

ÖZET

HIZLI TUTULUM İÇİN İNSÜLİN FORMÜLASYONLARI

- 5 Gelişmiş stabilite ve etkinin hızlı başlangıcına sahip enjekte edilebilir insülin formülasyonları burada açıklanmaktadır. Formülasyonlar subkütan, intradermal ya da intramüsküler uygulamaya yönelik olabilir. Tercih edilen düzenlemede, formülasyonlar subkütan enjeksiyon aracılığıyla
- 10 uygulanmaktadır. Formülasyonlar bir şelatör ve çözünme ajanı, ve tercihen ek yardımcı maddeler ile kombinasyon halinde insülin içerir. Tercih edilen düzenlemede, formülasyon insan insülini, EDTA gibi bir çinko şelatörü ve sitrik asit ya da sodyum sitrat
- 15 gibi bir çözünme ajanını içerir. Bu formülasyonlar subkütan enjeksiyon ile uygulandığında hızlı bir şekilde kan dolaşımının içine emilir. Tercih edilen düzenlemede, insülin, bir çok kullanımlı steril flakonda bir berrak akışkan, nötr pH olarak sağlanır. Bir alternatif düzenlemede, insülin bir
- 20 steril flakonda bir toz olarak sağlanır. Bu uygulamadan hemen önce ya da uygulama sırasında su gibi bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcıyı, EDTA gibi bir çinko şelatörü ve sitrik asit gibi bir çözünme ajanını içerir. Bir seyrelticiyle karıştırılır. Başka bir düzenlemede, insülin
- 25 çözülmeden sonra kullanıma hazır olan, bir dondurulmuş karışım olarak saklanır.

İSTEMLER

1. İnsülin, çözünme ajanı, ve çinko şelatör içeren bir insülin formülasyonu olup, özelliği; formülasyonun 7,0 ve 7,6
5 üzerinde bir pH arasında bir pH'a sahip olması ve berrak bir sulu çözelti olması ve HCl ve söz konusu çinko şelatörle kombinasyon halinde olan insüline göre artırılmış bir ilettime ve emilime sahip olması, olup, özelliği; formülasyonun hiyalüronik degrade edici enzim içermemesidir.
- 10 2. İstem 1'in formülasyonu olup, özelliği; formülasyonun insülin, çözünme ajanı, çinko şelatör, ve bir ya da daha fazla yardımcı maddeden oluşmasıdır.
3. İstem 1 ya da 2'nin formülasyonu olup, özelliği; formülasyonun 7,2 ila 7,6'lık bir pH'a sahip olmasıdır.
- 15 4. Herhangi bir önceki istemin formülasyonu olup, özelliği; formülasyonun 7,4 ya da 7,5'lik bir pH'a sahip olmasıdır.
5. İstem 1'in bir formülasyonu olup, özelliği; çinko şelatörün etilendiamin-tetraasetik asit (EDTA), EGTA, trisodyum sitrat (TSC), alginik asit, alfa lipoik asit, dimerkaptosüksinik
20 asit (DMSA) ve CDTA'dan (1,2-diaminosikloheksantetraasetik asit) oluşan gruptan seçilmesidir.
6. İstem 5'in formülasyonu olup, özelliği; çinko şelatörün etilendiamintetraasetik asit (EDTA) olmasıdır.
7. İstem 1'in formülasyonu olup, özelliği; çözünme ajanının
25 asetik asit, askorbik asit, sitrik asit, glutamik, süksinik, aspartik, maleik, fümarik, ve adipik asit, ya da bunların bir tuzu, tercihen sitrik asit ya da sodyum sitrattan oluşan bir gruptan seçilen asit ya da asetat, askorbat, sitrat, glutamat, aspartat, süksinat fumarat, maleat, ve adipat ve
30 bir metal Grup I grup II metal, tercihen sodyum ya da potasyum askorbat, sitrat, glutamat, aspartat, süksinat, fumarat, maleat, ve adipattan oluşan bir gruptan seçilen bir tuz olmasıdır.
8. İstem 7'nin formülasyonu olup, özelliği; çözünme ajanının

magnezyumun bir tuzu olmasıdır.

9. Herhangi bir önceki istemin formülasyonu olup, özelliği; insülin çözeltisinin pH'ını yaklaşık 4'ten 7,0 ve 7,6 üzerinde bir pH arasında bir pH'a yükseltilerek formülasyonun hazırlanmasıdır.
10. İstem 1'in formülasyonu olup, özelliği; insülinin insan insülininden, insülin analoglarından ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilmesidir.
11. İstem 10'un formülasyonu olup, özelliği; insülinin rekombinant insan insülini olmasıdır.
12. İstem 1'in formülasyonu olup, özelliği; insülinin bir birinci kapta bir kuru toz olarak sağlanması ve çinko şelatörünün ve çözünme ajanının en azından birinin bir seyreltici içeren bir ikinci kapta sağlanmasıdır.
13. İstem 1'in formülasyonu bir diyabetiğin tedavisi için bir dondurulmuş farmasötik olarak kabul edilebilir formülasyon olarak sağlanmıştır.
14. İstem 1'in formülasyonu 4°C'de bir berrak sulu çözelti olarak sağlanmıştır.
15. Önceki istemlerin herhangi birine göre bir enjekte edilebilir insülin formülasyonu, bir diyabetik bireyin tedavisi için, söz konusu çinko şelatör ve HCI ile kombinasyon halinde olan insüline kıyasla, insülinin epitel hücreler aracılığıyla tutulumunu ve iletimini artırmada kullanmak için insülini ve etkili bir miktarda bir çözünme ajanını ve bir çinko şelatörü içerir.

TARİFNAME

HIZLI TUTULUM İÇİN İNSÜLİN FORMÜLASYONLARI

- 5 Buluş enjekte edilebilir hızlı etkili ilaç verme insülin formülasyonlarının genel alanındadır.

ÖNCEKİ TEKNİK

10 *Diyabete genel bakış*

- Glukoz enerji üretmek ve yaşamı desteklemek için vücudun tüm hücrelerinin kullandığı basit bir şekerdir. İnsanlar hayatta kalabilmek için kanlarında her zaman minimum seviyede glukozu ihtiyaç duyarlar. Vücudun kan glukozu üretmesinin ilk yolu besinin sindirilmesidir. Kişi bu glukozu besinin sindirilmesiyle elde etmiyorsa, glukoz dokudaki depolardan üretilir ve karaciğerden salınır. Vücudun glukoz seviyelerini insülin düzenler. İnsülin pankreasın doğal olarak salgıladığı bir peptit hormonudur. İnsülin hayati derecede önemli bir enerji kaynağını sağlamak için glukozun vücut hücrelerine girmesine yardımcı olur.

- Sağlıklı bir birey yemeğe başladığında, pankreas birinci-faz insülin salınımı denilen doğal bir insülin artışı salar. Yiyeceğin sindirimiyle kana giren glukozu işlemek için yeterince insülin sağlamaya ek olarak, birinci-faz insülin salınımı yiyeceğin sindirimi gerçekleşirken glukoz yapmayı durdurmak için karaciğere bir sinyal görevi görür. Karaciğer glukoz üretmediği ve sindirimle glukozu işlemek için yeterince ek insülin olduğu için, sağlıklı bireylerin kan glukozu seviyeleri nispeten sabit kalır ve kan glukozu seviyeleri çok yüksek olmaz.

Diyabet anormal şekilde yüksek seviyelerde kan glukozu ve yetersiz seviyelerde insülin ile karakterize edilen bir

hastalıktır. Diyabetin başlıca iki tipi vardır -Tip 1 ve Tip 2. Tip 1 diyabetinde, vücut hiç insülin üretmez. Tip 2 diyabetinin erken evresinde, pankreasın insülin üretmemesine rağmen, ya vücut doğru zamanda insülin üretmez ya da vücut hücreleri insülin direnci olarak bilinen bir durum olan, insülini görmezden gelir.

Diğer semptomların görülmesinden önce bile, Tip 2 diyabetinin ilk etkilerinden biri yiyecek kaynaklı birinci-faz insülin salınımının kaybıdır. Birinci-faz insülin salınımının yokluğunda, karaciğer glukoz yapmayı durdurmak için sinyalini almayacaktır. Sonuç olarak, vücudun yiyeceğin sindirimiyle yeni glukoz üretmeye başladığı sırada karaciğer glukoz üretmeye devam edecektir. Sonuç olarak, diyabet hastalarının kan glukozu seviyesi yemekten sonra çok yükselecektir, bu hiperglisemi olarak bilinen bir durumdur. Hiperglisemi glukozun doğal olmayan şekilde kandaki belirli proteinlere yapışmasına neden olur, bu da proteinlerin küçük kan damarlarının bütünlüğünü korumak için normal işlevini yerine getirme yeteneğini engeller. Her yemekten sonra görülen hiperglisemi ile, küçük kan damarları en sonunda parçalanır ve sızıntı yapar. Hipergliseminin uzun vadeli yan etkileri körlüğü, böbrek işlevinin kaybını, sinir zedelenmesini ve duyu kaybını ve periferde zayıf dolaşımı, potansiyel olarak ekstremitelerde amputasyonu gerektirmeyi içerir.

Yemekten sonra iki ve üç saat arasında, tedavi edilmemiş bir diyabetiğin kan glukozu o kadar yükselir ki pankreas aşırı büyük miktarda bir insülin salgılaması için bir sinyal alır. Erken Tip 2 diyabetli bir hastada, pankreas hala cevap verebilir ve bu büyük miktardaki insülini salgılar. Bununla birlikte, bu durum sindirimin neredeyse bittiği ve kan glukoz seviyelerinin düşmeye başladığı sırada oluşur. Bu aşırı büyük miktardaki insülinin iki zararlı etkisi vardır. Birincisi, zaten kötü durumda olan pankreasın üzerine uygun olmayan şekilde aşırı yüklenir, bu da pankreasın daha hızlı şekilde

kötüleşmesine ve pankreasın insülin üretemez hale gelmesine yol açabilir. İkincisi, sindirimden sonra çok fazla insülin hastalık durumunun daha da kötüleştirebilen, kilo alımında sebep olur.

5

Diyabete Yönelik Güncel Tedaviler ve Bunların Kısıtlamaları

Tip 1 diyabetli hastalar hiç insülin üretmedikleri için, Tip 1 diyabeti için başlıca tedavi günlük yoğun insülin tedavisidir.

- 10 Tip 2 diyabetinin tedavisi tipik olarak diyet ve egzersizin yönetimi ile başlar. Kısa vadede yardımcı olmasına rağmen, yalnızca diyet ve egzersizle tedavi Tip 2 diyabetli hastaların çok büyük bir çoğunluğu için uzun vadede etkili bir çözüm değildir. Diyet ve egzersiz artık yeterli olmadığında, tedavi
- 15 çeşitli insülin-içermeyen oral ilaçlarla başlar. Bu oral ilaçlar pankreasın ürettiği insülin miktarını artırarak, insülin-duyarlı hücrelerin duyarlılığını artırarak, karaciğerin glukoz çıktısını azaltarak ya da bu mekanizmaların bazı kombinasyonu ile etki ederler. Bu tedaviler hastalığı
- 20 etkili bir şekilde yönetme yetenekleri bakımından kısıtlıdır ve genellikle kilo alımı ve hipertansiyon gibi, önemli yan etkileri vardır. İnsülin-içermeyen tedavilerin kısıtlamalarından dolayı, Tip 2 diyabetli birçok hasta zaman içerisinde kötüleşir ve sonunda metabolizmalarını desteklemek
- 25 için insülin tedavisine gereksinim duyarlar.

İnsülin tedavisi diyabeti tedavi etmek için 80 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Bu tedavi genellikle her gün birkaç enjeksiyon uygulamayı içerir. Bu enjeksiyonlar günde bir ya da iki defa uzun-etkili bazal enjeksiyonun ve yemek-saatinde

30 hızlı etkili bir enjeksiyonun uygulanmasından oluşmaktadır. Bu tedavi rejimi etkili olarak kabul edilse de, kısıtlamaları vardır. İlk olarak, hastalar iğnelerin zorluğundan ve acısından dolayı kendilerine insülin enjekte etmekten genellikle hoşlanmazlar. Sonuç olarak, hastalar reçete edilen

tedavi rejimlerine yeterince uymamaya meyillidir ve sıklıkla yanlış bir şekilde ilaçla tedavi edilirler.

Daha önemlisi, doğru şekilde uygulandığında bile, insülin enjeksiyonları insülinin doğal zaman-etki profilini

5 tekrarlamaz. Özellikle, diyabeti olmayan bir kişide birinci-faz insülin salınımının doğal artışı yiyecekten kana glukoz girdiğinde birkaç dakika içinde kan insülin seviyelerinin artmasıyla sonuçlanır. Aksine, enjekte edilen insülin, insülin artış seviyelerinin regüler insan insülinin enjekte edilmesini
10 takiben 80 ila 100 dakika içinde meydana gelmesiyle yavaşça kana girer.

Potansiyel bir çözüm yemek yemeden hemen önce diyabetik hastaların damarına insülinin doğrudan enjeksiyonudur.

İnsülinin intravenöz enjeksiyonlarının çalışmalarında,
15 hastalar yemeği takiben 3 ila 6 saat boyunca kan glukozlarının daha iyi bir kontrolünü sergilemişlerdir. Bununla birlikte, çeşitli medikal sebeplerden ötürü, her yemekten önce insülinin intravenöz enjeksiyonu pratik bir tedavi değildir.

İnsülin tedavilerindeki önemli gelişmelerden biri insülin

20 lispro (IL), insülin aspart (IA) ve insülin glulisin (IG) gibi, hızlı-etkili insülin analoglarının 1990'lı yıllarda tanıtılmasıydı. Bununla birlikte, hızlı-etkili insülin analoglarıyla bile, insülin artış seviyeleri tipik olarak enjeksiyonu takiben 50 ila 90 dakika içinde oluşur. Hızlı-

25 etkili insülin analogları birinci-faz insülin salınımını yeterince taklit etmediği için, insülin tedavisini kullanan diyabetli hastalar bir yemeğin başlangıcında yetersiz insülin seviyelerine ve yemeklerin arasında çok fazla insüline sahip olmaya devam ederler. İnsülin verilmesindeki bu gecikme yemek

30 başlangıcından sonra erken hiperglisemiyle sonuçlanabilir. Ayrıca, yemekler arasında aşırı insülin hipoglisemi olarak bilinen anormal şekilde düşük kan glukozu seviyesi ile sonuçlanabilir. Hipoglisemi zihin keskinliğinin kaybı, konfüzyon, hızlı kalp atışı, açlık, terleme ve bayılma ile

sonuçlanabilir. Çok düşük glukoz seviyelerinde, hipoglisemi bilinç kaybı, koma ve hatta ölümle sonuçlanabilir. Amerikan Diyabet Birliği ya da ADA'ya göre, insülin-kullanan diyabetik hastalar yılda bir defa ortalama 1.2 şiddetli hipoglisemik olay yaşamıştır, bu olayların çoğu hastaların hastane acil servisine gitmesini gerektirmiştir.

İnsülinin kana verilmesi süreci tüm glukoz kontrolünde önemli bir rol oynadığı için, hızlı etkili insülin analoglarından daha hızlı bir şekilde kana ulaşan enjekte edilebilir bir insülin insülinine önemli ihtiyaç vardır.

Bu yüzden, gelişmiş stabiliteye ve etkinin hızlı başlangıcına sahip hızlı etkili enjekte edilebilir insülin sağlamak buluşun bir amacıdır.

