condinho
e do Professor Doutor Carlos José Manaia Sinogas**

2022



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS DE BIOTECNOLOGIA NA FARMÁCIA
COMUNITÁRIA – O CASO DA INSULINA**

Olga Maranhão da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Mónica Sofia Leal Condinho
e do Professor Doutor Carlos José Manaia Sinogas**

2022

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2022 Olga Maranhão da Silva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Esta dissertação não seria realizada com sucesso sem o suporte, estímulo e dedicação dos meus pais, Maria e Manuel, das minhas irmãs, Mari e Cris e, do meu cunhado Tiago. Agradeço o enorme apoio que me deram.

À Fatu, obrigada, pela presença incondicional, pelas palavras motivadoras e pela pessoa que és para mim.

Ao Thomas pela paciência, pela força, pelo incentivo constante e por ser um bom ouvinte.

À Catarina, à Cláudia, à Joana, à Ana e à Inês por me compreenderem e me ajudarem a relaxar.

A toda a minha família e amigos que de uma forma direta ou indireta ajudaram que esta dissertação se tornasse possível.

Quero expressar uma gratidão enorme à minha orientadora Professora Doutora Mónica Condinho pelo apoio, dedicação, orientação e motivação que sempre me deu.

E por fim, mas não menos importante, agradecer ao Professor Doutor Carlos Sinogas por todos os bons conselhos partilhados.

Resumo

Os medicamentos de biotecnologia são produzidos por tecnologia de DNA recombinante, a partir de organismos vivos ou derivados destes. A tecnologia de DNA recombinante, descoberta em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer, permitiu o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir tanto proteínas expressas pelo Ser Humano como, novas proteínas que vão além do que é codificado no genoma.

Um exemplo paradigmático é a insulina. A insulina foi a primeira proteína humana recombinante comercializada. Para além da produção da insulina com a mesma sequência de aminoácidos da insulina humana, pelo processo de tecnologia de DNA recombinante, é possível introduzir modificações na sequência peptídica, que constituem enormes vantagens terapêuticas, pela disponibilização de insulinas com diferentes perfis farmacocinéticos.

Os medicamentos de biotecnologia de uma maneira geral, devido à sua novidade, são de uso mais frequente nos cuidados de saúde diferenciados, mais ao nível hospitalar. Contudo, alguns, de utilização mais bem estabelecida, estão também disponíveis na farmácia comunitária. Tanto num caso como no outro, é de extrema importância que o Farmacêutico conheça as suas características e particularidades para melhor acompanhar a sua utilização.

O objetivo desta dissertação é efetuar uma revisão bibliográfica sobre alguns aspetos da natureza, características e especificidades genéricas dos medicamentos de biotecnologia. Presta-se particular atenção à insulina, enquanto medicamento de biotecnologia de uso frequente no ambiente comunitário. Tendo em conta as características particulares dos medicamentos de biotecnologia, é necessário, no caso, perceber a estabilidade das insulinas em duas condições diferentes para além da normal conservação recomendada a temperaturas de refrigeração: quando há rotura da cadeia de frio e quando em uso normal. Para tal, desenvolveu-se um estudo de caso das insulinas comercializadas pela Novo Nordisk, em Portugal, quanto à sua estabilidade.

Palavras Chave: Diabetes *Mellitus*, Estabilidade, Insulina, Medicamentos de Biotecnologia.

Abstract

Biotechnology medicinal products are obtained by recombinant DNA technology, from living organisms or derivatives thereof. Recombinant DNA technology, discovered in 1973 by Stanley Cohen and Herbert Boyer, allowed the development of microbial cultures for producing proteins either expressed by humans or new entities that go beyond what is encoded in the genome.

A paradigmatic example is insulin. Insulin was the first commercially available recombinant human protein. In addition to producing insulin with the same amino acid sequence as human insulin, using recombinant DNA technology, it's possible to introduce changes in the peptide sequence, which constitute enormous therapeutic advantages, through the availability of insulins with different pharmacokinetic profiles. Biotechnology medicines in general, due to their novelty, are more frequently used in differentiated health care units, at the hospital level. However, some products, with well-established use, are also available in the community pharmacy. In either case, it is extremely important that the Pharmacist knows its characteristics and particularities to better monitor its use.

The objective of this dissertation is to carry out a literature review on some aspects of the nature, characteristics and generic specificities of biotechnology medicines. Particular attention is paid to insulin, as a biotechnology medicinal product, frequently used in the community environment. Taking into account the particular characteristics of biotechnology medicines, it is necessary to understand the stability of insulins under two different conditions, in addition to the normal recommended storage at refrigerated temperatures: when the cold chain breaks and when in normal use. To this end, a case study of the insulins marketed by Novo Nordisk, in Portugal, was developed regarding their stability.

Keywords: Biotechnology medicinal products, Diabetes Mellitus, Insulin, Stability.

Índice

1. Medicamentos de Biotecnologia	1
2. Tecnologia de DNA recombinante e processo geral de fabrico	6
3. Estabilidade dos medicamentos de biotecnologia.....	10
4. Estudos de estabilidade.....	15
5. Biossimilares	19
6. Aprovação de Medicamentos de Biotecnologia	21
7. Impacto do avanço da biotecnologia no tratamento da diabetes mellitus	23
8. Insulina	26
8.1. Estrutura da insulina	27
8.2 Tipos de insulina	29
8.2.1. Análogos de insulina de ação rápida	29
8.2.2. Análogos de insulina de ação lenta.....	35
8.2.3 Esquemas de insulina que hoje se preconizam para tratar a diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	40
8.2.4. Insulinas Pré-misturas ou Bifásicas	40
8.3. Estabilidade da insulina	41
9. Estudo de caso - Insulina	43
9.1. Objetivo.....	43
9.2. Metodologia	44
9.3. Resultados	45
9.4. Discussão.....	46
9.5. Conclusão	48
10. Perspetiva do autor.....	49
11. Bibliografia	50

Índice de Figuras

Figura 1.1. Sequência de aminoácidos das insulinas humana, suína e bovina	4
Figura 2.1. Plasmídeo recombinante	7
Figura 6.1. Organização do Dossier Técnico Comum	21
Figura 8.1. Estrutura primária da insulina humana	28
Figura 8.2. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da lispro	30
Figura 8.3. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da aspártico	31
Figura 8.4. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da glulisina	33
Figura 8.5. Perfil farmacocinético das insulinas de ação rápida e ultra rápida	34
Figura 8.6. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina detemir	36
Figura 8.7. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina glargina	37
Figura 8.8. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina degludec	38
Figura 8.9. Perfil farmacodinâmico das insulinas de ação lenta	39

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Características dos sistemas de expressão presentes	8
Tabela 9.1. Condições de conservação das insulinas da Novo Nordisk comercializadas em Portugal	45

Siglas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

CHO – Células de Ovário de Hamster Chinês

CIM – Centro de Informação do Medicamento

CSII - Infusão Subcutânea Contínua de Insulina

CTD – *Common Technical Document*

DM - *Diabetes Mellitus*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E. Coli - *Escherichia Coli*

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

FDA – *Food and Drug Administration*

ICH - *International Conference on Harmonization*

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NPH - Protamina Neutra de *Hagedorn*

RCM - Resumo das Características do Medicamento

RH - Humidade Relativa

1. Medicamentos de Biotecnologia

Os medicamentos de biotecnologia revolucionaram a farmacoterapia, em especial no que se refere a necessidades médicas anteriormente não atendidas, proporcionando novas opções terapêuticas para diversas patologias (1).

Vieram preencher um enorme *gap* onde respondem a inúmeras aplicações terapêuticas, em especial nas áreas das doenças inflamatórias e infecciosas, doenças autoimunes, metabólicas, hormonais, cardiovasculares, neurológicas ou oncologia.

Os chamados Biofármacos, quando recém-introduzidos são, em geral, muito caros, pois trata-se, com frequência, de terapêuticas para um número reduzido de doentes por quem tem de ser distribuído todo o investimento (1). Os custos de desenvolvimento dos novos medicamentos de biotecnologia são muito elevados, estimando-se em cerca 1 800 milhões de dólares por cada nova molécula. Cerca de 63% destes custos referem-se ao desenvolvimento clínico durante os ensaios das fases I a III e 32% aos estudos pré-clínicos (2). Quando uma das etapas do desenvolvimento não demonstra benefício suficiente, todo o investimento anterior se perde, pelo que também estes custos de investimento não remunerado terão de ser incorporados no preço dos medicamentos de biotecnologia (2).

Os custos com as doenças oncológicas, as autoimunes, as infecciosas ou as musculoesqueléticas para a segurança social, para os serviços de saúde e para a sociedade em geral são extremamente elevados. Porém, a despesa associada aos medicamentos biofarmacêuticos não chega a atingir 10% da despesa total associada ao tratamento destas doenças, contribuindo de forma significativa para o aumento da produtividade e o regresso à vida ativa dos doentes, diminuindo de forma expressiva os custos da Segurança Social originados por baixas e reformas antecipadas (3).

Os elevados custos dos medicamentos de biotecnologia são, por isso, em grande medida, compensados pelos benefícios que aportam à redução do sofrimento dos doentes e aos gastos da sociedade com as patologias debilitantes que tratam (3).

Os medicamentos de biotecnologia são produzidos por tecnologia de DNA recombinante, a partir de organismos vivos ou derivados destes (3). São, na maior parte dos casos, produtos de natureza proteica, sendo que o seu desenvolvimento tecnológico se inicia, muito frequentemente, pela identificação do alvo terapêutico. Face ao objetivo

e ao alvo terapêutico a estrutura da proteína é concebida e a sua expressão biológica viabilizada pela adequada sequência nucleotídica do gene artificial criado. A proteína de interesse produzida é depois purificada e formulada para atingir o alvo e produzir os efeitos terapêuticos desejados (1). As proteínas são moléculas geralmente de grandes dimensões e com uma estrutura complexa. A sua estrutura primária, definida pela sequência linear de aminoácidos que a compõem organiza-se numa estrutura secundária de folhas plissadas beta e hélices alfa, que, se arrumam numa conformação global espacial que define a estrutura terciária (4). A estrutura terciária é determinada por ligações covalentes e interações não covalentes, que ocorrem entre aminoácidos que podem estar a longas distâncias na sequência primária de aminoácidos, mas que se aproximam no espaço pela forma como a proteína se dobra. A estrutura quaternária descreve como várias estruturas terciárias de cadeias polipeptídicas se unem para formar uma única proteína multimérica funcional (4). A funcionalidade da proteína e consequentemente o efeito terapêutico pretendido depende da manutenção de uma estrutura adequada.

Estas proteínas terapêuticas dos chamados medicamentos biológicos, diferem em múltiplos aspetos das pequenas moléculas clássicas, dos designados medicamentos farmacológicos. Nomeadamente, no tamanho, sendo as moléculas químicas de pequenas dimensões e baixo peso molecular (1). Diferem também na sua estabilidade, pois a sua muito maior dimensão permite um mais alargado número de combinações dos seus componentes estruturais. Se a estabilidade destas proteínas for comprometida, não se mantendo a estrutura adequada, perde-se a função (1).

Diferem também na purificação. As substâncias ativas de natureza química dos medicamentos designados de farmacológicos são produzidas por síntese química a partir de reagentes bem definidos e conhecidos, podendo, por isso, ser purificados de formas muito específicas e controladas. Quando falamos de substâncias ativas de natureza biológica, em particular de proteínas, a sua purificação, a partir das células que a produziram é mais complexa (1). Dada ainda a dependência da atividade biológica da estrutura molecular, não podem ser usados processos drásticos na purificação das proteínas. Eventuais contaminações intrínsecas ou adventícias são mais facilmente removidas dos produtos de origem química que dos produtos de origem biológica.

Trata-se claramente de uma desvantagem dos medicamentos de origem biotecnológica (1).

Como consequência das diferenças sinalizadas, seja na sua origem e natureza química ou biológica, seja na potencialidade para a presença de contaminantes ou agentes infecciosos, existem múltiplas diferenças nos aspetos regulamentares aplicáveis aos dois tipos de medicamentos (1).

As diferenças para as substâncias químicas atrás elencadas dizem respeito a todos os medicamentos de origem biológica, quer se trate de substâncias ativas extraídas de organismos vivos não modificados, os designados medicamentos biológicos, quer se trate de medicamentos preparados por tecnologia de DNA recombinante, designados de medicamentos de biotecnologia (1). A grande vantagem relativa dos medicamentos de biotecnologia, ao contrário dos medicamentos biológicos, prende-se com a sua disponibilidade, pois podem existir em quantidades virtualmente ilimitadas. Esta enorme disponibilidade permite aplicar métodos e procedimentos mais exaustivos que conduzem a substâncias ativas mais purificadas, com perfis de especificidade, efetividade, segurança biológica e de reações adversas mais bem definidos (1).

No entanto, estes medicamentos apresentam algumas particularidades que merecem registo especial:

Prazo de validade - o prazo de validade é geralmente curto, de aproximadamente dois anos. A dependência da atividade biológica das características estruturais da proteína impõe prazos curtos que garantam a manutenção dessa estrutura durante o armazenamento (1). Pelas mesmas razões a conservação é, geralmente, a temperaturas de refrigeração por forma a que a mobilidade interna das moléculas não seja grande e permita um prazo mais alargado de conservação. Também não podem ser conservados a temperaturas de congelação para que a formação de cristais de água não destrua a estrutura molecular e possa ser preservada a função biológica pretendida (4).

Modificações pós-tradução – Muitas das substâncias ativas de biotecnologia são produzidas em células por tradução dos RNAs nos ribossomas ligados ao retículo endoplasmático. O processamento subsequente pelo Golgi para a secreção é acompanhado de diversas modificações covalentes da proteína que inevitavelmente condicionam a efetividade biológica da proteína. Também as proteínas sintetizadas nos

ribossomas citoplasmáticos livres podem ser modificadas pelas enzimas celulares, na medida em que são proteínas não normais nas células recombinantes (5).

Potencial infeciosidade – Uma característica indesejada dos medicamentos biológicos ou de biotecnologia relaciona-se com a existência de uma potencial infeciosidade no produto final. Esta potencial presença de agentes infeciosos pode decorrer de contaminações intrínsecas, presentes nas células recombinantes, ou de contaminações extrínsecas, devido à entrada de agentes infeciosos no processo, seja durante a fermentação da célula hospedeira, seja durante a purificação da substância ativa, ou na formulação do produto final (1).

As proteínas foram usadas pela primeira vez como medicamentos no final do século XIX, quando os anti-soros de animais foram introduzidos para o tratamento de infecções graves, como a difteria e tétano de coelhos e cavalos imunizados (1). Porém, as proteínas destes anti-soros são estranhas ao sistema imunológico dos doentes, tendo como resultado efeitos colaterais graves e, por vezes, fatais. Na década de 1920, foram introduzidos medicamentos de insulina suína e bovina para tratar a Diabetes *Melittus* (DM). Muitos dos doentes que receberam tratamento com essas insulinas desenvolveram anticorpos que neutralizam a proteína em questão (1). Hoje, sabe-se que a insulina suína difere apenas num aminoácido comparativamente à sequência de aminoácidos da insulina humana, e a insulina bovina em apenas três aminoácidos. Esta afirmação é ilustrada na figura 1.1.

