

УДК 615.014.2:616.379-008.64:577.175.72

DOI: 10.15587/2519-8025.2025.349033

## ЕВОЛЮЦІЯ ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОБНИЦТВА ІНСУЛІНУ: ВІД ІСТОРИЧНИХ ВІДКРИТТІВ СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛИ ДО СУЧАСНИХ ІННОВАЦІЙ

О. С. Калюжная, Н. В. Хохленкова

*The aim of the study is to assess the current state of the pharmaceutical market for insulins, including historical stages of studying the structure of the insulin molecule and its properties, which formed the basis for the development of commercial preparations and analogs, as well as analysis of promising biotechnological approaches to improve the treatment of diabetes mellitus (DM).*

*Materials and methods.* The materials used were scientific publications, official websites of manufacturing companies, FDA and EMA databases, clinical trial registries. Methods of content analysis, comparative, analytical, and generalization of information were applied.

*Results and discussion.* The results indicate that recombinant insulin preparations (from rapid-acting analogs to long-acting ones) provide better glycemic control but are limited by high development and production costs. Innovations include combined preparations with GLP-1 agonists, glucose-sensitive insulins, and oral forms, which face bioavailability challenges.

*Conclusions.* The analysis points to the evolution of insulin production technologies from determining the molecule structure and implementing recombinant DNA technologies, which enabled the transition to human recombinant preparations and analogs. The market offers preparations with various profiles (from ultra-rapid to ultra-long), including biphasic mixtures, improving glycemic control. Combinations of insulin with GLP-1 agonists, amylin analogs (pramlintide), and the development of glucose-sensitive insulins have potential for personalized therapy but are limited by technical challenges (stability, biocompatibility). Oral forms face low bioavailability, but the use of nanotechnology and effective excipients opens prospects for improving accessibility and effectiveness of DM treatment

**Keywords:** insulin, recombinant DNA technologies, biosimilars, insulin analogs, oral delivery systems

### How to cite:

Kaliuzhnaia, O., Khokhlenkova, N. (2025). Evolution of insulin production technologies: from historical discoveries of the molecule structure to modern innovations. ScienceRise: Biological Science, 3 (44), 19-40. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.349033>

© The Author(s) 2025

This is an open access article under the Creative Commons CC BY license

### 1. Вступ

Цукровий діабет (ЦД) залишається однією з найгостріших глобальних проблем охорони здоров'я, з прогнозованим зростанням кількості хворих до 853 мільйонів до 2050 року за даними Міжнародної федерації діабету [1]. В Україні, за офіційними даними Міністерства охорони здоров'я, у 2023 році зареєстровано понад 531 тисячу випадків діабету, що свідчить про необхідність постійного вдосконалення методів лікування та забезпечення доступності препаратів інсуліну [2].

За останні роки спостерігається значний прогрес у біотехнологічних підходах до терапії ЦД, зокрема розробка препаратів на основі моноклональних антитіл (МкАТ), таких як mAb43 (дослідження 2024 року показало, що експериментальний препарат на основі mAb43, спрямованого на поверхневий аутоантиген транспортер цинку 8, запобігає розвитку аутоімунного діабету в мишей, демонструючи потенціал як безпечної антиген-специфічної імунотерапії

для профілактики та реверсії ЦД1 [3]) та теплізумаб (Tzield, Provention Bio, Inc., Sanofi, гуманізоване МкАТ, схвалене Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA, U.S. Food and Drug Administration) у 2022 році для відтермінування розвитку ЦД1 [4]). Крім того, перспективними є інновації у виробництві, включаючи трансгенні біореактори на основі великої рогатої худоби з використанням лентивірусних векторів для експресії людського інсуліну в молочній залозі (дослідження 2024 року [5]), а також нові форми доставки, такі як інгаляційний інсулін (Afrezza, MannKind Corporation, схвалений FDA у 2014 році, нові дослідження демонструють його ефективність як зручної альтернативи ін'єкціям [6, 7]), та комбіновані агоністи рецепторів, зокрема тирзепатид (Mounjaro, Eli Lilly), схвалений у 2022 році для лікування ЦД2 та ожиріння. Ці підходи спрямовані на підвищення ефективності, зменшення побічних ефектів та індивідуалізацію терапії, включаючи використання стовбурових клітин для генерації інсу-

лін-продукуючих клітин [8, 9] та нанотехнологій для контрольованої доставки інсуліну [10].

У нашій попередній роботі [11] ми провели аналіз технологій виробництва рекомбінантного інсуліну, зосередившись на методах технології рекомбінантної ДНК (рДНК) (проінсуліновий та дволанцюговий) та системах експресії (*Escherichia coli* та *Saccharomyces cerevisiae*), а також перспективних альтернативах, таких як метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris*, трансгенні рослини (*Arabidopsis thaliana*, тютюн, салат, полуниця) та стовбурові клітини. Було встановлено, що проінсуліновий метод є більш рентабельним через роботу з одним рекомбінантним штамом, тоді як дволанцюговий забезпечує кращий контроль якості, хоча й вимагає додаткових етапів. Однак сучасні технології все ще обмежені високою вартістю та недостатньою потужністю виробництва, що не задовольняє зростаючий попит.

Ця стаття є логічним продовженням попереднього дослідження, де ми акцентуємо увагу на оновленій інформації про біотехнологічні підходи, з акцентом на історичних етапах дослідження будови молекули інсуліну та її властивостях, що у подальшому було застосовано у розробці комерційних препаратів інсуліну та його аналогів, розглядаємо присутність препаратів на фармацевтичному ринку та аналізуємо інноваційні стратегії розробки нових ефективних препаратів інсулінів з метою їхнього подальшого впровадження в умовах вітчизняних фармацевтичних підприємств.

Метою дослідження є оцінка сучасного стану фармацевтичного ринку інсулінів, включаючи історичні етапи вивчення структури молекули інсуліну та її властивостей, які лягли в основу розробки комерційних препаратів та аналогів, а також аналіз інноваційних біотехнологічних підходів для покращення доступності та ефективності лікування ЦД.

## 2. Матеріали та методи

Матеріалами дослідження слугували публікації в наукових періодичних виданнях (PubMed, PMC, ScienceDirect), офіційні сайти компаній-виробників інсулінів, бази даних регуляторних органів (U.S. Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)), реєстри клінічних досліджень США та ЄС, відкриті джерела інформації щодо епідеміологічних даних про поширеність цукрового діабету в Україні та світі. Для досягнення мети застосовувалися методи контент-аналізу, порівняльний, аналітичний, описовий та узагальнення інформації.

## 3. Результати та їх обговорення

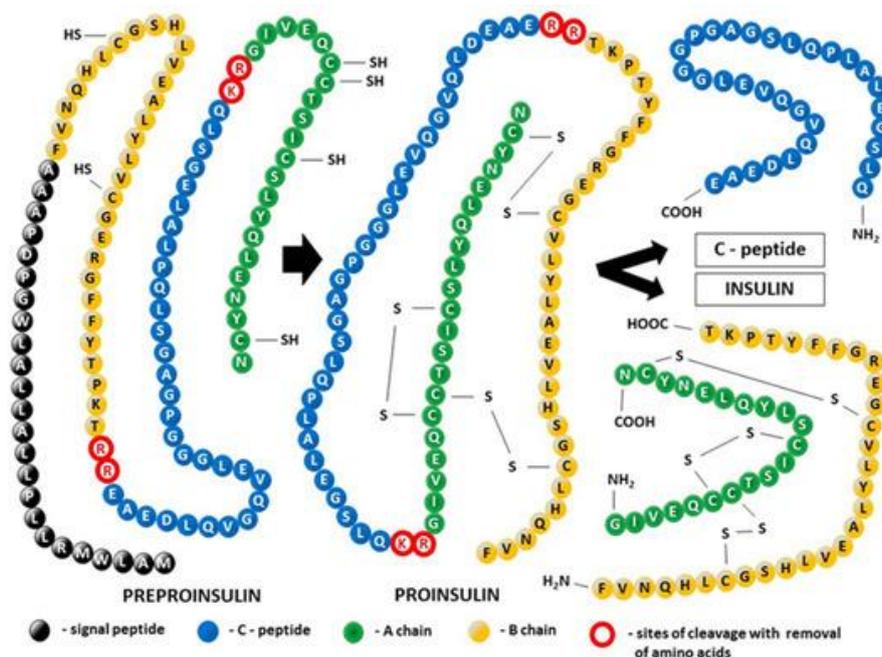
Інсулін секретується  $\beta$ -клітинами підшлункової залози як ключовий гормон для регуляції концентрації глюкози в крові. Гормон ініціює каскад внутрішньоклітинних сигнальних процесів, який забезпечує надходження глюкози в клітини тканин-мішеней за допомогою різних класів транспортерів цукру. Вже в клітинах глюкоза використовується для генерації енергії, або зберігається у формі глікогену та жирів [12]. Порушення секреції інсуліну знижує концентрацію гормону в крові та перешкоджає утилізації

глюкози клітинами, що призводить до розвитку ЦД1 або 2. ЦД1 є аутоімунним захворюванням, тому інсулінозамісна терапія залишається єдиним медикаментозним методом лікування. При ЦД2 лікування починається з використання бігуанідів (метформін), до яких послідовно додаються інші класи неінсулінових цукрознижувальних засобів з різними механізмами дії (наприклад, стимулятори секреції інсуліну – сульффонілсечовина та меглітиніди, або сенсibiliзатори – тiazолідиндіони), а екзогенний інсулін вводиться як крайній захід при неефективності комбінацій інших препаратів для досягнення цільового глікемічного контролю [13].

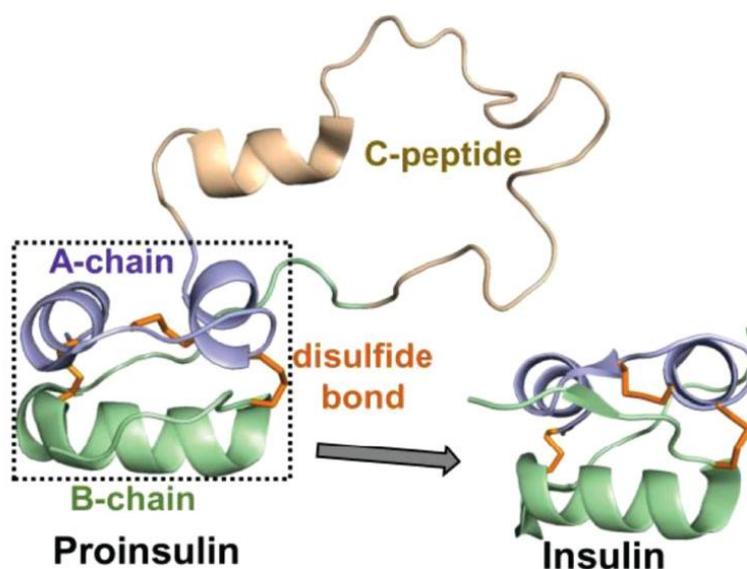
На сьогодні в клінічній практиці застосовуються рекомбінантні препарати інсуліну, розробка яких стала можливою після визначення амінокислотної послідовності молекули Фредеріком Сенгером (Frederick Sanger) у 1955 році [14, 15] та розуміння механізму синтезу інсуліну і посттрансляційної модифікації його третинної структури [16, 17].

Інсулін – пептидний гормон, що синтезується як попередник проінсуліну в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та перетворюється на інсулін шляхом ферментативного розщеплення (рис. 1). Рибосоми синтезують поліпептид у вигляді препроінсуліну (ланцюг із 110 амінокислот), N-кінцевий сегмент якого містить сигнальну послідовність C-пептид (connecting peptide). C-пептид транспортує препроінсулін з цитозолю в просвіт ендоплазматичного ретикулу (ЕПР), початкову точку секреторного шляху. У шорсткому ЕПР відбувається протеоліз препроінсуліну сигнальною пептидазою з видаленням сигнального пептиду, в результаті утворюється проінсулін – ланцюг із 86 амінокислот. У молекулі проінсуліну 6 залишків цистеїну, що дозволяє білку згортатися та утворювати три характерні дисульфідні містки. В апараті Гольджі пептид проінсуліну розщеплюється у двох місцях з утворенням C-пептиду та кінцевої молекули інсуліну [18]. C-пептид та інсулін потрапляють у кров одночасно та в рівних кількостях. Однак, на відміну від інсуліну, C-пептид не екстрагується печінкою чи іншими органами, тому його період напіврозпаду довший – близько 30 хв, тоді як у інсуліну він становить лише 6 хв. Отже, C-пептид точніше відображає ендogenous секрецію інсуліну, ніж сам інсулін, і з цієї причини широко використовується як клінічний маркер функції  $\beta$ -клітин підшлункової залози [19].

Утворена молекула зрілого інсуліну складається з 51 амінокислот двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних двома міжланцюговими дисульфідними зв'язками: ланцюг А складається з 21 амінокислоти, а ланцюг В – з 30 амінокислот (рис. 1, А). Міжланцюгові дисульфідні зв'язки розташовані між залишками цистеїну (Cys, C) ланцюгів А та В (Cys<sub>7А</sub> – Cys<sub>7В</sub> та Cys<sub>20А</sub> – Cys<sub>19В</sub>), третій внутрішньоланцюговий дисульфідний зв'язок розташований у ланцюзі А (Cys<sub>6А</sub> – Cys<sub>11В</sub>). Незважаючи на накопичений досвід, дисульфідні зв'язки, що стабілізують третинну структуру інсуліну, досі ускладнюють його високопродуктивний синтез, вимагаючи подальшого вдосконалення технологій виробництва та пошуку нових систем експресії [11].



a



б

Рис. 1. Утворення зрілого інсуліну шляхом посттрансляційних модифікацій попередників інсуліну:

а – Препроінсулін, проінсулін, інсулін (первинні структури) (Ілюстрація взята з [20]);

б – Проінсулін та інсулін (третинні структури) (Ілюстрація взята з [21])

Молекула зрілого інсуліну містить 3  $\alpha$ -спіральні ділянки – 2 короткі у ланцюзі А (синій колір) та 1 довгу у ланцюзі В (зелений колір), ланцюги з'єднанні дисульфідними зв'язками (помаранчевий колір)

Секреція інсуліну у осіб без ЦД класифікується за двома основними режимами: прандіальна (стимульована прийомом їжі) та базальна (фонове виділення гормону, яке підтримує стабільний рівень глюкози в крові між прийомами їжі та протягом нічного періоду). Пікові концентрації інсуліну в сироватці крові, зумовлені панкреатичною відповіддю на прийом їжі, зазвичай сягають 60–80 мкОд/мл, базальні рівні підтримуються в діапазоні 5–15 мкОд/мл [22]. Зважаючи на суттєву різницю в потребах організму в

інсуліні в цих двох станах, ключові наукові розробки були спрямовані на отримання форм інсуліну, які б відповідали специфічним фармакокінетичним (ФК) і фармакодинамічним (ФД) профілям, необхідним для ефективного заміщення як прандіальної, так і базальної секреції. Контроль глікемії у пацієнтів із ЦД здійснюється за допомогою двох основних підходів до введення інсуліну: багаторазові щоденні ін'єкції (за допомогою шприц-ручок або інсулінових шприців) або безперервна підшкірна інфузія інсуліну (за допомогою інсулінової помпи), що дозволяє оперативно коригувати дози (як базальної швидкості, так і болюсних (додаткових) доз) відповідно до поточних метаболічних потреб пацієнта [23].

Золотим стандартом інсулінотерапії є базал-болусна терапія, яка спрямована на імітацію фізіологічного вироблення інсуліну клітинами підшлункової залози. Вона поєднує в собі інсулін тривалої та швидкої дії шляхом багаторазових щоденних ін'єкцій. Форма тривалої дії зазвичай вводиться перед сном і забезпечує базальний рівень інсуліну, тоді як швидка форма вводиться для протидії пікам глюкози на прийом їжі, оскільки вона має швидкий початок та коротшу тривалість дії [24].