15 **BULUŞUN ÖZETİ**

Gelişmiş stabilite ve etkinin hızlı başlangıcına sahip enjekte edilebilir insülin bileşimleri burada açıklanmaktadır. Formülasyonlar subkütan, intradermal ya da intramüsküler uygulamaya yönelik olabilir. Tercih edilen düzenlemede, formülasyonlar subkütan enjeksiyon aracılığıyla uygulanmaktadır. Formülasyonlar bir şelatör ve çözünme ajanı, ve tercihen ek yardımcı maddeler ile kombinasyon halinde insülin içerir. Tercih edilen düzenlemede, formülasyon insan insülinini, EDTA gibi bir çinko şelatörünü ve sitrik asit gibi bir çözünme ajanını ve sodyum sitrat gibi bir tuzu içerir. Bu formülasyonlar subkütan enjeksiyon ile uygulandığında hızlı bir şekilde kan dolaşımının içine emilir. Örnekler pH'ın fizyolojik pH'a artırılabilirliğini ve yine de insülinin çözünmesini ve hızlı tutulumunu elde edebileceğini göstermektedir. Bir düzenlemede, insülin steril bir flakonda bir kuru toz olarak sağlanır. Bu su gibi, farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı, ve tercihen EDTA gibi bir çinko şelatörü ve/veya sitrik asit gibi bir çözünme ajanını

içeren bir seyrelticiyle uygulamadan hemen önce ya da uygulama sırasında karıştırılır. Diğer bir düzenlemede, genellikle yaklaşık 4 pH'da olan, insülin, çözülmeden sonra kullanıma hazır olan, dondurulmuş bir karışım halinde saklanır. Tercih edilen düzenlemede, insülin 4°C'de saklanan, pH 7'de bir sulu çözelti olarak sağlanır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

10 Şekil 1 çıplak yüzey yüklerini gösteren ve yükü maskelemek için uygun boyuttaki moleküllerle ("çözünme ve şelatlama ajanları") üst üste bindirilmiş insülinin üç boyutlu bir şematiğidir.

Şekil 2 bir verici odacığından 12 bir 0.1 mikron filtre 16 üzerinde ölümsüzleştirilmiş oral epitel hücrelerin 14 4-5 katmanları aracılığıyla bir alıcı odacığının 18 içine insülin Emilimini ölçmek için kullanılan transwell cihazının 10 bir şematik diyagramıdır.

Şekil 3a ve 3b çözünme ajanı olarak seçilen asitin bir işlevi olarak, 0.45 mg EDTA/ml ile ya da olmaksızın, Şekil 2'nin transwell sistemindeki oral epitel hücreler aracılığıyla *in vitro* insülin iletimini (mikroünite cinsinden kümülatif insülin) karşılaştıran grafiklerdir. EDTA 0.45 mg/mL'de sabitken asit konsantrasyonları aşağıdaki gibi çeşitlilik gösterdi: Şekil 3a, Aspartik asit (0.47 mg/mL), Glutamik asit (0.74 mg/mL), Süksinik asit (0.41 mg/mL), Adipik asit (0.73 mg/mL) ve Sitrik asit (0.29 mg/mL ve 0.56 mg/mL), pH aralığı 3.2-3.8. Şekil 3b, Maleik (0.32 mg/ml), Fumarik asit (1.28 mg/mL) ve Oksalik asit (0.32 mg/mL), pH aralığı 2-3. İki zaman aralığı (10 ve 30 dk) karşılaştırmalı analiz için seçildi. Bulgular ortalama artı ya da eksi standart hata ölçülüdür, n=4.

Şekil 4a ve 4b 0.56 mg EDTA/mL ve aşağıdaki eşmolar (1.50×10^{-3} Mol) konsantrasyonlarındaki asitler ile ya da olmaksızın,

faklı çözünme ajanlarını karşılaştıran, Şekil 2'de gösterilen transwell sisteminde oral epitel hücreler aracılığıyla *in vitro* insülin iletiminin (mikroünite cinsinden kümülatif insülin) grafikleridir: Aspartik asit (0.20 mg/mL), Glutamik asit (0.22 mg/mL) ve sitrik asit (0.29mg/mL) (Şekil 4a) ve 1.80 mg/mL'de Citrik asit (Şekil 4b). İki zaman aralığı (10 ve 30 dk) karşılaştırmalı analiz için seçildi.

Şekil 5 farklı şelatörlerin etkinliğini karşılaştırmak için Şekil 2'nin transwell sistemini kullanan oral epitel hücreler aracılığıyla *in vitro* insülin iletiminin bir grafiğidir. Şekil 5 ölçülen (kümülatif insülin, mikromoller) oral epitel hücreler aracılığıyla aynı molar konsantrasyonundaki (4.84×10^{-3} Mol) farklı şelatörlere eklenen glutamik asit, sitrik asit ya da HCl içeren bir çözeltiden insülin (1 mg/mL) iletiminin bir grafiğidir. Şelatörler şelatör (kontrol), EDTA, EGTA, DMSA, CDTA, ve TSC değildi.

Şekil 6 IL (12 U) ve RHI'ye (12 U) kıyasla, ortalama glukoz infüzyon hızı (GIR)/kg olarak ölçülen, sitrik asit ve EDTA (12 U) ile hazırlanmış insülinin, insan denekleri üzerinde *in vivo* farmakodinamik etkisinin bir grafiğidir.

Şekil 7 RHI'ye, zaman içindeki(dakika) insülin konsantrasyonu (mikroÜnite/ml), kıyasla, insanlarda sitrik asit ve EDTA ile hazırlanmış insülinin *in vivo* farmokinetik etkisinin grafiğidir. Ortalama değerler ($\pm$ SEM, n=10). İnsülin dozu 12 U/denek idi.

Şekil 8 RHI ve IL'ye kıyasla, zaman içinde (dakika) kan glukozu (mg/dl) çizen; sitrik asit ve EDTA ile hazırlanmış insülinin 16 diyabetik tip 2 hastalarda *in vivo* farmakodinamiğin grafiğidir. Hasta deneyinde kullanılan dozaj mevcut insülin tedavilerine göre her hasta için, hastaya özel hazırlandı.

Şekil 9A 0.17, 0.51, 1.68, ve 3.62 mg/ml konsantrasyonlarında RHI'nin sedimantasyon katsayılarının bir grafiğidir.

Şekil 9B 0.15, 0.56, 1.75, ve 3.59 mg/ml konsantrasyonlarında

IL'nin sedimentasyon katsayılarının bir grafiğidir.

Şekil 9C 0.16, 0.56, 1.66, ve 3.56 mg/ml konsantrasyonlarında IA'nın sedimentasyon katsayılarının bir grafiğidir.

Şekil 9D 0.15, 0.55, 1.72, ve 3.48 mg/ml konsantrasyonlarında

5 CE100-4'ün sedimentasyon katsayılarının bir grafiğidir.

Şekil 10A 0.18, 0.55, ve 1.72 mg/ml konsantrasyonlarında RHI'nin sedimentasyon katsayıları için yükleme konsantrasyonuna normalize edilen c(s) dağılımlarının bir grafiğidir.

10 Şekil 10B 0.17, 0.57, ve 1.82 mg/ml konsantrasyonlarında IL'nin sedimentasyon katsayıları için yükleme konsantrasyonun normalize edilmiş c(s) dağılımlarının bir grafiğidir.

Şekil 10C 0.19, 0.54, ve 1.84 mg/ml konsantrasyonlarında IA'nın sedimentasyon katsayıları için yükleme konsantrasyonuna
15 normalize edilmiş c(s) dağılımlarının bir grafiğidir.

Şekil 10D 0.18, 0.40, ve 0.84 mg/ml konsantrasyonlarında CE100-4'ün sedimentasyon katsayıları için yükleme konsantrasyonuna normalize edilen c(s) dağılımlarının bir grafiğidir.

20 Şekil 11 0.18, 0.57, 1.74 ve 3.53 mg/ml konsantrasyonlarında kontrol insülini pH 7'nin sedimentasyon katsayıları için yükleme konsantrasyonun normalize edilmiş c(s) dağılımlarının bir grafiğidir.

Şekil 12 CE 100-4, CE 100-7, ve CES 100-7 için bir seyreltme işlevi olarak insülin ortalama partikül boyutunun (nm) bir
25 grafiğidir.

Şekil 13 diyabetik minyatür domuzda zaman içinde (dakika) ELİSA ile insülin konsantrasyonunun (pünite/ml) bir grafiğidir.

30 **BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI**

Burada açıklanan enjekte edilebilir insan insülinin insülin formülasyonları yemekten hemen önce ya da yemeğin sonunda uygulanmaktadır. Tercih edilen düzenlemede, formülasyon

rekombinant insan insülinini genellikle FDA tarafından güvenli olarak görülen belirli içeriklerle birleştirir. Formülasyon halihazırda pazarlanan hızlı-etkili insülin analoglarından daha hızlı kana emilmek için tasarlanmıştır. İnsülin formülasyonunun önemli özelliklerinden biri insülinin altı molekül, ya da heksamerik, insülin formundan insülinin monomerik ya da dimerik formuna ayrışmasına, ya da ayrılmasına, olanak sağlaması ve heksamerik forma tekrar-birleşmesini engellemesidir. Monomerik ya da dimerik formu destekleyerek, bu formülasyonun insülin arzu edilen biyolojik etkilerini üretmek için vücudun içine emilmeden önce insan vücudu insülinin tek bir molekülün formunda olmasına gerek duyduğunda insülinin kana daha hızlı verilmesine olanak sağladığı düşünülmektedir. Enjeksiyon için satılan çoğu insan insülini heksamerik formdadır. Bu durum insülin heksameri dimerler ve sonrasında monomerler oluşturmak için ilk önce ayrışmak zorunda olduğu için, vücut için emilimi daha zor hale getirir.

20 I. Tanımlar

Burada kullanıldığı şekliyle, "insülin", aksi belirtilmedikçe, insan ya da insan-dışı, rekombinant, saflaştırılmış ya da sentetik insülin ya da insülin analoglarını anlatmaktadır.

25 Burada kullanıldığı şekliyle, "İnsan insülini", bir doğal kaynaktan izole edilmiş ya da genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalar tarafından yapılmış pankreasın salgıladığı insan peptit hormonudur.

Burada kullanıldığı şekliyle, "insan-dışı insülini" insan insülini ile aynıdır fakat domuz ya da inek gibi bir hayvan kaynağındandır.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir insülin analogu, pankreasın salgıladığı insülininden farklı, fakat doğal insülinle aynı işlevi gerçekleştirmek için vücuda uygun olan değiştirilmiş

- bir insülinidir. Altta yatan DNA'nın genetik mühendisliği aracılığıyla, insülinin amino asit dizilişi ADME (emilim, dağılım, metabolizma, ve atılım) özelliklerini değiştirmek için kullanılabilir. Örnekler insülin lispro, insülin glarjin,
- 5 insülin aspart, insülin glulisin, insülin detemiri içerir. İnsülin aynı zamanda, örneğin, asetilasyonla kimyasal olarak değiştirilebilir. Burada kullanıldığı şekilde, insan insülini analogları insan insülini ile aynı biyolojik etkiyi gerçekleştirebilen değiştirilmiş insan insülinidir.
- 10 Burada kullanıldığı şekliyle, bir "şelatör" ya da "şelatlama ajanı", çinko iyonlarla bir ya da daha fazla bağ oluşturma yeteneğine sahip olan bir kimyasal bileşiği anlatmaktadır. Bağlar tipik olarak iyonik ya da koordinasyon bağlarıdır. Şelatör inorganik ya da organik bir bileşik olabilir. Bir
- 15 şelat kompleksi metal iyonun şelatlama ajanının iki ya da daha çok atomuna bağlandığı bir komplekstir. Burada kullanıldığı şekliyle, "çözme ajanı", bir çözücü içindeki materyallerin, örneğin, bir sulu çözelti içindeki insülin, çözünürlüğünü artıran bir bileşiktir. Çözme
- 20 ajanlarının örnekleri surfaktanları (TWEENS®); etanol gibi, çözücüyü; oksietilen monostearat gibi, misel oluşturan bileşikleri; ve pH-düzenleyici ajanları içerir. Burada kullanıldığı şekliyle, bir "çözünme ajanı", aşağıdaki örneklerde açıklanan epitel hücre transwell plaka tahlili
- 25 kullanılarak ölçülen, insülin ve EDTA'ya eklendiğinde, aynı pH'da HCl ve EDTA'ya göre insülinin iletimini ve emilimini artıran bir asit ya da tuzdur. HCl bir çözünme ajanı değildir fakat bir çözme ajanı olabilir. Sitrik asit ve sodyum sitrat bu tahlilde ölçüldüğünde çözünme ajanlarıdır. Buna en azından
- 30 kısmen, bazılarının heksamerden ayrışması sırasında açığa çıktığı insülin üzerindeki yüklerin maskelenmesi ile ulaşıldığını düşünülmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle, bir "yardımcı madde", insülin için bir taşıyıcı olarak kullanılan ya da bir ürünün imal

edildiği sürece yardımcı olmak için kullanıldığı bir şelatör ya da çözünme ajanı dışında bir inaktif maddedir. Bu gibi durumlarda, aktif madde bir yardımcı madde ile çözünür ya da karıştırılır.

- 5 Burada kullanıldığı şekliyle, bir "fizyolojik pH" 6.8 ve 7.6 arasında, tercihen 7 ve 7.5 arasında, en çok tercih edilen şekilde yaklaşık 7.4'tür.

Burada kullanıldığı şekliyle, VIAJECT™ bir sitrik asit ve EDTA gibi bir şelatör gibi bir çözünme ajanıyla formüle edilmiş bir

- 10 rekombinant insan insülini için bir ticari markadır. *Viaject 25 U/mL (CE 25-4)* 25 U/mL regüler rekombinant insan insülini, 1.8 mg/mL Sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA, 0.82% NACI (izotonisite) ve 3 mg/mL m-krezol içerir. Dondurulmuş şekilde saklanan bir sulu çözelti olarak, ya da, en azından birinin
- 15 sitrik asit ve EDTA içerdiği kuru toz insülini ve seyrelticiden oluşan iki parçalı bir kit halinde sağlanır. Hem sulandırılarak hazırlanmış karışımın hem de dondurulmuş çözeltinin pH'ı yaklaşık olarak pH 4'tür. *Viaject 100U/mL (CE 100-4)* 100 U/mL regüler rekombinant insan insülini, 1.8 mg/mL
- 20 sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA, 22 mg/mL gliserin, 3 mg/mL m-krezol içerir.

Bu aynı zamanda ya dondurulmuş bir sulu çözelti ya da kuru tozlu insülin ve seyrelticiden oluşan iki parçalı kit olarak sağlanır. Sulandırılarak hazırlanmış karışımın ve dondurulmuş

- 25 çözeltinin her ikinin pH'ı yaklaşık olarak 4'tür. *Viaject 100U/mL (CE 100-7)* 100 U/mL regüler rekombinant insan insülini, 1.8 mg/mL sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA., 22 mg/mL gliserin, 3 mg/mL m-krezol içerir.

Bu, 4°C'de saklanabilen yaklaşık 7.4 pH'a sahip bir sulu

30 çözelti olarak sağlanır. *Asit tuzlara sahip VIAject (CSE 100-7)* 1.8 mg/mL hem EDTA hem de trisodyum sitratı suya ekleyerek, sonrasında 100U/mL insülin ekleyerek, pH'ı 6'ya düşürerek, sonra pH'ı 7.4'e çıkartarak yapılır.

Formülasyonlar

Formülasyonlar insülin, bir şelatör ve bir çözünme ajan(lar)ı ve, tercihen, bir ya da daha çok diğer yardımcı maddeleri içerir. Tercih edilen düzenlemede, formülasyonlar subkütan uygulamaya uygundur ve yağlı subkütan dokunun içine hızlı bir şekilde emilir. Çözünme ajanı ve şelatör tercihi, hem çözünme ajanının hem de şelatörün konsantrasyonu, ve formülasyonun ayarlandığı pH, hepsinin sistemin etkinliği üzerinde büyük etkisi vardır. Çoğu kombinasyon etkinliğe sahip olsa da, tercih edilen düzenleme, güvenliği, stabiliteyi, düzenleyici profili, ve performansı içeren pek çok sebepten ötürü seçilmiştir.

Tercih edilen düzenlemede, formülasyon içeriklerinden en azından biri aktif ajan üzerindeki yükleri maskelemek için seçilmiştir. Bu insülinin transmembran iletimini ve kolaylaştırabilir ve böylece hem etkinin başlangıcını hem de insülin için biyoyararlanımı artırır. İçerikler ayrıca sulu ortamda hızlı bir şekilde çözünen bileşimler oluşturmak için de seçilmiştir. Tercihen insülin, etkinin hızlı başlangıcıyla (tercihen uygulamayı takiben yaklaşık 5 dakika içinde başlayarak ve uygulamayı takiben yaklaşık 15-30 dakikada artarak) sonuçlanacak şekilde hızla emilir ve plazmaya taşınır.