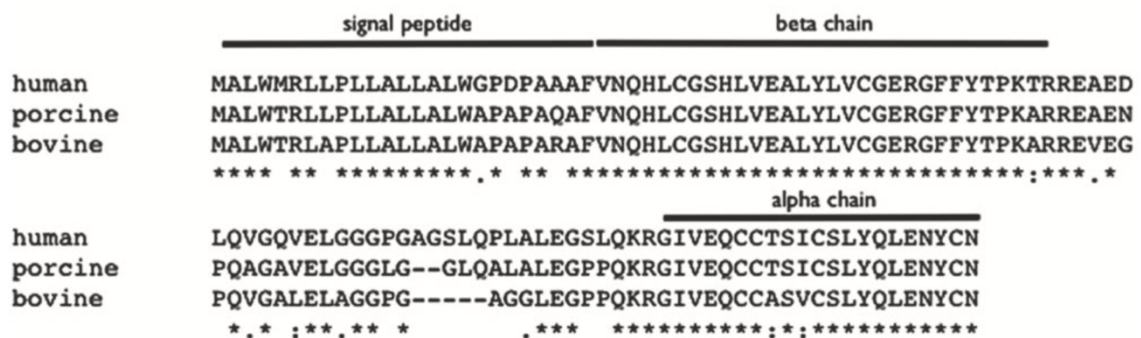


Figura 1.1. Sequência de aminoácidos das insulinas humana, suína e bovina (adaptado de (1))

Os avanços na biotecnologia permitiram passar do uso de proteínas extraídas de animais para proteínas recombinantes com a sequência de aminoácidos igual à sequência da proteína humana (1).

No entanto, os medicamentos de biotecnologia também são imunogênicos, e, de um modo geral, quando não se trata de vacinas, devem ser tão pouco imunogênicos quanto possível. A melhoria da qualidade dos primeiros medicamentos de proteínas terapêuticas resultou numa redução considerável da imunogenicidade (1). Esta imunogenicidade é a capacidade de uma substância provocar uma resposta imune. Nesta resposta imune ocorre o aparecimento de anticorpos específicos que neutralizam a proteína e provocam uma diminuição da eficácia do medicamento. A imunogenicidade raramente é resultado de um único fator, pois os vários fatores trabalham sinergicamente (1). Estes fatores podem ser a sequência de aminoácidos e glicosilações (quando exista maior variabilidade), a presença de impurezas e contaminações, a formulação, a via de administração (a via intravenosa induz menos imunogenicidade enquanto a subcutânea é, geralmente, mais imunogênica), a dose, o tempo do tratamento, as características do indivíduo, e ainda a fatores desconhecidos. Contudo, as proteínas terapêuticas humanas, quando administradas no local certo e em dose compatível com a concentração normal dessas proteínas no organismo, são menos prováveis de causar efeitos indesejáveis por via de uma resposta imunogênica (1).

A utilização crescente de terapêuticas à base de proteínas resultou em incrementos na segurança, eficácia e qualidade (6) bem como no advento de novas terapêuticas onde existiam importantes *gaps*. O impacto dos medicamentos de biotecnologia é evidente e contribui para a solução de doenças incapacitantes sem terapêutica anterior. A sua mais valia para a progressão da saúde global em todo o mundo é notória (3).

2. Tecnologia de DNA recombinante e processo geral de fabrico

A tecnologia de DNA recombinante, descoberta em 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer, permitiu o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir tanto proteínas expressas pelo Ser Humano bem como, novas proteínas que vão além do que é codificado no genoma (7). A chave da tecnologia de DNA recombinante iniciou-se em 1953 com a identificação da estrutura molecular do DNA em dupla hélice a que se seguiram os estudos que levaram os conhecimentos da biologia molecular, particularmente no que respeita à expressão genética, na década seguinte. Na década de setenta observou-se o desenvolvimento das ferramentas que permitem manipular o DNA, sendo particularmente relevante a descoberta de duas categorias de enzimas: as endonucleases de restrição e as DNA ligases. As endonucleases de restrição são enzimas de corte, pois para sequenciar o DNA, é necessário cortá-lo em fragmentos menores, em locais específicos (8). Em seguida a DNA ligase tem a capacidade de juntar dois fragmentos de DNA distintos formando assim uma molécula híbrida e incorporar esses fragmentos de DNA em vetores (plasmídeos, bacteriófagos, cosmídeos, etc.) que viabilizam a manutenção desses genes na célula recombinada e a sua expressão (9). A figura 2.1, ilustra o processo para a obtenção de uma célula transformada recombinante.

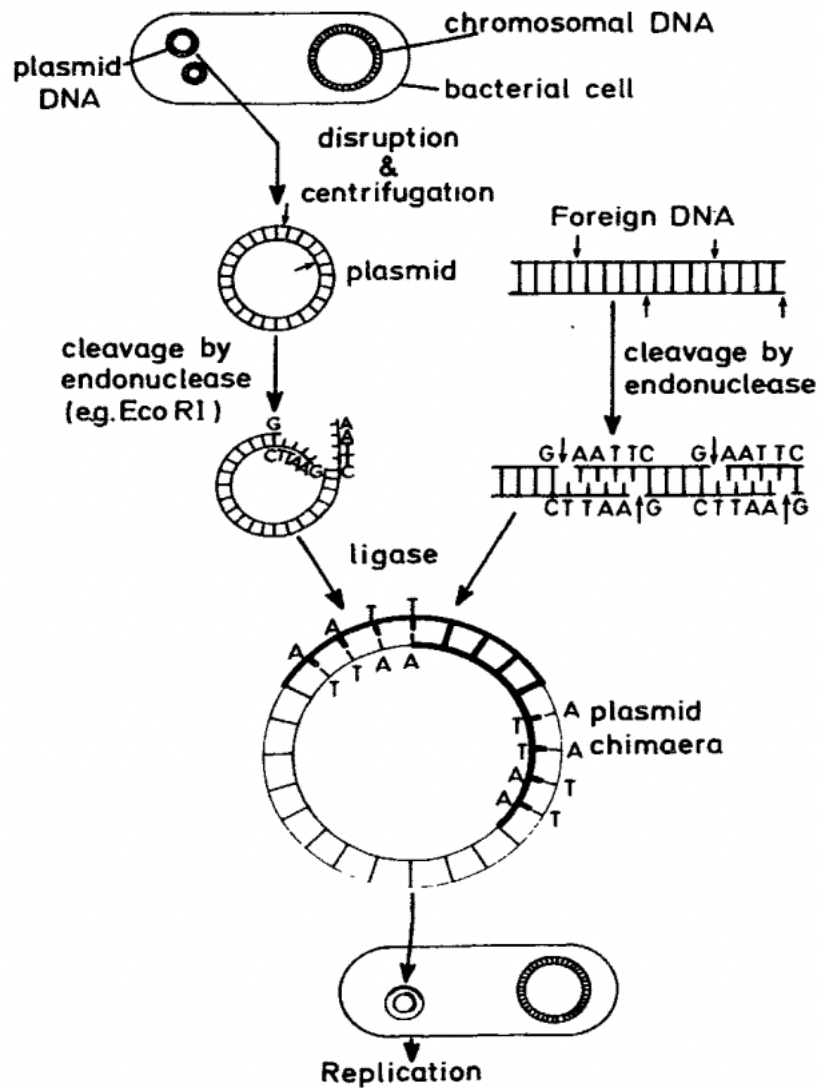


Figura 2.1. Plasmídeo recombinante (adaptado de (9))

A escolha do vetor depende de vários fatores, sendo mais relevantes a dimensão do fragmento a ser inserido e a estratégia de expressão necessária à obtenção da molécula recombinada. A molécula resultante da recombinação do DNA de interesse com o vetor é posteriormente inserida na célula hospedeira (6).

A célula hospedeira a recombinar, também chamado sistema de expressão, depende da natureza e da origem da proteína de interesse, do seu uso terapêutico, da quantidade pretendida e dos custos. Estes sistemas de expressão existentes podem ser células procariontas, que é o exemplo da *Escherichia Coli* (E. Coli), e as células eucariotas como são os exemplos mais significativos, as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), os

sistemas de células de inseto (*baculovirus*), e as células de mamífero (Ovário de Hamster Chinês - CHO). Mais de 70% das proteínas comercializadas são produzidas em células CHO. A principal razão das células de mamífero serem as prediletas para a produção de proteínas terapêuticas é que, nestas células, as modificações pós-tradução das proteínas sintetizadas são similares à situação na célula humana (1). Outro importante fator é a formação de ligações dissulfeto entre duas moléculas de cisteína, pois estas ligações são cruciais para definir a estrutura secundária e terciária de uma proteína. Qualquer proteína pode ser produzida usando organismos geneticamente modificados, mas nem todo o tipo de proteína pode ser produzido por todos os tipos de células (1).

Na tabela 2.1, observa-se as características de cada sistema de expressão, a fim de proporcionar uma melhor seleção, do sistema de expressão, para a proteína de interesse (1).

Tabela 2.1. Características dos sistemas de expressão presentes (adaptado de (1))

Protein feature	Prokaryotic bacteria	Eukaryotic yeast	Eukaryotic mammalian cells	Eukaryotic plant cells	Transgenic animals
Concentration	High	High	High	Low	Medium-High
Molecular weight	Low	High	High	High	High
S-S bridges	Limitation	No limitation	No limitation	No limitation	No limitation
Secretion	No	Yes/no	Yes	Yes/no	Yes
Aggregation state	Inclusion body	Singular, native	Singular, native	Singular, native	Singular, native
Folding	Risk of misfolding	Correct folding	Correct folding	Correct folding	Correct folding
Glycosylation (human-like)	Limited	Limited	Possible	Limited	Possible
Contamination risk	Possible (endotoxin)	Low	Possible (virus, prion, oncogenic DNA)	Low	Very possible (virus, prion, endotoxin)
Cost to manufacture	Low	Low	High	High ^a	Medium-high

Através da tabela, verifica-se as características de cada sistema de expressão. Um exemplo específico, é a glicosilação N que é importante para a atividade biológica completa, imunogenicidade, estabilidade, direcionamento e farmacocinética da proteína. Conclui-se assim, que um sistema de expressão procariota pode não ser adequado, mas o sistema de expressão eucariota, especificamente as células de mamífero, já é adequado (1).

Múltiplas repetições das etapas anteriormente referidas, criam milhões de cópias do segmento amplificado (8).

Para o crescimento das células recombinadas e produção da proteína de interesse é necessário dispor de um meio de cultura com a composição adequada ao

objetivo e nas condições ideais ao crescimento celular. Condições como o pH, a agitação, o oxigênio, a temperatura, a densidade, a área de contacto e a fase de crescimento, entre outras, terão de ser parametrizadas e cumpridas para o sucesso do processo produtivo. Segue-se a fermentação, ou seja, o crescimento das células recombinantes e a produção da proteína, que pode ser feito num fermentador se os sistemas de expressão são bactérias ou fungos, ou num bio-reator se os sistemas de expressão são células de mamíferos ou de insetos (1).

Terminada que seja a fermentação, há que purificar a proteína terapêutica para a formulação adequada à sua utilização clínica. Esta purificação inclui quase sempre, entre outros, três passos de cromatografia. A primeira é uma cromatografia de afinidade, que enriquece e concentra no produto intermediário a proteína de interesse. A segunda e terceira cromatografias são, geralmente, de troca iónica para aumentar o grau de pureza da proteína de interesse. Outros passos para “polimento” da proteína terapêutica e para garantir a sua maior segurança biológica são também executados durante o processo de fabrico para a obtenção do produto final (1).

Neste contexto e resumidamente, a tecnologia de DNA recombinante consiste no isolamento ou preparação sintética de uma sequência DNA que codifica para a proteína de interesse, que, numa fase posterior, é inserida numa célula hospedeira que produz a proteína. Segue-se a purificação e a formulação da proteína de interesse terapêutico para uso clínico. A tecnologia de DNA recombinante despertou, não só possibilidades terapêuticas novas, mas também o melhor conhecimento de etiologia de muitas doenças, viabilizando também assim novas abordagens terapêuticas. Através desta tecnologia pode-se sintetizar enzimas e recetores causadores ou envolvidos em processos de doenças, facilitando o estudo de possíveis alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos (7).

3. Estabilidade dos medicamentos de biotecnologia

O conhecimento profundo das características moleculares da proteína é necessário para a compreensão e controlo do processo de fabrico e da estabilidade da molécula. Esta estabilidade é crucial para o desenvolvimento de um medicamento adequado à sua função, bem como para a definição da estratégia de controlo apropriada para monitorizar a estabilidade durante o armazenamento a longo prazo. Para isto, usam-se métodos analíticos que, naturalmente a maior parte deles, vem de tecnologias, bem estabelecidas e tradicionais, de separação, como a cromatografia e a eletroforese (1).

As técnicas de cromatografia são amplamente utilizadas em biotecnologia, nos procedimentos de purificação de proteínas e na avaliação da integridade do produto. Assim, com este método é possível medir a quantidade relativa de proteína, através de um sistema de deteção localizado na saída da coluna, e estimar os baixos níveis de componentes que aparecem ao longo do tempo em relação à proteína analisada, sendo esta última uma função particularmente útil quando se pretende avaliar a estabilidade da proteína a longo prazo (1).

A eletroforese, de um modo geral, separa as proteínas num campo elétrico com base na sua relação carga/massa. A carga da proteína depende da presença de aminoácidos ácidos e básicos e pode ser controlada pelo pH da solução na qual a proteína é separada. A eletroforese capilar é o principal método eletroforético utilizado na análise biofarmacêutica (1).

A espectrometria de massa é uma técnica em que os iões de várias espécies presentes na amostra são gerados usando diferentes técnicas de ionização e onde as suas massas moleculares são medidas com alta precisão. Este atributo permitiu medir as modificações pós-tradução com diferenças de massa de apenas 1 Da e modificações específicas que surgem durante os estudos de estabilidade (1).

A inter-relação de instabilidade química e física, instabilidades que ocorrem durante o bioprocessamento, o impacto do ciclo de liofilização sobre a estabilidade da proteína, quando é esse o caso, e a importância do empacotamento na manutenção da estabilidade da proteína são critérios muito importantes. A instabilidade química envolve processos que formam ou quebram ligações covalentes. Por outro lado, existem

instabilidades físicas para proteínas em que a composição química é inalterada, mas o estado físico da proteína altera-se. A perda da estrutura secundária e/ou terciária corresponde a uma perda de atividade biológica da proteína terapêutica. Estas alterações nas estruturas podem incluir desnaturação, agregação, precipitação ou adsorção da proteína, entre outras (10).

Relativamente à instabilidade química, pode ocorrer, por exemplo, a desamidação da asparagina e a isomerização do aspartato. O mecanismo de desamidação envolve a formação de um intermediário imida cíclico, a succinimida, que por sua vez hidrolisa a mistura de ácido isoaspártico/aspártico numa proporção de 3:1. Estas modificações podem ser benignas, mas também podem resultar em consequências graves para a proteína, alterando a atividade biológica desta (1). A instabilidade química gera impurezas relacionadas ao processo e produtos de degradação, podendo contribuir para o aumento da imunogenicidade (10).