На сьогоднішній день на фармацевтичному ринку представлені типи інсулінів з різним часом початку

дії, піком та тривалістю (табл. 1), виробництво яких, починаючи з 1982 року після появи першого комерційно доступного рекомбінантного інсуліну Humulin® від Eli Lilly [12], здійснюється за допомогою технології рДНК [11]. Подальші досягнення в технології рДНК у поєднанні з глибоким розумінням молекулярних особливостей інсуліну та профілю його ендогенної секреції дозволили створити аналоги з поліпшеними фармакологічними характеристиками порівняно з існуючими препаратами людського інсуліну [25–27].

Таблиця 1

## Характеристика препаратів інсуліну, схвалених FDA [28] та EMA [29]

Тип інсуліну	Діюча речовина, торгова назва, форма випуску*, виробник	Початок дії	Пік дії	Тривалість дії	Час введення
1	2	3	4	5	6
Швидкої дії	<b>Аналоги:</b>  1. <i>Інсулін ліспро</i> – Humalog, Humalog KwikPen, Humalog Junior KwikPen (Eli Lilly) – Admelog, Admelog SoloStar (Sanofi) – «follow-on» версія  2. <i>Інсулін аспарт</i> – NovoLog (FDA) / NovoRapid (EMA), NovoLog FlexPen, NovoLog FlexTouch, NovoLog PenFill, NovoLog PumpCart, ReliOn NovoLog, ReliOn NovoLog FlexPen (Novo Nordisk)  3. <i>Інсулін аспарт-szjj</i> (біосиміляр до Novolog) – Merilog, Merilog SoloStar (Sanofi)  4. <i>Інсулін аспарт-xjhz</i> (взаємозамінний біосиміляр до Novolog) – Kirsty, Kirsty Prefilled Pen (Biocon Biologics та Viatris)  5. <i>Інсулін глулізин</i> – Apidra, Apidra SoloStar (Sanofi)	10–20 хв	1–3 год	3–5 год	перед їжею (0–15 хв до)
	<b>Людський інсулін</b> (інгаляційний):  6. <i>Людський інсулін</i> – Afrezza (MannKind Corporation)	до 15 хв	30–60 хв	2,5–3 год	на початку прийому їжі
	<b>Інсуліни ультрашвидкої дії</b> (з екципієнтами):  7. <i>Інсулін аспарт</i> (з ніацинамідом та L-аргініном) – Fiasp, Fiasp FlexTouch, Fiasp PenFill (Novo Nordisk)  8. <i>Інсулін ліспро-aabc</i> (з цитратом та трепростинилом) – Lyumjev, Lyumjev KwikPen (Eli Lilly)	5–10 хв	1–3 год	3–5 год	одразу перед їжею або до 20 хв після початку їжі
Короткої (простої) дії	<b>Людський інсулін</b> ( <i>регулярний</i> )  – Humulin R U-100 (Eli Lilly) – Novolin R (FDA) FlexPen / Actrapid (EMA) FlexPen, Novolin R ReliOn, Novolin R FlexPen ReliOn (Novo Nordisk)  – Muxredlin (Baxter Healthcare Corporation)	30 хв–1 год	2–3 год	5–8 год	за 30 хв до прийому їжі
Середньої дії (проміжний)	<b>Ізофан-інсулін</b> (NPH)  – Humulin N, Humulin N KwikPen (Eli Lilly) – Novolin N (FDA) / Insulatard (EMA), Novolin N FlexPen, Novolin N ReliOn, Novolin N FlexPen ReliOn (Novo Nordisk)	1–3 год	6–10 год	10–18 год	1 або 2 рази на добу

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6
Тривалої дії	<b>Концентрований простий інсулін:</b> 1. <i>Людський інсулін</i> – Humulin R U-500, Humulin R U-500 KwikPen (Eli Lilly) <b>Аналоги:</b> 2. <i>Інсулін гларгін</i> 2а. <i>Інсулін гларгін U-100</i> – Lantus, Lantus SoloStar (Sanofi) – Basaglar (FDA) / Abasaglar (EMA) KwikPen (Eli Lilly та Boehringer Ingelheim) – «follow-on» версія 2б. <i>Інсулін гларгін-yfgn</i> (взаємозамінний біосиміляр до Lantus) – Semglee-yfgn, Semglee Pen (Biocon Biologics та Viatris) 2в. <i>Інсулін гларгін- aglr</i> (взаємозамінний біосиміляр до Lantus) – Rezvoglar KwikPen (Eli Lilly)	30 хв – 1,5 год	2–4 год	До 24 год	2 або 3 рази на добу перед їжею
	3. <i>Інсулін гларгін U-300</i> – Toujeo SoloStar, Toujeo Max SoloStar (Sanofi)	2-6 год	без вираженого піку	30-36 год	1 раз на добу (в той самий час)
	6. <i>Інсулін детемір</i> – Levemir (Novo Nordisk)	1–2 год	6–8 год	20–24 год	1 або 2 рази на добу
	7. <i>Інсулін деглудек</i> – Tresiba, Tresiba FlexTouch (Novo Nordisk)	30 хв– 1,5 год	без вираженого піку	більше 42 год	1 раз на добу (гнучкий час введення)
	8. <i>Інсулін ікодек</i> – Awiqli ((Novo Nordisk) тільки EMA)	1–2 год	без вираженого піку	196 год	1 раз на тиждень (в той самий день)
Комбіновані (біфазні та премікси)	<b>Біфазні NPH і людського інсуліну:</b> 1. <i>Інсулін ізофан/простий інсулін 70/30</i> – Humulin 70/30, Humulin 70/30 KwikPen (Eli Lilly) – Novolin 70/30 (FDA) / Mixtard 30 (EMA), Novolin 70/30 FlexPen, Novolin 70/30 FlexPen ReliOn (Novo Nordisk) 2. <i>Інсулін ізофан/простий інсулін 60/40</i> – Mixtard 40 (тільки EMA), Mixtard 40 FlexPen (Novo Nordisk) 3. <i>Інсулін ізофан/простий інсулін 50/50</i> – Mixtard 50 (тільки EMA), Mixtard 50 FlexPen (Novo Nordisk) <b>Біфазні аналогів:</b>	30 хв–1 год	2–12 год	10–16 год	1 або 2 рази на добу перед їжею
	4. <i>Інсулін ліспро протамін/інсулін ліспро 50/50</i> – Humalog Mix 50/50, Humalog Mix 50/50 KwikPen (Eli Lilly)	10–20 хв	1–8 год	10–24 год	1 або 2 рази на добу перед їжею
	5. <i>Інсулін ліспро протамін/інсулін ліспро 75/25</i> – Humalog Mix 75/25, Humalog Mix 75/25 KwikPen (Eli Lilly)				
	6. <i>Інсулін аспарт протамін/інсулін аспарт 50/50</i> – NovoLog Mix 50/50 (FDA) / NovoMix 50 (EMA) PenFill, NovoLog Mix 50/50 FlexPen (Novo Nordisk)				
	7. <i>Інсулін аспарт протамін/інсулін аспарт 70/30</i> – NovoLog Mix 70/30 (FDA) / NovoMix 30 (EMA), NovoLog Mix 70/30 FlexPen (Novo Nordisk)				
	8. <i>Інсулін аспарт протамін/інсулін аспарт 30/70</i> – NovoMix 70 (тільки EMA), NovoMix FlexPen (Novo Nordisk)				
	<b>Премікси:</b>	10–20 хв	1–4 год	10–24 год	1 або 2 рази на добу перед їжею
	9. <i>Інсулін деглудек/інсулін аспарт</i> – Ryzodeg 70/30 FlexTouch (Novo Nordisk)				
	<b>Премікси інсулінів та агоністів GLP-1:</b>	1–1,5 год	без вираженого піку	до 24 год	1 раз на добу
	10. <i>Інсулін деглудек та ліраглутид</i> – Xultophy 100/3.6 FlexTouch (Novo Nordisk)				
	11. <i>Інсулін гларгін та ліксисенатид</i> – Soliqua (FDA) / Suliqua (EMA) 100/33 SoloStar (Sanofi)				

*Примітка: \* – більшість препаратів інсуліну випускаються у двох основних формах для підшкірного введення: флакони для багаторазових доз та попередньо наповненні шприц-ручки. Для введення інсуліну з флакона пацієнт використовує інсуліновий шприц або інсулінову помпу. Одноразові шприц-ручки: KwikPen (Eli Lilly), SoloStar (Sanofi), FlexPen / FlexTouch (Novo Nordisk), Kirsty Prefilled Pen; багаторазові шприц-ручки зі змінними картриджами: PenFill (Novo Nordisk). Інфузійна форма: інсуліни швидкої та ультрашвидкої дії у флаконах можуть використовуватися для наповнення резервуарів інсулінових помп для безперервної підшкірної інфузії; внутрішньовенна інфузія у флаконах або готових мішках (Muxredlin) в умовах стаціонару (для невідкладних станів, діабетичного кетоацидозу або госпітального контролю глікемії). Інгаляційна форма (Afrezza) випускається у формі сухого порошку в одноразових картриджах, які вводяться за допомогою інгалятора Dreamboat Inhaler.*

Ключовим моментом у вивченні інсуліну стало визначення його тривимірної структури, що показало здатність молекули асоціюватися у димеру та вищі асоційовані форми [30, 31] та у подальшому було враховано при розробці комерційних препаратів інсуліну [32, 33]. Про здатність іонів металів, зокрема цинку, подовжувати активність інсуліну, повідомили ще у 1935 році дослідницькі групи Максвелла (Maxwell) та Скотта (Scott) [34, 35], а механізм цього явища став зрозумілим у 1969 році після вивчення тривимірної структури інсуліну в димерній та гексамерній формах за допомогою рентгенівської кристалографії [30] та подальших робіт піонерів цієї галузі, включаючи лауреатку Нобелівської премії Дороті Ходжкін (Dorothy Hodgkin) [36, 37].

Гормон захищений від неправильного згортання в  $\beta$ -клітинах за допомогою  $Zn^{2+}$ -стабілізованої

асоціації та мікрокристалізації. Клітинні везикули, що зберігають інсулін, досить кислі, що додатково знижує розчинність і посилює кристалічне пакування інсуліну. Фізіологічно інсулін депонується у  $\beta$ -клітинах підшлункової залози у вигляді гексамеру, утвореного трьома димерами [18]. У димеризацію інсуліну переважно залучені С-кінцеві амінокислотні залишки В-ланцюга (Phe<sub>24В</sub> – Tyr<sub>26В</sub>). Гексамер стабілізований двома іонами цинку. Кожен іон цинку координується залишком гістидину (His, H) ланцюга В His<sub>10В</sub> від трьох сусідніх мономерів; до структурної організації гексамеру також залучені амінокислотні залишки обох ланцюгів (Ala<sub>14А</sub>, Leu<sub>17А</sub>, Leu<sub>13В</sub>, Tyr<sub>14В</sub>, Glu<sub>17В</sub>). Таким чином, утворені кристали гексамеру інсуліну демонструють трикратну симетрію – у центрі знаходяться два іони цинку, оточені трьома димерами (шістьма молекулами інсуліну) (рис. 2) [21].

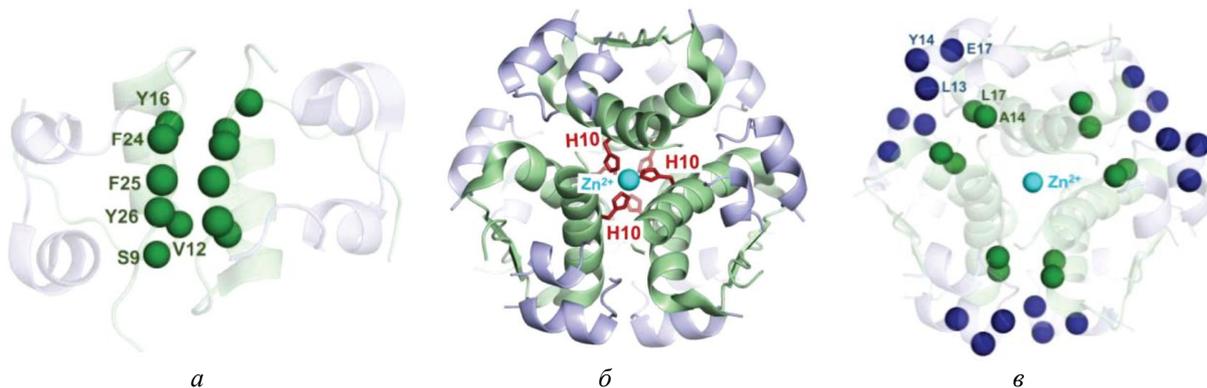


Рис. 2. Структурна організація гексамеру інсуліну (Ілюстрація взята з [21]): *a* – Димер інсуліну із залученням С-кінцевих залишків В-ланцюга (переважно F24 – Phe<sub>24В</sub>, F25 – Phe<sub>25В</sub>, Y26 – Tyr<sub>26В</sub>); *б* – Гексамер інсуліну з двома іонами цинку, кожен з яких координується залишком гістидину ланцюга В (H10 – His<sub>10В</sub>); *в* – Структурна організація гексамеру із залученням амінокислотних залишків обох ланцюгів (ланцюга А (зелений колір) A14 – Ala<sub>14А</sub>, L17 – Leu<sub>17А</sub>; ланцюга В (синій колір) L13 – Leu<sub>13В</sub>, Y14 – Tyr<sub>14В</sub>, E17 – Glu<sub>17В</sub>)

Гексамери інсуліну є неактивними і в цьому стані не можуть виконувати свою біологічну функцію. Коли підшлункова залоза вивільняє інсулін у кров'яне русло, концентрація іонів цинку знижується, гексамери дисоціюють до димерів і мономерів та стають активними. Таким чином, рівновага і перехід від гексамерів інсуліну до мономерів є критично важливими з фармакологічної точки зору.  $Zn^{2+}$ -стабілізовані гексамери використовуються у комерційних препаратах для уповільнення вивільнення інсуліну [38, 39].

Окремої уваги заслуговує інша властивість інсуліну, що впливає на швидкість дії препарату, – існування гексамерів у трьох алостеричних станах – T<sub>6</sub>, T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> та R<sub>6</sub> (T – tense, напружений стан, R – relaxed, розслаблений стан) та можливість структурного пе-

реходу молекули із одного стану в інший (T $\leftrightarrow$ R перехід) [40]. Для розуміння цього явища повернемося до будови мономеру інсуліну. Третинна структура молекули складається з трьох  $\alpha$ -спіралей: А-ланцюг містить дві короткі спіралі (залишки Gly<sub>1А</sub> – Ser<sub>9А</sub> та Leu<sub>13А</sub> – Tyr<sub>19А</sub>), В-ланцюг – одну велику спіраль (залишки Phe<sub>1В</sub> – Cys<sub>19В</sub>) (рис. 1, Б). Але перші вісім залишків на N-кінці В-ланцюга (Phe<sub>1В</sub> – Gly<sub>8В</sub>) кожного мономеру в гексамері інсуліну здатні до структурного переходу від спіралі (R-стан) до неупорядкованого подовженого фрагменту (T-стан) за певних умов (у різних середовищах розчинників). Так, при отриманні кристалів інсуліну в середовищі низьких концентрацій іонів хлориду ці залишки на N-кінці В-ланцюга приймають витягнуту (неупорядковану) конформацію, що нагадує  $\beta$ -поворот (T<sub>6</sub>, рис. 3, А);

при вищих концентраціях іонів хлориду та інших од-нозарядних неорганічних аніонів В-ланцюга трьох мономерів мають неупорядковану конформацію, а залишки Gln<sub>4В</sub> – Cys<sub>19В</sub> залишаються  $\alpha$ -спіральними в інших трьох мономерних гексамеру (T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, рис. 3, Б); у присутності низькомолекулярних циклічних спиртів (фенол, крезол, резорцин, гексанол, пентанол), залишки В-ланцюга (Phe<sub>1В</sub> – Cys<sub>19В</sub>) кожного мономера гексамеру мають  $\alpha$ -спіральну конформацію (R<sub>6</sub>, рис. 3, В). У вигляді гексамеру R<sub>6</sub> інсулін зберігається в підшлунковій залозі та при потраплянні в кров легко дисоціює на мономери [41–43]. Точне фізіологічне значення конформаційного переходу T $\leftrightarrow$ R в N-кінцевих

залишках В-ланцюга інсуліну досі потребує повного з'ясування, але це явище використовується у виробництві препаратів інсуліну для регулювання швидкості вивільнення гормону. Так, зв'язування зовнішніх лігандів (фенольні сполуки, такі як фенол, крезол, метилпарабен, які містяться у комерційних препаратах інсуліну як антимікробні речовини) з гідрофобними кишеними гексамеру, спричиняє структурну зміну (T $\leftrightarrow$ R перехід) [44], що підвищує хімічну стабільність інсуліну в комерційних препаратах [45, 46]. Стабілізація інсулінового гексамеру у T- або R-формі шляхом додавання фенолів дозволяє розробляти препарати інсуліну з пролонгованою або швидкою дією [21].