EDTA gibi, şelatör, insülin çözeltisinden çinkoyu çıkararak, insülinin içine çinkoyu şelatlar. Bu durum insülinin dimerik ve monomerik formunu almasına sebep olur ve heksamer durumuna tekrar birleşmeyi geciktirir. Örneklerde açıklanan çalışmalar ayrışan heksamerin tüm boyutunun çinko kompleks insülin heksamerinden daha büyük olduğunu, sonrasında daha küçük üniteler oluşturduğunu göstermektedir. Heksamerler, dimerler ve monomerler bir konsantrasyon-odaklı dengede mevcut olduğu için, monomerler emildikçe, daha çok monomerler oluşturulur. Bu yüzden, insülin monomerleri subkütan dokudan emildikçe, ek

dimeler daha çok monomer oluşturmak için gizlenir. Tamamen ayrıışmış monomerik form, böylece insülin emiliminin hem hızını hem de miktarını önemli derecede artıran, heksamerik formun bir-altı molekül ağırlığından daha az olan bir ağırlığa sahiptir. Şelatör (EDTA gibi) ve/veya çözünme ajanının (sitrik asit gibi) insülinle hidrojen bağı olması durumunda, transmembran iletimini kolaylaştırarak ve böylelikle hem etkinin başlangıcını hem de insülin için biyoyararlanımı artırarak, insülin üzerindeki yükü maskeleyiği düşünölmektedir.

İnsülin

İnsülin rekombinant ya da doğal bir kaynaktan saflaştırılmış olabilir. İnsülin insan ya da insan-dışı olabilir. İnsan tercih edilmektedir. En çok tercih edilen düzenlemede, insülin insan rekombinant insülinidir. Rekombinant insan insülini birçok kaynaktan temin edilebilir. İnsülin aynı zamanda insan insülinin amino asit dizilişine dayanabilen fakat bir ya da daha fazla amino asitler farklılıklarına, ya da kimyasal olarak değiştirilmiş bir insüline ya da insülin analoguna sahip olan bir insülin analogu olabilir.

İnsülinin dozajları biyoyararlanımına ve tedavi edilecek hastaya bağılıdır. İnsülin genellikle insan dozu başına 1.5-100 IU, tercihen 3-50 IU doz aralığında yer alır. Tipik olarak, insülin 10 IU flakonlarda sağlanır.

Çözünme ajanları

Belirli asitlerin, ya da bunların tuzların, Şekil 1'de gösterildiği üzere, tutulumu ve iletimi artırarak, insülin üzerindeki yükleri maskeleyiği görölür. Çözünme ajanları olarak etkili olan bu asitler, aşağıdaki örneklerde açıklanan transwell tahlilinde ölçölen, hidroklorik aside kıyasla,

asetik asit, askorbik asit, sitrik asit, glutamik, aspartik, süksinik, fumarik, maleik, ve adipik içerir. Örneğin, aktif ajan insülinse, tercih edilen bir çözünme ajanı sitrik asittir. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksit pH ayarlaması için tercih edilen ajanlardır. HCl formülasyonların herhangi biriyle kombinasyon halinde kullanılabilir, fakat bir çözünme ajanı değildir. Asitlerin tuzları sodyum asetat, askorbat, sitrat, glutamat, aspartat, süksinat, fumarat, maleat, ve adipat içerir. Organik asitlerin tuzları metal hidroksitler, metal oksitler, metal karbonatlar ve bikarbonatlar, metal aminlerin yanı sıra, amonyum klorür, amonyum karbonat, vb. gibi amonyum bazlarını içeren, fakat bununla sınırlı olmayan, çeşitli bazlar kullanılarak hazırlanabilir. Uygun metaller tek değerli ya da çok değerli metal iyonları içerir. Örnekleyici metal iyonları lityum, sodyum, ve potasyum gibi Grup I metalleri; baryum, magnezyum, kalsiyum, ve stronsiyum gibi, Grup II metalleri; ve alüminyum gibi yarı metalleri içerir. Çok değerli metal iyonları birden fazla karboksilik asit grubunu içeren organik asitleri için arzu edilebilir olabilir çünkü bu iyonlar birden fazla karboksilik asit grubuna eşzamanlı olarak kompleks oluşturabilir.

Çözünme ajanının aralığı 9.37×10^{-4} M ila 9.37×10^{-2} M sitrik asit arasındaki insülin ve EDTA ile kombinasyon halinde olan etkili bir sitrik asit miktarına karşılık gelir.

25

Şelatörler

Tercih edilen düzenlemede, çinko şelatörü insülinle karıştırılmıştır. Şelatör iyonik ya da non-iyonik olabilir. Uygun şelatörler etilendiamintetraasetik asit (EDTA), EGTA, aljinik asit, alfa lipoik asit, dimerkaptosüksinik asit (DMSA), CDTA (1,2-diaminosikloheksantetraasetik asit), trisodyum sitrat (TSC) içerir. Hidroklorik asit pH'ı ayarlamak için TSC ile birlikte kullanılır, ve işlemde, bir çözünme

ajanı olan sitrik asidin oluşumuna yol açar.

Tercih edilen düzenlemede, şelatör EDTA'dır. Şelatör insülinin çinkoyu yakalar, böylelikle insülinin dimerik formunu heksamerik forma tercih eder ve uygulama alanını çevreleyen dokulardan (örneğin, mukoza, ya da yağlı doku) insülinin emilimini kolaylaştırır. Ek olarak, şelatör hidrojeni aktif ajana bağlanabilir, böylece insülin monomerlerinin yük maskelenmesine yardım eder ve insülin monomerlerinin transmembran iletimini kolaylaştırır.

- 5
- 10 Şelatörün aralığı 2.42×10^{-4} M ila 9.68×10^{-2} M EDTA arasındaki insülin ve sitrik asitle kombinasyon halinde olan etkili bir EDTA miktarına karşılık gelir.

Yardımcı maddeler

15

Farmasötik bileşimler aktif bileşiklerin farmasötik olarak kullanılabilen preparatlara işlenmesini kolaylaştıran yardımcı maddeleri ve yardımcıları içeren bir ya da daha fazla fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcıları kullanan geleneksel bir şekilde formüle edilebilir. İlaçların formülasyonu, örneğin, Remington'ın Farmasötik Bilimleri, Mack Yayınevi, Easton, Pensilvanya(1975), ve Liberman, H.A. ve Lachman, L., Eds., Farmasötik Dozaj Şekilleri, Marcel Decker, New York, N.Y. (1980) kitaplarında tartışılmıştır.

- 20
- 25 Tercih edilen düzenlemede, bir ya da daha fazla çözme ajanı sulu ortamda hızlı çözünmeyi artırmak için insülin ajanıyla yer alır. Uygun çözme ajanları polisorbatsızlar, gliserin ve poloksamerler, non-iyonik ve iyonik surfaktanlar, gıda asitleri ve bazlar (örneğin, sodyum bikarbonat), ve alkoller,
- 30 ve pH kontrolü için tampon tuzlar gibi ıslatma ajanlarını içerir.

Dengeleyiciler, örnek yoluyla, oksidatif tepkimeleri içeren ilaç ayrışım tepkimelerini önlemek ya da geciktirmek için kullanılır. Çok sayıda dengeleyici kullanılabilir. Uygun

dengeleyiciler selüloz ve selüloz türevleri gibi, polisakkaritleri; ve gliserol gibi, basit alkoller; fenol, m-krezol ve metilparaben gibi bakteri önleyici ajanları; sodyum klorür, gliserol, ve glukoz gibi, izotonik ajanları; örnek
5 doğal lesitinler (örneğin yumurta sarısı lesitin ya da soya fasulyesi lesitin) ve sentetik ya da yarısentetik lesintiler (örneğin, distearoil-fosfatidilserin, dipalmitoilfosfatidilserin ve diarakidoilfosfatidilserin; fosfatidilgliseroller; fosfatidilinozitoller; kardiolipinler;
10 spingomyelinler gibi dimiristofilfosfatidilkolin, dipalmitoilfosfatidilkolin ya da distearoil-fosfatidilkolin; fosfatidikasitler; fosfatidiletanolaminler; fosfatidilserinler gibi lesitinleri içerir. Bir örnekte, dengeleyici gliserolün, bakteri önleyici ajanların ve izotonik
15 ajanların bir kombinasyonu olabilir.

II. Formülasyonların yapım metotları

Enjekte edilebilir formülasyon insülin, bir şelatör, ve bir
20 çözünme ajanı içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, enjekte edilebilir formülasyonlar insülin, EDTA, Sitrik asit, salin ve/veya gliserin içerir.

Bir düzenlemede, subkütan enjekte edilebilir formülasyon bir çözelti oluşturmak ve çözeltiyi sterilize etmek ("seyreltici"
25 olarak anılacaktır) için salini ve gliserini, sitrik asidi ve EDTA'yı karıştırarak üretilmiştir. İnsülin bir çözelti oluşturmak için steril bir suya ayrı olarak eklenir, süzülür, ve çok sayıda ayrı steril enjeksiyon şişelerinin her birine belirlenmiş bir miktarı yerleştirilir. İnsülin çözeltisi bir
30 toz oluşturmak için dondurularak kurutulur ve stabilitesini korumak için seyrelticiden ayrı bir şekilde saklanmalıdır. Uygulamadan önce, seyreltici insülin enjeksiyon şişesine eklenir. İnsülinin önceden belirlenmiş bir miktarı hastaya deri altından enjekte edilir, geriye kalan insülin çözeltisi,

tercihen soğutmayla, saklanabilir.

Başka bir düzenlemede, insülin seyrelticiyle, pH 4, birleştirilir çok-kullanımlı enjeksiyon flakonlarına ya da kartuşlarına steril olarak süzülür ve kullanımdan önce

5 dondurulur.

Tercih edilen bir düzenlemede, insülin, flakonlarda ya da kartuşlarda, pH 7.0'da, bir sulu çözelti olarak hazırlanır ve 4°C'de tutulur.

10 III. Formülasyonları Kullanma Metotları

Formülasyonlar subkütan ya da intramüsküler enjeksiyon yoluyla uygulanabilir. Formülasyon hızlıca emilmek ve sistemik iletim için plazmaya iletilmek için tasarlanmıştır.

15 Aktif ajan olarak insülin içeren formülasyonlar yemekten önce ya da sırasında tip 1 ya da tip 2 diyabetik hastaya uygulanabilir. Hızlı emilimden dolayı, bileşimler glikojenin karaciğerdeki glukozla dönüşümünü durdurabilir, böylelikle hiperglisemi, diyabet komplikasyonlarının ana nedeni ve tip 2

20 diyabetin ilk semptomu önlenabilir. İnsan insülininin halihazırda temin edilebilen, standart, subkütan enjeksiyonları arzu edilen etkiden daha azını sağlamak için yemekten yaklaşık yarım ila bir saat önce uygulanmalıdır, çünkü insülin karaciğerde glukozun üretimini durdurmak için

25 yavaş emilmektedir. Ek olarak, hastalığın ilerlemesinde eğer yetersince erken verilirse, subkütan insülin bileşimleri tip 2 diyabetinin ilerlemesini yavaşlatabilir ya da durdurabilir.

Düşük pH formülasyonunun avantajı BYETTA® (eksenatid), SYMLIN® (pramlintid) asetat), ve LANTUS® (uzun etkili insülin analog)

30 ile karıştırılabilmesidir, bunların hiçbirisi karışmazlık ve çökelmeden dolayı piyasada mevcut olan diğer türdeki insülinlerle karıştırılamaz.

Daha yüksek pH insülininin avantajı saklama sırasında daha düşük pH'da olan insülinlerden daha stabil olmasıdır. Mevcut buluş

aşağıdaki sınırlayıcı-olmayan örneklerle istinaden daha iyi anlaşılacaktır. Aşağıdaki insülinler örneklerde kullanıldı.

HUMULIN® (RHI) rekombinant insan insülinidir. Her mililitre 100 ünite regüler rekombinant insan insülini, 0.22% m-krezol, 1.4-1.8% gliserin, pH 7 içerir. Bu birçok kaynaktan ticari olarak temin edilebilir.

Eli Lilly (IL)'den HUMALOG®, insülin lispro enjeksiyon, insülin B-zinciri üzerinde 28 ve 29 konumlarında olan amino asitler ters çevrildiğinde oluşan, bir Lys (B28), Pro(B29) insan insülin analoğu olan bir rekombinant insan insülin analoğudur. IL enjeksiyonunun her mililitresi insülin lispro 100 ünite, 16 mg gliserin, 1.88 mg dibazik sodyum fosfat, 3.15 mg metakrezol, 0.0197 mg çinko iyon sağlamak için ayarlanmış çinko oksit içeriği, eser miktarda fenol, ve enjeksiyon için su içerir. İnsülin lispro 7.0 ila 7.8 pH'a sahiptir. Hidroklorik asit 10% ve/veya sodyum hidroksit 10% pH'ı ayarlamak için eklenebilir. IL'nin bir ünitesi Regüler insan insülininin bir ünitesiyle aynı glukoz-düşürücü etkiye sahiptir, fakat etkisi daha hızlıdır ve daha kısa sürelidir.

NOVOLOG® (IA) Novo Nordisk A/S'den temin edilebilen bir rekombinant insülin analoğudur. Bu analog B28 konumunda aspartik asitle amino asit prolininin tek bir değiştirimini içerir, ve rekombinant maya tarafından üretilir. 100 Ünite insülin aspart/ml, 16 mg/ml gliserin, 1.50 mg fenol/ml,

1.72 mg metakrezol/ml, 19.6 mg çinko/ml, 1.25 mg disodyum hidrojen fosfat dihidrat/ml, 0.58 mg sodyum klorür/ml içeren, 7.2 ila 7.6 pH'a sahip olan, 10% HCl ya da NaOH ile ayarlanan bir steril, sulu çözeltide sağlanır.

VIAJECT™ sitrik asit ve EDTA ile formüle edilen bir rekombinant insan insülinidir. Viaject 25 U/mL (CE 25-4) 25 U/mL regüler rekombinant insan insülinleri, 1.8 mg/mL Sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA, 0.82% NaCl (izotonisite) ve 3 mg/mL m-krezol içerir. Dondurulmuş şekilde saklanan bir sulu

çözelti olarak, ya da, en azından birinin sitrik asit ve EDTA içerdiği kuru toz insülini ve seyrelticiden oluşan iki parçalı bir kit halinde sağlanır. Hem sulandırılarak hazırlanmış karışımın hem de dondurulmuş çözeltinin pH'ı yaklaşık olarak 5 pH 4'tür. Sulandırılarak hazırlanmış toz örneklerde kullanılan şeydir. *Viaject 100U/mL (CE 100-4)* 100 U/mL regüler rekombinant insan insülini, 1.8 mg/mL sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA, 22 mg/mL gliserin, 3 mg/mL m-krezol içerir. Bu aynı zamanda ya dondurulmuş bir sulu çözelti ya da kuru tozlu 10 insülin ve seyrelticiden oluşan iki parçalı kit olarak sağlanır. Sulandırılarak hazırlanmış karışımın ve dondurulmuş çözeltinin her ikisinin pH'ı yaklaşık olarak 4'tür. Analitik santrifüj veriler ve malvernde yalnızca dondurulmuş sulu çözelti kullanıldı. *Viaject 100 U/mL (CE 100-7)* 100 U/mL 15 regüler rekombinant insan insülini, 1.8 mg/mL sitrik asit, 1.8 mg/mL disodyum EDTA, 22 mg/mL gliserin, 3 mg/mL m-krezol içerir. Bu, 4°C'de saklanabilen yaklaşık 7.4 pH'a sahip olan bir sulu çözelti olarak sağlanır. Bu domuz çalışmasında kullanıldı. *Asit tuzlarına sahip olan VIAject (CSE 100-7)* su 20 içinde hem EDTA hem de trisodyum sitrat ile, 100U/mL insülin ve gliserin (22 mg/mL) ile yapılır. Son pH sodyum hidroksitle 7.4'e ayarlanır. Bu malvern bilgisi için son örnekte kullanıldı.

25 **Örnekler 1: Çözünme Ajanının Bir İşlevi Olarak Epitel Hücre Transwell Tahlilini Kullanan İnsülinin Tutulumunun ve İletiminin *In Nitro* Karşılaştırması**

Materyaller ve Metotlar

30

Oral epitel hücreler, Şekil 2'de gösterildiği üzere çoklu (4-5 katman) hücre katmaları oluşana kadar iki hafta boyunca transwell insertleri üzerinde büyütüldü. İletim çalışmaları verici kuyucuğuna uygun çözeltileri ekleyerek ve 10 dakika

sonra alıcı kuyucuğundan numuneleri çıkararak yürütüldü. Çözeltiler sudan, +/- EDTA'dan (0.45 mg/ml), NaCl'dan (0.85% w/v), 1 mg/ml insülin ve pH'ı 3.8'de tutmak için yeterli miktarda asitten oluştu. Alıcı kuyucuklarındaki insülin miktarı ELİSA kullanılarak test edildi.