Em relação à instabilidade física, esta refere-se a qualquer processo pelo qual a proteína muda o seu estado físico sem qualquer mudança na composição química (10).

A desnaturação caracteriza-se pela perda da estrutura globular ou tridimensional que a maioria das proteínas adota. Consequentemente, após este desdobramento, a proteína altera o seu estado físico mantendo a composição química (10).

A agregação de proteínas terapêuticas pode aumentar a probabilidade de reações adversas e efeitos imunogénicos durante a terapia, associados ao aumento da morbidade ou mortalidade do doente. A agregação pode ter muitas causas, tais como dobramento incorreto durante a expressão da proteína e perturbação da conformação nativa durante a purificação da proteína, formulação, congelamento, descongelamento, liofilização, ultrafiltração/diafiltração, enchimento do frasco ou da seringa, bombeamento, transporte e armazenamento. Estes processos podem comprometer a estabilidade da proteína (10).

A revisão de 1989 listou a precipitação como uma das 4 principais vias de instabilidade física. Por um lado, há formação de agregados que resulta numa manifestação macroscópica de agregação em que se observa nebulosidade, sendo este processo irreversível, levando ao desdobramento parcial ou completo da proteína. Por outro lado, nem todo o material proteico é insolúvel devido à agregação. Pode-se ter

uma proteína com sal adsorvido, que retém a atividade e a estrutura, podendo o processo de precipitação ser reversível após diluição (10).

A adsorção em si, é também uma instabilidade física. Proteínas em solução aquosa são conhecidas por adsorverem a várias superfícies. A instabilidade da proteína induzida pela superfície começa com a adsorção da proteína nativa ou da proteína parcialmente desdobrada, na superfície. Esta interação é, geralmente, mais energética quando uma proteína é parcialmente desdobrada devido à exposição das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos, que normalmente, estão no núcleo da proteína (10). Após adsorção inicial da proteína, as forças de tensão superficial em várias interfaces (ar-líquido, sólido-líquido) pode conduzir à agregação, afetando a integridade da proteína que povoa essa interface. Assim, verifica-se que a estabilidade interfacial de uma proteína é dependente de um número de fatores como, a tensão superficial, área de superfície disponível para adsorção, hidrofobicidade, e da estabilidade estrutural (10).

Existem várias diretivas da Comissão Europeia e “guidelines” da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) relativas à estabilidade dos medicamentos de biotecnologia e ao impacto das alterações do processo de fabrico nessa estabilidade e consequente efetividade do medicamento.

Na mesma linha, estes estudos de verificação da manutenção da estabilidade, no decurso de alterações do processo de fabrico, servem também para os estudos de comparabilidade de medicamentos de referência com biossimilares (10).

Quando há mudanças nos métodos de produção de um medicamento de biotecnologia é exigida também uma avaliação de comparabilidade para garantir que estas mudanças de fabrico não afetam a segurança, pureza ou eficácia do medicamento. Dependendo da natureza da proteína ou da alteração, esta avaliação consiste numa hierarquia de testes sequenciais em testes analíticos, estudos pré-clínicos em animais e estudos clínicos (10). As diferenças nos resultados dos testes analíticos entre os produtos pré e pós-mudança podem exigir testes funcionais para estabelecer o significado biológico ou clínico da diferença observada. Um princípio básico da comparabilidade é que, sob certas condições, os produtos proteicos podem ser considerados comparáveis com base apenas nos resultados dos testes analíticos (10). Por vezes é necessário alterar o método de fabrico por motivos de melhoria de

rendimento, aumento de escala, novas tecnologias, maior pureza, ou novas formulações e as vantagens e desvantagens de qualquer método depende da propriedade da proteína a ser caracterizada. Isto exige comparar o material antes e depois da mudança para avaliar se uma mudança ocorreu, e em caso afirmativo, se afeta a segurança e eficácia.

A imunogenicidade continua a ser uma preocupação para a caracterização da proteína porque os testes pré-clínicos ainda não são capazes de prever o que acontecerá na população-alvo. Os requisitos dos testes de imunogenicidade são determinados pela natureza da proteína, o risco para a população de doentes e a gestão do tratamento (11).

O facto de os medicamentos de biotecnologia serem tão suscetíveis a variações, é necessário que haja um controlo eficiente e é obrigatório garantir que as indústrias farmacêuticas de biossimilares produzam uma versão do medicamento de biotecnologia adequadamente semelhante ao medicamento de referência já aprovado (12). Por esse motivo, para um biossimilar que está no processo de Autorização de Introdução no Mercado (AIM), recomenda-se uma conduta gradual de procedimentos não clínicos e clínicos, incluindo o uso de estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, ensaios clínicos em populações adequadas, ensaios de eficácia, estudos de segurança, uma avaliação da imunogenicidade e da farmacovigilância, destinados a extrapolar a segurança e eficácia do biossimilar em relação ao medicamento de biotecnologia já autorizado (12).

Na diretriz *“guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues”* são estabelecidos os princípios gerais para o desenvolvimento clínico e não-clínico e é estabelecida a avaliação dos pedidos de AIM dos biossimilares. A comparabilidade clínica de um biossimilar é normalmente, um procedimento gradual que deve começar com estudos farmacocinéticos e, se possível, farmacodinâmicos, seguidos da eficácia clínica e ensaios de segurança (13).

Já os estudos não clínicos de apoio à biossimilaridade devem ser planeados antes de iniciar qualquer ensaio clínico em humanos. Estes estudos devem ser baseados em diversas abordagens de forma a avaliar principalmente ensaios comparativos *in vitro* entre o medicamento de referência e o biossimilar (12). Estes testes *in vitro* têm como

objetivo avaliar a capacidade de ligação a alvos, bem como transdução de sinal e atividade funcional/viabilidade dos medicamentos comparados. Além disso, a presença de diferenças potencialmente relevantes entre os dois medicamentos devem ser consideradas em termos de formulação, qualidade e estabilidade (12). E é aqui, na visão geral não clínica que, a abordagem adotada, deverá ser totalmente justificada (13).

Podemos concluir que, com base em estudos de comparabilidade, pode ser estabelecida a similaridade do biossimilar ao medicamento de referência de acordo com a garantia da qualidade, atividade biológica, segurança e eficácia (13).

4. Estudos de estabilidade

A diretriz sobre “*Quality of Biotechnology Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*” aplica-se a proteínas e polipeptídeos bem caracterizados, e seus derivados dos quais são isolados de tecidos, fluidos corporais ou culturas de células produzidas por tecnologia de DNA recombinante (14).

Os medicamentos de biotecnologia têm características específicas que devem ser levadas em consideração em qualquer programa de teste bem definido projetado para comprovar a sua estabilidade durante o período de armazenamento pretendido. As substâncias ativas destes medicamentos são tipicamente proteínas e/ou polipeptídeos, logo, a manutenção da conformação molecular e, portanto, da atividade biológica, depende tanto das forças não covalentes como das covalentes (14). Estes medicamentos são particularmente sensíveis a fatores ambientais, como mudanças de temperatura, oxidação, luz e, material iônico. Para garantir a manutenção da atividade biológica e evitar a degradação, geralmente são necessárias condições rigorosas para o seu armazenamento (14).

Quando aplicável, devem fazer parte nos estudos essenciais de estabilidade os ensaios de atividade biológica. Os métodos físico-químicos, bioquímicos e imunoquímicos apropriados para a análise da estrutura molecular e a detecção quantitativa de produtos de degradação também devem fazer parte dos estudos de estabilidade sempre que a pureza e as características moleculares do medicamento o permitirem (14).

O requerente do medicamento de biotecnologia deve desenvolver os dados de estabilidade de suporte adequados e considerar as condições externas que podem afetar a potência, pureza e qualidade deste medicamento. Os dados primários para apoiar um período de armazenamento solicitado para qualquer substância ou medicamento devem ser sempre baseados em estudos de estabilidade em condições reais, em tempo real e de longo prazo (14).

Relativamente ao produto final na embalagem, as informações de estabilidade devem ser fornecidas em pelo menos 3 lotes do produto final representativo daquele que será usado na escala de fabrico. Sempre que possível, os lotes do produto final

incluídos no teste de estabilidade devem ser derivados de diferentes lotes de material a granel (14).

Os estudos de estabilidade realizados em matriz pretendem avaliar o comportamento das substâncias ativas no armazenamento por extrapolação. Apesar da indicação de que os estudos de estabilidade dos medicamentos de biotecnologia deverão ser realizados a temperaturas reais e em tempos reais, é possível estudar apenas uns lotes e deduzir daí o comportamento de outros. É o caso, por exemplo de estudar a estabilidade duma proteína terapêutica numa concentração de 10 mg/ml e na concentração de 100 mg/ml. Se os dados da estabilidade mostrarem suficiente equivalência, podem ser extrapolados para uma solução da mesma proteína, nos mesmos excipientes, na concentração de 50 mg/ml. Já a extrapolação para as concentrações de 5 mg/ml ou de 200 mg/ml não poderão ser deduzidas dos dados recolhidos. Os dados estatísticos de um estudo de estabilidade em que diferentes frações de amostras são testadas em diferentes pontos de amostragem, só deve ser aplicada, quando a documentação adequada é fornecida e que confirma que a estabilidade das amostras testadas representa a estabilidade de todas as amostras. A matriz não deve ser aplicada a amostras com diferenças não representadas nas amostras estudadas, como por exemplo, diferentes dosagens e diferentes recipientes, pois não pode ser confirmado que os produtos respondam de forma semelhante às mesmas condições de armazenamento (14).

Relativamente ao perfil indicador de estabilidade, em geral, não existe um único ensaio ou parâmetro indicador de estabilidade que traça o perfil das características de estabilidade de um medicamento biotecnológico. Estes indicadores da estabilidade de uma proteína terapêutica são identificados caso a caso. O fabricante deve propor um perfil indicador de estabilidade que forneça uma garantia de que as alterações na estrutura, pureza e potência do produto serão detetadas. Os testes a ser incluídos constituirão especificações obrigatórias da substância ativa ou do medicamento (14).

O dossiê que acompanha o pedido de AIM deve incluir um protocolo detalhado sobre a avaliação da substância ativa e do medicamento apoiado nas condições de armazenamento propostas e nos prazos de validade decorrentes dos estudos de estabilidade. O protocolo deve incluir todas as informações necessárias que

demonstrem a estabilidade do medicamento biotecnológico ao longo do prazo de validade proposto, incluindo, especificações bem definidas e intervalos de teste (14).

Para fins de teste de estabilidade dos medicamentos de biotecnologia, é necessário fazer parte deste, o estudo da potência. A potência é a habilidade ou capacidade específica de um medicamento atingir o efeito pretendido. Este estudo da potência baseia-se na medição de algum atributo do medicamento e é determinada por um método quantitativo adequado (14). Devem também fazer parte dos testes de estabilidade dos medicamentos de biotecnologia, estudos da pureza, em que esta é um termo relativo. Devido ao efeito de glicosilação, desamidação ou outras heterogeneidades, a pureza absoluta de um medicamento de biotecnologia é extremamente difícil de determinar. Assim, a pureza de um medicamento de biotecnologia deve ser tipicamente avaliada por mais do que um método, devendo os testes de pureza concentrarem-se em métodos para determinação de produtos de degradação (14). O uso de metodologias analíticas físico-químicas, bioquímicas e imunológicas relevantes deve permitir uma caracterização abrangente da substância e do medicamento, como por exemplo, o tamanho molecular, carga, hidrofobicidade e a detecção precisa de alterações de degradação que podem resultar da desamidação, oxidação, sulfoxidação ou fragmentação durante o armazenamento (14).

As condições de armazenamento mais relevantes são a temperatura, humidade, luz, condições aceleradas e de *stress*, embalagem primária e respetiva tampa e a estabilidade após reconstituição do medicamento liofilizado, quando é este o caso. É fortemente sugerido que os estudos sobre a substância e o medicamento sejam conduzidos sob condições aceleradas e de *stress* (14). Os estudos em condições aceleradas podem fornecer dados de suporte úteis para manutenção do prazo de validade, quando existam alterações no processo de fabrico. As informações de estabilidade do medicamento, seja a temperatura de conservação seja em condições de *stress*, são importantes para o desenvolvimento futuro do medicamento, e preciosos auxiliares na validação de métodos analíticos para os estudos de estabilidade, ou gerar informações que possam ajudar a elucidar o perfil de degradação do medicamento (14). Os estudos sob condições de *stress*, como por exemplo, a temperaturas elevadas, são regulamentares e estão previstos nas *guidelines* tanto para caracterização da substância ativa e do produto final como para antecipar consequências em caso de exposição

pontual a estas situações. São particularmente relevantes, para comparar as substâncias ativas ou produtos intermediários ou finais, quando existem alterações significativas no processo de fabrico, como atrás se referiu. É também com base nestes perfis de degradação das substâncias ativas quando expostas a condições de stress, que permitem a comparação dos biossimilares. As condições devem ser cuidadosamente selecionadas caso a caso (14).

A embalagem primária e respetiva tampa, devido às possíveis interações com o medicamento de biotecnologia, podem induzir alterações na estrutura da proteína terapêutica e, conseqüentemente na qualidade e eficácia do medicamento. Os dados devem ser fornecidos para todas as diferentes combinações de recipiente/tampa que serão comercializadas (14). Para além dos dados padrão necessários para um frasco para injetáveis de uso único convencional, por exemplo, o requerente deve demonstrar que a tampa usada com um frasco para injetáveis de dose múltipla é capaz de suportar as condições de repetidas inserções e retiradas de modo que o medicamento retenha a sua potência e pureza total e qualidade pelo período máximo especificado nas instruções de uso em recipientes, embalagens e folheto informativo. Por fim, a estabilidade do medicamento liofilizado após a sua reconstituição deve ser demonstrada para as condições e o período máximo de armazenamento especificados nos recipientes, embalagens e folhetos informativos (14).

Relativamente à frequência de testes sabe-se que o prazo de validade dos medicamentos biotecnológicos pode variar entre dias a vários anos, sendo difícil traçar diretrizes uniformes em relação à duração do estudo de estabilidade e frequência de testes que seriam aplicáveis a todos os tipos de medicamentos de biotecnologia (14).

Cada medicamento deve manter as suas especificações dentro dos limites estabelecidos de segurança, pureza e potência ao longo do prazo de validade proposto. Estas especificações e limites devem ser derivados de todas as informações adquiridas através dos estudos laboratoriais, pré-clínicos e clínicos, usando os métodos estatísticos apropriados (14).