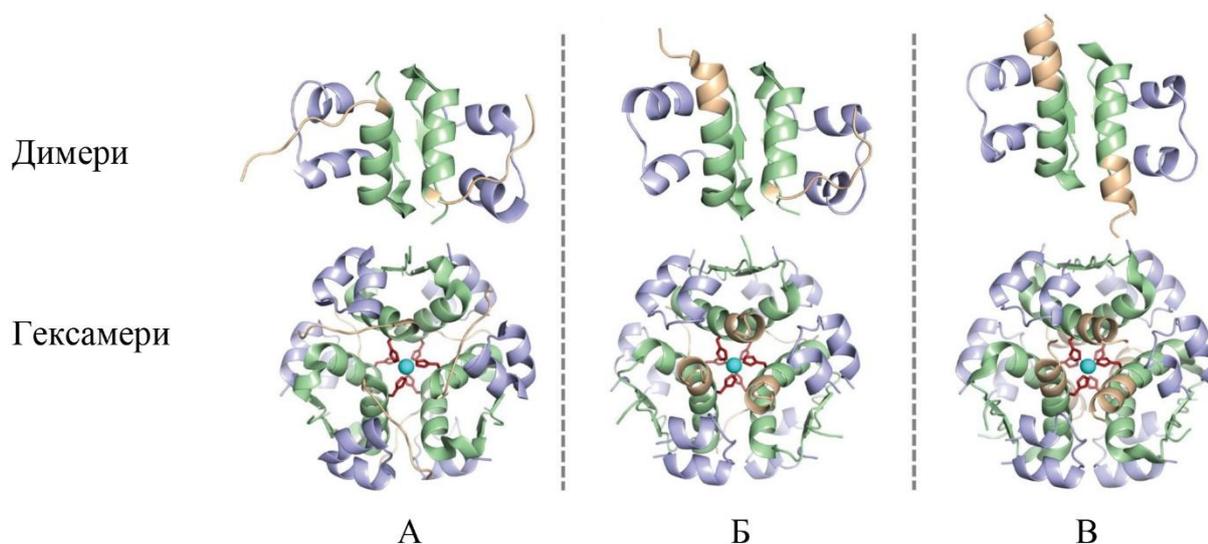


Рис. 3. Конформаційні стани інсуліну: А – T<sub>6</sub>; Б – T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>; В – R<sub>6</sub> (Ілюстрація взята з [21]).  
Ланцюги А – синій колір, ланцюги В – зелений колір, залишки Phe<sub>1В</sub> – Gly<sub>8В</sub> – світло-коричневий колір

Додавання іонів цинку до розчинів інсуліну для досягнення пролонгованої активності використовувалась ще в епоху тваринних інсулінів. Так, в препаратах серії ленте (семіленте, ленте, ультраленте), розроблених у 1950-х роках Халлас-Мьолером (Hallas-Møller) та співробітниками з тодішньої Novo Terapeutisk (зараз Novo Nordisk), використовували свинячий та бичачий інсуліни, які мають різну розчинність при рН 7,4. [47, 48]. Це були пролонговані препарати інсуліну, створені шляхом комплексоутворення нейтральних суспензій інсуліну з іонами цинку. Комерційний інсулін ленте (Pletin®, цинк-інсулінова суспензія) складався з 30% аморфного свинячого інсуліну (семіленте, проміжної дії) та 70% кристалічного бичачого інсуліну (ультраленте, пролонгованої дії). Пізніше Novo Nordisk випустила інші інсуліни серії ленте Monotard® (100% свинячого інсуліну) та Rapitard® (25% свинячого / 75% бичачого кристалічного інсуліну) [49], а з 2000-х років почалося виробництво рекомбінантних людських інсулінів ленте середньої тривалості дії – Humulin® L (Eli Lilly and Company) та Novolin® L (Novo Nordisk). Ці препарати являли собою суспензії цинк-інсуліну, де іони цинку стабілізують гексамери інсуліну, уповільнюючи абсорбцію з підшкірного депо. Як і препарати регулярних інсулінів лінійок Humulin® [50] та

Novolin® (реєстрація FDA – Novolin® R, EMA – Actrapid®) [51], вони вироблялися за технологією рДНК з використанням бактерій *Escherichia coli* (Eli Lilly) або дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Novo Nordisk) [11]. Після появи аналогів інсуліну, зокрема тривалої дії – гларгіну, інсуліни ленте почали втрачати популярність. Наразі інсулін ленте схвалений лише для застосування у ветеринарії (Vetsulin®, Merck Animal Health, свиняча цинк-інсулінова суспензія) [52], але саме дослідження процесів осадження та кристалізації Zn<sup>2+</sup>-інсулінів [53, 54] передвістили відкриття алостеричного T $\leftrightarrow$ R переходу серед цинк-інсулінових гексамерів.

Окрім стабілізації інсуліну іонами цинку, продовжує дію гормону і використання сильнолужних білків, зокрема протаміну. Вперше використання протаміну разом з інсуліном запропонував Хагедорн (Hagedorn) із колегами у 1936 році, створивши пролонгований інсулін проміжної дії – нейтральну суспензію протамін-інсуліну [55]. На основі цієї форми Скотт (Scott) і Фішер (Fisher) розробили протамін-цинк інсулін, який містив надлишок протаміну та невелику кількість цинку [56], а у 1946 році Краєнбуль (Kraeynbühl) і Розенберг (Rosenberg) – більш стабільну модифікацію, що поєднувала інсулін і протамін у так званих «ізофанних» пропорціях (без надлишку

інсуліну і протаміну) при нейтральному рН із невеликою кількістю цинку та фенолу (або його похідних), яка отримала назву кристалічний нейтральний протамін Хагедорна (НПХ-інсулін), або ізофан-інсулін [57]. Кристалічний НПХ-інсулін можна було попередньо змішувати з інсуліном проміжної дії (розчинним інсуліном) та вводити один або два рази на добу як самостійно, так і в комбінації. Використання протаміну як агента, що уповільнює всмоктування і подовжує дію інсуліну, залишається актуальним і науково обґрунтованим принципом у фармацевтичній розробці і після впровадження технологій рДНК. Зокрема, компанії Eli Lilly and Company та Novo Nordisk серед препаратів лінійок Humulin® та Novolin® мають і NPH або ізофан-інсуліни (Humulin® N, Novolin® N (FDA) / Insulatard® (EMA)), а також комбіновані біфазні – інсулін ізофан та простий інсулін (Humulin® 70/30, Novolin® 70/30 (FDA) / Mixtard® 30, 40, 50 (EMA)) [28, 50, 51].

З додавання цинку та/або протаміну для стабілізації гексамерів почалася розробка інсулінів тривалої дії, але ці підходи мали певні обмеження, включаючи варіабельність абсорбції та ризик гіпоглікемії [32]. Альтернативна стратегія ацилювання жирними кислотами була запропонована в 1990-х роках [58], натхненна природними властивостями альбуміну транспортувати жирні кислоти [59, 60]. Цей метод дозволяє інсуліну зворотно зв'язуватися з сироватковим альбуміном, що є основним транспортним білком плазми з періодом напіввиведення близько 19 днів [61, 62]. В результаті досягається повільне вивільнення інсуліну, імітація базальної секреції та зменшення частоти ін'єкцій, що покращує комплаєнс пацієнтів з цукровим діабетом. В перших дослідженнях Куртцхальс (Kurtzhals) із колегами для пошуку оптимального профілю синтезували серію похідних інсуліну шляхом ацилювання жирними кислотами з різною довжиною вуглецевого ланцюга та різною спорідненістю до альбуміну [58], а дослідження Вітінгема (Whittingham) з колегами описували кристалічну структуру ацилюваного інсуліну, в структурі якого тетрадеканова (міристинова) кислота приєднана до Lys29<sub>B</sub>, забезпечуючи зворотне зв'язування з альбуміном [63]. Після ін'єкції модифікований інсулін самоасоціюється в гексамери, уповільнюючи абсорбцію. У крові близько 98-99% інсуліну (залежно від афінності до білка) зв'язується з альбуміном через неполярні та іонні взаємодії, надалі відбувається поступове вивільнення – інсулін дисоціює від альбуміну, зв'язується з інсуліновими рецепторами на клітинах, знижуючи рівень глюкози в крові [58, 62].

Іншою важливою властивістю молекули інсуліну, стало визначення її сумарного заряду. У денатурованому стані інсулін має ізоелектричну точку (pI) 5,3, що зумовлює наявність негативного заряду молекули при нейтральному рН [64]. Він формується внаслідок потенціалу іонізації чотирьох залишків глутамінової кислоти (Glu, E), чотирьох залишків тирозину (Tyr, Y), двох залишків гістидину (His, H), залишку лізину (Lys, K) та залишку аргініну (Arg, R), а також двох α-карбокських і двох α-аміногруп (-COOH, -NH<sub>2</sub> на кожному ланцюзі) (рис. 1, A). Вплив на зміщення позитивних та негативних зарядів

в межах молекули інсуліну було покладено в основу принципу ізоелектричного осадження препаратів базальних аналогів інсуліну. Хоча інсулін добре розчинний при значеннях рН >7 або <5, між цими значеннями білок оборотно піддається ізоелектричному осадженню [39]. Осадження інсуліну поблизу своєї ізоелектричної точки потребує зсуву рІ до нейтрального значення для забезпечення осадження у підшкірному депо (де рН близько 7,4). Цей принцип лежить в основі розробки гларгіну [65] (Lantus®, Sanofi, з концентрацією U-100 (100 міжнародних одиниць, МО) інсуліну в 1 мл розчину), який у 2000 році став першим аналогом інсуліну тривалої дії впровадженим у клінічну практику. Гларгін є аналогом людського інсуліну, виробленим за технологією рДНК із застосуванням сайт-специфічного мутагенезу для введення точкових мутацій амінокислот, зокрема: подовження С-кінця В ланцюга шляхом додавання двох залишків аргініну Arg31<sub>B</sub>, Arg32<sub>B</sub>, позитивно заряджені бічні ланцюги яких зміщують рІ з 5,8 до 7,0, та заміна Asn21<sub>A</sub> → Gly21<sub>A</sub> у ланцюзі А, що забезпечує більшу стабільність при кислому рН (препарат випускається при рН 4) та робить інсулін гларгін менш розчинним при нейтральному рН (рис. 4) [38]. Як наслідок, після підшкірної ін'єкції гларгін утворює аморфний преципітат у підшкірній тканині, що уповільнює його абсорбцію та подовжує тривалість дії. [66]. У 2015 році була затверджена концентрована версія гларгіна U-300 – Toujeo® (Sanofi-Aventis), що забезпечувала плавніше вивільнення та зменшення об'єму ін'єкції [67].

У 2015 році, після закінчення патентного захисту Lantus®, компанія Eli Lilly and Company спільно з Boehringer Ingelheim виводять на ринок свій інсулін гларгін. Цей продукт отримав реєстрацію FDA як «follow-on» версія (подібний біологічний продукт) під назвою Basaglar®, а EMA кваліфікувало його як біосиміляр, що реалізується під торговою назвою Abasaglar® [68]. Basaglar® не є повноцінним біосиміляром у розумінні FDA, оскільки був схвалений, коли інсуліни ще регулювалися як звичайні ліки (NDA, New Drug Application – заявка на реєстрацію нового лікарського засобу), а не як біологічні продукти (BLA, Biologics License Application – заявка на отримання ліцензії на біологічний продукт) [69] і, відповідно, через інший регуляторний шлях (505(b)(2) NDA) [70], а не як біосиміляр (351(k) pathway) [71]. Після переходу інсулінів до категорії біологічних продуктів у 2020 році Basaglar® отримав статус окремого референсного продукту та увійшов до офіційного списку біологічних продуктів FDA Purple Book [28].

Першими взаємозамінними біосимілярами інсуліну, схваленими FDA, були саме препарати інсуліну гларгін, і на сьогодні вони залишаються єдиними серед біосимілярів до інсулінів тривалої дії. У липні 2021 році схвалено гларгін-yfgn (Semglee®, Biocon Biologics та Viatris), у грудні 2021 році – гларгін-aglr (Rezvoglar®, Eli Lilly), які є біосимілярами до референсного Lantus® [72].

Сучасні розробки препаратів тривалої дії включають комбінацію технологій ацилювання з модифікацією жирних кислот та сайт-специфічного му-

тагенезу для введення точкових мутацій амінокислот в молекулі інсуліну для оптимізації стабільності, розчинності та афінності до рецепторів [62]. Модифікації жирних кислот при ацилюванні збільшують спорідненість інсуліну до альбуміну, що сприяє повільнішому та більш тривалому вивільненню гормону. Отримані препарати складаються із остова інсуліну, жирної довогланцогової дикислоти (зазвичай C14-C22), лінкера та спейсера. Приєднання жирної кислоти до інсуліну відбувається через ацилювання  $\epsilon$ -аміногрупи лізину Lys29<sub>B</sub>. Жирна дикислота у ацилюваному інсуліні взаємодіє з гідрофобними кишнями альбуміну, причому довжина ланцюга жирної кислоти впливає на афінність – довші ланцюги посилюють гідрофобні взаємодії, подовжуючи напіввиведення. Лінкер ( $\gamma$ -глутамат,  $\gamma$ Glu) додає негативний заряд для підвищення гідрофільності та зменшення агрегації. Спейсер (олігоетиленгліколь, OEG) забезпечує гнучкість та просторову відстань між сайтами зв'язування з рецептором інсуліну та альбуміном, запобігаючи інтерференції. Варіювання кількостями OEG у спейсері або  $\gamma$ Glu у лінкері також впливає на афінність [73].

Застосування технологій сайт-специфічного мутагенезу, що передбачає цілеспрямовану заміну окремих амінокислот, забезпечує покращення стабільності та розчинності білка та спорідненість до рецептора інсуліну. Наприклад, видалення треоніну Thr30<sub>B</sub> (desThr30<sub>B</sub>) дозволяє приєднати жирну кислоту до лізину Lys29<sub>B</sub> без стеричних перешкод [73].

Комбінацією технологій ацилювання з модифікацією жирних кислот та сайт-специфічного мутагенезу або хімічної модифікації амінокислот створені інші інсуліни тривалої дії – детемір (Levemir®, Novo Nordisk, але виробник оголосив про припинення його виробництва до кінця 2026 р. через перехід на новіші інсуліни тривалої дії), деглудек (Tresiba®, Novo Nordisk) та новий аналог інсуліну, призначений для щотижневого дозування, ікодек (Awiqli®, Novo Nordisk).

Детемір став другим базальним аналогом інсуліну та першим ацильованим похідним, доступним для клінічного використання з 2005 року. Препарат випускається у розчинній формі з нейтральним рН, містить R6 цинк-гексамери, отримані технологією рДНК, і відрізняється від молекули людського інсуліну двома модифікаціями: видаленням кінцевої амінокислоти треоніну з В ланцюга desThr30<sub>B</sub> та додаванням міристинового залишку жирної кислоти (C14) до  $\epsilon$ -аміногрупи залишку лізину Lys29<sub>B</sub> (рис. 4) [74, 75].