Bulgular

Şekil 3a ve 3b'de gösterilen bulgular epitel hücreler aracılığıyla insülin tutulumunu ve iletimini artırmada bazı asitlerin daha etkili olduğunu göstermektedir. Bunlar kolayca test edilebilir ve HCl kullanılarak elde edilen bulgularla kıyaslanabilir, böylelikle test edilebilecek ya da bir çözünme ajanı olarak saptanabilecek (yani, HCl'ye göre tutulumu ve iletimi artıran) ya da saptanmayacak herhangi bir aside karşı bir standart sağlar.

3.2-3.8 aralığında pH'a sahip asitlerle elde edilen bulgular Şekil 3a'da gruplandırılmıştır. Daha güçlü asitler (pH <3) Şekil 3b'de gruplandırılmıştır.

Bulgular aynı şelatör konsantrasyonuna sahip olan asit tercihinin hücre kültürü yoluyla insülinin iletimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Tercih edilen asit sitrik asittir.

Örnek 2: Çözünme Ajanının Konsantrasyonunun Bir İşlevi Olarak Epitel Hücre Transwell Tahlilini Kullanan İnsülinin Tutulumunun ve İletiminin *In Vitro* Karşılaştırması

Materyaller ve Metotlar

Örnek 1'in materyalleri ve metotları reaktiflerin farklı konsantrasyonları ile kullanıldı. Çalışmada, asidin ve şelatörün eşmolar konsantrasyonları eklendi. Çözeltiler sudan, +/- EDTA'dan (0.56 mg/mL), NaCl'dan (0.85% w/v), 1 mg/mL

insülininden ve asitten: Aspartik asit (0.20 mg/mL), Glutamik asit (0.22 mg/mL) ya da sitrik asit (0.20 mg/ml) oluşur. Sitrik asit şelatörle ve şelatörsüz 1.8 mg/mL'lik daha yüksek bir konsantrasyonda test edildi. Bu veriler, hücre verici odacıklarının dozlama sonrası iki zaman aralığında, 10 ve 30 dakika, gösterilmiştir.

Bulgular

10 Aspartik asit (0.20 mg/mL), Glutamik asit (0.22 mg/mL) ya da sitrik asitle (0.29 mg/ml) elde edilen bulgular Şekil 4a'da gösterilmektedir. Bu durumda, şelatörün eklenmesiyle görülen önemli bir fark yoktu.

Aksine, daha yüksek bir konsantrasyonda, 1.80 mg/mL'de, Sitrik asit kullanan çalışma şelatörün çözeltiye eklenmesi üzerine önemli bir artış (t-testi karşılaştırması, tek taraflı) göstermiştir. Bkz. Şekil 4b. Bu her iki bileşenin konsantrasyonunun tutulumu ve iletimi iyileştirmede önemli olduğunu göstermektedir.

20

Örnek 3: Şelatörün bir işlevi olarak Epitel Hücre Transwell Tahlili kullanan İnsülinin Tutulumu ve İletiminin In Vitro Karşılaştırması

Materyaller ve Metotlar

Oral epitel hücreler çoklu (4-5) hücre katmanları oluşana kadar iki hafta boyunca transwell insertlerinin üzerinde büyütüldü. İletim çalışmaları verici kuyucuğuna uygun çözeltileri ekleyerek ve 10, 20 ve 30 dakika sonra alıcıdan numuneler çıkarılarak yürütüldü.

Çözeltiler aşağıdaki şekilde transwell deneylerinden hemen önce hazırlandı: 1.8 mg/ml'de sitrik asit 0.85% w/v salinle çözüldü ve sonrasında aşağıdaki şelatörlerden biri gösterilen

konsantrasyonda bu çözeltiye eklendi:

1.8 1.80 mg/ml'de EDTA, 1.84 mg/ml'de EDTA, 0.88 mg/ml'de EDTA ve 1.42 mg/ml'de EDTA. CDTA sıvı formunda kullanıldığı için, sitrik asit doğrudan CDTA'ya eklendi. Bu durumların her

5 birinde, şelatörün konsantrasyonu 4.84×10^{-3} molde sabitti.

İnsülin sonrasında 1 mg/ml'de eklendi ve pH gerekirse 3.8'e tekrar-ayarlandı. pH ayarlaması için yalnızca HCl kullanan

numunelerin bir kontrol seti karşılaştırma için dahil edildi.

10 Transwell deneyleri her bir çözeltinin 0.2 ml'si verici kuyucuklarına eklenerek yapıldı.

Alıcı kuyucuklarındaki insülin miktarı ELİSA kullanılarak test edildi.

Bulgular

15

30 dakika insülin verilerinin bir grafiği Şekil 5'te gösterilmektedir. TSC (trisodyum sitrat) ile elde edilen bulgularla kıyaslandığı zaman dışında, sitrik ya da glutamik asit kullanıldığında hücreler aracılığıyla iletilen büyük

20 ölçüde daha çok insülin vardı. TSC durumunda, pH ayarlaması için HCl kullanıldı. pH'ın ayarlanması, bu bulguları açıklayacak şekilde sitrik asit oluşturdu. Bu bulgularda gösterildiği üzere, tutulumun ve iletimin artırılması şelatör tercihine bağlıdır.

25

Örnek 4: Domuzda sitrik asit bazlı insülin formülasyonunda şelatörlerin preklinik değerlendirmesi

Materyaller ve Metotlar

30

Yayınli bir çalışmayla ilgili olarak, A. Plum, H. Agerso ve L. Andersen. hızlı-etkili insülin analogunun, insülin aspartın, sıçanlarda, köpeklerde ve domuzlarda farmakokinetiği, ve domuzlarda insülin aspartın farmakodinamiği. Drug Metab.

Dispos., 28(2):155-60 (2000), eliminasyondaki bir gecikme enjeksiyon alanından daha yavaş emilim anlamına geldiği için, eliminasyon yarı ömrünün insülin emiliminin iyi bir belirleyici etkeni olduğu saptandı. Bu yüzden, bir minyatür domuz çalışmasının bir bölmesiz analizi PK ve PD parametrelerini, özellikle eliminasyon yarı ömrünü incelemek için gerçekleştirildi. Diyabetik domuz insülinin dört formülasyonundan biriyle deri altından enjekte edildi. Bu formülasyonlar bir şelatörü (EDTA, EGTA ya da TSC) içerdi ve dördüncü kontrol yalnızca regüler insan insülinini RHI içerdi, hiç şelatör yoktu. Sitrik asit (1.8 mg/ml) tüm şelatör formülasyonlarında asit olarak kullanıldı, ve NaCl ve m-krezol tüm durumlarda izotinisite ve formülasyon sterilliği için eklendi. Şelatörler 4.84×10^{-3} molün aynı molar konsantrasyonundaydı.

Domuz bir gece aç bırakıldı, ve 0.125 U/kg doz EDTA (n=3) içeren insan insülini ya da 0.08 U/kg EGTA ya da TSC (n=2) içeren insan insülini deri altından uygulandı. Yüksek dozla aşırı kan glukozu düşürmeden dolayı dozlar azaltıldı. Kan glukozu ve insülin seviyeleri tüm zaman noktalarında, doz sonrası 8 saate saptandı.

Farmakokinetik modelleme, üniform ağırlıklandırmayla bir bölmesiz model kullanan, Win Nonlin ile gerçekleştirildi. Eliminasyon yarı ömürler Tablo 1'de karşılaştırıldı:

Tablo 1: Şelatörün İşlevi olarak Domuzda Kan Glukozunun Karşılaştırması

İnsülin	Yarı ömür "lamda z" (dk. +/-sd) Son yarı ömür
RHI/ Şelatör yok,	120
İnsülin/EDTA	39.1 +/-15.8
İnsülin/EGTA	37.5 +/- 8.0
İnsülin/TSC	30.1 +/- 9.0

Domuzda bu pilot çalışmada regüler insan insülininin eliminasyon yarı ömrü (120 dk) literatürde görülen ile tutarlıydı ve verileri doğrulamak için ölçme noktası olarak kullanıldı. Bu sonraki intravenöz uygulamadan büyük ölçüde daha uzun olduğu için, bu enjeksiyonu takiben enjeksiyon alanından devamlı yavaş emilim olduğunu doğrulamaktadır.

Sitrik asit formülasyonundaki şelatörler bu parametrede açıkça bir azalma göstermiştir, bu da bu üç şelatörün, farklı derecelerde olsa da regüler insan insülininin emilimini artırmada etkili olduğunu göstermiştir.

Örnek 5: İnsan klinik deneyinde EDTA-sitrik asit insülin formülasyonunun regüler insan insülinine karşılaştırması.

Materyaller ve Metotlar

Bu çalışmanın amacı sitrik asit ve EDTA, "CE 25-4" ile kombinasyon halinde insülin içeren bir test formülasyonunun farmakodinamik (PD) özelliklerini değerlendirmektir. Beş öglisemik glukoz-kelepçeleri (Biostator; hedef kan glukozu 90 mg/ml) 10aç bırakılmış gönüllüde (ortalama yaş 40 (20-62 yaş aralığı); VKİ 22.5 (19.2-24.9) kg/m²) gerçekleştirildi. Bir sabit tedavi sırasıyla bir çapraz tasarım kullanarak, 12 IU Regüler insülin CE insülin formülasyonunun 12 IU'su karın bölgesine deri altından enjekte edildi.

Bulgular

Bulgular Şekil 6 ve 7'de gösterilmektedir. CE 25-4'ün SC enjeksiyonu glukoz tüketim regüler insan insülininde büyük ölçüde daha hızlı bir artış üreten bir zaman-etki profiliyle sonuçlandı. Ortalama farmakokinetik veriler PD bulgularını doğrulamaktadır (Şekil 7).

Bu çalışma regüler insan insülinine sitrik asit ve EDTA'nın

eklenmesinin maksimal konsantrasyona daha hızlı bir zamanla (Şekil 7) ve regüler insan insüline kıyasla daha etkinin daha hızlı bir başlangıcıyla (Şekil 6) gösterildiği üzere insülinin emilim hızını geliştirmektedir.

5

Örnek 6: Tip 1 Diyabetli Hastalarda Yemekten Hemen Önce Deri Altından Enjekte Edildiğinde CE İnsülininin, İnsülin Lispronun ve Regüler İnsan İnsülininin Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği

10

Arkaplan ve hedefler: Bu çalışmanın amacı Tip 1 diyabetli hastalarda standart bir yemekten sonra tokluk kan glukozu (BG) ekskürsiyonları üzerinde CE 25-4, RHI, ve IL'nin etkisini saptamaktır.

15

Materyaller ve Metotlar

20

9 hastanın BG'si (5 erkek ve 4 kadın; yaş 40 ± 10 yaş, VKİ 24.0 ± 2.0 kg/m²) yemeğin sindiriminden önce bir glukoz kelepçesi (hedef BG 120 mg/dl) aracılığıyla stabilize edildi. Glukoz infüzyonu standart yemekten ve insülin dozlamadan önce kapatıldı. Sabit tedavi sırasıyla bir çapraz çalışma tasarımı kullanarak, VLAject™ (CE25-4) IL ya da RHI'nin aynı hastaya özgü dozu şöyle ki yemekten hemen önce enjekte edildi.

25

Sonrasında, tokluk glukoz ekskürsiyonları 8 saat boyunca devamlı olarak kontrol edildi ve glukoz infüzyonu BG 60 mg/dl'den daha azsa tekrar başlatıldı. Plazma insülin seviyeleri çalışma boyunca saptandı.

Bulgular

Ortalama artı ya da eksi standart sapma olarak Tablo 2’de gösterilen bulgular yemekten sonra tip 2 diyabetik hastalara 5 deri altından enjeksiyondan sonra insülin Tmax’i, regüler insan insülinini, insülin artı sitrik asidi ve EDTA (CE) ve lisproyu karşılaştırmaktadır. Tablo 3’te gösterilen bulgular aynı test denekleri için kan glukozunu karşılaştırmaktadır.

Tablo 2: İnsülin Tmax(dk)’nin Karşılaştırması

Farmakokinetik	RHI	IL	(CE25-4)
Ins Tmax (dk)	143±29*	62±37	43±36*
*p<.001, bağımlı t-testi			

Tablo 3: İnsülin Farmakokinetik Kan Glukozunun Karşılaştırması

Farmakodinamik(0-180 dk)	RHI	IL	CE 25-4
BG TMax (dk.)	93 ± 56*	47±28	41±26*

(tablonun devamı)

Farmakodinamik(0-180 dk.)	RHI	IL	CE 25-4
BG Max (mg/dL)	185±44	158±33	157±27
BG Min (mg/dL)	103±21	73±31	87±24
BG Max-BG Min (mg/dL)	82±30	84±11*	70±18*
*p<0.05, bağımlı t-testi			

Enjeksiyon sonrası 1 ila 8 saat hipoglisemik olayların toplam sayısı (glukoz infüzyonunu gerektiren saatler) RHI ile 13, IL ile 11 ve CE 25-4 formülasyonu ile 4’tü. Bu sürede hipoglisemiyi önlemek için infüze edilen glukozun ortalama toplam miktarı CE 25-4 ile olduğundan RHI için altı kat daha fazlaydı ve IL için iki fazlaydı. Grup başına tüm hastalar için toplanan normal glisemik hedef bölgesinin üzerindeki ve altındaki alanlar (BG AUC 140’ın yukarısında ve 80mg/dL’nin

altı nda) RHI için 81,895, IL için 57,423 ve CE 25-4 için 38,740 mg/dL*dk idi. Ortalama kan glukozu seviyeleri Şekil 8'de gösterilmektedir. CE 25-4 standart yemeği takiben kan glukozundaki artışı tersine çevirmekte en hızlıydı. CE 25-4 ile tedavi edilen hastalar azalmış tokluk glukozu ekskürsiyonları deneyimledi. Aksine, RHI en yüksek glukoz ekskürsiyonuna sahipti, ki bu da daha düşük emilim hızıyla tutarlıdır. Glukoz seviyelerinin değişkenliği (maksimal minimum değerler arasındaki ortalama fark) CE 25-4 için IL'den büyük ölçüde azdı, bu da bu tip 1 diyabetli hastalarda CE 25-4'ün daha iyi glisemik kontrolünü göstermektedir.

Örnek 7: Işık Saçılımıyla İnsülinlerin Boyutlarının Karakterizasyonu

CE 100-4 hastalarda çok hızlı bir ekti başlangıcına sahiptir. Hızlı emilim profilinin temelini anlamak için, *in vitro* deneyler piyasada mevcut olan diğer rekombinant insan insülinlerine ve hızlı etkili insülin analoglarına kıyasla CE 100-4 ile gerçekleştirildi. Işık saçılımı teknikleri sentetik hücre dışı akışkan tamponda bir seyreltme dizisinin yanı sıra orijinal ürünlere uygulandı. Sonuçlar regüler rekombinant insülinin ve hızlı etkili analogların aksine, CE 100-4'ün hızlı emilim profiliyle tutarlı olan, bir 1:3 seyrelticiden sonra yaklaşık olarak bir dimerinki kadar boyutunda azaldığını göstermektedir.

Materyaller ve Metotlar

Bu etkinin hızlı başlangıcının mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için, *in vitro* deneyler subkütan enjeksiyonu takiben doğal olarak oluşan şeyi taklit etmek için bir araç olarak bir sentetik hücre dışı akışkan tamponda geleneksel formülasyonun seyrelticisinin etkisini çalışmak için

tasarlandı. Bir ışık saçılım tekniği ortalama boyut dağılımını (nm) değerlendirmek için kullanıldı. Bu *in vitro* deneylerinde karşılaştırma için kullanılan ticari hızlı etkili ya da prandiyal insülin formülasyonları: IL, IA, RHI ve CE 100-4'tü.

- 5 Boyut karşılaştırması için, monomerik (pH 2.0) ve heksamerik çinko insülinlerinin (pH 7) standart preparasyonları standartlar için kullanıldı.