5. Biossimilares

Um medicamento genérico deve conter o mesmo princípio ativo do medicamento original, mas no caso de uma proteína terapêutica, isto é quase impossível. Isto acontece porque há diferenças nas condições do sistema de expressão e do meio de cultura, para além das pequenas mudanças no processo de purificação da proteína terapêutica que podem afetar a sua atividade e quantidade (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde, denomina-se biossimilar o medicamento biológico e de biotecnologia que é similar em termos de qualidade, segurança e eficácia ao medicamento biológico e de biotecnologia de referência já aprovado (15). O desenvolvimento de um biossimilar consiste em demonstrar a biossimilaridade, ou seja, a alta similaridade em termos de estrutura, atividade biológica, perfil de eficácia, de segurança e de imunogenicidade. A demonstração da biossimilaridade assenta em estudos exaustivos de comparabilidade com o medicamento de referência. Ao demonstrar a biossimilaridade, evita-se uma repetição desnecessária de todos os ensaios clínicos já realizados com o medicamento de referência (16).

Esta comparabilidade é delineada por três etapas, especificamente concebidas para cada produto. Os conhecimentos provenientes dos estudos iniciais de comparabilidade da qualidade, referentes à primeira etapa, são utilizados para determinar o teor e o tipo dos estudos não clínicos (segunda etapa) e clínicos (terceira etapa) necessários para a próxima etapa do desenvolvimento, sempre com o intuito de excluir do desempenho clínico as diferenças entre o biossimilar e o medicamento de referência (16). Detalhadamente, na primeira etapa fazem-se estudos comparativos da qualidade, que consiste em estudos *in vitro* onde comparam a estrutura das proteínas e a função biológica. Na segunda etapa, os estudos não clínicos comparativos, incluem estudos farmacodinâmicos *in vitro*, que se debruçam sobre a ligação e a ativação dos recetores fisiológicos e sobre os efeitos fisiológicos imediato nas células. Os estudos farmacodinâmicos *in vivo* só serão efetuados se não existir um modelo *in vitro* adequado. Os estudos toxicológicos *in vivo* só são necessários em determinados casos, por exemplo, quando o biossimilar é produzido num novo tipo de célula ou organismo, ou quando a formulação inclui novos excipientes que não foram utilizados anteriormente. Na terceira etapa, os ensaios clínicos são adaptados na perspetiva de

confirmar a biossimilaridade e abordar quaisquer questões que possam ter ficado sem resposta em anteriores estudos clínicos ou funcionais (16).

Neste sentido, na UE, a aprovação dos biossimilares, da mesma forma que para os medicamentos de biotecnologia, segue uma via centralizada através da EMA. A recomendação final para autorização de medicamentos biossimilares é produzida pelo *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP) da EMA. Na maioria dos casos, os testes clínicos comparativos do medicamento biossimilar deve incluir uma avaliação robusta de segurança e confirmação de eficácia em populações de doentes apropriadas (1).

Realçar que, os biossimilares de insulina aprovados em Portugal, são a insulina glargina com o nome comercial Abasaglar (17) e Semglee (18) e, a insulina lispro (solúvel) com o nome comercial Insulina Lispro Sanofi (19), embora esta não esteja comercializada em Portugal.

6. Aprovação de Medicamentos de Biotecnologia

Os pedidos de AIM de medicamentos de biotecnologia, incluindo os biossimilares, são avaliados por procedimento centralizado pela EMA. A comissão Europeia emite as decisões finais relativas às autorizações destes medicamentos com base nos pareceres científicos da EMA. A AIM resultante é válida em todos os Estados Membros da EU (20).

A maioria das diretrizes do *International Conference on Harmonization (ICH)* contém as informações sobre qual a documentação necessária para um pedido de AIM. Em 2000, o ICH publicou uma diretriz muito importante sobre o *dossier Common Technical Document (CTD)*, pois é útil para todos os envolvidos que os documentos sejam estruturados de forma semelhante para diferentes regiões (21). O CTD está organizado em cinco módulos onde reúne todas as informações de qualidade, segurança e eficácia. O módulo 1 é específico da região e os módulos 2, 3, 4 e 5 devem ser comuns a todas as regiões (22).

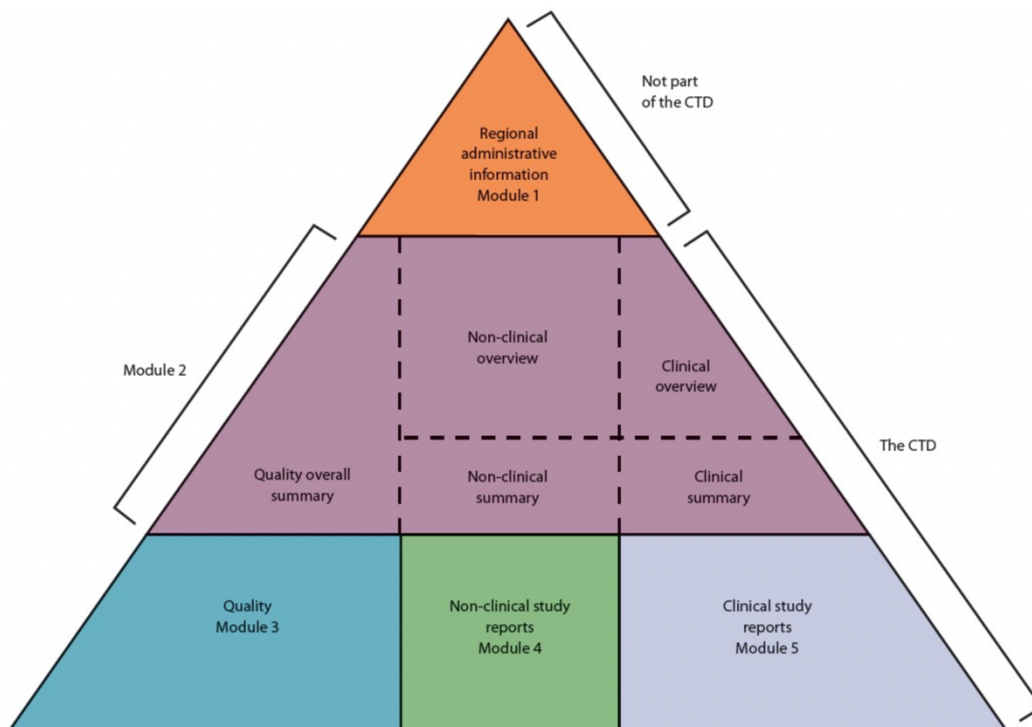


Figura 6.1. Organização do Dossier Técnico Comum (adaptado de (22))

Na figura 6.1, está representada a organização do CTD em forma de triângulo, onde mostra que quanto mais ampla for a secção, maior é a quantidade necessária de documentação.

Nos módulos 3, 4 e 5 contém a documentação completa e detalhada que abrange a qualidade, segurança e eficácia. No módulo 2, incluem-se resumos gerais sobre cada tópico, são versões condensadas para melhorar a legibilidade do dossier. Relativamente ao módulo 1, cada região deve elaborar o seu próprio módulo 1 (21).

7. Impacto do avanço da biotecnologia no tratamento da diabetes *mellitus*

A DM é uma doença crónica, definida pelo aumento dos níveis de glucose no sangue. A DM é reconhecida como uma epidemia global emergente que representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (23). Pessoas com DM, têm um risco aumentado de desenvolver complicações microvasculares que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia e, complicações macrovasculares que incluem doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (24). Estes problemas de saúde resultam em custos mais elevados de cuidados médicos, redução da qualidade de vida e aumento da mortalidade (25).

A DM tipo 1 é uma doença autoimune na qual as células β pancreáticas, produtoras de insulina, são destruídas pelo sistema imunitário, resultando numa deficiente ou inexistente produção de insulina (26). Já os principais defeitos fisiopatológicos da DM tipo 2 são a secreção de insulina progressivamente prejudicada pelas células β pancreáticas e a resistência à insulina pré-existente no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (27). As células β pancreáticas estão metabolicamente ligadas à manutenção da homeostasia glicémica, sendo o principal regulador da secreção de insulina, a concentração de glucose plasmática presente. Embora a concentração de glucose presente no plasma seja o mediador primário na regulação da secreção de insulina, podem também contribuir nesta regulação os aminoácidos, ácidos gordos, incretinas, alguns neurotransmissores e certas hormonas hipofisárias (28).

A insulina é necessária para transportar a glucose para as células e facilita a absorção e o armazenamento de ácidos gordos e de aminoácidos. Esta liga-se ao seu recetor que está presente na superfície celular e esta interação estimula uma cascata de reações intracelulares, cada uma catalisada por uma enzima diferente, que resulta na produção da proteína GLUT4, chamada de transportador de glucose (29). Esta proteína migra para a superfície da célula facilitando a entrada de nutrientes moleculares maiores, como a glucose. A insulina estimula as enzimas que produzem glicogénio e gordura, e suprime as enzimas que cessam este processo, sendo este, vital para o processo metabólico (29). Na ausência de insulina, o processo é muito rápido, e o

organismo não consegue utilizar os metabolitos produzidos e é criado um estado catabólico. O fígado também pode produzir glucose a partir das proteínas e do glicerol. Este processo resulta em hiperglicemia, seja de deficiência, ou de resistência de insulina (29).

Neste sentido, a deficiência de insulina resulta na reversão de processos vitais. Na DM tipo 1, a glucose não consegue entrar nas células e acumula-se no sangue, levando a uma hiperglicemia, colocando em causa a vida do doente, se não for tratada. Esta hiperglicemia resulta em sintomas típicos como poliúria (excesso de urina), levando conseqüentemente à polidipsia (sede excessiva) para compensar a perda de água, seguida de polifagia (excesso de fome) (29). Quando a ingestão de alimentos e líquidos não está em proporção com as perdas, ocorre desidratação e deficiência eletrolítica. Os ácidos gordos e glicerol são libertados no sangue e transportados para o fígado, onde são convertidos em corpos cetónicos. Estes são produzidos mais rapidamente do que as células são capazes de utilizar, levando a uma acumulação que provoca acidose. O resultado final é a cetoacidose que pode levar a coma e morte, se não for tratada. A cetoacidose é uma doença comum em doentes com DM tipo 1, e raramente acontece em doentes com DM tipo 2 (29).

Na DM tipo 2 existem muitos genes envolvidos, em que a maioria dos quais ainda não foi identificado. Estes genes controlam várias etapas químicas relativamente à ação das células β pancreáticas, secreção de insulina, ação da insulina e produção do recetor da insulina pela célula. Uma modificação em qualquer um desses genes pode interferir na produção das enzimas, bloqueando assim, a ação da insulina. Este bloqueio pode interferir na captação da glucose pela célula, aumentar a produção de glucose pelo fígado, afetar a absorção de glucose e ácidos gordos e aumentar a degradação dos triglicéridos, causando muitas outras disfunções (29).

A hiperglicemia crónica está associada a complicações a longo prazo e à falência de diferentes órgãos, em especial aos olhos, rins, coração e nervos periféricos (30).

O tratamento da DM tipo 1 consiste na substituição externa das funções das células β pancreáticas com o objetivo de atingir os níveis sanguíneos de glucose ideais, o que faz com que estes indivíduos necessitem de insulina para viver. Esta abordagem significa que os níveis de insulina devem imitar a secreção e ação da insulina fisiológica (31). Em indivíduos com DM tipo 2, quando os antidiabéticos orais não conseguem

regularizar os níveis sanguíneos de glucose e HbA1c, a insulina pode ser utilizada em associação ou mesmo em monoterapia (32).

Os objetivos do tratamento passam por melhorar os sintomas, reduzir o risco de complicações microvasculares e macrovasculares, reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida (24).

A previsão do tempo de vida é mais baixa em doentes com DM tipo 1 comparativamente a doentes com DM tipo 2, devido à incidência relativamente maior de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos agudos nos primeiros (32).

Antes dos avanços da biotecnologia e mesmo com a descoberta da insulina animal, as pessoas com DM tipo 1 morriam precocemente, inclusive crianças. Isto porque, apesar da semelhança entre a insulina suína e a insulina humana, eram sempre extratos animais administrados a humanos, o que induzia uma resposta imunológica no indivíduo humano que se manifestava como efeitos indesejáveis, por vezes, fatais. Com a biotecnologia, tudo mudou. Passou a ser possível produzir insulina com a mesma sequência de aminoácidos da insulina humana, garantido segurança e efetividade na administração.

8. Insulina

A insulina, descoberta em 1920 por Banting and Best, desenvolvida através da extração da insulina do pâncreas de bovinos e suínos, representou uma grande evolução na medicina, em que apenas 3 anos mais tarde, a insulina suína é industrializada (33). No entanto, para controlar os valores sanguíneos de glucose, eram necessárias várias administrações por dia, causando ao doente abcessos graves para além, dos problemas de imunogenicidade que ocorriam. Foram feitas várias tentativas com o intuito de retardar a absorção para reduzir o número de injeções necessárias por dia, levando ao desenvolvimento de Lente, Semilente, Ultralente, Monotard (70% Ultralente / 30% Semilente) e Insulina Protamina-Zinco que permaneceram até 2004/2005 (34).

Contudo, tornou-se necessário desenvolver insulinas que melhor imitassem a secreção e ação da insulina fisiológica e, que permitissem ultrapassar o problema da imunogenicidade. Assim, desenvolveu-se, em 1982, a primeira insulina humana biossintética, *Humulin*, produzida em bactérias *E. Coli*, através da tecnologia de DNA recombinante (35). Esta importante conquista, foi o resultado de uma vasta rede de avanços científicos que começaram na década de 1950 com estudos da estrutura de DNA por Watson e Crick e estudos da insulina por Sanger (35). O facto da *E. Coli* ter sido a escolha para o sistema de expressão baseia-se na sua cinética de crescimento rápido, sendo o seu tempo de duplicação de cerca de 20 minutos, a facilidade de alcançar culturas de alta densidade celular, produção a partir de componentes baratos e prontamente disponíveis, e pela transformação com DNA exógeno fácil e rápida, em apenas 5 minutos (36). Atualmente, a insulina é produzida também em células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia Pastoris*, pois tal como a *E. coli*, estas células crescem rapidamente e são muito fáceis de manusear, sendo passíveis de várias manipulações genéticas. *Pichia Pastoris* em comparação com a *Saccharomyces Cerevisiae* oferece uma grande vantagem na glicosilação de proteínas secretadas porque não hiperglicosila as proteínas heterólogas, podendo estas, ser mais adequadas para uso terapêutico (37).

Em indivíduos não diabéticos, após ingestão de alimentos, os níveis de concentração de insulina aumentam relativamente rápido, num período entre 30 a 45 minutos seguido de um declínio para os níveis normais após 2-3 horas (38).

Após a administração da insulina humana regular, sendo que esta é de ação curta, a concentração glicémica pode atingir o pico tarde demais e o seu efeito pode durar muito tempo. Estudos de indivíduos com diabetes conduzidos por Bashkar et al (39) e Gardner et al (40) mostram que o efeito do pico provocado pela insulina regular ocorre entre 2 a 6 horas após a administração desta e os seus efeitos podem prolongar-se até 16 horas. Consequentemente, isto leva a hiperglicemia pós-prandial precoce seguida de uma hipoglicemia antes da refeição seguinte. Da mesma forma, a insulina de ação intermédia, NPH, é incapaz de fornecer um nível basal de insulina estável e contínuo. Com estas limitações identificadas, desenvolveram-se análogos de insulina, através da tecnologia de DNA recombinante. Os análogos de insulina são moléculas produzidas pela modificação da estrutura da proteína nativa, resultante da alteração das propriedades físico-químicas, biológicas e farmacodinâmicas (38).