Але пряме приєднання 14-вуглецевої ацильної групи обумовлює зниження спорідненості до інсулінового рецептора [76], що вимагає значно вищих концентрацій діючої речовини для досягнення біологічної активності, еквівалентної препаратам людського інсуліну [77–80].

Оптимізація ацильної модифікації та включення лінкера призвели до створення інсуліну деглудек [81]. Препарат випускається з 2015 року у вигляді розчину із нейтральним рН. Як і детемір він має видалений треонін (desThr30<sub>B</sub>), але відрізняється приєднанням гексадекандіоїлової кислоти (C16) через  $\gamma$ -L-глутамільний лінкер до Lys29<sub>B</sub> за допомогою амідного зв'язку (рис. 4). Така структура дозволяє формувати гексамери, подібні до людського інсуліну, але з посиленою здатністю до самоасамблеї завдяки ацильній групі, яка сприяє лінійній полімеризації гексамерів [82, 83]. У препараті (з цинком та фенолом) деглудек існує у формі димеру цинк-гексамерів у стані T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, які з'єднані Glu-ацильною модифікацією в залишку Lys29<sub>B</sub>. У підшкірному депо відбувається T→R перехід інсуліну та ініціація лінійної мультигексамерної збірки – після підшкірної ін'єкції фенол дифундує, вивільнення зв'язаного фенольного ліганда викликає конформаційний перехід (T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> → T<sub>6</sub>), що запускає послідовне з'єднання гексамерів через ацильні групи. Це створює лінійні мультигексамери (сотні одиниць), з яких мономери повільно вивільнюються, забезпечуючи дію до 42 год без піків. Цей механізм забезпечує існування інсуліну як стабільних дигексамерів у препараті з цинком та фенолом, а після ін'єкції – як лінійних мультигексамерів [81, 83].

Подальша оптимізація стратегії ацилювання та успіх агоністів GLP-1 для щотижневого введення [84] призвели до створення інсуліну ікодек [85], який отримав схвалення для клінічного застосування з 2024 року як перший базальний аналог інсуліну для щотижневого дозування. Цей аналог, подібно до деглудеку, відрізняється від людського інсуліну видаленням треоніну desThr30<sub>B</sub> та ацилюванням залишку лізину Lys29<sub>B</sub>, але довшою та складнішою жирною дикислотою (C20 дикислота), з'єднаною через спейсер (OEG) та лінкер ( $\gamma$ Glu), що посилює зв'язування з сироватковим альбуміном. Додатково введені мутації включають заміни в В-ланцюзі (Tyr16<sub>B</sub>→His та Phe25<sub>B</sub>→His), які зменшують афінність до рецептора інсуліну, уповільнюючи кліренс та протеоліз, а також заміну в А-ланцюзі (Tyr14<sub>A</sub>→Glu), що підвищує термодинамічну стабільність мономеру (рис. 5) [86]. Завдяки цим модифікаціям ікодек досягає максимальної концентрації через 16 год після підшкірної ін'єкції з періодом напіввиведення 196 год, забезпечуючи ультрадовгі ФК та ФД профілі без виражених піків, що робить його придатним для щотижневого введення [87]. Awiqli® (інсулін ікодек) був схвалений ЕМА у липні 2024 року для лікування діабету 1 і 2 типу у дорослих [88]; станом на грудень 2025 року повторна заявка BLA від Novo Nordisk знаходиться на розгляді FDA [89].

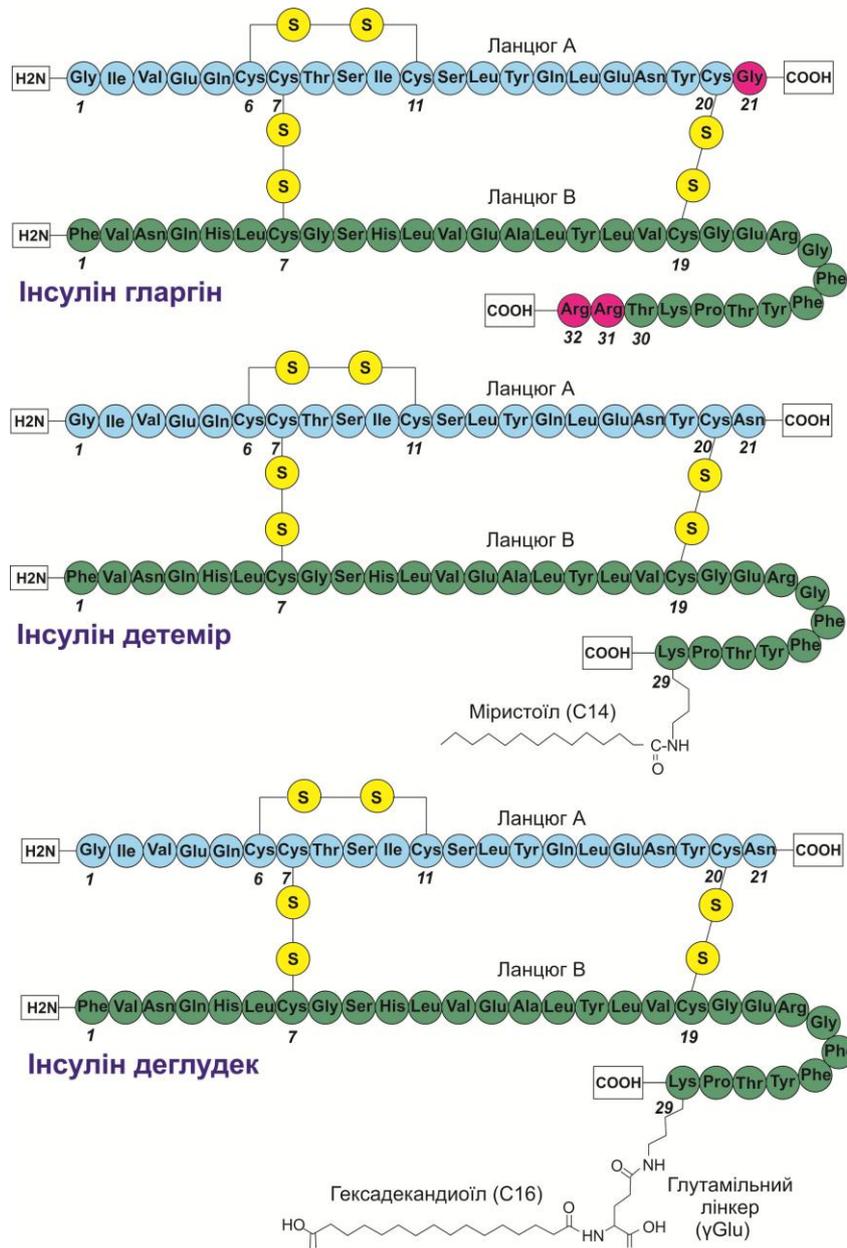


Рис. 4. Первинна будова аналогів інсуліну тривалої дії гларгіну, детеміру, деглудеку

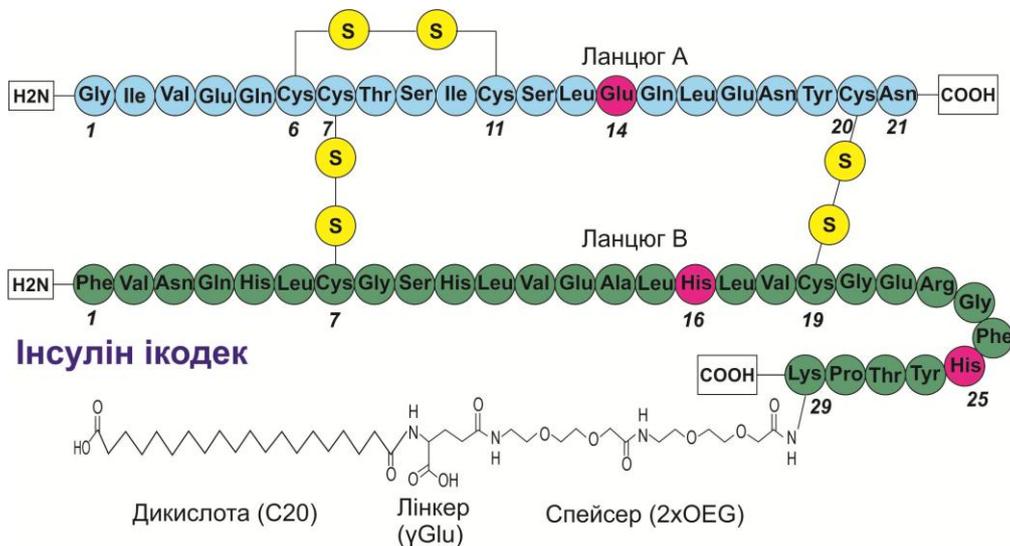


Рис. 5. Первинна будова аналога інсуліну тривалої дії ікодеку

Вдосконалення структури аналогів інсуліну тривалої дії шляхом мутацій амінокислот та модифікацій бічного ланцюга жирних кислот триває, прикладом цієї інноваційної стратегії є синтезований та кон'югований перспективний аналог TBE001-A-S033 [73].

Отже, для розробки форм інсуліну з різними ФК та ФД використовують різні підходи. Виробництво форм тривалої дії забезпечується стабілізацією гексамера шляхом комплексоутворення з цинком та/або протаміном. Інша стратегія включає приєднання довголанцюгової жирної кислоти для посилення зв'язування інсуліну з сироватковим альбуміном. Відповідно, стратегії отримання препаратів ультракороткої дії спрямовані на забезпечення перебування інсуліну в мономерній формі, що зазвичай досягається шляхом мутацій, які дестабілізують взаємодії антипаралельної  $\beta$ -структури між мономерами.

Вище було розглянуто застосування сайт-специфічного мутагенезу при отриманні аналогів інсулінів тривалої дії. Але за цим же принципом створюються цілеспрямовані заміни окремих амінокислот, зміщуючи властивості самоасоціації інсуліну на користь мономерних форм і, як наслідок, збільшуючи швидкість абсорбції [25, 38].

Історія розробки препаратів ультракороткої дії почалася в 1990-х років з впровадження технологій мутагенезу для подолання обмежень простого людського інсуліну, який утворює стабільні гексамери в присутності цинку, уповільнюючи абсорбцію [30]. Ці мутації не впливають на афінність до рецептора інсуліну, зберігаючи біологічну активність [90]. Першим аналогом став інсулін ліспро (Humalog®, Eli Lilly), схвалений FDA у 1996 році, де інверсія амінокислот Pro28<sub>B</sub>-Lys29<sub>B</sub> на Lys28<sub>B</sub>-Pro29<sub>B</sub> (рис. 5) дестабілізує димерний інтерфейс, зменшуючи схильність до олігомеризації та прискорюючи початок дії до 15 хв.; проте його тривалість є меншою порівняно з людським інсуліном короткої дії [25]. У 2000 році компанія Eli Lilly and Company виводить на ринок біфазні аналоги інсуліну ліспро протаміну (insulin lispro protamine suspension, проміжної дії) та інсуліну ліспро (insulin lispro, швидкої дії) – Humalog® Mix 50/50 та Humalog® Mix 75/25. Ці преміксовані форми імітують фізіологічну секрецію інсуліну в одній ін'єкції, зменшуючи кількість уколів до 2 на добу, та зручні для пацієнтів, які потребують як базальної, так і болюсної терапії. У 2017 році як «follow-on» (подібний) продукт до оригінального Humalog® за скороченням шляхом 505(b)(2) NDA FDA схвалює інсулін ліспро Admelog®, Sanofi. Цей препарат, як і Basaglar®, наразі входить до списку біологічних продуктів FDA Purple Book як окремий референсний продукт [28].

Аналогічно ліспро, інсулін аспарт (схвалений EMA у 1999 році як NovoRapid® та FDA у 2000 році як NovoLog®, Novo Nordisk) містить заміну амінокислот – проліну на негативно заряджену аспарагінову кислоту Pro28<sub>B</sub>→Asp (рис. 5), що послаблює гідрофобні взаємодії та сприяє швидкому розпаду гексамерів після ін'єкції [76]. За прикладом Eli Lilly and Company компанія Novo Nordisk з 2001 року випускає біфазні інсуліни NovoLog® Mix 50/50 та NovoLog® Mix 70/30 (FDA) / NovoMix 30 та 50 (EMA), що є сумішшю кристалічної протамінованої

форми (insulin aspart protamine, проміжної дії) та розчинного інсуліну аспарту (insulin aspart, швидкої дії) та забезпечують зниження рівня глюкози в крові зі швидким початком дії та середньою тривалістю [91]. Іншим прикладом преміксів від Novo Nordisk є препарат Ryzodeg® 70/30 (інсулін деглудек та інсулін аспарт), схвалений EMA у 2013 році, FDA – у 2015 році. Препарат поєднує базальну та болюсну компоненти в одній ін'єкції – деглудек утворює мультигексамери в підшкірному депо, забезпечуючи стабільне вивільнення до 42 год без піків, тоді як аспарт швидко абсорбується (початок 10–20 хв, пік 1–3 год). Загальна тривалість дії – до 24 год, що імітує фізіологічну секрецію інсуліну. Деглудек зв'язується з альбуміном для циркулюючого депо, зменшуючи варіабельність [91, 92].

У 2025 році FDA схвалено два біосиміляра до NovoLog® – Merilog® (insulin aspart-szjj, Sanofi) та Kirsty® (insulin aspart-xjhz, Biocon Biologics та Viatris); останній має статус взаємозамінного (interchangeable) [72].

Інсулін глулізин (Apidra®, Sanofi), схвалений 2004 року, має заміни Asn3<sub>B</sub>→Lys та Lys29<sub>B</sub>→Glu (рис. 5), що збільшує негативний заряд молекули при нейтральному рН, зменшуючи самоасоціацію та усуваючи потребу в цинку для формування (в ліспро та аспарті для стабілізації молекул додається цинк) [93]; також посилює стабільність препарату додавання полісорбату 20, що запобігає необоротному утворенню агрегатів з мономерів [94].

Для ще швидшої абсорбції розроблені ультрашвидкі форми з додаванням ексципієнтів [95, 96]. Інсулін аспарт у формуляції Fiasp®, Novo Nordisk, схвалений 2017 року, містить ніацинамід для посилення місцевої вазодилатації та L-аргінін для стабілізації, прискорюючи початок дії до 5–10 хв [97]. Аналогічно, інсулін ліспро у формуляції Lyumjev® (insulin lispro-aabc), Eli Lilly, схвалений 2020 року, містить цитрат для збільшення проникності судин та трепростинил (простациклін-аналог) для вазодилатації [98], досягаючи початку дії через 1-2 хв після ін'єкції [99].

Однією з останніх тенденцій у лікування діабету, зокрема ЦД2, є терапія на основі інкретинів, спрямована на рецептори глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), глюкозозалежного інсулінотропного поліпептиду (GIP) та глюкагону (GCGR). Наразі на різних стадіях розробки та впровадження знаходяться препарати агоністи GLP-1 (ліксисенатид, ліраглутид, ексенатид, альбіглутид, семаглутид), подвійні агоністи GLP/GIP (тірзепатид, сурвудутид, пемвідутид), потрібні агоністи GLP-1/ GIP/ GCGR (ретатрутид, ефоципегтрутид), тетрагоністи GLP-1/GIP/амілін/кальцитонін (PTT-A) [91, 100]. Популярність цих препаратів призвела до знаходження їх у топ-10 препаратів бестселерів за продажами у світі, де 4 з 10 позицій займають агоністи інкретинів для терапії ЦД та ожиріння – Mounjaro®, Eli Lilly (тірзепатид), Ozempic®, Novo Nordisk, (семаглутид), Wegovy®, Novo Nordisk (семаглутид), Zepbound®, Eli Lilly (тірзепатид) [101, 102]. Сучасні рекомендації наголошують, що індивідуалізація режимів лікування має враховувати уникнення як гіпоглікемії, так і збі-

льшення ваги [103]. Успіхи застосування комбінації інсуліну та агоністів обумовили вдосконалення форм інсулінів шляхом розробки комбінованих препаратів [104–107].