- Ticari insülinler Zetasizer nano (Malvern Inst, UK) ile boyut için karakterize edildi. Bir mL numuneleri cam küvete
10 yerleştirildi ve çözeltideki insülinin bir ortalama volümetrik boyut dağılımını (nm) saptamak için analiz edildi. 3 numunenin ortalaması (her numune birkaç çalışmaya sahipti) karşılaştırma için bir temel olarak kullanıldı. İlk tam mukavemet analizini takiben, bir seyreltici dizisi benzer pH'a ve hücre dışı
15 akışkanın tamponluk kapasitesine (ECF, 0.7 mM Much, 1.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM KCl, 0.5 mM Na_2SO_4 , 104 mM NaCl, 28.3 mM NaHCO_3) sahip olan tamponda 1:2 ila 1:16 ile gerçekleştirildi. Ortalama boyut, her bir formülasyon için monomer/dimer/heksamer boyutunu anlamak için piyasada mevcut
20 olan insülinlerin ve CE 100-4'ün her biriyle tüm seyrelticiler için saptandı.

İnsülinler

- 25 RHI, IL, IA, ve CE 100-4.

Seyrelticiler

- Steril suda ECF, 0.7mM MgCl_2 , 1,2mM CaCl_2 , 2mM KH_2PO_4 , 2mM KCl,
30 0.5mM Na_2SO_4 , 104 mM NaCl, 28.3 mM NaHCO_3 .

Bulgular

Boyut ölçüm çalışmalarında, seyreltilmemiş CE 100-4 IL, IA ve RHI'dan daha büyüktür. Bununla birlikte, bir 1:3
5 seyrelticiyle, diğer çalışılan insülinler yaklaşık 5 nm heksamerik boyutta kalırken CE 100-4'ün ortalama boyutu 2 nm ile monomerik/dimerik boyuta azaltıldı. IL, IA ve RHI değil fakat CE 100-4 artırılmış seyrelticiyle daha da azaltıldı. Seyreltilmemiş RHI daha küçük görünür fakat 1:1 ile
10 seyreltiğinde 5 nm'den daha büyük boyuta büyür ve 1:16 oranında bir seyreltiye bu boyut aralığında kalır.

Seyreltilmemiş CE 100-4, yüzey yükünü maskeleyerek subkütan alanlardan emilim hızını daha da artırmaya yarayabilecek, muhtemelen sitirik asit ve EDTA zayıf bir şekilde yüzeye
15 çekildiği için, çalışılan diğer insülinlerden ilk başta daha büyük görünmektedir. Yük emilime bir engel olabilir. Subkütan uygulamadan kısa bir süre sonra, enjekte edilen materyal ECF ile seyreltildiği için, CE 100-4 özdeş seyreltilerde hızlı etkili insülin analoglarından ve RHI'den daha küçük bir
20 ortalama boyuta sahiptir.

Örnek 8: İnsülinin Analitik Ultrasantrifügasyonu

Materyaller ve Metotlar

Bir dizi deney, yüzme etkili molar ağırlığa orantılı olan
25 ağırlık ortalamalı sedimentasyon katsayısının (Svedbergs^{20°C}, su S(20,w)) bir tahminini saptayan, analitik ultrasantrifügasyon kullanılarak geliştirildi. Bu analize yönelik prosedür ışık saçılım boyut saptamasından biraz farklıydı. İlk olarak, her numune ticari ürününki ile
30 bileşimde özdeş olan bir seyreltici ile seyreltildi. Bunu elde etmek için, bir 3kDa MW ayırma sınırı ile Centriprep® Ultracel-3 membran filtre ünitesi(Millipore Inc, MA, USA) insülini seyrelticiden ayırmak için kullanıldı. Orijinal seyreltici geri kazanıldı ve herhangi bir insülin içeriğinin

varlığı için analiz edildi. Onaylanan insülininsiz seyrelticiler ticari ürünü seyreltmek için kullanıldı.

Bu birinci veriler dizisi insülini bir stabil tek türler olarak ya da kendi seyrelticisinde heksamerden, dimerden, monomerden değişen biri olarak karakterize etmek için kullanıldı. Verilerin iki dizisi analitik ultrasantrifügasyon kullanılarak elde edildi. Verilerin birinci dizisi formülasyonun tam seyrelticisiyle seyreltiden elde edildi. Ticari preparasyonların durumlarında, bu insülini ya da analoğu seyrelticiden ayıran sentiprep tüplerden elde edildi. Süzüntü protein içeriği için kontrol edildi ve son onay deneylerin birinci aşamasında seyreltici için kullanıldı.

Numunelerin ikinci dizisi seyreltici yerine ECF tamponunu değiştirerek hazırlandı. Bunun çalışması için, en çok konsantre edilen numune ilk önce ECF 1:2 ile seyreltildi. Başka seyreltiler sonrasında ECF ile yapıldı. CE 100-4'ün durumunda, izoelektrik noktasının herhangi bir çöktürülmüş maddeyi yok etmek için çaprazladığından emin olmak için ECF'nin ilk seyreltisi 1:4'tü. Bu deneyler subkütan sonrası enjeksiyon ortamını taklit etmeyi amaçladı.

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir. Hız analizi bir Beckman-Coulter XL-analitık ultrasantrifügasyonla girişim optikleri kullanarak 20°C ve 55,000 RPM'de yürütüldü. Safir pencerelerle donatılmış çift sektör sentetik sınır hücreleri numune ve referans menisküslerini eşleştirmek için kullanıldı. Rotor 20°C'de vakum altında dengelendi ve yaklaşık 1 saatlik bir süreden sonra 20°C'de rotor 55,000 RPM'ye hızlandırıldı. Interferans taramaları 5 saat boyunca 60 saniye aralıklarla elde edildi

Birçok analitik program her bir numuneye özgü bilgi elde etmek için veriler (DcDt+ vers. 2.1.02, ve Sedfit, vers 11.3b3) üzerinde çalıştırıldı. Sedfit programından veriler aşağıdaki

bulgulara gösterilmektedir. DcDt konsantrasyon profilinin zaman türevlerini kullanan bir model bağımsız, sedimentasyon katsayısı dağılımıdır $g(s^*)$. Konsantrasyonda bir artışla S' 'nin daha yüksek değerlerine kayma yoksa, meydana gelen tersine çevrilebilir tepkimeler (yani monomer, dimer heksamer) yoktur. Boyut ve şekil seyreltinin üzerinde değişirse (heksamerden dimere monomere kayarak), molekül ağırlığının tahminini saptamak mümkün değildir, fakat sedimentasyon katsayısı $S(w)$ üzerine Sedfit programında faydalı bilgiler elde edilebilir. Ek olarak, bu program Lamm denkleminde bir model bazlı sayısal çözüm kullanan bireysel veriler dizisi için bir doğrudan sınır modeli üretir. ³ Çökelti türlerinin nispi boyutlarını açıklayan eğriler üretmek için sürekli sedimentasyon katsayısına $c(s)$ karşı sedimentasyon katsayısı (s) çizer.

15

Her bir insülinin insülin-özümlü seyrelticiyle seyreltilmesi:

A. RHI

RHI sedimentasyon hızı ultrasantrifügasyonla analiz için gönderildi. Tahmini stok konsantrasyonu 3.745 mg/ml'di. Seyreltici yukarıda açıklandığı şekildeydi. Sonraki fiziksel değişmezler Sednterp programı kullanılarak protein için amino asit bileşimlerinden hesaplandı.⁵

25 RHI: $MW_{seq} = 5792$ Da. $N_{20^\circ} = 0.726$ ml/g

Seyreltici yoğunluğu ve viskozitesi, Sednterp kullanılarak, sırasıyla, $20^\circ C$ 'de 1.00231 g/ml ve 0.01041 poise olarak hesaplandı.

30

Bulgular

Şekil 9A RHI™'nin yükleme konsantrasyonuna normalize edilmiş $c(s)$ dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. Normalize

edilmiş grafik için gösterilen veri $DcDt+$ 'dan $g(s^*)$ verileriyle tutarlıdır. Konsantrasyonda bir artışla sedimentasyonda S' 'nin değerlerine belirgin bir kayma vardır.

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	$S(20,w)$ (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	3.05	0.168
2	3.00	0.561
3	3.00	1.678
4	2.84	3.624

Sonuç:

10

Bu analizler deney koşulları altında RHI'nin öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir. Heksamerlerin dimerleri gibi görünen şeyin yanı sıra, düşük konsantrasyon numunelerinde mevcut olan küçük bir miktar yavaş çökelti materyali vardır.

15

B. IL

Materyaller ve metotlar yukarıda açıklandığı şekildedir.

Bulgular

20

Şekil 9B her bir konsantrasyon için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayılarının bir grafiğidir. Protein seyreltme üzerine ayrışır. Ek olarak, muhtemelen heksamerin bir dimeri olan daha hızlı çökelti türlerinin küçük bir miktarı (<5%) olduğu görülmektedir.

25

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	2.78	0.151
2	3.02	0.558
3	3.09	1.755
4	3.10	3.595

Sonuçlar:

5 Bu analizler bu deney koşulları altında, protein numunesinin, IL'nin öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir. Seyreltme üzerine IL'nin ayrışmasının kanıtı vardır, ve mevcut heksamerlerin dimerler olarak görünen şeyin küçük bir miktarı vardır. Çalışılan konsantrasyonlar yaklaşık olarak 30µm, 100 µm, 300µm, ve 600µm (monomer üniteleri) idi.

10 C. IA

Materyaller ve Metotlar yukarıda açıklandığı şekildedir.

Bulgular

15 Şekil 9C yükleme konsantrasyonuna normalize edilen $c(s)$ dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. Normalize edilmiş $c(s)$ grafiği için gösterilen veriler $DcDt^+$ 'dan $g(s^*)$ verileriyle tutarlıdır. Düşük konsantrasyondaki $c(s)$ eğrileri konsantrasyon arttıkça azalan daha küçük türlerin (monomer) bir katkısını gösterir. Konsantrasyonda bir artışla

20 sedimentasyondaki S' 'nin daha düşük değerlerine ayrıca hafif bir kayma vardır. Muhtemelen heksamerin bir dimeri olan daha hızlı çökelti türlerinin küçük bir miktarı (<5%) vardır.

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

25

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
--------	---------------------	---------------

1	2.72	0.158
2	3.05	0.561
3	3.19	1.655
4	3.14	3.563

Sonuçlar:

- 5 Bu analizler bu deneyin koşulları altında, IA'nın öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir. Seyreltme üzerine IA'nın ayrışmasının kanıtı vardır, ve mevcut heksamerlerin dimerleri olarak görünen şeyin küçük bir miktarı vardır. Konsantrasyon çalışmaları yaklaşık olarak 30 μm , 100 μm , 300 μm , ve 600 μm (monomer üniteleri) idi.
- 10 D. CE-100 4
- Materyaller ve Metotlar yukarıda açıklandığı şekildedir.

Bulgular

- 15 CE-100 4 için veritabanları Sedfit ve c(s) modeli kullanılarak analiz edildi. Doğrusunu söylemek gerekirse bu model yalnızca etkileşimli olmayan karışımlara uygundur fakat etkileşimli türlerin durumunda çözeltide hangi türlerin mevcut olduğu hakkında yine de bir fikir verebilir. Şekil 9D yükleme
- 20 konsantrasyonunda normalize edilmiş c(s) dağılımının bir grafiğini göstermektedir. C(s) grafiği seyreltme üzerine daha düşük S değerlerine doğru belirgin bir kayma olması açısından DcDt+'den g(s*) verileriyle tutarlıdır. Daha yüksek konsantrasyonlardan c(s) grafikleri CE 100-4'ün bir
- 25 heksamerden daha büyük olabileceğini açıkça gösterilmiştir. Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S (20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	1.85	0.153
2	2.41	0.548
3	3.05	1.722
4	3.56	3.484

Sonuçlar:

Bu analizler bu deney koşulları altındaki, protein numunesi, CE 100-4'ün monomerler, dimerler, heksamerler, ve muhtemelen daha büyük oligomerler arasında bir dengede mevcut olduğunu belirtmektedir. Konsantrasyonlar çalışmaları yaklaşık olarak 30µm, 100µm, 300µm, ve 600µm (monomer üniteler) idi.

10 ECF tamponuyla seyreltme

Ticari preparasyonlar 1:4 oranında seyreltilmiş, CE 100-4 hariç, ECF ile ilk olarak 1:2 oranında seyreltildi. Bu pH 4'te başladığı için, izoelektrik noktadan çökelmeyi önlemek için farklı bir şekilde ele alınmalıdır. Diğer ticari insülinler zaten pH 7'deydi, böylelikle ilk seyreltme 1:2 oranındaydı.

A. RHI

RHI sedimentasyon hızı ultrasantrifügasyonla analiz için verildi. Tahmin edilen stok konsantrasyonu sağlanan ECF'nin eşit bir hacmiyle seyreltmeden sonra 1.87'ydı.

Sonraki fiziksel değişmezler Sednterp programı kullanılarak protein için amino asit bileşimlerinden hesaplandı.

RHI: $MW_{seq} = 5792 \text{ Da}$, $N_{20^\circ} = 0.726 \text{ ml/g}$

Seyreltici yoğunluğu ve viskozitesi, Sednterp kullanılarak, sırasıyla, 20°C'de 1.00273 g/ml ve 0.01043 poise olarak hesaplandı.

Analizde kullanılan üç hücre için, stok çözeltisi kullanılarak, seyreltme şeması aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

Hücre#	Hacim Stok (µl)	Hacim Tampon (µl)	Tahmini Kons. (mg/ml)
1	45	405	0.19
2	150	300	0.62
3	450	--	1.87

5

Sedfit, 11.71 versiyonu, Lamm denklemine model bazlı sayısal çözümler kullanan bireysel veri dizileri için doğrudan sınır modelleme programı kullanıldı.

Devamlı sedimentasyon katsayı dağılımı, $c(s)$, model hesaplandı. $C(s)$ dağılım grafikleri, diğer analiz metotlarına göre, keskinleştirildi çünkü difüzyonun genişleme etkileri sürtünme katsayısı için bir ortalama değer kullanımıyla kaldırılmıştır.

15 **Bulgular**

Şekil 10A yükleme konsantrasyonunda normalize edilmiş $c(s)$ dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. Normalize edilmiş $c(s)$ grafiği için gösterilen veriler $DcDt+$ 'dan $g(s^*)$ verileriyle tutarlıdır. $C(s)$ grafikleri neredeyse tesadüfidir fakat konsantrasyondaki bir artışla sedimentasyonda S' 'nin daha düşük değerlerine küçük bir kayma vardır.

İki en düşük konsantrasyonda küçük bir miktar daha yavaş çökelti materyalinin (<1%), ve heksamerin muhtemelen bir dimeri olan daha küçük bir miktar hızlı çökelti türlerinin (<3%) olduğu görülmektedir. Artan konsantrasyonla daha düşük türlerde azalma ve daha hızlı türlerde bir artış konsantrasyon aralığı çalışmalarında RHI'nin kendiliğinden birleşmesinde yalnızca çok az bir kayma olduğunu işaret etmektedir.

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	3.25	0.176
2	3.24	0.552
3	3.35	1.721

5

Sonuçlar:

Bu analizler bu deneyin koşulları atında, RHI'nin öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir.

10 Heksamerlerin dimerleri olarak görünen şeyin yanı sıra, daha düşük konsantrasyon numunelerinde mevcut olan çok küçük miktarda daha yavaş çökeltme materyali vardır. Konsantrasyon çalışmaları yaklaşık olarak 30 μ M, 100 μ M, ve 300 μ M (monomer üniteleri) idi.

15 ILMetotlar yukarıda açıklandı.

Bulgular

20 Şekil 10B yükleme konsantrasyonunda normalize edilmiş c(s) dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. Normalize edilmiş c(s) grafiği için gösterilen veriler $DcDt^+$ 'dan g(s*) verileriyle tutarlıdır. Düşük konsantrasyonda c(s) eğrileri konsantrasyon arttıkça azalan daha küçük türlerin (belki dimer) önemli bir katkısını göstermektedir. Aynı zamanda 25 konsantrasyonda bir artışla sedimentasyonda S'nin daha düşük değerlerine hafif bir kayma vardır.

Özellikle iki daha yüksek numunelerde belli olan, küçük bir miktar (<2%) daha hızlı çökelti türlerinin olduğu görülmektedir.