O objetivo é reduzir a hiperglicemia e a hipoglicemia, diminuir a variabilidade da eficácia nos doentes, melhorar a qualidade do controlo glicémico e, consequentemente, reduzir os riscos de complicações a longo prazo (34).

Estimou-se que em 2017, 451 milhões de pessoas tinham diabetes, com um aumento projetado, em 2045, para 693 milhões de pessoas, a nível global. Portanto, prevê-se que a necessidade de insulina aumente drasticamente (25).

8.1. Estrutura da insulina

A insulina é uma pequena proteína globular (41), com peso molecular de 5734 Da (42), sintetizada nas células β pancreáticas e excretada na forma de polipéptido (41). A insulina, composta por duas cadeias, contendo a cadeia A 21 aminoácidos e a cadeia B, 30 aminoácidos, está ligada por duas pontes dissulfídicas, A7-B7 e A20-B19, e tem uma ponte dissulfídica adicional intra-cadeia, na cadeia A, nas posições A6-A11. O núcleo hidrofóbico da insulina é composto por quatro elementos estruturais: a hélice

central da cadeia B (B9-B19), a ponte de dissulfeto A20-B19, a hélice C-terminal da cadeia A (A13-A19), e uma volta β em B20-B23 (43). Na figura 8.1, está representada a estrutura primária da insulina humana (44).

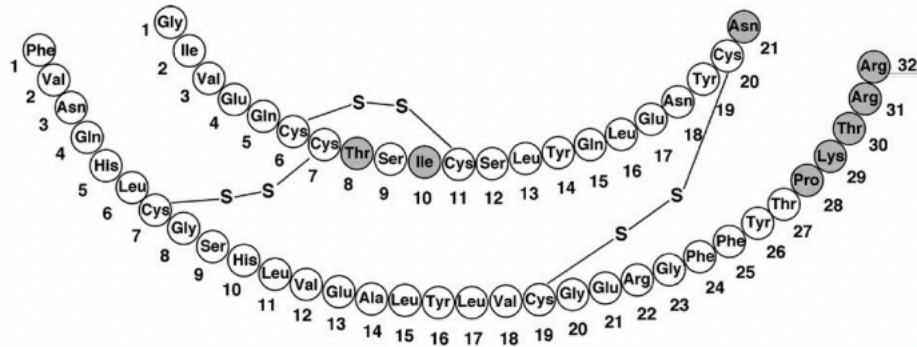


Figura 8.1. Estrutura primária da insulina humana (adaptado de (44))

Tendo por base a estrutura secundária e terciária da insulina, esta contém duas α hélices de A2 para A8 e de A13 para A20, e de uma única α hélice na cadeia B de B9 a B19. Enquanto que as hélices da cadeia A e a hélice da cadeia B são estruturalmente estáveis, os segmentos B25-B30 e B1-B8 são variáveis na sua conformação (45).

O mecanismo de ação da insulina baseia-se na diminuição dos níveis de glucose no sangue pela estimulação da captação de glucose periférica, especialmente pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo, e também por inibição da produção de glucose pelo fígado. Para além disso, a insulina inibe a lipólise nos adipócitos, inibe a proteólise e estimula a síntese proteica (46).

Assim, a ação da insulina é mediada pelo seu recetor, uma glicoproteína transmembranar com atividade intrínseca chamada tirosina quinase. O recetor do fator de crescimento (IGF-1) e o recetor da insulina exibem uma estrutura homóloga, pois compartilham mais de 80% de identidade na sequência de aminoácidos no domínio quinase, mas têm baixa identidade na sequência de aminoácidos no domínio extracelular (47). Os aminoácidos da molécula de insulina essenciais para a ligação ao seu recetor são A1Gly, A2Ile, A3Val, A19Tyr, B6Leu, B12Val, B23Gly, B24Phe, B25Phe, enquanto que, alterações nas regiões B10 e B26 a B30 na molécula de insulina, alteram a sua afinidade com o recetor IGF-1, melhorando esta ligação (48). No entanto, a

constante de afinidade de ligação ao recetor (10^9) é muito maior do que a constante de dimerização (10^5) (49).

A ligação recetor-insulina pode ser comprometida devido a uma alteração na estrutura terciária, em que diminui a ligação da insulina ao recetor. Outro fator que leva ao comprometimento desta ligação, é quando há modificações nos aminoácidos integrados na região de ligação recetor-insulina, que faz com que a ligação total ao recetor, não seja alcançada. A ligação ao recetor, que é obtida por interações hidrofóbicas e formação de ligações de hidrogénio específicas podem também levar ao comprometimento da ligação. As ligações de hidrogénio contribuem para a estabilidade do complexo recetor-hormona. No entanto, alterações fora da região de ligação da insulina ao recetor, podem, mesmo assim, afetar esta ligação (49).

Com base neste conhecimento, foi possível desenvolver análogos de insulina, preservando a ligação da insulina ao recetor, mas com pequenas alterações noutras propriedades.

8.2 Tipos de insulina

8.2.1. Análogos de insulina de ação rápida

Os primeiros análogos de insulina de ação rápida foram projetados para formar hexâmeros de insulina menos estáveis que, após a injeção subcutânea, rapidamente se dissociam em dímeros e monómeros, o que permite uma absorção nos vasos sanguíneos mais rápida, comparativamente à insulina humana regular. Isto é possível, alterando a sequência de aminoácidos da insulina humana regular. A região B26-30 da molécula de insulina não é fulcral na região de ligação desta ao seu recetor, no entanto, é importante na dimerização. Portanto, modificações estruturais na insulina, geram análogos de insulina com tendência mínima para a autoassociação e com afinidade inalterada para

o seu recetor. Este perfil de ação permite uma redução do tempo entre a injeção e o início da refeição, fornecendo a combinação ideal entre o perfil de ação da insulina e os valores sanguíneos de glucose pós-prandiais desejados (38).

Neste momento, há três análogos de insulina de ação rápida, disponíveis para uso clínico na Europa e nos EUA, sendo estes a insulina lispro, insulina aspártico e a insulina glulisina (31). Recentemente, foi desenvolvida ainda, a insulina aspártico solúvel com ação ultra rápida (50).

A insulina lispro foi aprovada em 1996, e é reconhecida como um análogo de insulina de ação rápida e curta duração de ação (38). A insulina lispro é produzida em *E. Coli* através da tecnologia de DNA recombinante (51) e difere da insulina humana regular pela inversão da prolina na posição 28 da cadeia B com a lisina na posição 29 da mesma cadeia (LysB28, ProB29). A figura 8.2 ilustra esta alteração de aminoácidos. Apesar da afinidade de ligação da insulina lispro ao recetor IGF-1 ser ligeiramente maior com esta modificação, não é o suficiente para causar uma diferença na atividade do crescimento celular (38).

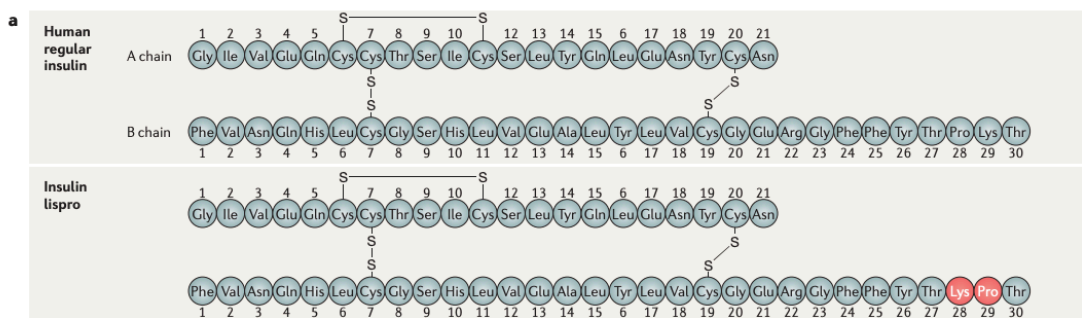


Figura 8.2. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da insulina lispro (adaptado de (31))

Relativamente às formulações da insulina humana regular e da insulina lispro, estas são hexâmeros estabilizados com iões de zinco e conservantes fenólicos para garantir 2 anos de validade a 4°C. No entanto, a formulação da insulina lispro, após injeção, dissocia-se, instantaneamente, em subunidades monoméricas (52), pois é nesta

forma que a insulina é reconhecida pelo seu recetor para desencadear uma resposta biológica (53).

Estudos farmacocinéticos mostram que, na primeira hora após a injeção, a concentração plasmática máxima da insulina lispro é duas vezes maior comparativamente à concentração plasmática da insulina humana regular. Quando comparado o tempo máximo, a concentração da insulina lispro é aproximadamente metade, da insulina humana regular. A concentração da insulina lispro diminui para níveis inferiores a 20% das concentrações máximas, 4 horas após a injeção. Isto permite que, a insulina seja administrada apenas 15 minutos antes da refeição (54)(55).

A insulina lispro pode ser usada em várias combinações de insulinas para o tratamento da DM tipo 1 (53). Num estudo, em que a insulina lispro foi combinada com NPH, em cada refeição, em proporções variáveis, verificou-se que a frequência de hipoglicemia diminuiu cerca de 35%, bem como a HbA1c comparativamente a doentes a fazer a combinação de insulina humana regular com NPH (56). A adição de NPH, resulta numa melhoria da glicemia pré-prandial e em jejum, fazendo com que permaneçam concentrações adequadas de insulina no sangue entre refeições (53).

A insulina aspártico, produzida em *Saccharomyces cerevisiae* por tecnologia de DNA recombinante (57), aprovada para uso clínico nos Estados Unidos em 2000 (38), difere da insulina humana regular pela substituição da prolina pelo ácido aspártico, de carga negativa, na posição 28 da cadeia B. A figura 8.3 ilustra esta alteração de aminoácidos. Esta substituição apenas leva a pequenas modificações locais tendo pouco efeito na conformação geral. A repulsão de carga, gerada por esta substituição, contribui para a dissociação rápida em monómeros logo após a injeção (53).

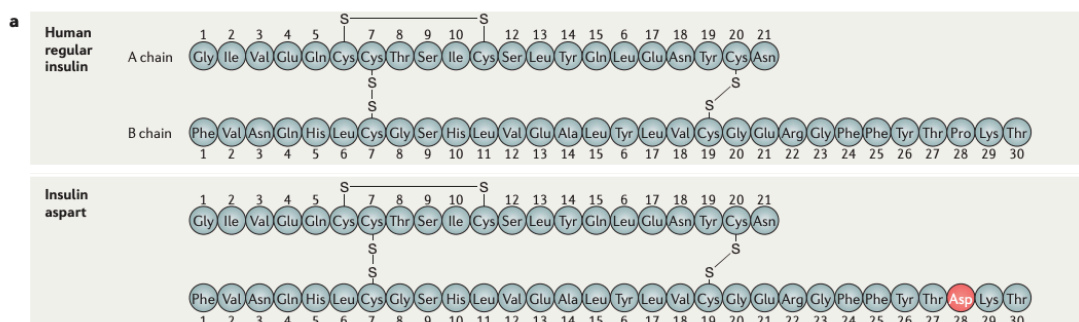


Figura 8.3. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da insulina aspártico (adaptado de (31))

A afinidade de ligação da insulina aspártico ao recetor IGF-1 é semelhante à observada pela insulina humana (58). O perfil de ação da insulina aspártico é semelhante ao perfil de ação da insulina lispro (59), sendo a absorção da insulina aspártico, em média, duas vezes mais rápida alcançando níveis de concentração de insulina duas vezes maiores comparativamente à insulina humana (53).

Um estudo multicêntrico, com doentes diabéticos tipo 1, a fazer administração da insulina aspártico antes das refeições, mostrou que houve uma redução de 50% nos principais eventos hipoglicémicos comparativamente à insulina humana (60).

A insulina aspártico ultra rápida é uma nova formulação da insulina aspártico que contém adicionalmente, a niacinamida e L-arginina. A niacinamida proporciona uma absorção inicial mais rápida na corrente sanguínea, aumentando a abundância inicial de monómeros de insulina aspártico no tecido subcutâneo resultando num efeito vasodilatador e a L-arginina funciona como um agente estabilizador (50).

O perfil farmacológico melhorado e com maior ação redutora dos níveis precoces de glucose através do tratamento com insulina aspártico ultra rápida em comparação com a insulina aspártico sugere que, a primeira, é mais vantajosa para pessoas com diabetes que usam infusão subcutânea contínua de insulina (CSII). O controlo da glucose pós-prandial com terapia com CSII, permanece limitado pela farmacocinética dos análogos de insulina de ação rápida (50).

Numa análise de seis estudos clínicos, em adultos com DM tipo 1, a insulina aspártico ultra rápida administrada por injeção subcutânea, demonstrou um início na circulação sanguínea 5 minutos mais cedo, duas vezes maior exposição precoce à insulina e efeito de redução de glucose inicial de 74% dentro dos primeiros 30 minutos, em comparação com a insulina aspártico. Quando administrado por meio de CSII, o desvio à esquerda no perfil farmacológico da insulina aspártico ultra rápida *versus* insulina aspártico, parece ser ainda maior em comparação com a injeção subcutânea. Nos adultos com DM tipo 1 usando CSII, a insulina aspártico ultra rápida demonstra uma redução da glucose de 100% nos primeiros 30 minutos, 3 vezes mais, em comparação com a insulina aspártico. Isto acontece devido ao fornecimento contínuo de niacinamida numa configuração CSII dado que, aumenta mais a taxa de dissociação do monómero de insulina. Isto também é possível devido ao menor tamanho do depósito de CSII,

comparativamente ao da injeção subcutânea que, contribui para a cinética acelerada da insulina aspártico ultra rápida (50).

A insulina glulisina é produzida em *E. Coli* por tecnologia de DNA recombinante (46). A estrutura molecular da insulina glulisina difere da insulina humana regular pela substituição de asparagina por lisina na posição 3 da cadeia B, e pela substituição de lisina por ácido glutâmico na posição 29 da mesma cadeia (Lys3B, Glu29B). Esta alteração de aminoácidos é ilustrada na figura 8.4. Em contraste com as insulinas lispro e aspártico, a insulina glulisina contém na sua estrutura polissorbato 20 ao invés de zinco.