На ринку станом на 2025 рік доступні два основні препарати цієї групи, обидва схвалені FDA та EMA у 2016 році: Xultophy® 100/3.6 (інсулін деглу-

дек та ліраглутид), Novo Nordisk та Soliqua® (FDA) / Suliqua® (EMA) 100/33 (інсулін гларгін та ліксисенатид), Sanofi [28, 29]. Ці препарати є на ринку в США, Європі, зокрема і в Україні [108], і тенденція до їхнього використання продовжує зростати, оскільки вони дозволяють оптимізувати терапію з меншим навантаженням на пацієнта.

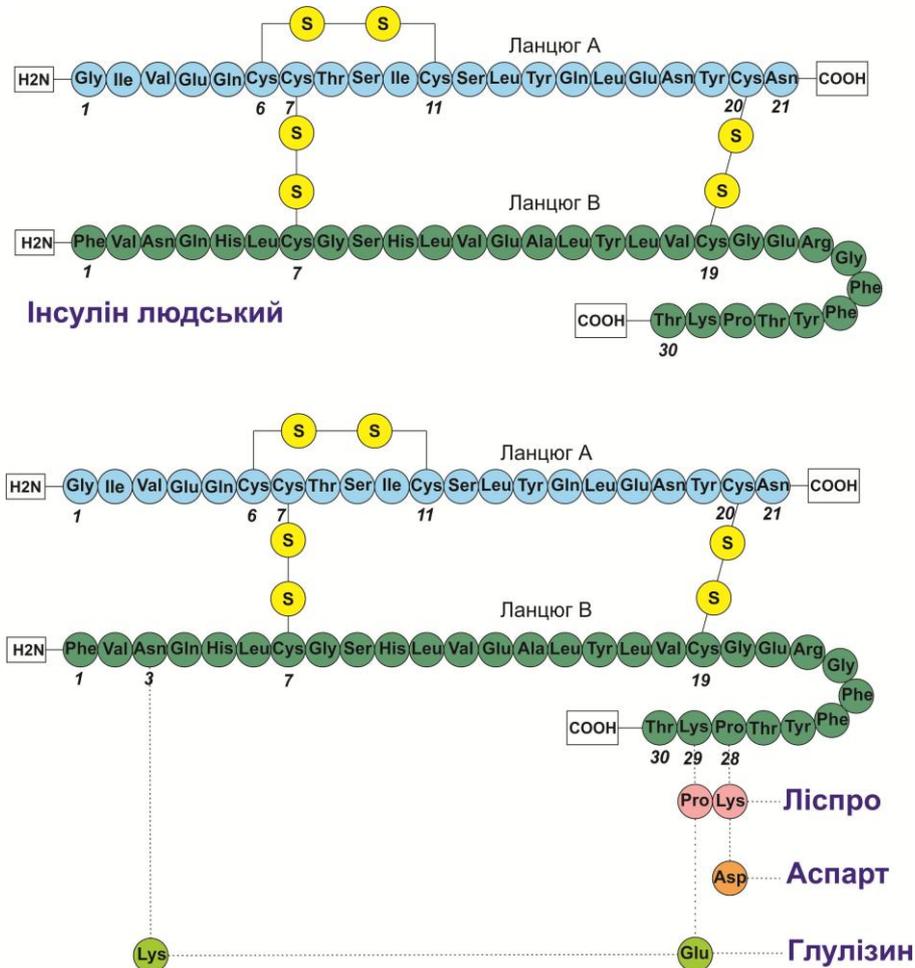


Рис. 5. Первинна будова аналогів інсуліну швидкої дії ліспро, аспарт, глулізін

Клінічну користь також може забезпечити комбінація аналогів інсуліну з іншими гормонами. При ЦДІ перспективним підходом є одночасне введення аналогів інсуліну та прамлінтиду (аналога аміліну), що імітує ендогенну косекрецію з бета-клітин. Прамлінтид (Symlin®, AstraZeneca Pharmaceuticals LP) – потрійний проліновий аналог людського панкреатичного пептиду аміліну. Препарат застосовується перед їжею, затримує спорожнення шлунку, допомагає зменшити апетит та знижує секрецію глюкагону після їжі, що сприяє зниженню рівня цукру в крові [109]. Поточно прамлінтид застосовується у вигляді ін'єкцій, проте ведуться активні дослідження, спрямовані на розробку пероральної форми на основі полімерних мікрочастинок, що забезпечують пролонговане вивільнення препарату [110]. Як і при одночасному введенні GLP-1, амілін може посилювати глікемічний контроль, зменшувати збільшення ваги та знижувати частоту гіпоглікемії [111, 112]. Для підвищення зручності та ефективності терапії перспективним вважається розробка єдиної системи введен-

ня, що дозволить одночасно доставляти інсулін та прамлінтид як гормони, що в нормі секретуються разом для регуляції глюкози. Але використання прамлінтиду (єдиний комерційно доступний аналог аміліну виготовляється при pH 4) ускладнюється його несумісністю з сучасними швидкодіючими інсуліновими формами (pH 7), що призводить до необхідності окремих ін'єкцій. Обхід цього бар'єру за допомогою дослідної двогормональної помпи призвів до покращення глікемічного контролю, зменшення гіперглікемічних піків після прийому їжі без збільшення ризику гіпоглікемії у порівнянні із монотерапією інсуліном [113]. Наразі досліджуються нові, стабілізовані полімерами комбіновані препарати інсуліну та прамлінтиду [114, 115].

Однією з тенденцій у сучасних дослідженнях є розробка технологій «розумних» інсулінів, чутливих до рівня глюкози (glucose-responsive insulin, GRI), що здатні автоматично регулювати вивільнення інсуліну залежно від гіперглікемії, зменшуючи ризик гіпоглікемії, без зовнішнього моніторингу з боку пацієнта

або медичного працівника [116, 117]. Серед підходів до створення GRI можна виділити наступні:

1) інтеграція безперервного моніторингу глюкози (continuous glucose monitoring, CGM) з пристроями доставки інсуліну в системах «замкненого циклу» (closed-loop systems, CLSs), де AI-алгоритми автоматично регулюють дозування на основі реального часу даних (наприклад, системи Medtronic MiniMed 780G від компанії Medtronic [118, 119] або Tandem t:slim X2 від компанії Tandem Diabetes Care [120, 121], що зменшують глікований гемоглобін (HbA1c) на 0,5–1% з нижчим ризиком гіпоглікемії);

2) інкапсуляція інсуліну в глюкозо-чутливі полімери, де матриця розпадається при гіперглікемії, вивільняючи інсулін (наприклад, на основі амфіфільного кополімера PPF, у складі якого два сегменти – цвітеріонний гідрофільний (полікарбоксібетаїн) та гідрофобний (полі2-аміноетилметакрилат модифікований 4-карбоксі-3-фторфенілбороновою кислотою) [122]), або молекулярна модифікація самого інсуліну, в молекулу якого вводяться глюкозо-чутливі групи (наприклад, на основі фенілборонової кислоти [123, 124] та диборонових кислот [125]) для реверсивного зв'язування/вивільнення залежно від рівня глюкози;

3) створення гібридних білків для подвійної гормональної сигналізації, наприклад злиттям двох пептидів глюкагону та інсуліну, що забезпечує «включення» інсуліну при гіперглікемії та глюкагону при гіпоглікемії [126–128].

Показовим прикладом «розумних» інсулінів є NNC2215, Novo Nordisk – інсуліновий кон'югат, розроблений на основі людського інсуліну (des30<sub>B</sub>), з глюкозо-чутливим перемикачем для регуляції активності залежно від рівня глюкози. Його конструкція включає подвійну кон'югацію: глюкозо-зв'язуючий макроцикл прикріплений до Lys29<sub>B</sub> через триазольне з'єднання на ε-амінійній групі (досягається за допомогою азидо-пропільного лінкера від макроциклу та алкін-лінкера на інсуліні при pH >10) та O<sub>1</sub>-глюкозид прикріплений до Phe1<sub>B</sub> через короткий лінкер на N-термінальній амінійній групі (прикріплення відбувається за допомогою бром-трифторметилсульфат феніл естеру при pH 7,5, з подальшим видаленням O-ацетилювання шляхом сапоніфікації). Перемикач реагує на глюкозу завдяки реакціям кон'югаційних сайтів таким чином, що при низькому рівні глюкози перемикач індукує закритий менш активний стан (глюкозид зв'язується з макроциклом, викликаючи стеричний конфлікт з α-СТ доменом рецептора інсуліну, що знижує афінність), врівноважуючи його до відкритого більш активного стану (повністю активна конформація інсуліну, здатна зв'язуватися з рецептором) при вищих концентраціях глюкози. У дослідженнях на тваринах було продемонстровано, що глюкозо-чутлива біоактивність NNC2215 призводить до захисту від гіпоглікемії, частково покриваючи колювання рівня глюкози [129]. Ці властивості роблять NNC2215 перспективним кандидатом для лікуванні ЦД, але препарат ще не дійшов до клінічних випробувань через низку проблем, зокрема потенційне неспецифічне зв'язування [130].

На ринку вже доступні численні системи замкненого циклу (CLS) з безперервним моніторингом

глюкози (CGM), схвалені FDA та ЕМА. Водночас, розробка препаратів інсулінів, що реагують на глюкозу (GRI), знаходиться на різних етапах дослідження від доклінічних до фази 2. Очікується, що GRI можуть з'явитися у продажу до 2030 року, але головними перешкодами залишаються точність регуляції та безпека і забезпечення біосумісності та стабільності всіх компонентів у одній лікарській формі.

Іншим пріоритетним напрямом сучасних досліджень є розробка ефективного перорального інсуліну для заміни щоденних ін'єкцій або інсулінових pomp на таблетки і капсули. Але пероральний прийом інсуліну не тільки покращує комплаєнс пацієнтів, а й має значні клінічні та фізіологічні переваги порівняно з підшкірними ін'єкціями. При пероральному введенні інсулін всмоктується з кишківника і потрапляє у ворітну вену, транспортуючись безпосередньо до печінки, що забезпечує переважне зв'язування інсуліну з рецепторами печінки. Це імітує природний шлях інсуліну, що секретується підшлунковою залозою, та є ключовою перевагою для кращого контролю глюкози. При парентеральному введенні інсулін напругу потрапляє у зовнішній кровотік, причому лише 20% потрапляє в печінку, більшість поглинається м'язовою та жировою тканинами, що призводить до швидкого виведення глюкози з кровотоку і ризику гіпоглікемії [131, 132]. Але комерціалізація перорального інсуліну стикається з викликами, пов'язаними з його білковою природою. Основною проблемою є ферментативна деградація інсуліну протеазами шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Також велика молекулярна маса молекули (близько 5800 Да) ускладнює його проходження через епітеліальні клітини кишківника до кровотоку. Сукупність цих факторів призводить до низької та нестабільної системної біодоступності інсуліну на рівні 1-2%, що є ключовою проблемою, яку необхідно вирішити для створення клінічно ефективної пероральної форми [133]. Для подолання цих бар'єрів застосовують численні наукові стратегії [134, 135], серед яких виділимо основні:

1) інкапсуляцію інсуліну в наночастинках на основі: мукоадгезивних полімерів (наприклад, хітозан [136], полімолочна ко-гліколева кислота [137], їхні комбінації [138], інші полієфіри [139], тіоли [140]); ліпідів (ліпосоми) [141, 142]; неорганічних матеріалів (наприклад, мезопористі наночастинки кремнезему [143], похідні гідроксиапатиту [144]); металорганічних каркасів [145], що захищають молекулу від протеаз і забезпечують контрольоване вивільнення в тонкому кишечнику, посилюючи трансклітинний транспорт через ентероцити;

2) використання пермеаційних енхансерів, або підсилювачів проникнення [146]: хітозану [147], жирних кислот (наприклад, деканоату натрію (C10), пальмітинової кислоти (C16)) [148], неіоногенних поверхнево-активних речовин (ПАР, наприклад, поліоксіетилен-8 лауриловий ефір, лаурат сахарози, гліцериди макроголу-8) [149, 150], солей жовчних кислот [151], тощо, що тимчасово порушують щільні контакти епітелію для парацелюлярного транспорту;

3) ентросолубільні покриття (наприклад, на основі желатини, гідрогелю, гідроксипропілметилцелюлози) [152, 153], що захищають від кислоти шлун-

ку та забезпечують вивільнення в лужному середовищі кишечника;

4) мікронідли або патчі для оральної доставки, де мікроструктури проникають через слизову рота або кишечника, уникаючи деградації діючої речовини [154, 155].

Для посилення біодоступності інсуліну сучасні розробки часто поєднують комбінацію різних стратегій, що дозволяє досягти високої біодоступності перорального інсуліну (10-30%) у доклінічних моделях (на гризунах або свинях), але впровадження таких препаратів у клінічну практику стикається зі значними труднощами, адже більшість кандидатів (табл. 2) не демонструють достатньої ефективності та безпеки для переходу до фінальних етапів клінічних випробувань, а ті, що демонструють обнадійливі клінічні результати, часто є непридатними для

комерціалізації через надмірно високу вартість виробництва. Наприклад, перспективний кандидат, який міг стати першим пероральним інсуліном, схваленим FDA, – ORMD-0801, незважаючи на багатообіцяючі результати II фази клінічних досліджень [156, 157], у 2023 р. зазнав невдачі у дослідженні III фази [158]. Інший кандидат – I338 у дослідженні фази II продемонстрував порівнянні із «золотим стандартом» базальної інсулінотерапії – інсуліном гларгіном клінічні результати щодо зниження рівня глюкози натщесерце та частоти побічних ефектів [159]. Незважаючи на обнадійливі результати, I338 мав низьку біодоступність (менше 2%) та вимагав надмірно високих доз (у 58 разів більших за дозу інсуліну гларгін), що зумовило високу виробничу вартість і, як наслідок, призвело до припинення його комерціалізації.