30 Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu

için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	3.17	0.167
2	3.12	0.568
3	3.17	1.820

5 Sonuçlar:

Bu analizler, bu deneyin koşulları altında, IL'nin öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir. Seyreltme üzerine IL'nin ayrışmasının kanıtı vardır, ve mevcut heksamerlerin dimerler olarak görünen şeyin küçük bir miktar vardır. Konsantrasyon çalışmaları yaklaşık olarak 30µM, 100µ, ve 300uM idi (monomer üniteleri).

İnsülin aspart (IA)

Metotlar yukarıda açıklandı.

15

Bulgular

Şekil 10C yükleme konsantrasyonuna normalize edilmiş c(s) dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. Normalize edilmiş c(s) grafiği için gösterilen veriler DcDt+'dan g(s*) verileriyle tutarlıdır. Düşük konsantrasyonlarda c(s) eğrileri konsantrasyon arttıkça azalan küçük bir miktar daha küçük türleri (monomer/dimer) göstermektedir. Aynı zamanda konsantrasyonda bir artışla sedimentasyonda S'nin daha düşük değerlerine hafif bir kayma vardır. Grafik seyreltme üzerine proteinin az oranda ayrışmasını açıkça göstermektedir. Ek olarak, heksamerin bir dimeri olabilecek küçük miktarda (en yüksek konsantrasyon numunesine yaklaşık olarak 3%) bir daha hızlı çökelti türlerinin olduğu görülmektedir.

30 Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu

için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	3.10	0,186
2	3.23	0.544
3	3.24	1.848

5 Sonuç:

Bu analizler, bu deneyin koşulları altında, IA'nın öncelikle bir heksamer olarak mevcut olduğunu belirtmektedir. Seyreltme üzerine IA'nın ayrışmasının kanıtı vardır, ve mevcut heksamerlerin dimerleri olarak görünen şeyin küçük bir miktarı vardır. Konsantrasyon çalışmaları yaklaşık olarak 30µM, 100µ, ve 300µM idi (monomer üniteleri).

D. CE 100-4

15 Materyaller

Tahmin edilen stok konsantrasyonu sağlanan ECF'nin üç hacmiyle çözeltinin bir hacminin seyreltilmesinden sonra 0.936 mg/ml idi.

20

Metot

Analiz için kullanılan dört hücre için, stok çözeltisi kullanan, seyreltme şeması aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

25

Hücre#	Hacim Stok (µl)	Hacim Tampon (µl)	Tahmini Kons. (mg/ml)
1	90	360	0.19
2	200	250	0.42

3	450	--	0.94
---	-----	----	------

Bulgular

- 5 CE 100-4 için verisetleri Sedfit ve c(s) modeli kullanılarak analiz edildi. Açıkça konuşmak gerekirse bu model yalnızca etkileşimli olmayan karışımlara uygulanabilir fakat etkileşimli türlerin durumunda çözeltide hangi türlerin mevcut olduğu hakkında bir fikir verebilir. Şekil 10D yükleme konsantrasyonuna normalize edilen c(s) dağılımlarının bir
- 10 grafiğini göstermektedir. C(s) grafiği seyreltme üzerine daha düşük S değerlerine doğru belirgin bir kayma olması açısından DcDt+'dan g(s*) verileriyle tutarlıdır. Daha yüksek konsantrasyonlardan c(s) grafikleri CE 100-4'ün bir heksamerden daha büyük olabileceğini açıkça göstermektedir.
- 15 Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	1.61	0.178
2	1.95	0.40
3	3.14	0.84

- 20 Bu analizler, bu deneyin koşulları altında, CE 100-4'ün monomerler, dimerler, heksamerler, ve muhtemelen yüksek konsantrasyonda daha büyük oligomerler arasında dengede mevcut olduğunu belirtmektedir. Çalışılan konsantrasyonlar yaklaşık olarak 30µM, 70µM, ve 145µM idi (monomer üniteleri).

25

HCl pH 2 ya da NaOH pH 7 ile ayarlanmış suda kontroller

Sonraki fiziksel değişmezler Sednterp programı kullanılarak protein için amino asit bileşimleri için hesaplandı.⁵

IC-pH7: $MW_{seq} = 5792 \text{ Da}$, $N_{20^\circ} = 0.72 \text{ 6 ml/g}$

5 Seyreltici yoğunluğu ve viskozitesi, Sednterp kullanılarak, sırasıyla, $20^\circ\text{C}'\text{de}$ 0.99823 g/ml ve 0.01002 poise olarak hesaplandı.

İç Kontrol IC pH7

10 Metot

Analizde kullanılan dört hücre için NaOH ile su, seyreltici olarak pH 7 kullanan, seyreltme şeması aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

15

Hücre#	Hacim Stok (μl)	Hacim Tampon (μl)	Tahmini Kons. (mg/ml)
1	25	475	0.19
2	75	375	0.62
3	250	250	1.87
3	450	--	3.745

Devamlı sedimentasyon katsayı dağılımı, $c(s)$.

20 $C(s)$ dağılım grafikleri, diğer analiz metotlarına göre, keskinleştirildi çünkü difüzyonun genişleme etkileri sürtünme katsayısı için bir ortalama değer kullanımıyla kaldırılmıştır.

Bulgular

25 IC-pH7 için verisetleri Sedfit ve $c(s)$ modeli kullanılarak analiz edildi. Açıkça konuşmak gerekirse bu model yalnızca etkileşimli olmayan karışımlara uygulanabilir fakat etkileşimli türlerin durumunda çözeltide hangi türlerin mevcut

olduğu hakkında yine de bir fikir verebilir. Şekil 11 yükleme konsantrasyonuna normalize edilen $c(s)$ dağılımlarının bir grafiğini göstermektedir. $C(s)$ grafiği seyreltme üzerine daha düşük S değerlerine doğru belirgin bir kayma olması açısından

5 $DcDt+$ 'dan $g(s^*)$ verileriyle tutarlıdır.

Standart koşullara düzeltilmiş, her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Hücre#	$S(20,w)$ (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	2.43	0.18
2	2.90	0.57
3	3.04	1.74
4	3.10	3.52

10

Analizler, bu deneyin koşulları altında, numune, IC-pH7'nin, burada kullanılan üç en yüksek konsantrasyonlarda heksamerik durumu fazlasıyla destekleyen, en düşük seyreltmede bir dimer-heksamer dengesinde mevcut olduğunu belirtmektedir.

15 Konsantrasyonlar alışmaları yaklaşık olarak 30 μ M, 100 μ M, 305 μ M, ve 620 μ M (monomer üniteler) idi.

İç Kontrol IC **pH 2**

Metot:

20

İnsülin yukarıda açıklandığı üzere 0.01 N HCl ile seyreltildi.

Bulgular:

25 IC-pH2 için verisetleri yükleme konsantrasyonlarının öncelikle iyi bir tahminini elde etmek için Sedfit ve $c(s)$ modeli kullanılarak analiz edildi. Her bir yükleme konsantrasyonu için ağırlık ortalama sedimentasyon katsayısı için elde edilen değerler $DcDt+$ kullanılarak saptanan değerlere oldukça iyi bir

şekilde uymuştur. Sedfit kullanılarak saptandığı şekliyle $S_{20,w}$ değerlerinin bir tablosu aşağıda verilmektedir:

Hücre#	S(20,w) (Svedbergs)	Kons. (mg/ml)
1	1.26	0.17
2	1.28	0.56
3	1.28	1.77
4	1.28	3.61

- 5 Bu analizler, bu deneyin koşulları altında, IC-pH2'nin ayrıca kendiliğinden birleşmeye eğilim göstermeyen tek bir türler olarak (büyük olasılıkla insülin monomer) öncelikle mevcut olduğunu belirtmektedir. Çözücü koşulları herhangi bir destek elektrolitinin eksikliğinden dolayı oldukça ideal olmayandı.
- 10 Çalışılan konsantrasyonlar yaklaşık olarak 30 μ M, 97 μ M, 305 μ M, ve 620 μ M idi (monomer üniteleri).

Tüm Sonuçlar, Sedimentasyon analizi

- 15 DcDt yazılımını kullanan, RHI'nin molekül ağırlığının tahmini, molekül ağırlığının tüm seyreltme aralığında bir heksamerle (35.6 $\pm$ 1.6 kDa) tutarlı olduğunu ortaya koymuştur. Monomerik insülin (2.29 nm) için standart olan, pH 2 insülin için kontrol değerleri, seyreltme dizilerinde büyük ölçüde
- 20 değişmeden kalan 1.28 S(20,w)'lik bir sedimentasyon katsayısı değerine sahiptir, bu da monomerik durumunu doğrulamaktadır. Tam konsantrasyonda kontrol stabilize edilmemiş insülin, pH 7 heksameriktir, fakat pH 7 seyrelticide seyreltme üzerinde boyutta azalmayla gösterildiği üzere, daha küçük dimer
- 25 formlarıyla dinamik denge içindedir. IA ve IL heksamer boyut aralığında başlar ve ECF'de 1:16 oranında seyreltmeden sonra monomer/dimer formlarının küçük bir popülasyonuna sahiptir. CE 100-4 ile monomerik/dimerik partiküllerin daha yüksek bir oranı daha hızlı emilim profiliyle tutarlıdır.

Örnek 10: İnsülin pH 7.4'e sodyum sitrat ve EDTA'nın Eklenmesiyle İnsülin Boyutu üzerine Etkisinin Saptanması

5 CES 100-4'ün pH'ında 7'ye yükselme domuz modelinde hızlı emilim ve Malvern tarafından boyutunda bir azalma gösterdiği için, trisodyum sitrat için sitrik asidin bir yer değiştirmesinin aynı zamanda pH 7.4'te çalışıp çalışmayacağını görmek için alternatif bir metot tasarlanmıştır.

10

Materyaller ve Metotlar

Disodyum EDTA (1.8 mg/mL) ve trisodyum sitrat (1.8 mg/mL) gliserinle (22 mg/mL) suda çözüldü. İnsülin 3.8 mg/mL'lik bir konsantrasyonda çözeltiye eklendi. Sodyum Hidroksit pH'ı 7.4'e yükseltmek için damlatılarak eklendi. Seyreltilmemiş materyal sonrasında ortalama partikül boyutu için Malvern üzerinde analiz edildi, ve sonrasında hücre dışı akışkan tamponla (ECF) seyreltildi ve seyreltme dizileri boyunca her bir noktada boyutlandırıldı.

20

Bulgular

ECF tamponla seyreltilen, CES 100-7, Sodyum Sitrat İnsülin pH 7.4 bir asit ve nötr ortamda bir sitrik asit formülasyonu ile karşılaştırıldı. Bulgular Şekil 12'de gösterilmektedir. Şekil 12 sitrik asit, pH 7.4'ün yerine sodyum sitrat içeren CE 100-7 pH 7.5, ve CSE 100-7 için seyreltmenin bir işlevi olarak insülin ortalama partiküller boyutunun (nm) bir grafiğidir.

25

Bulgular hızlı bir şekilde ayrılan insülinin nötr bir pH'da çözeltide sodyum sitratın, EDTA'nın ve insülinin karıştırılmasıyla yaratılabileceğini göstermektedir. Ortalama partikül boyutu ilk olarak tipik bir heksamerden daha büyüktür, bu da büyük ihtimalle heksamerin ayrıştığını ve

30

insülin moleküllerinin gevşek bir şekilde birleşen multimer formunda olduğunu belirtmektedir. Enjeksiyon sonrası bir ortamda 1:2 seyreltmede (ECF'de seyreltme), insülin daha küçük ünitelere, büyük ihtimalle insülin dimerlere hızlı bir şekilde ayrışır. Yeni formülasyon tam olarak ilk olarak pH 4'te yapılan ve sonrasında pH 7'ye getirilen bir sitrik asit/EDTA insülin formülasyonu olarak davranır.

Örnek 11: Diyabetik minyatür domuzda Sitrik asit EDTA insülin pH 7

Materyaller ve Metotlar

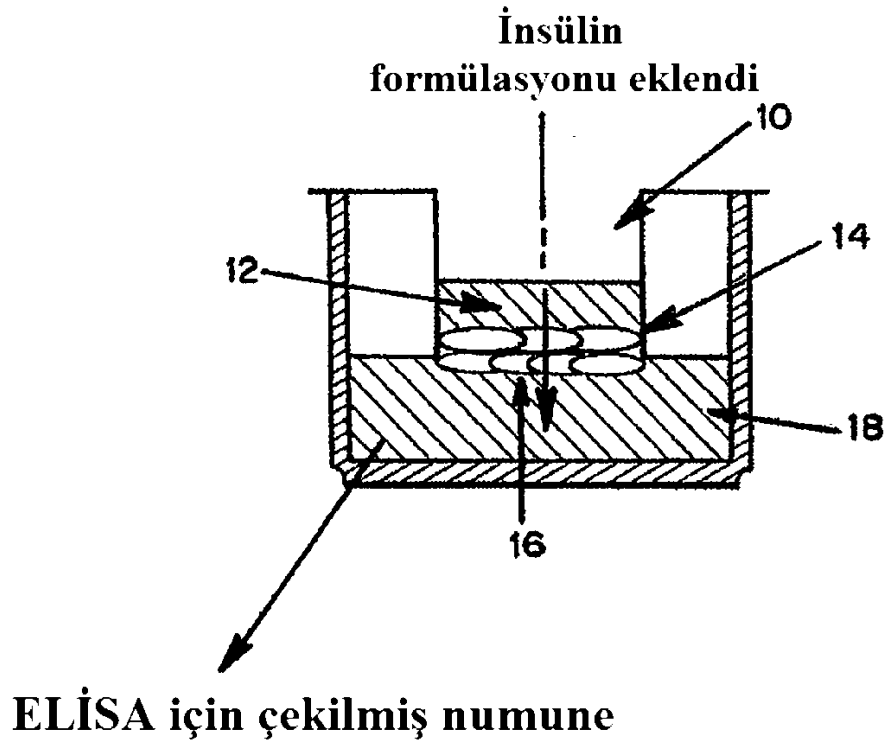
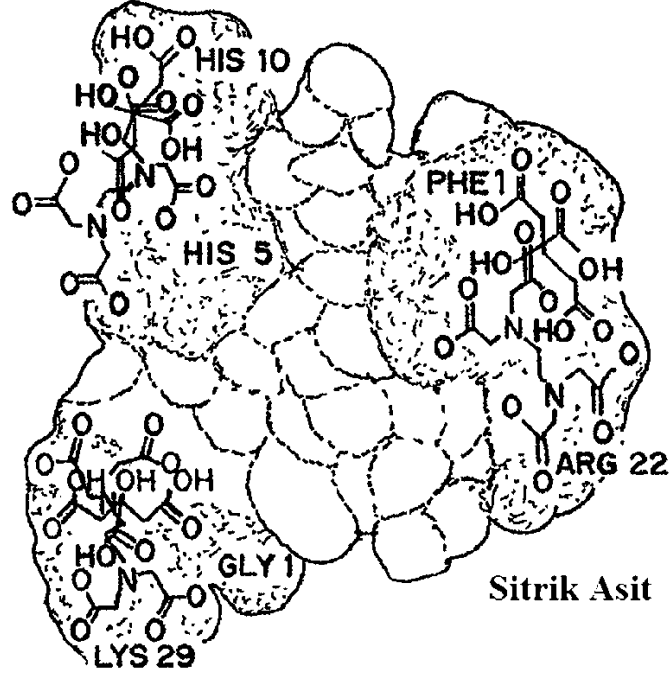
İnsülin (3.8 mg/ml), disodyum EDTA (1.8 mg/mL), Sitrik Asit (1.8 mg/mL), gliserin ve m-krezol (3mg/mL) karıştırılarak ve HCl ile pH 4'e ayarlanarak insülin hazırlandı. Çözeltinin pH'ı sonrasında NaOH'un eklenmesiyle pH 7'ye yükseltildi. Bu özetle 7.4'lük son pH'a ulaşıldığında berraklaşan bulanık bir karışım yaratarak insülinin izoelektrik noktası aracılığıyla formülasyonu getirdi. CE 100-7 yemekten önce domuza bir prandiyal insülin olarak verildi. Altı erkek diyabetik minyatür domuza (30-50 kg) ilk önce 0.25 U/kg test insülini uygulandı, sonrasında hemen 500g standart domuz yemeği ile beslendi. Kan numuneleri -30, -20, -10, 0 dakikada beslenmeden önce, sonrasında 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480 dk dozlama sonrasında elde edildi. İki mL kan numuneleri bir damlasının bir standart glukoz şerit metodu kullanılarak glukoz ölçümünü kontrol etmek için kullanıldığı bir juguler ven kateteri aracılığıyla elde edildi ve geriye kalan numune K₂EDTA ile tedavi edildi ve plazma numunesi gelecekteki analiz için donduruldu.