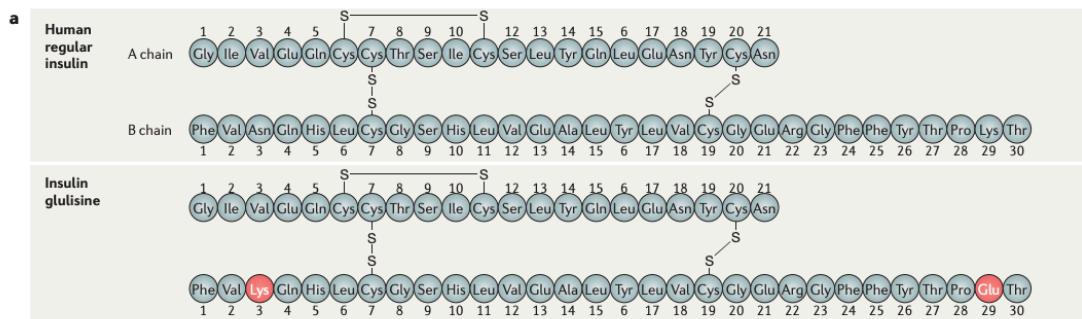


Figura 8.4. Sequência de aminoácidos da insulina humana regular e da insulina glulisina (adaptado de (31))

Vários estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que compararam a insulina glulisina concomitantemente com as insulinas aspártico e lispro, verificaram que a insulina glulisina tem um início de ação ligeiramente mais rápido, particularmente, em doentes obesos (31). Pensa-se, que isto, deve-se ao facto da formulação da insulina glulisina não conter zinco, pois este atrasa a absorção e a ação das insulinas lispro e aspártico comparativamente à insulina glulisina (61). Por outro lado, as insulinas lispro e aspártico são mais estáveis em infusão, que faz com que haja menos problemas de coagulação e obstrução dos cateteres, comparativamente à insulina glulisina (31).

A hiperglicemia pode ser sintomática ou pode ser detetada através da monitorização dos valores de glucose e, esta pode ser corrigida de forma mais eficaz com um análogo de insulina de ação rápida (53).

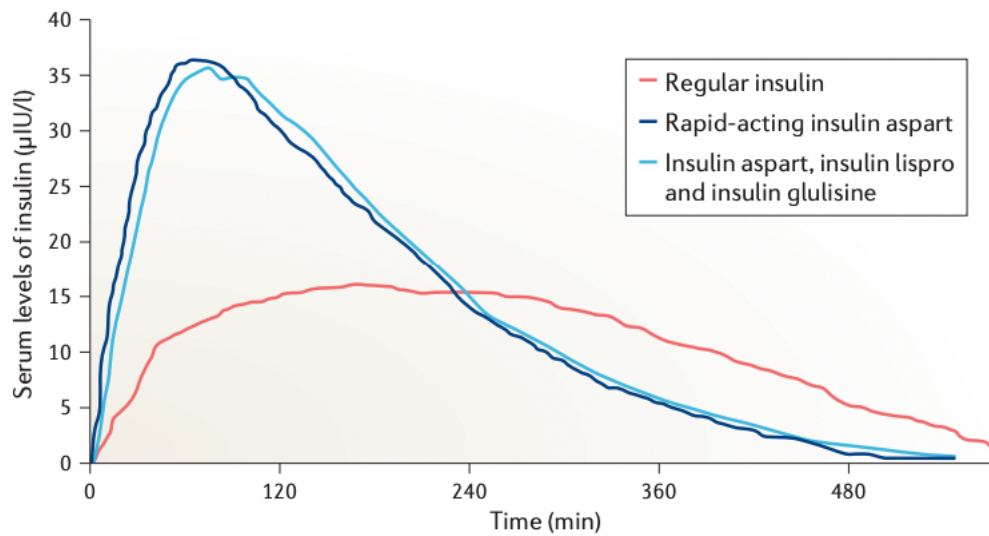


Figura 8.5. Perfil farmacocinético das insulinas de ação rápida e ultra rápida (adaptado de (31))

Através do gráfico, na figura 8.5, podemos comparar o perfil de ação da insulina humana regular com os análogos de insulina de ação rápida, nomeadamente, insulina aspártico, insulina lispro e insulina glulisina e, ainda, com o análogo da insulina aspártico de ação ultra rápida. Analisando o comportamento destas, conclui-se que os análogos de insulina têm um início de ação mais rápido, um pico mais elevado, e a sua duração de ação é mais curta comparativamente à insulina humana regular. Comparando ainda, a insulina aspártico ultra rápida com os restantes análogos podemos verificar que há diferenças no perfil farmacocinético, sendo a curva da insulina aspártico ultra rápida deslocada para a esquerda relativamente aos restantes análogos, o que faz com que tenha um início de ação ainda mais rápido e que atinja o pico mais cedo (31).

8.2.2. Análogos de insulina de ação lenta

As insulinas de ação intermédia disponíveis eram a NPH, Lente, Ultralente e uma mistura de 30% de Semilente e 70% Ultralente, mas estas apresentavam vários defeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Após injeção da insulina NPH ou Lente, o perfil de atividade mostra um pico precoce, cerca de 4 a 5h após a injeção e, 5 a 6 h após o pico, há um declínio da ação. Isto contribui para a hipoglicemia nas primeiras horas durante a noite (53). Deste modo, os doentes com DM1, necessitam de quantidades variáveis de insulina durante a noite, sendo que necessitam de menor quantidade entre as 00h00 e as 3h00 e conseqüentemente, um aumento de cerca de 30% entre as 4h00 e as 7h00 (62). Assim, foi necessário desenvolver análogos de insulina de ação lenta, de modo a retardar e a estabilizar a absorção da insulina.

Os primeiros análogos de insulina de ação lenta aprovados foram a insulina detemir e a insulina glargina. Uma possibilidade para tornar a ação da insulina lenta é elevar o ponto isoelétrico da insulina humana, passando o PH de 5,4 para um PH neutro, tornando o análogo menos solúvel ao PH fisiológico no local de injeção (38). Assim, a preparação de insulina resultante é solúvel em solução ácida, mas após injeção, no tecido subcutâneo onde o PH é neutro, precipita em microcristais. A outra possibilidade é uma modificação que promova a ligação à albumina que, conseqüentemente, aumentará o tempo de semi-vida no plasma prolongando o perfil de ação (53). A albumina serve como uma proteína de transporte multifuncional, que está presente no fluido do tecido subcutâneo e, usufrui de uma taxa de eliminação lenta (38).

A insulina detemir, produzida em *Saccharomyces cerevisiae* por tecnologia de DNA recombinante (63), é um análogo de insulina basal solúvel, com PH neutro, em que na posição 30 da cadeia B a treonina foi removida e um ácido gordo de 14 carbonos foi adicionado à lisina na posição 29 da cadeia B. Esta alteração na sequência de aminoácidos é ilustrada na figura 8.6. Estas modificações facilitam a autoassociação das moléculas de insulina em di-hexâmeros no local da injeção, facilitando também a ligação, reversível, à albumina, no tecido e na corrente sanguínea (31).

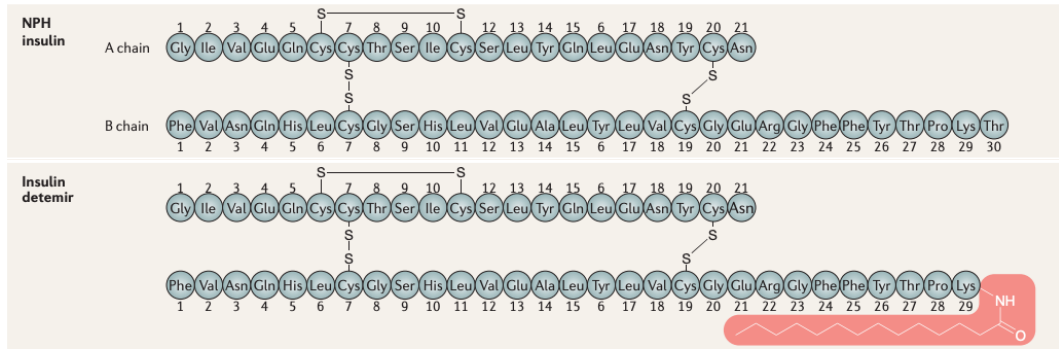


Figura 8.6. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina detemir (adaptado de (31))

Os estudos que investigam o comportamento da insulina detemir, em doentes com DM1, relatam uma diminuição notável na hipoglicemia noturna. Contudo, não se verifica a redução dos níveis de HbA1c (31).

Num estudo de 26 semanas verificaram que havia uma menor probabilidade de hipoglicemia noturna em doentes a administrar insulina detemir duas vezes ao dia do que em doentes a administrar insulina glargina uma vez ao dia (64).

Em todos os estudos, em que compararam a insulina detemir com a insulina NPH, verificou-se que houve um menor ganho de peso e que até houve uma perda de peso em doentes usando a insulina detemir como terapêutica (31).

A insulina Glargina, produzida em *E. Coli* por tecnologia de DNA recombinante (65), aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela EMA em 2000, resulta do alongamento da extremidade C-terminal da cadeia B, ao qual foram adicionados dois aminoácidos de Arginina, como também da substituição da Asparagina pela Glicina, na posição 21 da cadeia A (A21Gly, B31Arg, B32Arg insulina humana) (38). Esta alteração na sequência de aminoácidos é ilustrada na figura 8.7.

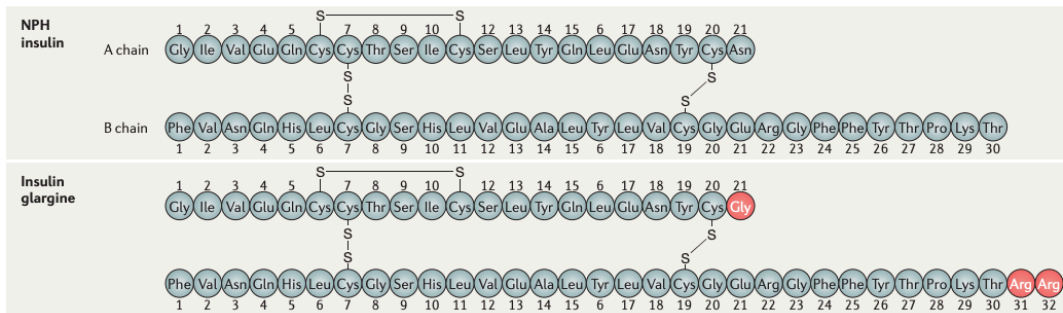


Figura 8.7. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina glargina (adaptado de (31))

Após injeção subcutânea, a insulina glargina precipita nos tecidos subcutâneos o que faz com que haja um atraso na absorção e prolongue a sua duração de ação, formando hexâmeros mais estáveis e mais densos comparativamente aos formados na insulina humana (66). A insulina glargina tem maior afinidade com o recetor IGF-1 comparativamente à insulina humana. Um dos problemas associados à modificação da estrutura da insulina, é o aumento do risco de desenvolvimento de anticorpos e reações adversas no local de injeção. Contudo, isto já acontecia aos doentes a usar a insulina NPH como terapêutica (38). A insulina glargina está disponível comercialmente a 100U e 300U (31).

Num estudo clínico de curto prazo, em doentes com DM tipo 1, a receber uma injeção por dia de insulina glargina concluiu-se que houve um controlo glicémico semelhante ao controlo conseguido pela insulina NPH com 4 injeções diárias das mesmas unidades totais (38).

A insulina Degludec, produzida em *Saccharomyces cerevisiae* por tecnologia de DNA recombinante (67), resultou da remoção da treonina na posição 30 da cadeia B, bem como da adição de um ácido gordo com 16 carbonos na posição 29 da cadeia B, da insulina Humana. Esta alteração na sequência de aminoácidos é ilustrada na figura 8.8. Estas modificações permitem que haja formação de cadeias de multi hexâmeros após a sua administração e ainda, que a albumina se ligue à insulina favorecendo, assim, um perfil de ação longo e estável (31).

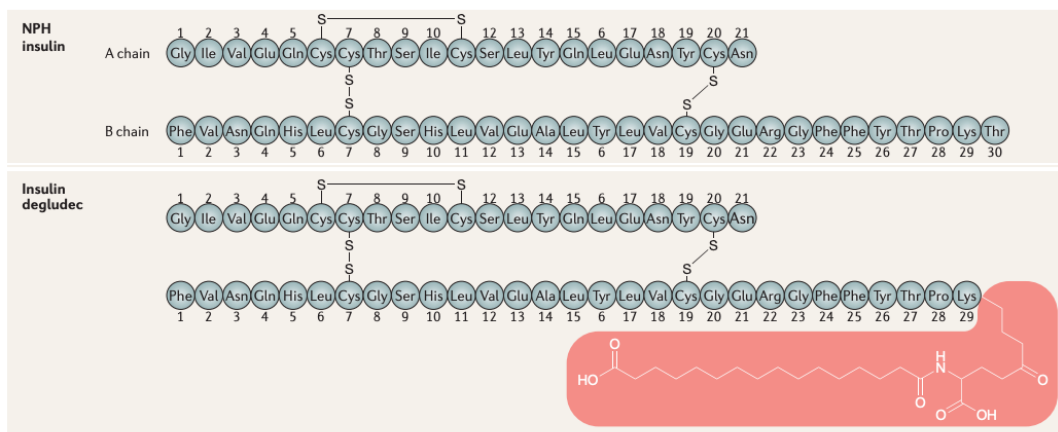


Figura 8.8. Sequência de aminoácidos da insulina NPH e da insulina degludec (adaptado de (31))

Num estudo, em doentes com *DM* tipo 1, foram estudados os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos da insulina degludec comparativamente com a insulina glargina e concluiu-se que o tempo de semi-vida de ação da insulina degludec foi de 25,4h e da insulina glargina foi apenas de 12,1h (68). Foi demonstrado, em ensaios clínicos, que uma administração por dia da insulina degludec, não leva a uma acumulação de insulina ativa, mas leva a uma reserva estável de insulina, resultando num perfil de ação de insulina estável. O facto da insulina degludec apresentar uma duração de ação muito longa permite uma grande flexibilidade na administração desta tendo-se estabelecido um intervalo de tempo entre as administrações entre 8h a 40h (31). Em contraste, é mandatório que as insulinas glargina e detemir sejam administradas no mesmo horário, diariamente, para manter uma cobertura adequada de insulina basal. Um pequeno estudo observacional demonstrou que, em doentes com *DM* tipo 1, a administrar insulina glargina ou detemir duas vezes ao dia alteraram para a insulina degludec uma vez ao dia, em doses menores, obtiveram melhores resultados relativamente aos níveis de HbA1c, risco de hipoglicemia e à satisfação do tratamento. A insulina degludec está disponível comercialmente em duas formulações: 100U e 200U (31). Apesar de, em Portugal, apenas ser comercializada a dose de 100U/mL.