Таблиця 2

Приклади кандидатів пероральних інсулінів на різних стадіях дослідження (згідно з реєстрами клінічних досліджень [160, 161])

Кандидат, компанія	Стратегія	Результати та статус дослідження (номер*)
1	2	3
ORMD-0801, Oramed Pharmaceuticals,	Пермеаційні енхансери + ентеросолюбильне покриття: кишковорозчинна капсула полегшує проходження через шлунок та тонкий кишечник, підсилювачі проникнення (ЕДТА та солі жовчних кислот) відкривають щільні контакти епітелію для парацелюлярного транспорту	Позитивні результати у 16 клінічних випробуваннях фази 1 та 10 – фази 2, в яких взяли участь 884 добровольців, включаючи здорових людей та осіб з ЦД 1 та 2. 26-тижневе рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване клінічне дослідження фази III, в якому взяли участь 710 пацієнтів з ЦД 2, – не досягло ні первинної кінцевої точки (порівняння ефективності ORMD-0801 з плацебо у покращенні глікемічного контролю, оціненого за показником HbA1c), ні вторинної (оцінка зміни рівня глюкози в плазмі натщесерце від початкового рівня через 26 тижнів). Фаза III завершена/неактивна (NCT04606576)
IN-105 (Insulin Tregopil), Biocon	Модифікація хімічної структури інсуліну + пермеаційний енхансер: інсулін – ультрашвидкий аналог короткої дії, одноланцюговий амфіфільний олігомер, модифікований ковалентним приєднанням метокси-триетиленгліколь-пропіонільного фрагмента до LysB29 через амідний зв'язок; підсилювач проникнення – капрат натрію, збільшує всмоктування через ШКТ.	Позитивні результати фази I (NCT03392961, NCT01035801) та II (NCT03430856). Дослідження фази III на 264 пацієнтах з ЦД2 демонструє постпрандіальний контроль глюкози, який є ефективнішим, ніж плацебо, протягом усього періоду прийому їжі; однак, порівняно з активним препаратом порівняння інсуліном аспарт, постпрандіальний контроль є ефективнішим переважно в ранній період після прийому їжі; демонструє хороший профіль безпеки з нижчою частотою клінічно значущої гіпоглікемії; не виявлено різниці в HbA1c. Фаза III завершена/неактивна (CTRI/2008/091/000276).
Oral HDV-Insulin (HDV-I) (Пероральний HDV-Інсулін), Diasome Pharmaceuticals Inc.	Ліпідні наночастинки: технологія гепато-спрямованих везикул (Hepatic-Directed Vesicle, HDV), ліпосомальний наноносій ( $\leq 150$ нм), націлений на гепатоцити. Інсулін, інкорпорований у ліпосому, до якої приєднано ліганд, що націлюється на гепатоцити (біотин-фосфатидилетаноламін)	Ранні дослідження підбору дози у пацієнтів із ЦД2 показали дозозалежне зниження постпрандіальної глюкози плазми та добрий профіль безпеки. Фаза II Завершена/Неактивна (NCT00814294 та NCT03096392)

Продовження табл.2

1	2	3
Oshadi-Icp, Oshadi Drug Administration Ltd.	Наночастинки кремнезему + ентеросолюбильне покриття: носій являє собою композит, що складається з фармакологічно інертних наночастинок кремнезему (близько 100 нм), на поверхні яких адсорбовані полісахарид та інсулін. Цей порошок комплекс суспендується в олійній фазі (природній або синтетичній) і поміщається в кишковорозчинні капсули.	Показав багатообіцяючі ранні результати зі зниженням глюкози плазми та добрим профілем безпеки. Фаза II Завершена/Зупинена (NCT01973920)
I338 (Insulin 338), Novo Nordisk	Модифікація хімічної структури інсуліну + пермеаційний енхансер: модифікована амінокислотними замінами молекула забезпечує зниження чутливості до протеолізу у ШКТ; капрат натрію модулює щільні контакти між клітинами шлункового епітелію та підвищує плинність апікальної мембрани, сприяючи транспорту інсуліну через епітеліальний бар'єр	Рандомізоване подвійне сліпе паралельне дослідження фази II з активним контролем тривалістю 8 тижнів, в якому взяли участь 49 осіб з ЦД 2, які не досягли цільових показників на терапії метформіном у поєднанні або без поєднання з іншими пероральними протидіабетичними препаратами. Препарат порівняння - інсулін гларгін 100 ОД/мл. Порівняльні з гларгіном результати щодо зниження рівня глюкози натщесерце та частоти побічних ефектів (60% пацієнтів, які отримували I338, та у 68% пацієнтів, які отримували інсулін гларгін). Але препарат мав низьку біодоступність (менше 2%) та вимагав високих доз (у 58 разів більших за дозу інсуліну гларгін). Фаза II Завершена/Зупинена (NCT02470039)
Capsulin, Diabetology Ltd	Пермеаційні енхансери + ентеросолюбильне покриття: кишковорозчинна капсула з інсуліном, підсилювачами проникності (ароматичні спирти), сольоблізаторами (для покращення трансцелюлярного всмоктування).	Введення пероральних доз (150 та 300 ОД) 16 пацієнтам із ЦД2 продемонструвало гіпоглікемічну дію протягом 6-годинної процедури глюкозного клампу. Це відображає високі цільові концентрації інсуліну у ворітній вені печінки, але не у периферичній плазмі, що вважається фізіологічною перевагою та перевагою безпеки Фаза II Завершена/ Неактивна (EudraCT: 2005-004753-95)
Nodlin, NOD Pharmaceuticals/Shanghai Biolaxy	Біoadгезивні наночастинки + ентеросолюбильне покриття: капсули мають кишковорозчинне покриття з ацетатфталату целюлози; інсулін змішується з фосфатом кальцію у присутності ПЕГ-солей жирних кислот або жовчних солей, що забезпечує утворення біoadгезивних наночастинок	Випробування фази I показали ефект зниження глюкози, подібний до підшкірного інсуліну NPH. Однак, формула виявила високу варіабельність показника AUC (Area Under the Curve, оцінки загальної абсорбції та ефективності препарату в організмі) та неможливість виявлення мінімальних змін концентрації інсуліну. Фаза I Завершена/Неактивна (ChiCTR-TRC-12001872)

Примітка: \* NCT номер – присвоюється кожному клінічному дослідженню під час реєстрації на сайті *ClinicalTrials.gov*, призначається після подання інформації про протокол дослідження, та розміщується в базі даних Національної бібліотеки медицини США (*National Library of Medicine*); ChiCTR-TRC номер – для терапевтичних рандомізованих контрольованих випробувань, зареєстрованих у Китаї; EudraCT номер – в реєстрі клінічних випробувань ЄС

**Обмеження дослідження.** Це дослідження є оглядом літератури, тому воно обмежене доступними даними з наукових публікацій, офіційних сайтів компаній-виробників, баз даних регуляторних органів (FDA та ЕМА) та реєстрів клінічних досліджень на момент аналізу (до 2025 року). Акцент на біотехнологічних аспектах (структура молекули, технології рДНК, аналоги та інноваційні форми доставки) обмежує охоплення економічних, соціальних та регуляторних факторів, зокрема специфіки впровадження в країнах з обмеженими ресурсами. Аналіз ринку фокусується переважно на препаратах, схвалених FDA та ЕМА, що може не повною мірою відображати ситуацію на глобальному рівні, включаючи регіональні відмінності в доступності та вартості.

**Перспективи подальших досліджень.** Наступні етапи досліджень передбачають емпіричний аналіз ефективності глюкозо-чутливих та пероральних систем доставки інсуліну. Пріоритетним напрямком є вивчення потенціалу біосимілярів на регіональних ринках для формування стратегій їх подальшого освоєння вітчизняними фармацевтичними потужностями.

#### 4. Висновки

Аналіз наукової літератури та даних регуляторних органів свідчить про значну еволюцію технологій виробництва інсуліну, починаючи з визначення структури молекули у 1955 році та впровадження рекомбінантної ДНК-технології у 1982 році, що дозволило перейти від тваринних інсулінів до рекомбінантних людських та їхніх аналогів. Сучасний фармацевтичний ринок пропонує широкий спектр препаратів з різними фармакокінетичними профілями (від ультрашвидких до ультратривалих), включаючи біфазні суміші та премікси, які забезпечують кращий контроль глікемії та зменшення ризику гіпоглікемії. Інноваційні підходи, такі як комбіновані препарати з агоністами GLP-1 (наприклад, *Kultophy®* та *Soliqua®/Suliqua®*), аналоги амліліну (прамліїтид) та глюкозо-чутливі інсуліни (GRI), демонструють потенціал для індивідуалі-

зованої терапії, хоча їх впровадження обмежується технічними викликами. Розробка пероральних форм інсуліну (наприклад, ORMД-0801, І338) стикається з проблемами низької біодоступності (1–2%), проте комбінації наночастинок, пермеаційних енансерів та ентросоліюбильних покриттів відкривають перспективи для подолання бар'єрів ШКТ. Незважаючи на прогрес, сучасні технології не повністю задовольняють глобальний попит через високу вартість та обмежені виробничі потужності, що актуально для України з її епідеміологічним навантаженням. Перспективи подальших досліджень полягають у вдосконаленні біотехнологічних систем експресії, розробці доступних біосимілярів та ефективних систем доставки, з акцентом на можливості адаптації в умовах вітчизняних фармацевтичних підприємств.

#### Конфлікт інтересів

Автори заявляють, що у них немає конфлікту інтересів у зв'язку з цим дослідженням, фінансового, особистого, авторського чи іншого, який міг би вплинути на дослідження та його результати, представлені в цій статті.

#### Фінансування

Дослідження проводилось без фінансової підтримки.

#### Доступність даних

Дані будуть доступні за обґрунтованим запитом.

#### Використання штучного інтелекту

Автори підтверджують, що при створенні поточної роботи не використовували технології штучного інтелекту.

#### Внесок авторів

**Калюжная Ольга Сергіївна:** методологія, концептуалізація, формальний аналіз; програмне забезпечення; написання – рецензування та редактування; **Хохленкова Наталя Вікторівна:** концептуалізація, перевірка, нагляд.

#### Література

1. International Diabetes Federation. Available at: <https://diabetesatlas.org/>
2. У пів мільйона українців діагностовано цукровий діабет у 2023 році (2023). Міністерство охорони здоров'я України. Availabe at: <https://moz.gov.ua/uk/u-piv-miljona-ukrainciv-diagnostovano-cukrovij-diabet-u-2023-roci>
3. Kasinathan, D., Guo, Z., Sarver, D. C., Wong, G. W., Yun, S., Michels, A. W. et al. (2024). Cell-Surface ZnT8 Antibody Prevents and Reverses Autoimmune Diabetes in Mice. *Diabetes*, 73 (5), 806–818. <https://doi.org/10.2337/db23-0568>
4. Baker, D. E. (2023). Teplizumab. *Hospital Pharmacy*, 58 (6), 549–556. <https://doi.org/10.1177/00185787231160431>
5. Monzani, P. S., Sangalli, J. R., Sampaio, R. V., Guemra, S., Zanin, R., Adona, P. R. et al. (2024). Human proinsulin production in the milk of transgenic cattle. *Biotechnology Journal*, 19 (3). <https://doi.org/10.1002/biot.202300307>
6. Beck, R. W., Bailey, R. J., Klein, K. R., Aleppo, G., Levy, C. J., Diner, J. et al. (2025). Inhaled Technosphere Insulin Plus Insulin Degludec for Adults with Type 1 Diabetes: The INHALE-3 Extension Study. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 27 (3), 170–178. <https://doi.org/10.1089/dia.2024.0582>
7. Gaddas, M., Saida, I. B., Saad, H. B. (2025). Twenty years of inhaled insulin: promise, setbacks, and future directions. *EXCLI Journal*, 28 (24), 573–577. <https://doi.org/10.17179/excli2025-8260>
8. Silva, I. B. V., Kimura, C. H., Colantoni, V. P., Sogayar, M. C. (2022). Stem cells differentiation into insulin-producing cells (IPCs): recent advances and current challenges. *Stem Cell Research & Therapy*, 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02977-y>
9. Kumar, D., Tanwar, R. (2024). World's first: stem cell therapy reverses diabetes. *Stem Cell Research & Therapy*, 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04036-0>

10. Zhang, T., Tang, J. Z., Fei, X., Li, Y., Song, Y., Qian, Z., Peng, Q. (2021). Can nanoparticles and nano-protein interactions bring a bright future for insulin delivery? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (3), 651–667. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.08.016>
11. Каложная, О. С., Хохленкова, Н. В., Паненко, М. В. (2024). Аналіз технологій виробництва рекомбінантного інсуліну. *Вісник фармації*, 108 (2), (108), 25–36. <https://doi.org/10.24959/nphj.24.158>
12. Alyas, Ej., Rafiq, A., Amir, H., Khan, S. U., Sultana, T., Ali, A., Hameed, A., Ahmad, I., Kazmi, A., Sajid, T., Ahmad, A. (2021). Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production. *Biomedical Research and Therapy*, 8 (9), 4540–4561. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i9.692>
13. Artasensi, A., Pedretti, A., Vistoli, G., Fumagalli, L. (2020). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*, 25 (8), 1987. <https://doi.org/10.3390/molecules25081987>
14. Brown, H., Sanger, F., Kitai, R. (1955). The structure of pig and sheep insulins. *Biochemical Journal*, 60 (4), 556–565. <https://doi.org/10.1042/bj0600556>
15. Stretton, A. O. W. (2002). The First Sequence: Fred Sanger and Insulin. *Genetics*, 162 (2), 527–532. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.2.527>
16. Halban, P. A. (1991). Structural domains and molecular lifestyles of insulin and its precursors in the pancreatic Beta cell. *Diabetologia*, 34 (11), 767–778. <https://doi.org/10.1007/bf00408349>
17. Steiner, D. F., James, D. E. (1992). Cellular and molecular biology of the Beta cell. *Diabetologia*, 35 (S2), S41–S48. <https://doi.org/10.1007/bf00586278>
18. Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson, L. H.; Feingold, K. R., Ahmed, S. F., Anawalt, B. et al. (Eds.) (2014). Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. *Endotext*. South Dartmouth: MDText.com, Inc. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
19. Saisho, Y. (2016). Postprandial C-Peptide to Glucose Ratio as a Marker of  $\beta$  Cell Function: Implication for the Management of Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (5), 744. <https://doi.org/10.3390/ijms17050744>
20. Szukiewicz, D. (2023). Molecular Mechanisms for the Vicious Cycle between Insulin Resistance and the Inflammatory Response in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (12), 9818. <https://doi.org/10.3390/ijms24129818>
21. Gorai, B., Vashisth, H. (2022). Progress in Simulation Studies of Insulin Structure and Function. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.908724>
22. Galloway, J., Chance, R. (1994). Improving Insulin Therapy: Achievements and Challenges. *Hormone and Metabolic Research*, 26 (12), 591–598. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1001766>
23. Bußmann, A. B., Grünerbel, L. M., Durasiewicz, C. P., Thalhofer, T. A., Wille, A., Richter, M. (2021). Microdosing for drug delivery application – A review. *Sensors and Actuators A: Physical*, 330, 112820. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112820>
24. Giugliano, D., Scappaticcio, L., Longo, M., Caruso, P., Maiorino, M. I., Bellastella, G., Esposito, K. (2021). Simplification of complex insulin therapy: a story of dogma and therapeutic resignation. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 178, 108958. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108958>
25. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S. et al. (1988). Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature*, 333 (6174), 679–682. <https://doi.org/10.1038/333679a0>
26. Bakaysa, D. L., Radziuk, J., Havel, H. A., Brader, M. L., Li, S., Dodd, S. W. et al. (1996). Physicochemical basis for the rapid time-action of LysB28ProB29-insulin: Dissociation of a protein-ligand complex. *Protein Science*, 5 (12), 2521–2531. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051215>
27. Birnbaum, D. T., Kilcomons, M. A., DeFelippis, M. R., Beals, J. M. (1997). Assembly and Dissociation of Human Insulin and LysB28ProB29-Insulin Hexamers: A Comparison Study. *Pharmaceutical Research*, 14 (1), 25–36. <https://doi.org/10.1023/a:1012095115151>
28. Purple Book Database of Licensed Biological Products: U.S. Food and Drug Administration. Available at: <https://purplebooksearch.fda.gov/>
29. Download medicine data (2024). European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/download-medicine-data>
30. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N. et al. (1969). Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature*, 224 (5218), 491–495. <https://doi.org/10.1038/224491a0>
31. Pekar, A. H., Frank, B. H. (1972). Conformation of proinsulin. Comparison of insulin and proinsulin self-association at neutral pH. *Biochemistry*, 11(22), 4013–4016. <https://doi.org/10.1021/bi00772a001>
32. Owens, D. R. (2011). Insulin Preparations with Prolonged Effect. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 13 (S1), S-5–S-14. <https://doi.org/10.1089/dia.2011.0068>
33. Berenson, D. F., Weiss, A. R., Wan, Z., Weiss, M. A. (2011). Insulin analogs for the treatment of diabetes mellitus: therapeutic applications of protein engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243 (1), 40–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06468.x>
34. Maxwell, L. C., Bischoff, F. (1935). Augmentation of the physiologic response to insulin. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 112 (1), 172–175. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1935.112.1.172>
35. Scott, D. A., Fisher, A. M. (1935). The effect of zinc salts on the action of insulin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 55 (2), 206–221. [https://doi.org/10.1016/s0022-3565\(25\)04174-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3565(25)04174-6)
36. Blundell, T. L., Dodson, G. G., Dodson, E., Hodgkin, D. C., Vijayan, M. (1971). X-Ray Analysis and the Structure of Insulin. *Proceedings of the 1970 Laurentian Hormone Conference*, 27, 1–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571127-2.50025-0>
37. Hodgkin, D. C. (1971). X rays and the structures of insulin. *British Medical Journal*, 4 (5785), 447–451. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5785.447>
38. Jarosinski, M. A., Dhayalan, B., Chen, Y.-S., Chatterjee, D., Varas, N., Weiss, M. A. (2021). Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Molecular Metabolism*, 52, 101325. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101325>
39. Phillips, N. B., Wan, Z., Whittaker, L., Hu, S.-Q., Huang, K., Hua, Q. et al. (2010). Supramolecular Protein Engineering. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (16), 11755–11759. <https://doi.org/10.1074/jbc.c110.105825>
40. Vashisth, H. (2015). Theoretical and Computational Studies of Peptides and Receptors of the Insulin Family. *Membranes*, 5 (1), 48–83. <https://doi.org/10.3390/membranes5010048>