Bulgular

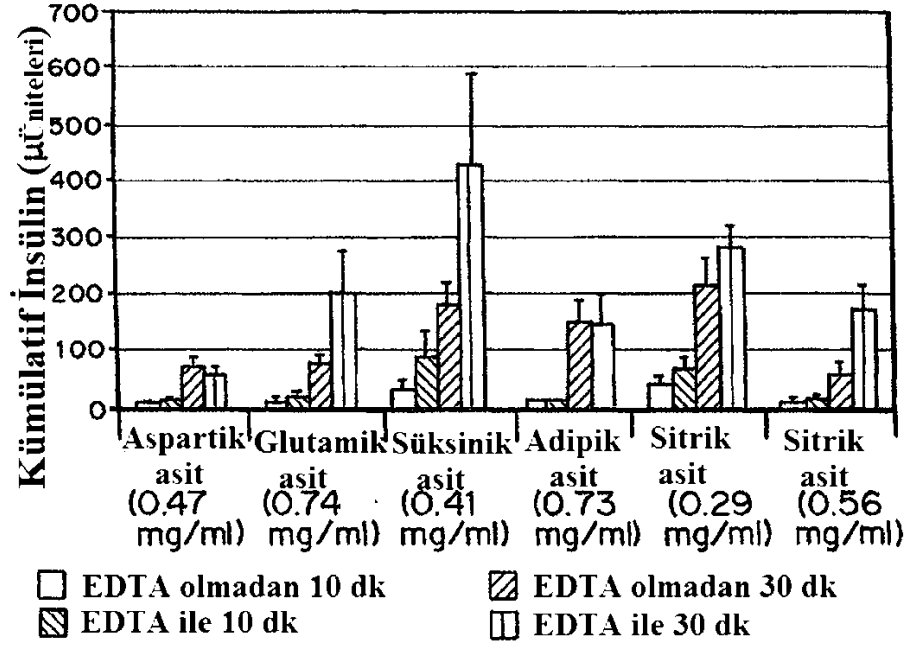
5 pH 7 formülasyonunun farmakokinetik profili Şekil 13'te gösterilmektedir. Bu çok hızlı profil Örnek 6'daki diyabetli hastalarda gösterilen verilerle tutarlıdır. Sitrik asit ve EDTA içeren asit formülasyonunun pH'nın 7'ye yükselmesi minyatür diyabetik domuzda çok iyi bir performans gösterdi.

10 Bu pH değişimi sitrik asitin sodyum sitrata dönüşmesi ile sonuçlandı. Bu yüzden, asit çalışmalarının tuz formu asit kadar iyi çalışmalıdır.