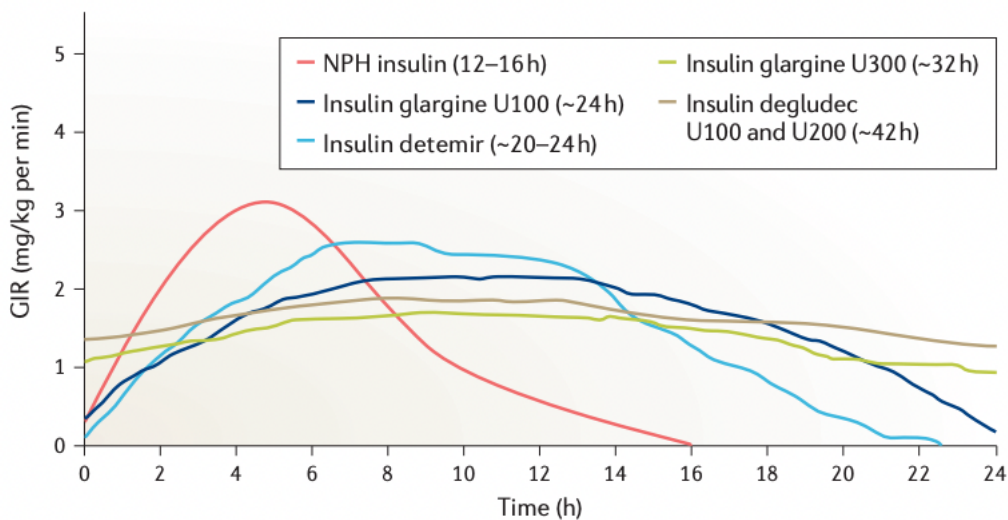


Figura 8.9. Perfil farmacodinâmico das insulinas de ação lenta (adaptado de (31))

Na figura 8.9, os perfis de ação farmacocinética não podem ser comparados porque as insulinas detemir e degludec são principalmente ligadas à albumina e, neste sentido, as concentrações totais de insulina não fornecem informações úteis sobre os perfis de ação. Portanto, este gráfico compara apenas a ação farmacodinâmica da insulina NPH com os análogos de insulina de ação lenta, nomeadamente, as insulinas degludec, detemir e glargina, no estado estacionário. A diferença no perfil de ação entre uma única injeção e o estado estacionário é particularmente importante para as insulinas com um tempo de semi-vida superior a 12 horas (insulina glargina U300 e insulina degludec) (31).

Devido às características farmacocinéticas dos análogos de insulina, os doentes com DM tipo 1 e tipo 2, conseguem alcançar o perfil de insulina ideal, o mais semelhante possível ao da insulina fisiológica, melhorando o controlo metabólico e o estilo de vida (53).

8.2.3 Esquemas de insulina que hoje se preconizam para tratar a diabetes *mellitus* tipo 1

Na DM tipo 1, os esquemas terapêuticos com insulina, devem ser individualizados e devem adaptar-se ao perfil glicémico do doente e ao seu estilo de vida. A dose diária total inicial de insulina em adultos varia de 0.2 a 0.4 unidade/kg/dia. Em crianças, a dosagem diária inicial será de 0.5 a 1 unidade/kg/dia e, durante a puberdade, as necessidades podem aumentar até 1.5 unidade/kg/dia. É possível elaborar esquemas de múltiplas injeções diárias, com base na preferência do médico e do doente e modificá-los de acordo com os dados da glucose que são consistentemente monitorizados (69).

Pode-se usar a combinação de insulina de ação lenta (insulina detemir, degludec ou glargina) numa dosagem basal e insulina de ação rápida (insulina lispro, aspártico ou glulisina) numa dosagem em bólus (69).

Quando se fala em Insulinoterapia basal recomenda-se a insulina detemir duas vezes por dia, ou em alternativa, a insulina glargina uma vez por dia se o doente não tolerar a insulina detemir ou por preferir apenas uma administração por dia. Se houver preocupação específica com hipoglicemia noturna, a melhor opção é a insulina degludec uma vez por dia (70).

No que diz respeito à insulinoterapia em bólus, as insulinas de ação rápida, a insulina lispro, a insulina aspártico e a insulina glulisina são a opção de primeira linha (70).

8.2.4. Insulinas Pré-misturas ou Bifásicas

As Insulinas Pré-misturas ou bifásicas foram desenvolvidas para uma melhor regulação dos valores de glucose no sangue e reduzir o número de administrações diárias necessárias, fornecendo características de ação rápida e de ação intermédia numa só formulação. Embora não houvesse um algoritmo fixo para a dosagem de insulina a administrar, uma abordagem comum era administrar 2/3 da insulina diária total antes do pequeno-almoço e 1/3 antes do jantar numa proporção de 2:1 de NPH e insulina de zinco cristalina (também chamada de insulina regular) e na proporção de 1:1

antes do jantar. Os doentes tinham que misturar as insulinas, administrando primeiramente a insulina humana regular e de seguida administrar a NPH. Esta abordagem de tratamento levou ao desenvolvimento de pré-misturas, tornando possível uma proporção de insulina humana regular e NPH sem a complexidade da auto mistura. Assim, as características da insulina de ação curta fornecem um pico de insulina pós-refeição e reduz a quantidade de insulina NPH, evitando níveis elevados de insulina no início da manhã, e conseqüentemente, a hipoglicemia (71).

A formulação 70/30 NPH/insulina humana regular tornou-se muito popular tanto na DM tipo 1 como na DM tipo 2. Com o desenvolvimento do análogo de insulina lispro, as propriedades de ação rápida melhoradas levaram a uma formulação de 75/25 (Protamina Neutra Lispro/Lispro) e o desenvolvimento do análogo de insulina aspártico deu origem a uma formulação de 70/30 de NPH/Aspártico. Existe ainda, a formulação de insulina degludec 70% e insulina aspártico 30% (não comercializadas em Portugal) e, a pré-mistura de insulina lispro na proporção de 50/50 (solúvel/protamina) (71).

As insulinas de pré-mistura são adequadas para o tratamento da DM tipo 2 e podem ser administradas antes das refeições, uma a três vezes ao dia. Clinicamente, estas insulinas são mais adequadas a indivíduos que mantêm consistência nos horários das suas refeições (72).

Num estudo, em que foram questionados 1408 médicos sobre a terapia com insulinas pré-mistura no tratamento da DM tipo 2, concluiu-se que a pré-mistura dos análogos de insulina foram preferidos à pré-mistura de insulina humana por mais de metade dos médicos participantes (52,2%) (73) .

8.3. Estabilidade da insulina

A estabilidade conformacional da insulina representa uma das estratégias para a preservação da sua função biológica, pois a estrutura tridimensional da insulina, fundamental para a ligação ao seu recetor e conseqüente ação biológica, é altamente sensível às condições ambientais e às modificações químicas (74). Uma modificação na estrutura da insulina pode alterar a atividade biológica devido a uma redução da

afinidade entre o recetor e a proteína ou por diminuição da capacidade do complexo, quando formado, de induzir uma resposta biológica (49).

A instabilidade física refere-se a alterações na estrutura, sejam a nível da estrutura secundária, terciária ou quaternária, levando à desnaturação da proteína e, conseqüente perda de função (45).

Quanto à instabilidade química, esta baseia-se numa alteração covalente da sequência, a nível da estrutura primária, levando à formação ou clivagem de uma ligação. Na prática, estas alterações podem acontecer em concomitância, pois alterações na estrutura afetam a suscetibilidade da molécula a nível químico e vice-versa (45).

Enquanto que, as pontes dissulfeto A7-B7 e A20-B19 são facilmente reduzidas, a A6-A11 é a ligação dissulfeto mais estável, sendo essencial para a sua função biológica (74).

9. Estudo de caso - Insulina

Os medicamentos de biotecnologia são mais comuns em ambiente hospitalar mas, também existem ao nível da farmácia comunitária, sendo de extrema importância que o Farmacêutico conheça as suas características e particularidades. É o caso das insulinas na farmácia comunitária.

Todos os medicamentos são submetidos a ensaios de estabilidade que estabelecem as suas condições de conservação e prazo de validade que devem ser cumpridos antes da AIM, como atrás se refere. Duma maneira geral, os medicamentos termolábeis de uso ambulatorio, devem ser conservados a temperaturas de refrigeração, entre 2°C e os 8 °C, para assegurar a sua estabilidade. As condições particulares de conservação são descritas no Resumo das Características do Medicamento (RCM) dos medicamentos (75). Contudo, estes medicamentos termolábeis podem ser sujeitos a quebras inadvertidas da cadeia de frio, ou conservados a temperaturas diferentes das recomendadas para a sua conservação, quando em uso. Face aos estudos realizados, as informações relativas à estabilidade de cada medicamento são do conhecimento dos titulares de AIM do respetivo medicamento e nem sempre partilhadas com o utilizador no RCM. Quando ocorra quebra na cadeia de frio do medicamento de biotecnologia, durante o seu armazenamento, as consequências dessa exposição a temperaturas diferentes deverão ser alvo de questionamento específico ao titular da respetiva AIM. O procedimento a adotar consistirá no contacto com o titular de AIM do respetivo medicamento, expondo o nome do medicamento, o respetivo lote, data de validade, intervalo de tempo a que o medicamento esteve sujeito a temperaturas fora do intervalo entre 2 a 8 °C, bem como as temperaturas máximas e mínimas atingidas (75).

9.1. Objetivo

O objetivo deste estudo de caso é perceber a estabilidade das insulinas em duas condições diferentes: quando há rotura da cadeia de frio e quando estão em uso normal.

9.2. Metodologia

Para tal, efetuou-se uma revisão sobre a natureza, características e especificidades dos medicamentos de biotecnologia no geral e procedeu-se à consulta dos titulares de AIM das insulinas comercializadas em Portugal quanto à sua estabilidade, usando por base um questionário elaborado para o efeito. Lamentavelmente apenas se recebeu resposta da empresa Novo Nordisk. Nesta circunstância restringimos o objetivo ao estudo de caso que inclui apenas as insulinas comercializadas pela Novo Nordisk, em Portugal.

9.3. Resultados

Na tabela 9.1, estão presentes as condições de conservação das insulinas comercializadas pela Novo Nordisk, ao nível da farmácia comunitária, em dois momentos. Em uso normal, condições constantes no RCM de cada insulina mencionada e, na rotura da cadeia de frio, de acordo com informações obtidas através do titular de AIM destas insulinas.

Tabela 9.1. Condições de conservação das insulinas da Novo Nordisk comercializadas em Portugal

Insulinas	Em uso normal (RCM)		Rotura da cadeia de frio	
	Temperatura (°C)	Prazo de utilização	Temperatura (°C)	Prazo de validade
Actrapid® 100 UI/ml (frasco) (76)	<25	6 semanas	< 25°C até 24 horas	Prazo de validade mantido
Actrapid® Penfill 100 UI/ml (76)	<25	6 semanas		
Insulatard® 100 UI/ml (frasco)(77)	<25	6 semanas		
Insulatard® Penfill 100 UI/ml(77)	<30	6 semanas		
Mixtard 30® Penfill 100 UI/ml (78)	<30	6 semanas		
Fiasp® FlexTouch 100 UI/ml (79)	<30	4 semanas		
Fiasp® Penfill 100 UI/ml (79)	<30	4 semanas		
Fiasp® 100 UI/ml (frasco) *(79)	<30	4 semanas		
NovoRapid® Penfill 100 UI/ml (80)	<30	4 semanas		
NovoRapid® PumpCart ** 100 UI/ml (80)	<30	2 semanas		
NovoMix 30® Penfill 100 UI/ml (57)	<30	4 semanas		
NovoMix 30® FlexPen 100 UI/ml (57)	<30	4 semanas		
Levemir® FlexPen 100 UI/ml (63)	<30	6 semanas		
Tresiba® 100 UI/ml (caneta)(67)	<30	8 semanas		

* Relativamente à Fiasp 100 UI/ml de solução injetável em frasco após a primeira abertura, o medicamento pode ser conservado durante um máximo de 4 semanas, incluindo o tempo de permanência no reservatório de uma bomba de perfusão, sendo este, um período máximo de 6 dias (79).

** A partir deste período de tempo (2 semanas), pode ser utilizado durante o máximo de 7 dias a uma temperatura inferior a 37°C em sistemas de bombas de perfusão de insulina concebidos para serem utilizados com este cartucho (80).

No RCM de cada insulina, estão descritos o prazo de validade e as precauções especiais de conservação. O prazo de validade é de 30 meses antes da abertura inicial (63),(67),(76)-(80), à exceção da insulina Novomix 30, que é de apenas 24 meses (57). Para todas estas insulinas aqui descritas, devem-se conservar no frigorífico, entre 2°C a 8°C.

Sabemos que as insulinas denominadas FlexPen ou FlexTouch são em caneta pré-cheia e, as insulinas denominadas Penfill ou PumpCart são em cartucho. Todas elas são em solução injetável, à exceção de todas as insulinas Insulatard, NovoMix 30 e Mixtard 30 que são em suspensão injetável.

Conforme indicado no RCM, a Actrapid em frasco para injetáveis de 100 unidades internacionais/ml, durante a utilização ou quando transportado como sobresselente, pode ser guardada durante um máximo de 6 semanas e deve ser conservada a uma temperatura inferior a 25°C (76). A tabela deve ler-se desta forma, e o mesmo acontece com as restantes insulinas, em que apresentam valores diferentes entre elas.

Relativamente à rotura da cadeia de frio, para todas as insulinas aqui presentes, podem ser armazenadas abaixo dos 25°C fora da temperatura de conservação por um período máximo de um dia (24 horas), mantendo-se assim o seu prazo de validade inscrito na embalagem. De notar que, posteriormente, não excedendo as 24 horas, o medicamento deve ser armazenado a temperaturas entre os 2°C e o 8°C, novamente. Excedendo as condições indicadas pelo Fabricante, os medicamentos não deverão ser utilizados.

9.4. Discussão

Inicialmente o projeto pensado baseava-se em obter os dados de estabilidade dos medicamentos de biotecnologia dispensados na farmácia comunitária, em duas condições diferentes, na rotura da cadeia de frio e em uso normal.

Relativamente à situação da rotura da cadeia de frio, para obter os dados de estabilidade de cada medicamento de biotecnologia dispensado na farmácia

comunitária necessitava de contactar os titulares de AIM de cada medicamento, a solicitar os dados de estabilidade destes medicamentos em específico, numa situação da rotura da cadeia de frio e, na impossibilidade destes, recorrer ao centro de informação do medicamento (CIM) da ordem dos farmacêuticos. O objetivo era perceber se após esta rotura, há impacto na conservação daquele medicamento, ou seja, quanto tempo o medicamento é estável após ter sido exposto às condições alteradas de frio e se de alguma forma isso afeta ou não o seu prazo de validade, de acordo com as temperaturas atingidas e o tempo que permanecem a essa temperatura. Mas estes dados apenas nos foram fornecidos pela Novo Nordisk, o que limitou esta dissertação. Com esta insuficiência de dados, contactamos também o CIM, mas não obtivemos uma resposta concreta pois, para tal, teríamos de apresentar a situação real de rotura da cadeia de frio (duração e temperatura atingida) e não o exercício teórico que estávamos a tentar construir.

Assim, os dados presentes nesta dissertação apenas se referem às insulinas comercializadas em Portugal, pela Novo Nordisk, relativos a uma rotura de apenas 24 horas a uma temperatura abaixo dos 25°C fora da temperatura de conservação. Esta falta de dados, ocorreu porque os dados são dependentes de vários fatores, nomeadamente, quanto tempo específico esteve fora da temperatura de conservação e, em que intervalo de temperaturas esteve durante aquele período de tempo. Há uma necessidade de fazer caso a caso, medicamento a medicamento. Lamentavelmente os outros titulares de AIM de insulinas não nos libertaram os seus dados.

Relativamente à situação em uso normal, esta apenas se baseou em transcrever os dados de estabilidade destas insulinas do respetivo RCM para esta dissertação.