41. Brader, M. L., Kaarsholm, N. C., Dunn, M. F. (1990). The R-state proinsulin and insulin hexamers mimic the carbonic anhydrase active site. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (26), 15666–15670. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55450-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55450-8)
42. Rahuel-Clermont, S., French, C. A., Kaarsholm, N. C., Dunn, M. F. (1997). Mechanisms of Stabilization of the Insulin Hexamer through Allosteric Ligand Interactions. *Biochemistry*, 36 (19), 5837–5845. <https://doi.org/10.1021/bi963038q>
43. Kosinová, L., Veverka, V., Novotná, P., Collinsová, M., Urbanová, M., Moody, N. R. et al. (2014). Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry*, 53 (21), 3392–3402. <https://doi.org/10.1021/bi500073z>
44. Blader, M. L., Dunn, M. F. (1991). Insulin hexamers: new conformations and applications. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 341–345. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90140-q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90140-q)
45. Roy, M., Brader, M. L., Lee, R. W., Kaarsholm, N. C., Hansen, J. F., Dunn, M. F. (1989). Spectroscopic signatures of the T to R conformational transition in the insulin hexamer. *Journal of Biological Chemistry*, 264 (32), 19081–19085. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)47269-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)47269-4)
46. Berchtold, H., Hilgenfeld, R. (1999). Binding of phenol to R6 insulin hexamers. *Biopolymers*, 51 (2), 165–172. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1999\)51:2<165::aid-bip6>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1999)51:2<165::aid-bip6>3.0.co;2-x)
47. Hallas-Møller, K., Petersen, K., Schlichtkrull, J. (1952). Crystalline and Amorphous Insulin-Zinc Compounds with Prolonged Action. *Science*, 116 (3015), 394–398. <https://doi.org/10.1126/science.116.3015.394>
48. Hallas-Mø, K. (1956). The Lente Insulins. *Diabetes*, 5 (1), 7–14. <https://doi.org/10.2337/diab.5.1.7>
49. Schlichtkrull, J., Munck, O., Jersild, M. (1965). Insulin Rapitard and Insulin Actrapid. *Acta Medica Scandinavica*, 177 (1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1965.tb01811.x>
50. Humulin® Therapies. Eli Lilly and Company. Available at: <https://medical.lilly.com/us/products/medical-information/diabetes/humulin>
51. Our medicines. Diabetes medications. Novo Nordisk. Available at: <https://www.novonordisk.com/our-products/our-medicines.html>
52. Vetsulin. Merck Animal Health. Available at: <https://www.merck-animal-health-usa.com/pet-owners/vetsulin/>
53. Bentley, G., Dodson, G., Lewitova, A. (1978). Rhombohedral insulin crystal transformation. *Journal of Molecular Biology*, 126 (4), 871–875. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90026-8)
54. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Reynolds, C. D., Smith, G. D. et al. (1989). Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*, 338 (6216), 594–596. <https://doi.org/10.1038/338594a0>
55. Hagedorn, H. C., Jensen, B. N., Krarup, N. B., Wodstrup, I. (1936). Protamine Insulinate. *Journal of the American Medical Association*, 106 (3), 177–180. <https://doi.org/10.1001/jama.1936.02770030007002>
56. Scott, D. A., Fisher, A. M. (1936). Studies on insulin with protamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 58 (1), 78–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-3565\(25\)09793-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3565(25)09793-9)
57. Yip, C. M., Brader, M. L., Frank, B. H., DeFelippis, M. R., Ward, M. D. (2000). Structural Studies of a Crystalline Insulin Analog Complex with Protamine by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 78 (1), 466–473. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(00\)76609-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76609-4)
58. Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Larsen, U. D., Ribel, U., Markussen, J. (1995). Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. *Biochemical Journal*, 312 (3), 725–731. <https://doi.org/10.1042/bj3120725>
59. Peters, T. (1985). Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 37, 161–245. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60065-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60065-0)
60. Kragh-Hansen, U. (1990). Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish Medical Bulletin*, 37 (1), 57–84.
61. Wasko, J., Wolszczak, M., Zajackowska, Z., Dudek, M., Kolesinska, B. (2024). Human serum albumin as a potential drug delivery system for N-methylated hot spot insulin analogs inhibiting hormone aggregation. *Bioorganic Chemistry*, 143, 107104. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107104>
62. Rao, S. S., Somayaji, Y., Kulal, A. (2022). Synthesis and Evaluation of the Insulin-Albumin Conjugate with Prolonged Glycemic Control. *ACS Omega*, 7 (6), 5131–5138. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06119>
63. Whittingham, J. L., Havelund, S., Jonassen, I. (1997). Crystal Structure of a Prolonged-Acting Insulin with Albumin-Binding Properties. *Biochemistry*, 36 (10), 2826–2831. <https://doi.org/10.1021/bi9625105>
64. Kaarsholm, N. C., Havelund, S., Hougaard, P. (1990). Ionization behavior of native and mutant insulins: pK perturbation of B13-Glu in aggregated species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 283 (2), 496–502. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90673-m](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90673-m)
65. Roskamp, R. H., Park, G. (1999). Long-acting insulin analogs. *Diabetes Care*, 22 (2), 109–113.
66. Campbell, R. K., White, J. R., Levien, T., Baker, D. (2001). Insulin glargine. *Clinical Therapeutics*, 23 (12), 1938–1957. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(01\)80148-x](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(01)80148-x)
67. Toujeo®. Sanofi. Available at: <https://www.toujeopro.com/>
68. Kim, A. P., Bindler, R. J. (2016). The Future of Biosimilar Insulins. *Diabetes Spectrum*, 29 (3), 161–166. <https://doi.org/10.2337/diaspect.29.3.161>
69. BLA vs. NDA: Understanding the Differences in Biopharmaceutical Approvals. Syner G. Available at: <https://synergbiopharma.com/blog/bla-vs-nda/>
70. Guidance document. Applications Covered by Section 505(b)(2) (1999). U.S. Food and Drug Administration, FDA. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/applications-covered-section-505b2>
71. Industry Information and Guidance (2025). Biosimilars: U.S. Food and Drug Administration, FDA. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/industry-information-and-guidance>
72. Approved Biosimilars. U.S. Food and Drug Administration, FDA. Available at: <https://biosimilarsforum.org/approved-biosimilars/>
73. Yu, M., Zhang, C., Xu, H., Dong, Y., Zhu, H., Xia, C., Feng, J. (2025). Design of a novel long-acting insulin analogs by acetylation modification and compared with insulin Icodec. *Scientific Reports*, 15 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94014-0>
74. Barlocco, D. (2003). Insulin detemir. Novo Nordisk. *Current Opinion Investigational Drugs*, 4 (4), 449–454.

75. Vasselli, J. R., Pi-Sunyer, F. X., Wall, D. G., John, C. S., Chapman, C. D., Currie, P. J. (2017). Central effects of insulin detemir on feeding, body weight, and metabolism in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313 (5), E613–E621. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00111.2016>
76. Kurtzhals, P., Schäffer, L., Sørensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C., Trüb, T. (2000). Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*, 49 (6), 999–1005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.999>
77. Hordern, S. V. M., Wright, J. E., Umpleby, A. M., Shojaee-Moradie, F., Amiss, J., Russell-Jones, D. L. (2005). Comparison of the effects on glucose and lipid metabolism of equipotent doses of insulin detemir and NPH insulin with a 16-h euglycaemic clamp. *Diabetologia*, 48 (3), 420–426. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1670-1>
78. Rossetti, P., Porcellati, F., Ricci, N. B., Candeloro, P., Cioli, P., Bolli, G. B., Fanelli, C. G. (2008). Different Brain Responses to Hypoglycemia Induced by Equipotent Doses of the Long-Acting Insulin Analog Detemir and Human Regular Insulin in Humans. *Diabetes*, 57 (3), 746–756. <https://doi.org/10.2337/db07-1433>
79. Hermansen, K., Davies, M., Dereziński, T., Martinez Ravn, G., Clauson, P., Home, P. (2006). A 26-Week, Randomized, Parallel, Treat-to-Target Trial Comparing Insulin Detemir With NPH Insulin as Add-On Therapy to Oral Glucose-Lowering Drugs in Insulin-Naïve People With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 29 (6), 1269–1274. <https://doi.org/10.2337/dc05-1365>
80. Rosenstock, J., Davies, M., Home, P. D., Larsen, J., Koenen, C., Schernthaner, G. (2008). A randomised, 52-week, treat-to-target trial comparing insulin detemir with insulin glargine when administered as add-on to glucose-lowering drugs in insulin-naïve people with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51 (3), 408–416. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0911-x>
81. Steensgaard, D. B., Schluckebier, G., Strauss, H. M., Norrman, M., Thomsen, J. K., Friderichsen, A. V. et al. (2013). Ligand-Controlled Assembly of Hexamers, Dihexamers, and Linear Multihexamer Structures by the Engineered Acylated Insulin Degludec. *Biochemistry*, 52 (2), 295–309. <https://doi.org/10.1021/bi3008609>
82. Tambascia, M. A., Eliashewitz, F. G. (2015). Degludec: the new ultra-long insulin analogue. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s13098-015-0037-0>
83. Jonassen, I., Havelund, S., Hoeg-Jensen, T., Steensgaard, D. B., Wahlund, P.-O., Ribøl, U. (2012). Design of the Novel Protraction Mechanism of Insulin Degludec, an Ultra-long-Acting Basal Insulin. *Pharmaceutical Research*, 29 (8), 2104–2114. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0739-z>
84. Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., Meier, J. J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. *Molecular Metabolism*, 46, 101102. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101102>
85. Nishimura, E., Pridal, L., Glendorf, T., Hansen, B. F., Hubálek, F., Kjeldsen, T. et al. (2021). Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal insulin analog designed for once-weekly dosing. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 9 (1), e002301. <https://doi.org/10.1136/bmjdc-2021-002301>
86. Goldman, J., Triplitt, C., Isaacs, D. (2024). Icodec: A Novel Once-Weekly Basal Insulin for Diabetes Management. *Annals of Pharmacotherapy*, 59 (6), 554–569. <https://doi.org/10.1177/10600280241287790>
87. Ashraf, T., Kumar, A., Tara, A., Memon, N., Muhammad, A., Turesh, M. et al. (2025). Once-weekly insulin icodec vs. daily insulin glargine in type 2 diabetes: a meta-analysis with longitudinal insights. *Annals of Medicine & Surgery*, 87 (7), 4452–4466. <https://doi.org/10.1097/ms9.0000000000003392>
88. Awiqli insulin icodec. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/awiqli>
89. Novo Nordisk Resubmits FDA Application for First Once-Weekly Insulin for Type 2 Diabetes. *MedPath*. Available at: <https://trial.medpath.com/news/08cba5b13b946426/novo-nordisk-resubmits-fda-application-for-first-once-weekly-insulin-for-type-2-diabetes>
90. Slieker, L. J., Brooke, G. S., DiMarchi, R. D., Flora, D. B., Green, J. S., Hoffmann, J. A. et al. (1997). 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*, 40, 54–61. <https://doi.org/10.1007/s001250051402>
91. Kesavadev, J., Basanth, A., Shankar, A., Saboo, B., Mohan, A. R., Joshi, S. et al. (2025). An Overview of Currently Available Injectable Therapies in Diabetes: A Guide to Practitioners. *Advances in Therapy*, 42 (8), 3634–3656. <https://doi.org/10.1007/s12325-025-03250-3>
92. Raedler, L. A. (2016). Tresiba (Insulin Degludec Injection) and Ryzodeg 70/30 (Insulin Degludec and Insulin Aspart Injection): Two New Insulin Analogs for Glycemic Control in Diabetes Mellitus. *American health & drug benefits*, 9, 144–148. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5013846/>
93. Becker, R. H. A., Frick, A. D. (2008). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Insulin Glulisine. *Clinical Pharmacokinetics*, 47 (1), 7–20. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847010-00002>
94. Lih, A., Hibbert, E., Wong, T., Girgis, Ch. M., Garg, N., Carter, J. N. (2010). The role of insulin glulisine to improve glycemic control in children with diabetes mellitus. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 26 (3), 403–412. <https://doi.org/10.2147/dmsott.s5116>
95. Heise, T., Hövelmann, U., Zijlstra, E., Stender-Petersen, K., Jacobsen, J. B., & Haahr, H. (2016). A Comparison of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties Between Faster-Acting Insulin Aspart and Insulin Aspart in Elderly Subjects with Type 1 Diabetes Mellitus. *Drugs & Aging*, 34 (1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s40266-016-0418-6>
96. Shah, H. K., Shah, M., Patel, H., Maslekar, A., Kanzariya, T. (2025). Comparison of Two Short-acting Insulin Formulations in the Management of Blood Glucose in Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery Patients. *International Journal of Diabetes and Technology*, 4 (2), 29–34. [https://doi.org/10.4103/ijdt.ijdt\\_2\\_25](https://doi.org/10.4103/ijdt.ijdt_2_25)
97. Dutta, D., Mohindra, R., Mahajan, K., Sharma, M. (2023). Performance of Fast-Acting Aspart Insulin as Compared to Aspart Insulin in Insulin Pump for Managing Type 1 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Diabetes & Metabolism Journal*, 47 (1), 72–81. <https://doi.org/10.4093/dmj.2022.0035>
98. Leohr, J., Dellva, M. A., LaBell, E., Coutant, D. E., Arrubla, J., Plum-Mörschel, L. et al. (2023). Ultra rapid lispro (Lyumjev®) shortens time to recovery from hyperglycaemia compared to Humalog® in individuals with type 1 diabetes on continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 26 (1), 215–223. <https://doi.org/10.1111/dom.15307>
99. Giorgino, F., Battelino, T., Bergenstal, R. M., Forst, T., Green, J. B., Mathieu, C. et al. (2023). The Role of Ultra-Rapid-Acting Insulin Analogs in Diabetes: An Expert Consensus. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 19 (2), 452–469. <https://doi.org/10.1177/19322968231204584>