Estas condições de conservação a que estes medicamentos estão sujeitos devem ser cumpridas, pois a insulina é uma proteína altamente sensível aos *stresses* ambientais o que pode provocar alterações estruturais e, conseqüentemente, ter um impacto na eficácia biológica em relação às atividades fisiológicas e farmacológicas (74).

Para tal não acontecer, ou para existirem dados para apresentar ao titular de AIM, a farmácia deve dispor de um frigorífico com sistema de monitorização contínua de temperatura interna, deve estar equipado com um alarme sonoro ativado para se ocorrerem variações de temperatura fora do intervalo permitido (2°C a 8°C) e, deve estar ligado a um circuito elétrico independente com disjuntor próprio e tomada

exclusiva, para assegurar que não seja acidentalmente desligado e, se houver quebras de energia frequentes, estar ligado a uma fonte de energia alternativa. O farmacêutico deve assegurar o seu imediato armazenamento no frigorífico (75).

9.5. Conclusão

Os dados obtidos a partir dos estudos de estabilidade da substância e do produto final são usados para definir as condições de armazenamento ideais e correspondentes prazos de validade (81).

Quando há uma rotura da cadeia de frio, numa farmácia comunitária, o farmacêutico deve contactar o titular de AIM de cada medicamento. Se estes dados fossem divulgados e organizados num documento, haveria uma enorme facilidade na verificação da estabilidade destes. Tendo estas informações sistematizadas, há uma menor necessidade de recursos, havendo menos pessoas envolvidas e, conseqüentemente, menos tempo o medicamento ficaria em quarentena à espera desta avaliação da estabilidade.

No entanto, compreende-se que isto seria difícil porque seria necessário especificar a temperatura a que o medicamento esteve sujeito e quanto tempo o medicamento esteve a essa temperatura. Existem numerosos dados, o que torna difícil a sua recolha.

Desenvolver este estudo de caso foi muito interessante e mesmo que, sejam insuficientes estes dados, acredito que possam ajudar, de certa medida, alguma farmácia que se encontra nesta situação e, de certa forma, ajudar também algum utente diabético que não lhe tenham informado acerca destas condições de conservação, e tenha dificuldade em fazer essa pesquisa no Infomed.

10. Perspetiva do autor

Uma grande preocupação da indústria farmacêutica e autoridades de saúde é garantir que os medicamentos sejam entregues aos utentes sem perda das propriedades terapêuticas. Os medicamentos sensíveis às condições de transporte precisam de um cuidado especial para garantir que a sua qualidade não seja prejudicada pelo transporte (81). E é aqui que o farmacêutico comunitário atua. Ao aumentar o conhecimento e a experiência no desenvolvimento, aplicação e uso terapêutico dos medicamentos de biotecnologia, pode ser facilitada a aplicação ampla, racional e segura desta classe terapêutica importante e em rápida evolução. Versando concretamente para as insulinas, como podemos ver nesta dissertação, que são um medicamento com algumas especificidades, e é fulcral que o farmacêutico ao dispensar, chame a atenção dos utentes sobre todas elas.

11. Bibliografia

1. Crommelin, DJA; Sindelar, R; Meibohm B. Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and applications. 5th ed. AG SNS, editor. 2019.
2. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar 19;9(3):203–14.
3. Apifarma. White-Paper sobre Inovação Biofarmacêutica [Internet]. 2013. (último acesso em 22 de março de 2021)
4. Buxbaum E. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, editor. 2007.
5. Seo J-W, Lee K-J. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *BMB Rep.* 2004 Jan 31;37(1):35–44.
6. Dimitrov DS. Therapeutic Proteins. In 2012. p. 1–26.
7. Reis C, Xavier L, Capanema DL, Lins P, Filho P, Reis C, et al. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. BNDES Setorial, no 29. 2009;
8. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Reports.* 2013 Sep;65(5):1075–85.
9. Emery AH. Recombinant DNA Technology. *Lancet.* 1981 Dec;318(8260–8261):1406–9.
10. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm Res.* 2010 Apr 9;27(4):544–75.
11. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol.* 2004 Nov 4;22(11):1383–91.
12. Agostini C, Canonica GW, Maggi E. European medicines agency guideline for biological medicinal products: a further step for a safe use of biosimilars. *Clin Mol Allergy.* 2015 Dec 15;13(1):3.
13. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products

containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues.

14. European Medicines Agency. ICH: Topic Q 5 C: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products - Step 5. CPMP/ICH/138/95. 1996;(December 1995).
15. OMS. Guidelines on evaluation of similar Biotherapeutic products (sbps). Biotherapeutics.
16. Agência Europeia de Medicamentos. Medicamentos biossimilares na UE - Guia informativo para profissionais de saúde. 2019;
17. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Abasaglar, Insulina Glargina [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ABASAGLAR-epar-product-information_pt.pdf
18. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Semglee, Inulina Glargina [Internet]. [cited 2022 Mar 18]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/semglee-epar-product-information_pt.pdf
19. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Insulina Lispro Sanofi [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/INSULINA-LISPRO-SANOFI-epar-product-information_pt.pdf
20. Enterprise and Industry. O que precisa saber sobre medicamentos biossimilares. 2013;
21. 4. International Council on Harmonisation (ICH) [Internet]. [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://learning.eupati.eu/mod/book/tool/print/index.php?id=614&chapterid=506>
22. Harmonization IC on. ICH Official web site : ICH [Internet]. [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.ich.org/page/ctd>
23. Papatheodorou K, Banach M, Edmonds M, Papanas N, Papazoglou D. Complications of Diabetes. J Diabetes Res. 2015;2015:1–5.
24. G. Wells, Barbara; Schwinghammer L., Terry; T. DiPiro, Joseph; V. DiPiro C.

- Pharmacotherapy Handbook. 10 th. Education MGH, editor. 2017.
25. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Apr;138:271–81.
 26. Flier JS, Underhill LH, Eisenbarth GS. Type I Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1986 May 22;314(21):1360–8.
 27. DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 2009 Apr 1;58(4):773–95.
 28. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Mol Metab.* 2017 Sep;6(9):958–73.
 29. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Crit Care Nurs Q.* 2004 Apr;27(2):113–25.
 30. Organization WH. WHO | Diabetes [Internet]. [cited 2021 Sep 11]. Available from: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
 31. Mathieu C, Gillard P, Benhalima K. Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Jul 21;13(7):385–99.
 32. Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2019 Jan;13(1):364–72.
 33. Hegele RA, Maltman GM. Insulin’s centenary: the birth of an idea. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Dec;8(12):971–7.
 34. Rodbard HW, Rodbard D. Biosynthetic Human Insulin and Insulin Analogs. *Am J Ther.* 2020 Jan;27(1):e42–51.
 35. Chance RE, Frank BH. Research, Development, Production, and Safety of Biosynthetic Human Insulin. *Diabetes Care.* 1993 Dec 1;16(Supplement_3):133–42.
 36. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014 Apr 17;5.
 37. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, et al. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact.* 2014 Dec 2;13(1):141.
 38. Vajo Z, Fawcett J, Duckworth WC. Recombinant DNA Technology in the

- Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocr Rev.* 2001 Oct 1;22(5):706–17.
39. Roy B, Chou MCY, Field JB. Time-Action Characteristics of Regular and NPH Insulin in Insulin-Treated Diabetics*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 Mar;50(3):475–9.
 40. Gardener DF, Arakaki RF, Podet EJ, Nell LJ, Thomas JW, Field JB. The Pharmacokinetics of Subcutaneous Regular Insulin in Type I Diabetic Patients: Assessment Using a Glucose Clamp Technique*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986 Sep;63(3):689–94.
 41. Ong SC, Belgi A, van Lierop B, Delaine C, Andrikopoulos S, MacRaild CA, et al. Probing the correlation between insulin activity and structural stability through introduction of the rigid A6–A11 bond. *J Biol Chem.* 2018 Jul;293(30):11928–43.
 42. Ryle AP, Sanger F, Smith LF, Kitai R. The disulphide bonds of insulin. *Biochem J.* 1955 Aug 1;60(4):541–56.
 43. Hua Q, Mayer JP, Jia W, Zhang J, Weiss MA. The Folding Nucleus of the Insulin Superfamily. *J Biol Chem.* 2006 Sep;281(38):28131–42.
 44. Ye H, Hill J, Kauffman J, Gryniwicz C, Han X. Detection of protein modifications and counterfeit protein pharmaceuticals using isotope tags for relative and absolute quantification and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry: Studies of insulins. *Anal Biochem.* 2008 Aug;379(2):182–91.
 45. Brange J, Langkjær L. Insulin Structure and Stability. In 1993. p. 315–50.
 46. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Apidra, INN-insulina glulisina [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/apidra-epar-product-information_pt.pdf
 47. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994 Jan 7;269(1):1–4.
 48. Slieker LJ, Brooke GS, DiMarchi RD, Flora DB, Green LK, Hoffmann JA, et al. Modifications in the B10 and B26–30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. *Diabetologia.* 1997 Jun 24;40(14):S54–61.
 49. Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Wollmer A, et al.

- Receptor-binding region of insulin. *Nature*. 1976 Feb;259(5542):369–73.
50. Evans M, Ceriello A, Danne T, De Block C, DeVries JH, Lind M, et al. Use of fast-acting insulin aspart in insulin pump therapy in clinical practice. *Diabetes, Obes Metab*. 2019 Sep 19;21(9):2039–47.
 51. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Humalog, INN - insulina lispro [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/humalog-epar-product-information_pt.pdf
 52. Richards JP, Stickelmeyer MP, Flora DB, Chance RE, Frank BH, DeFelippis MR. Self-association properties of monomeric insulin analogs under formulation conditions. *Pharm Res*. 1998;15(9):1434–41.
 53. Bolli GB, Di Marchi RD, Park GD, Pramming S, Koivisto VA. Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999 Oct 1;42(10):1151–67.
 54. Heinemann L, Heise T, Wahl LC, Trautmann ME, Ampudia J, Starke AAR, et al. Prandial Glycaemia After a Carbohydrate-rich Meal in Type I Diabetic Patients: Using the Rapid Acting Insulin Analogue [Lys(B28), Pro(B29)] Human Insulin. *Diabet Med*. 1996 Jul;13(7):625–9.
 55. Home PD. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences. *Diabetes, Obes Metab*. 2012 Sep;14(9):780–8.
 56. Lalli C, Ciofetta M, Del Sindaco P, Torlone E, Pampanelli S, Compagnucci P, et al. Long-term intensive treatment of type 1 diabetes with the short-acting insulin analog lispro in variable combination with NPH insulin at mealtime. *Diabetes Care*. 1999 Mar 1;22(3):468–77.
 57. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Novo Mix, INN-insulina aspártico [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novomix-epar-product-information_pt.pdf
 58. Drejer K, Kruse V, Dahl Larsen U, Hougaard P, Bjorn S, Gammeltoft S. Receptor Binding and Tyrosine Kinase Activation by Insulin Analogues With Extreme Affinities Studied in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Diabetes*. 1991 Nov

- 1;40(11):1488–95.
59. Lindholm A, McEwen J, Riis AP. Improved postprandial glycemc control with insulin aspart. A randomized double-blind cross-over trial in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 May 1;22(5):801–5.
 60. Home PD, Lindholm A, Hylleberg B, Round P. Improved glycemc control with insulin aspart: a multicenter randomized double-blind crossover trial in type 1 diabetic patients. UK Insulin Aspart Study Group. *Diabetes Care*. 1998 Nov 1;21(11):1904–9.
 61. Becker R, Frick A, Burger F, Potgieter J, Scholtz H. Insulin Glulisine, a New Rapid-Acting Insulin Analogue, Displays a Rapid Time-Action Profile in Obese Non-Diabetic Subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005 Sep 8;113(08):435–43.
 62. Perriello G, De Feo P, Torlone E, Fanelli C, Santeusano F, Brunetti P, et al. The dawn phenomenon in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: magnitude, frequency, variability, and dependency on glucose counterregulation and insulin sensitivity. *Diabetologia*. 1991 Jan;34(1):21–8.
 63. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Levemir, INN - inulina detemir [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/levemir-epar-product-information_pt.pdf
 64. Pieber TR, Treichel H-C, Hompesch B, Philotheou A, Mordhorst L, Gall M-A, et al. Comparison of insulin detemir and insulin glargine in subjects with Type 1 diabetes using intensive insulin therapy. *Diabet Med*. 2007 Jun;24(6):635–42.
 65. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Lantus, INN- insulina glargina [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lantus-epar-product-information_pt.pdf
 66. Heinemann L, Linkeschova R, Rave K, Hompesch B, Sedlak M, Heise T. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *Diabetes Care*. 2000 May 1;23(5):644–9.
 67. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Tresiba, INN- insulina degludec [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from:

- https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tresiba-epar-product-information_pt.pdf
68. Heise T, Hövelmann U, Nosek L, Hermanski L, Böttcher SG, Haahr H. Comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of insulin degludec and insulin glargine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015 Aug 3;11(8):1193–201.
 69. Type 1 diabetes - Treatment approach | BMJ Best Practice [Internet]. [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://bestpractice.bmj.com/topics/pt-br/25/management-approach#referencePop36>
 70. Excellence NI for H and C. Type 1 diabetes in adults: diagnosis and management NICE guideline. 2015;
 71. Rendell M. Premix insulins in type 1 diabetes: the coming of degludec/aspart. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Apr 3;15(4):341–8.
 72. Hirsch IB, Juneja R, Beals JM, Antalis CJ, Wright EE. The Evolution of Insulin and How it Informs Therapy and Treatment Choices. *Endocr Rev*. 2020 Oct 1;41(5):733–55.
 73. Kalra S, Sahay R, Tiwaskar M, Priya G, Das S, Bantwal G. A Prospective Validation Survey to Assess Usage of Premix Insulins in Management of Diabetes with Respect to the Recommendations Enlisted in Indian Guidelines. *J Assoc Physicians India*. 2020 Jun;68(6):20–5.
 74. Akbarian M, Ghasemi Y, Uversky VN, Yousefi R. Chemical modifications of insulin: Finding a compromise between stability and pharmaceutical performance. *Int J Pharm*. 2018 Aug;547(1–2):450–68.
 75. CEDIME responde. FAQ - Conservação de Produtos Termolábeis. Plataforma ANF online. 2019.
 76. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Actrapid, INN -insulina humana [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/actrapid-epar-product-information_pt.pdf
 77. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Insulatard, INN - inulina humana. [cited 2022 Feb 18]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/insulatard-epar-product-information_pt.pdf

78. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Mixtard, INN-insulina humana. [cited 2022 Feb 18]; Available from:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mixtard-epar-product-information_pt.pdf
79. Infomed. Resumo das Características do Medicamento, Fiasp, INN - inulina aspártico. [cited 2022 Feb 18]; Available from:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/fiasp-epar-product-information_pt.pdf
80. Infomed. Resumos das Características do Medicamento, NovoRapid, INN - insulina aspártico. [cited 2022 Feb 18]; Available from:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novorapid-epar-product-information_pt.pdf
81. Ammann C. Stability Studies Needed to Define the Handling and Transport Conditions of Sensitive Pharmaceutical or Biotechnological Products. AAPS PharmSciTech. 2011 Dec 27;12(4):1264–75.