100. Bailey, C. J., Flatt, P. R., Conlon, J. M. (2025). Multifunctional incretin peptides in therapies for type 2 diabetes, obesity and associated co-morbidities. *Peptides*, 187, 171380. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2025.171380>
101. Leading drugs worldwide based on projected 2025 sales (2024). Statista. Available at: [https://www.statista.com/statistics/973523/top-drugs-by-year-on-year-sales-increase/?srsltid=AfmBOoqM8YOOnt-ZldMq1TtqMzA5Tlqhp0gTTqh7uxBbHbj7WbB\\_Bn66](https://www.statista.com/statistics/973523/top-drugs-by-year-on-year-sales-increase/?srsltid=AfmBOoqM8YOOnt-ZldMq1TtqMzA5Tlqhp0gTTqh7uxBbHbj7WbB_Bn66)
102. Malone, E. (2025). Top 10 Drugs Q2 2025: Mounjaro Overtakes Ozempic: Citeline. Available at: <https://insights.citeline.com/scrip/business/top-10-drugs-q2-2025-mounjaro-overtakes-ozempic-HJVMVTVQPFHC7NR7XUR46WEZBQ/>
103. ElSayed, N. A., McCoy, R. G., Aleppo, G., Bajaj, M., Balapattabi, K., Beverly, E. A. et al. (2024). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes – 2025. *Diabetes Care*, 48 (1), S181–S206. <https://doi.org/10.2337/dc25-s009>
104. Jung, H. N., Cho, Y. K., Min, S. H., Kim, H. S., Kim, Y.-J., Park, J.-Y. et al. (2022). Free Versus Fixed-Ratio Combination of Basal Insulin and GLP-1 Receptor Agonists in Type 2 Diabetes Uncontrolled With GLP-1 Receptor Agonists: A Systematic Review and Indirect Treatment Comparison. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.870722>
105. Candido, R., Nicolucci, A., Larosa, M., Rossi, M. C., Napoli, R., Gabellieri, E. et al. (2024). Treatment intensification following glucagon-like peptide-1 receptor agonist in type 2 diabetes: Comparative effectiveness analyses between free vs. fixed combination of GLP-1 RA and basal insulin. *RESTORE-G real-world study. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 34 (8), 1846–1853. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2024.03.023>
106. Ahmed, A., Monir, Akl, M. (2024). Exploring a Synergistic Approach: Dual GLP-1 Agonist Combined with Degludec Basal Insulin for Early Type 1 Diabetes Treatment and its Impact on Albumin-Insulin Producing Cells Expression. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 14 (2), 262–265. <https://doi.org/10.34172/apb.2024.040>
107. Bolli, G. B., Porcellati, F., Lucidi, P., Fanelli, C. G., Perseghin, G., Horowitz, M. et al. (2025). An overview of randomized clinical trials of fixed-ratio combinations of basal insulin plus GLP-1RA (injectable therapy): Lessons for advancing therapy in people with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 27 (7), 14–25. <https://doi.org/10.1111/dom.16616>
108. Державний реєстр лікарських засобів України. Available at: <http://www.drllz.com.ua/>
109. Hoogwerf, B. J., Doshi, K. B., Diab, D. (2008). Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vascular health and risk management*, 4 (2), 355–362. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s1978>
110. Sinézia, C., Sisnande, T., Icart, L. P., Lima, L. M. T. R. (2024). Oral delivery of the amylin receptor agonist pramlintide. *Peptide Science*, 116 (4). <https://doi.org/10.1002/pep2.24346>
111. Riddle, M. C., Nahra, R., Han, J., Castle, J., Hanavan, K., Hompesch, M. et al. (2018). Control of Postprandial Hyperglycemia in Type 1 Diabetes by 24-Hour Fixed-Dose Coadministration of Pramlintide and Regular Human Insulin: A Randomized, Two-Way Crossover Study. *Diabetes Care*, 41 (11), 2346–2352. <https://doi.org/10.2337/dc18-1091>
112. Riddle, M. C. (2020). Rediscovery of the Second  $\beta$ -Cell Hormone: Co-replacement With Pramlintide and Insulin in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 43 (3), 518–521. <https://doi.org/10.2337/dci19-0077>
113. Haidar, A., Tsoukas, M. A., Bernier-Twardy, S., Yale, J.-F., Rutkowski, J., Bossy, A. et al. (2020). A Novel Dual-Hormone Insulin-and-Pramlintide Artificial Pancreas for Type 1 Diabetes: A Randomized Controlled Crossover Trial. *Diabetes Care*, 43 (3), 597–606. <https://doi.org/10.2337/dc19-1922>
114. Maikawa, C. L., Chen, P. C., Vuong, E. T., Nguyen, L. T., Mann, J. L., d'Aquino, A. I. et al. (2021). Ultra-Fast Insulin–Pramlintide Co-Formulation for Improved Glucose Management in Diabetic Rats. *Advanced Science*, 8 (21). <https://doi.org/10.1002/advs.202101575>
115. Kommera, S. P., Kumar, A., Chitkara, D., Mittal, A. (2024). Pramlintide an Adjunct to Insulin Therapy: Challenges and Recent Progress in Delivery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 388 (1), 81–90. <https://doi.org/10.1124/jpet.123.001679>
116. Rege, N. K., Phillips, N. F. B., Weiss, M. A. (2017). Development of glucose-responsive ‘smart’ insulin systems. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 24 (4), 267–278. <https://doi.org/10.1097/med.0000000000000345>
117. Brouillard, J. E. (2025). Update on the status of Glucose-Responsive Insulins. *Clinical Diabetes*, 43 (2), 322–323. <https://doi.org/10.2337/cd25-0007>
118. FDA Approves Medtronic MiniMed 780G System (2023). Danatech. *Diabetes Technology ADCES*. Available at: <https://www.adces.org/education/danatech/latest-news/danatech-latest-news/2023/11/16/fda-approved-medtronic-minimed-780g-system>
119. Studies show promising results for individuals with type 2 diabetes and young children with type 1 diabetes on MiniMed™ 780G system (2025). Medtronic. Available at: <https://news.medtronic.com/2025-06-20-Studies-show-promising-results-for-individuals-with-type-2-diabetes-and-young-children-with-type-1-diabetes-on-MiniMed-TM-780G-system>
120. Safety evaluation of an advanced Hybrid Closed Loop System using Lyumjev with the Tandem t:Slm X2 Insulin pump with control-iq technology in adults, adolescents and children with type 1 diabetes (2024). *ClinicalTrials*, National Library of Medicine. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT05403502>
121. Tandem Diabetes Care Announces t:slim X2™ Insulin Pump Compatibility with Abbott’s FreeStyle Libre® 3 Plus Sensor in the United States (2025). Tandem Diabetes Care. Available at: <https://investor.tandemdiabetes.com/news-releases/news-release-details/tandem-diabetes-care-announces-tslim-x2tm-insulin-pump>
122. Ji, K., Wei, X., Kahkoska, A. R., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, J. et al. (2024). An orally administered glucose-responsive polymeric complex for high-efficiency and safe delivery of insulin in mice and pigs. *Nature Nanotechnology*, 19 (12), 1880–1891. <https://doi.org/10.1038/s41565-024-01764-5>
123. Chou, D. H.-C., Webber, M. J., Tang, B. C., Lin, A. B., Thapa, L. S., Deng, D. et al. (2015). Glucose-responsive insulin activity by covalent modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (8), 2401–2406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424684112>
124. Liu, W., Zhang, J., Wang, Y., He, Y., Wang, Y., Wei, X. et al. (2025). Long-acting glucose-responsive insulin with swift onset-of-action. *Journal of Controlled Release*, 383, 113826. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113826>
125. Kruse, Th., Kofoed-Hansen, M., Muenzel, M. W. B., Thøgersen, H., Sauerberg, P., Rasmussen, J. E. et al. (2020). Glucose-sensitive albumin-binding derivatives. Patent US20200325160A1.

126. Varas, N., Jarosinski, M. A., Chen, Y.-S., Ni, C.-L., Grabowski, R. A., Tai, N. et al. (2025). Ultrastable Insulin-Glucagon Fusion Protein Exploits an Endogenous Hepatic Switch to Mitigate Hypoglycemic Risk. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 8 (9), 3240–3258. <https://doi.org/10.1021/acspsci.5c00362>
127. Bode, B. W., Boyd, J., Shah, A., Parkes, D., Ghosh, S., Cherrington, A. D. (2020). 7-LB: Insulin and Glucagon Coadministration in Type 1 Diabetes Prevents Hypoglycemia without Worsening Hyperglycemia. *Diabetes*, 69 (1). <https://doi.org/10.2337/db20-7-lb>
128. Pedersen, C., Bouman, S. D., Porsgaard, T., Rosenkilde, M. M., Roed, N. K. (2018). Dual treatment with a fixed ratio of glucagon and insulin increases the therapeutic window of insulin in diabetic rats. *Physiological Reports*, 6 (6), e13657. <https://doi.org/10.14814/phy2.13657>
129. Hoeg-Jensen, T., Kruse, T., Brand, C. L., Sturis, J., Fledelius, C., Nielsen, P. K. et al. (2024). Glucose-sensitive insulin with attenuation of hypoglycaemia. *Nature*, 634 (8035), 944–951. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08042-3>
130. Hoeg-Jensen, T. (2021). Review: Glucose-sensitive insulin. *Molecular Metabolism*, 46, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101107>
131. Asare-Bediako, I., Paszkiewicz, R. L., Kim, S. P., Woolcott, O. O., Kolka, C. M., Burch, M. A. et al. (2018). Variability of Directly Measured First-Pass Hepatic Insulin Extraction and Its Association With Insulin Sensitivity and Plasma Insulin. *Diabetes*, 67(8), 1495–1503. <https://doi.org/10.2337/db17-1520>
132. Roger, R. C. (2025). Oral Insulin – Harnessing the Natural Physiology of Glucose Control in the Body. *Medical Research Archives*, 13 (1). <https://doi.org/10.18103/mra.v13i1.6180>
133. Wong, C. Y., Martinez, J., Dass, C. R. (2016). Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68 (9), 1093–1108. <https://doi.org/10.1111/jphp.12607>
134. Fontana, G., Innamorati, G., Giacomello, L. (2025). Nanoparticle-Based Oral Insulin Delivery: Challenges, Advances, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 17 (12), 1563. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17121563>
135. Zhang, E., Zhu, H., Song, B., Shi, Y., Cao, Z. (2024). Recent advances in oral insulin delivery technologies. *Journal of Controlled Release*, 366, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.12.045>
136. Rekha, M. R., Sharma, C. P. (2009). Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *Journal of Controlled Release*, 135 (2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.011>
137. Shams K. (2015). Nanoencapsulation of insulin using blends of biodegradable polymers and in vitro controlled release of insulin. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 06 (02). <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000228>
138. Zhou, J., Zhang, J., Sun, Y., Luo, F., Guan, M., Ma, H. et al. (2023). A nano-delivery system based on preventing degradation and promoting absorption to improve the oral bioavailability of insulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125263>
139. Ghassemi, A. H., van Steenberghe, M. J., Talsma, H., van Nostrum, C. F., Jiskoot, W., Crommelin, D. J. A., Hennink, W. E. (2009). Preparation and characterization of protein loaded microspheres based on a hydroxylated aliphatic polyester, poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid). *Journal of Controlled Release*, 138 (1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.04.025>
140. Zhang, Y., Wu, X., Meng, L., Zhang, Y., Ai, R., Qi, N. et al. (2012). Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 436 (1-2), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.054>
141. Lin, C.-H., Chen, C.-H., Lin, Z.-C., Fang, J.-Y. (2017). Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2), 219–234. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.02.001>
142. Muntoni, E., Marini, E., Ahmadi, N., Milla, P., Ghè, C., Bargoni, A. et al. (2019). Lipid nanoparticles as vehicles for oral delivery of insulin and insulin analogs: preliminary ex vivo and in vivo studies. *Acta Diabetologica*, 56 (12), 1283–1292. <https://doi.org/10.1007/s00592-019-01403-9>
143. Zhang, Y., Xiong, M., Ni, X., Wang, J., Rong, H., Su, Y. et al. (2021). Virus-Mimicking Mesoporous Silica Nanoparticles with an Electrically Neutral and Hydrophilic Surface to Improve the Oral Absorption of Insulin by Breaking Through Dual Barriers of the Mucus Layer and the Intestinal Epithelium. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13 (15), 18077–18088. <https://doi.org/10.1021/acsmi.1c00580>
144. Scudeller, L. A., Mavropoulos, E., Tanaka, M. N., Costa, A. M., Braga, C. A. C., López, E. O. et al. (2017). Effects on insulin adsorption due to zinc and strontium substitution in hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 802–811. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.061>
145. Zou, J.-J., Wei, G., Xiong, C., Yu, Y., Li, S., Hu, L. et al. (2022). Efficient oral insulin delivery enabled by transferrin-coated acid-resistant metal-organic framework nanoparticles. *Science Advances*, 8 (8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4677>
146. Maher, S., Brayden, D. J., Casertari, L., Illum, L. (2019). Application of Permeation Enhancers in Oral Delivery of Macromolecules: An Update. *Pharmaceutics*, 11 (1), 41. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010041>
147. Wang, J., Kong, M., Zhou, Z., Yan, D., Yu, X., Cheng, X. et al. (2017). Mechanism of surface charge triggered intestinal epithelial tight junction opening upon chitosan nanoparticles for insulin oral delivery. *Carbohydrate Polymers*, 157, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.021>
148. Raptis, K., Heade, J., Cunha, C., van de Weert, M., Saaby, L., Rønholdt, S., Nielsen, H. M. (2025). Permeation Enhancer-based Ionogel Shows Remarkable Potential for Oral Insulin Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 14 (20). <https://doi.org/10.1002/adhm.202500946>
149. Maher, S., Heade, J., McCartney, F., Waters, S., Bleiel, S. B., Brayden, D. J. (2018). Effects of surfactant-based permeation enhancers on mannitol permeability, histology, and electrogenic ion transport responses in excised rat colonic mucosae. *International Journal of Pharmaceutics*, 539 (1-2), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.008>
150. Perinelli, D. R., Cespi, M., Casertari, L., Vllasaliu, D., Cangiotti, M., Ottaviani, M. F. et al. (2016). Correlation among chemical structure, surface properties and cytotoxicity of N-acyl alanine and serine surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.015>
151. Fan, W., Xia, D., Zhu, Q., Li, X., He, S., Zhu, C. et al. (2018). Functional nanoparticles exploit the bile acid pathway to overcome multiple barriers of the intestinal epithelium for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 151, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.022>

152. Wu, H., Nan, J., Yang, L., Park, H. J., Li, J. (2023). Insulin-loaded liposomes packaged in alginate hydrogels promote the oral bioavailability of insulin. *Journal of Controlled Release*, 353, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.032>
153. Kumar, P., Kaur, N., Tiwari, P., Gupta, A. K., Mobin, S. M. (2023). Gelatin-Coated Copper-Based Metal–Organic Framework for Controlled Insulin Delivery: Possibility toward Oral Delivery System. *ACS Materials Letters*, 5 (4), 1100–1108. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialslett.2c01175>
154. Gu, Zh., Yu, J. (2018). Glucose-responsive insulin delivery microneedle system. Patent US11191815B2.
155. Aich, K., Singh, T., Dang, S. (2022). Advances in microneedle-based transdermal delivery for drugs and peptides. *Drug Delivery and Translational Research*, 12 (7), 1556–1568. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01056-8>
156. Oramed Completes Patient Enrollment in Pivotal Phase 3 Oral Insulin Study ORA-D-013-1 (2022). ANP. Available at: <https://persportaal.anp.nl/artikel/CSN-030522109/oramed-completes-patient-enrollment-in-pivotal-phase-3-oral-insulin-study-ora-d-013-1>
157. Eldor, R., Francis, B. H., Fleming, A., Neutel, J., Homer, K., Kidron, M. et al. (2022). Oral insulin (ORMD-0801) in type 2 diabetes mellitus: A dose-finding 12-week randomized placebo-controlled study, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 25 (4), 943–952. <https://doi.org/10.1111/dom.14901>
158. Oramed Announces Top-line Results from Phase 3 Trial of ORMD-0801 for the Treatment of Type 2 Diabetes (2023). Oramed. Available at: <https://oramed.com/oramed-announces-top-line-results-from-phase-3-trial-of-ormd-0801-for-the-treatment-of-type-2-diabetes/>
159. Halberg, I. B., Lyby, K., Wassermann, K., Heise, T., Zijlstra, E., Plum-Mörschel, L. (2019). Efficacy and safety of oral basal insulin versus subcutaneous insulin glargine in type 2 diabetes: a randomised, double-blind, phase 2 trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7 (3), 179–188. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(18\)30372-3](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(18)30372-3)
160. National Library of Medicine. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>
161. EudraCT. Available at: <https://eudract.ema.europa.eu/>

*Received 05.08.2025*

*Received in revised form 27.08.2025*

*Accepted 16.09.2025*

*Published 30.09.2025*

**Ольга Сергіївна Калюжная**, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра біотехнології, Національний фармацевтичний університет, вул. Григорія Сковороди, 53, м. Харків, Україна, 61002

**Наталія Вікторівна Хохленкова**, доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра біотехнології, Національний фармацевтичний університет, вул. Григорія Сковороди, 53, м. Харків, Україна, 61002

*\*Corresponding author: Olha Kaliuzhnaia, e-mail: kalyuzhnaia.o@gmail.com*