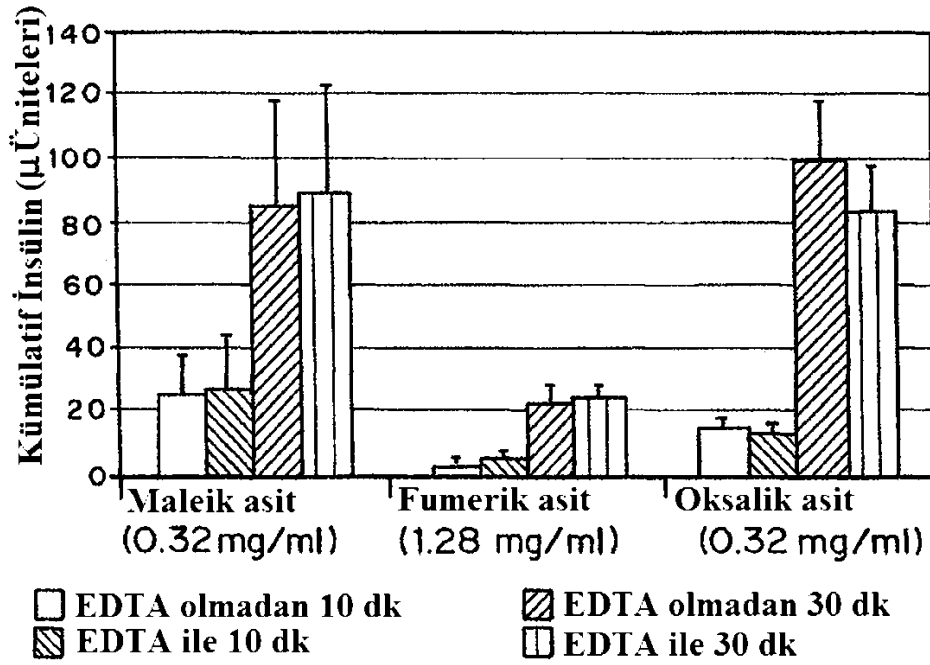
ŞEKİL 1



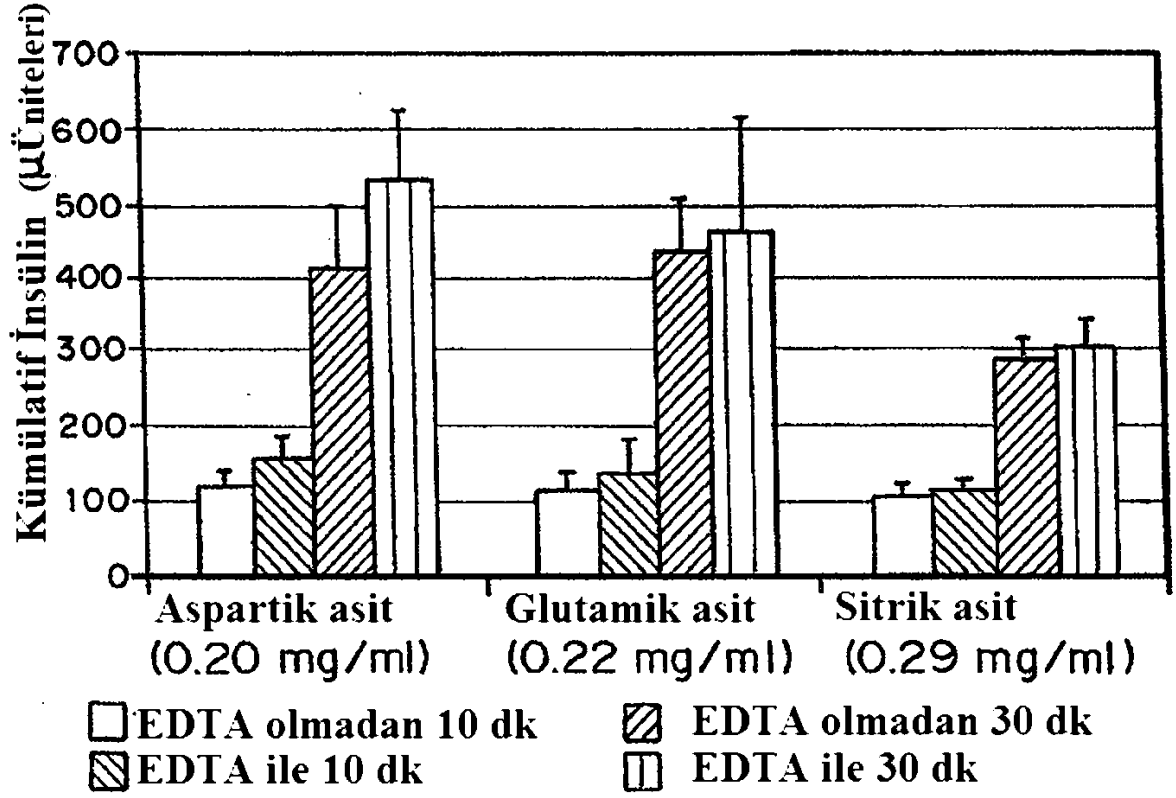
ŞEKİL 2



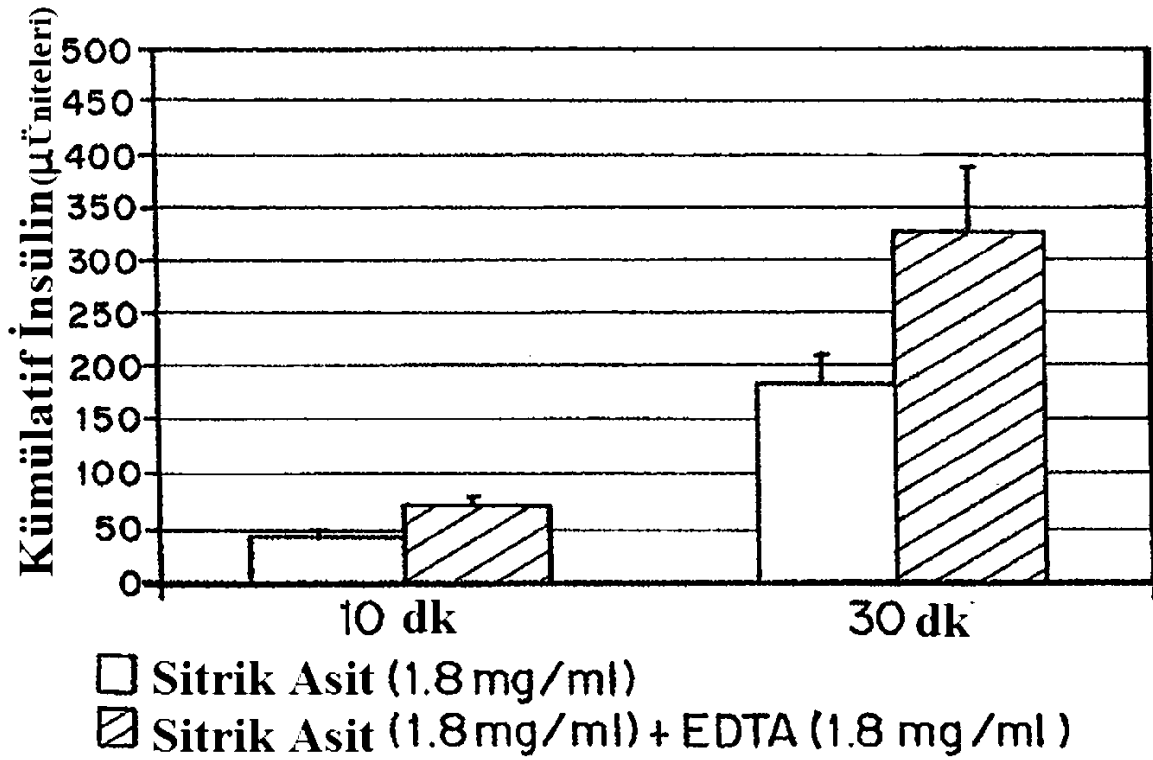
ŞEKİL 3A



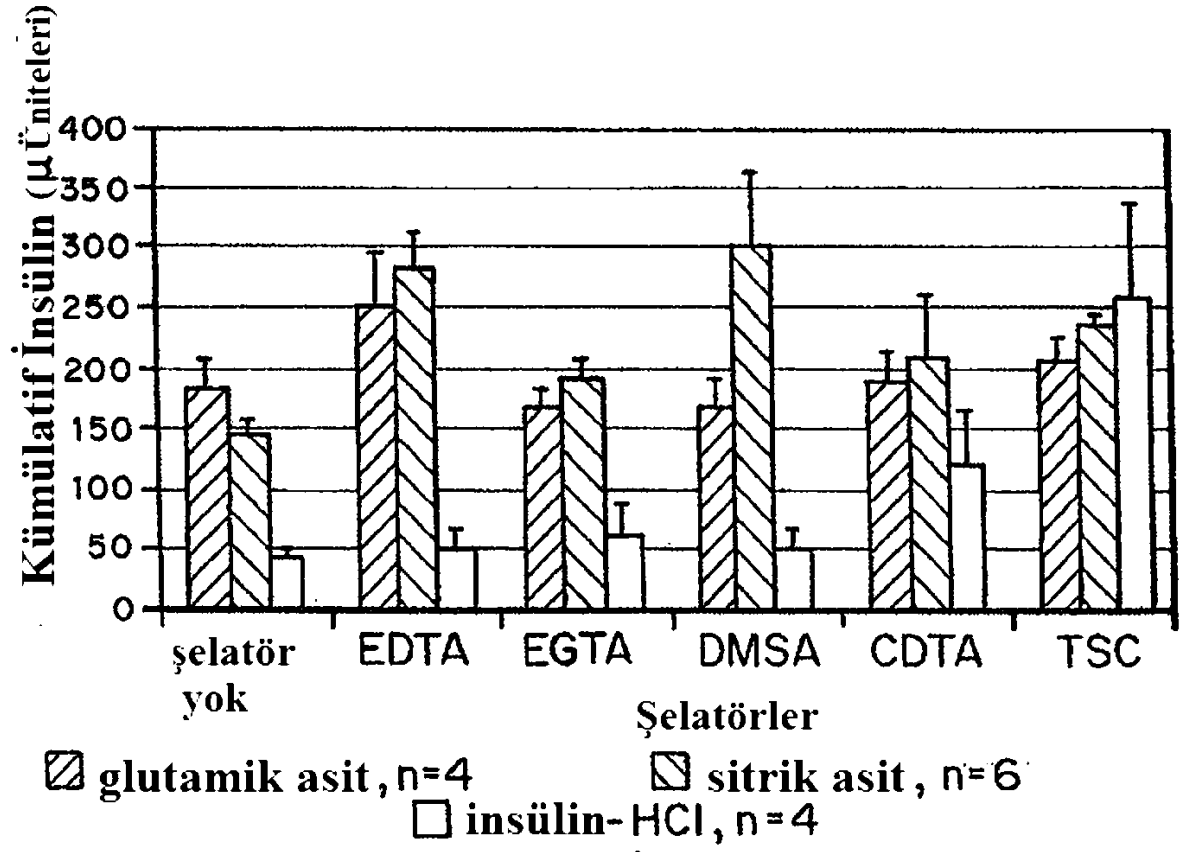
ŞEKİL 3B



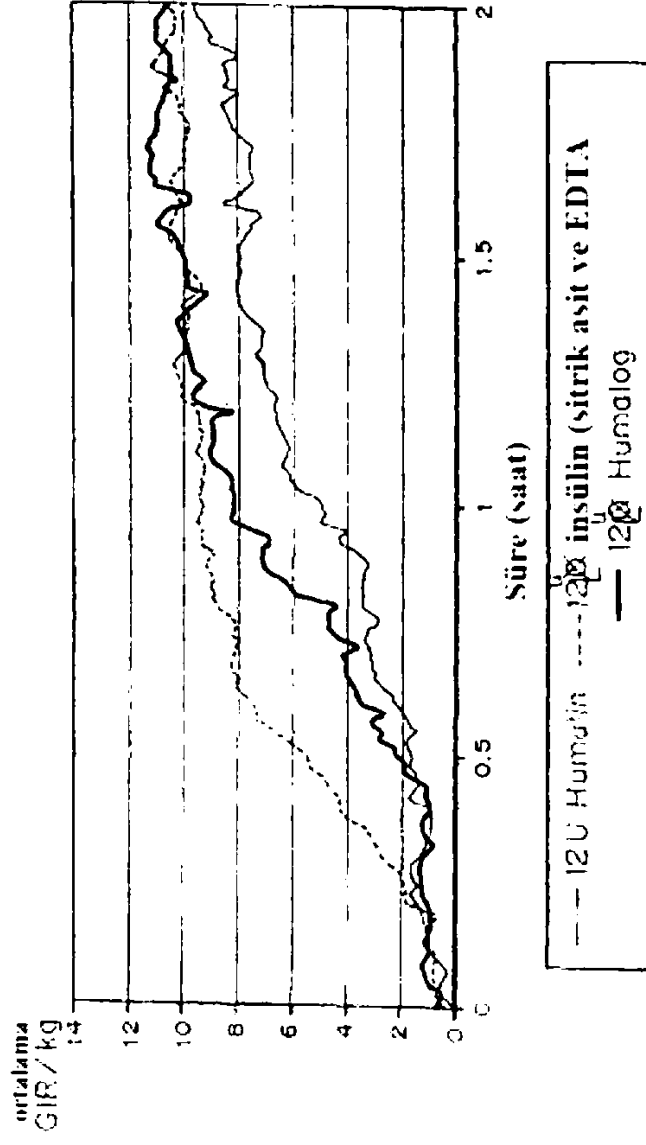
ŞEKİL 4A



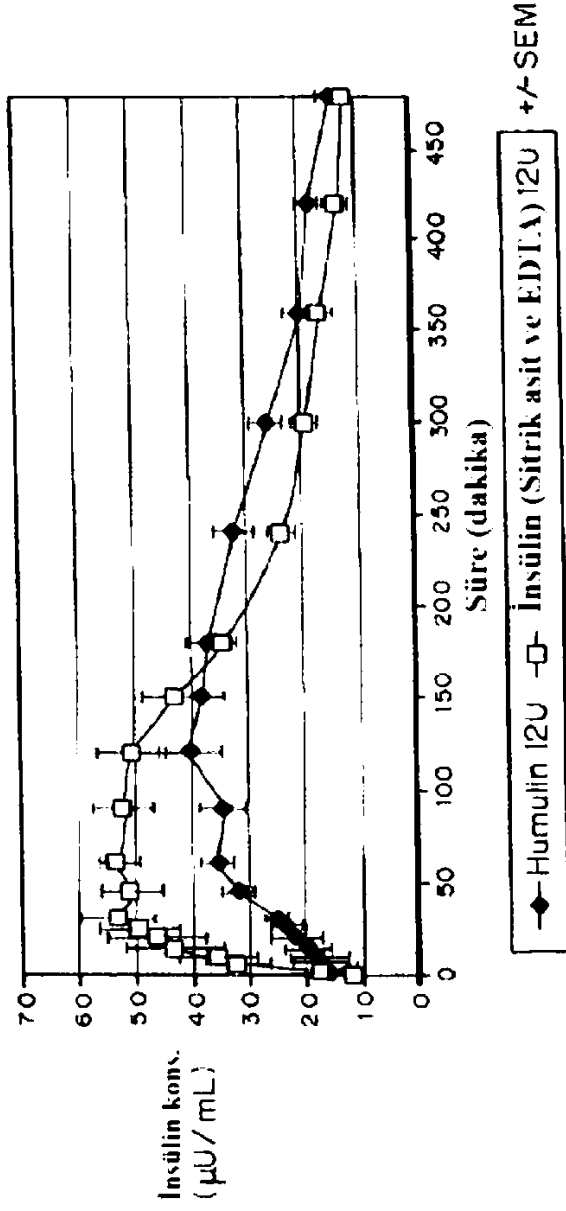
ŞEKİL 4B



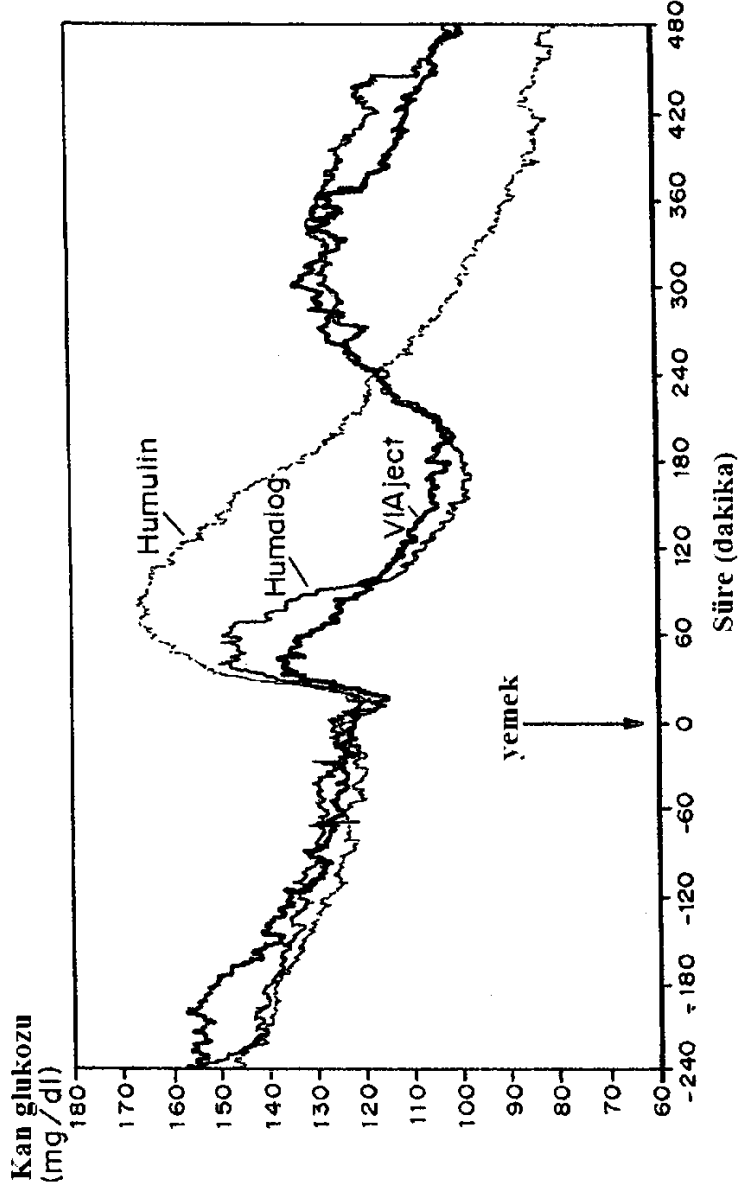
ŞEKİL 5



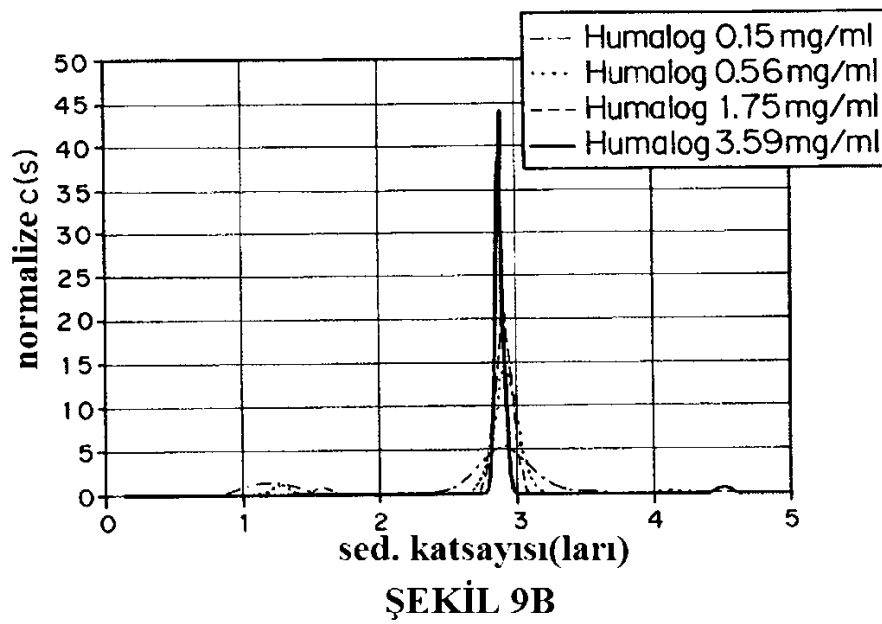
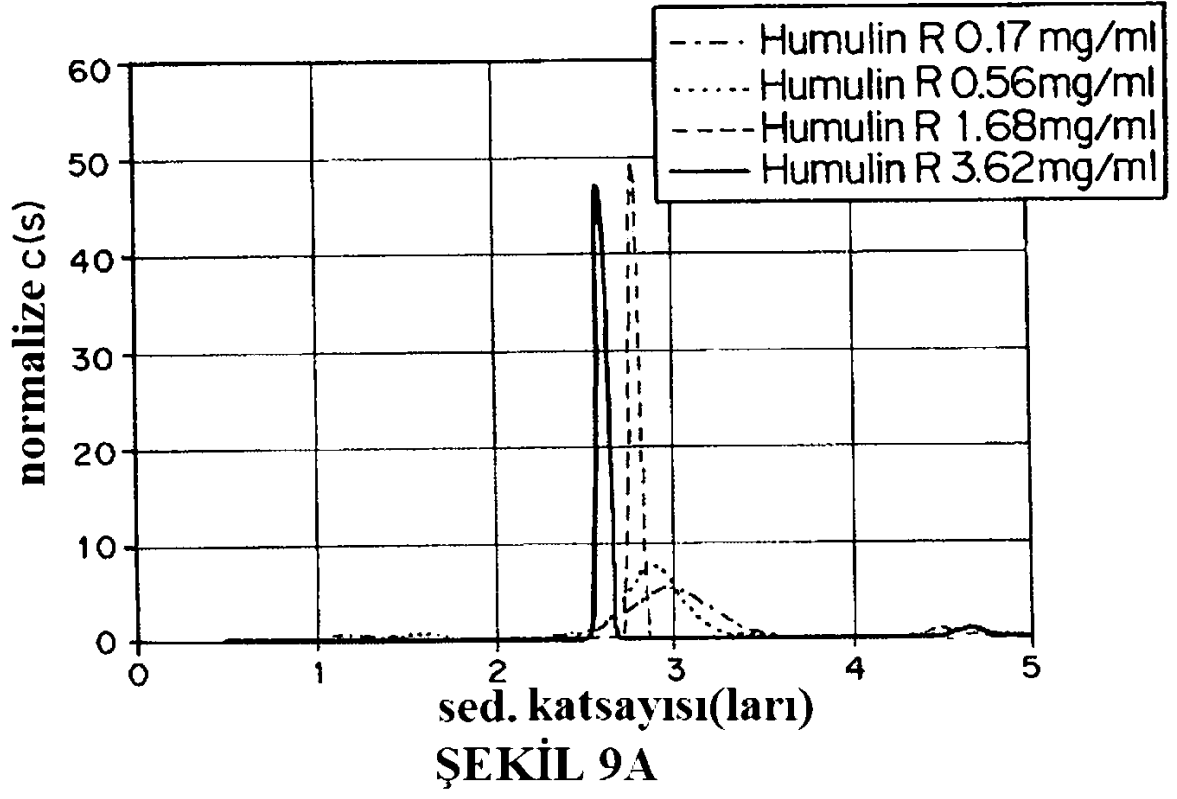
ŞEKİL. 6

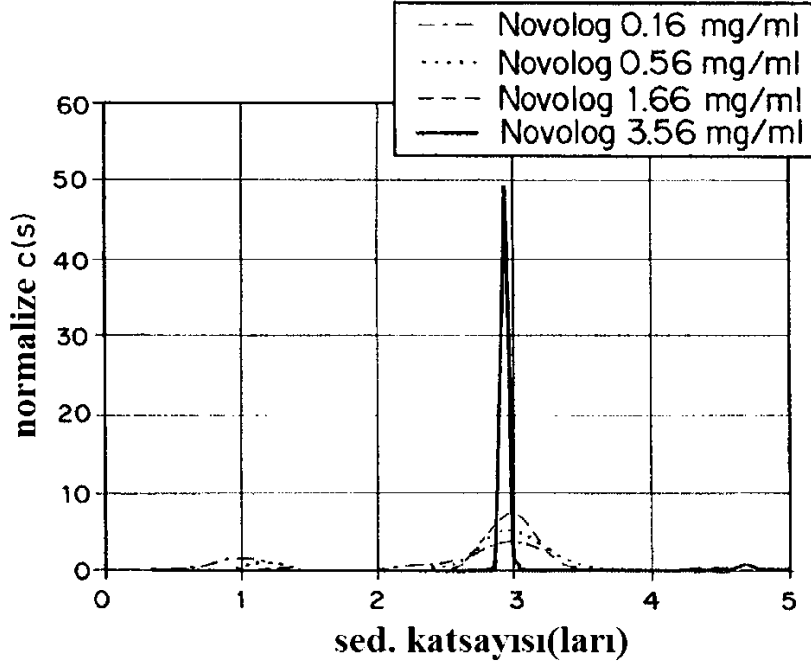


ŞEKİL. 7

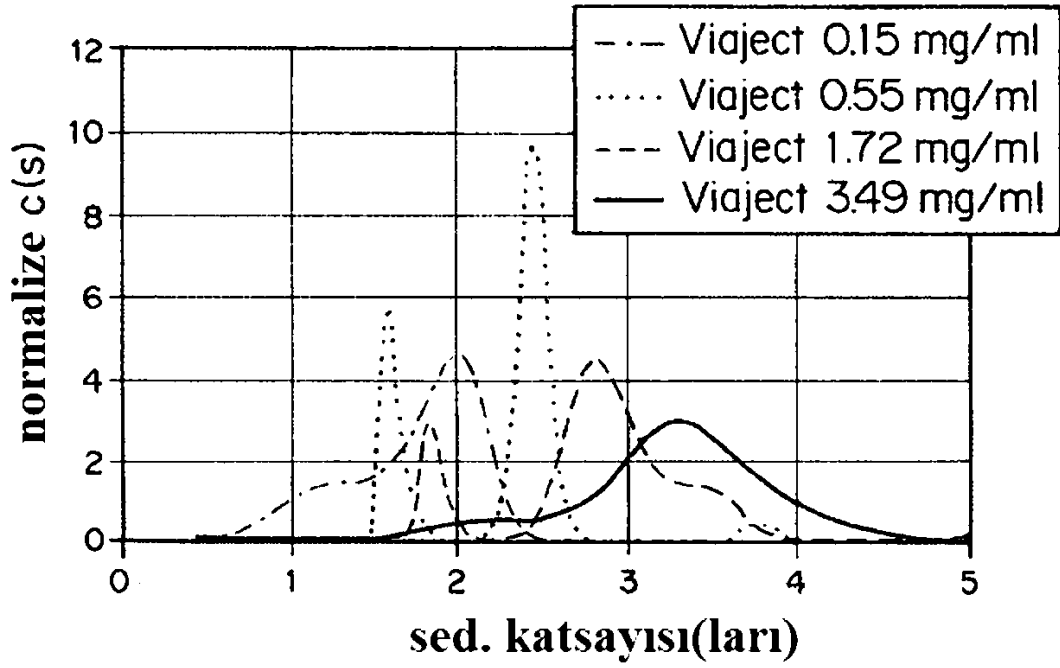


ŞEKİL 8

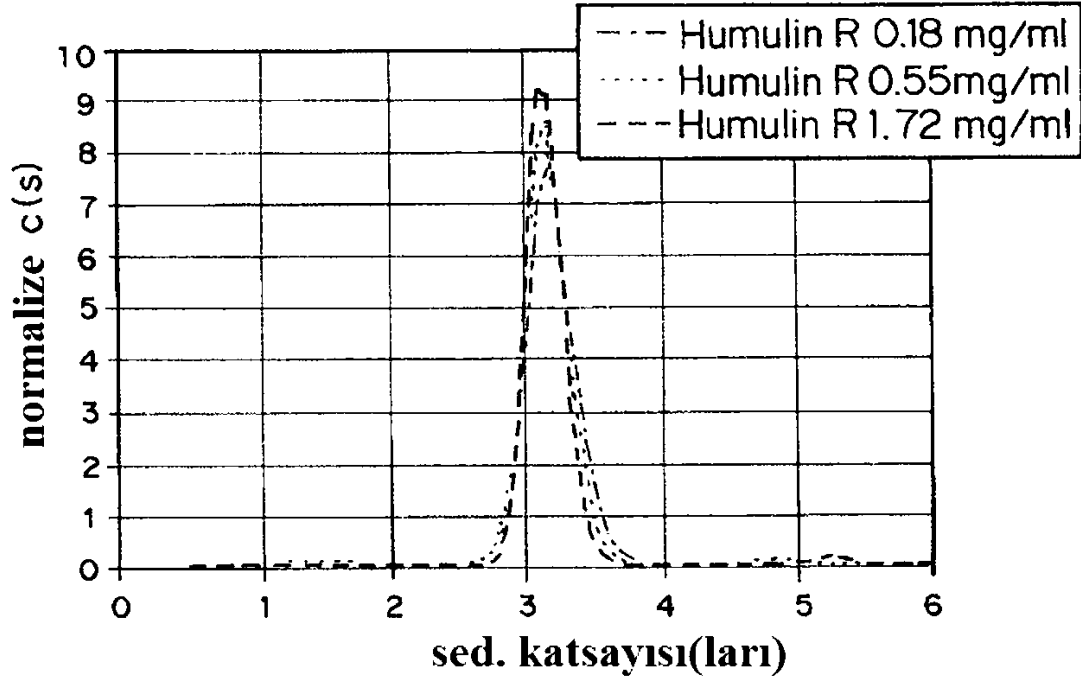




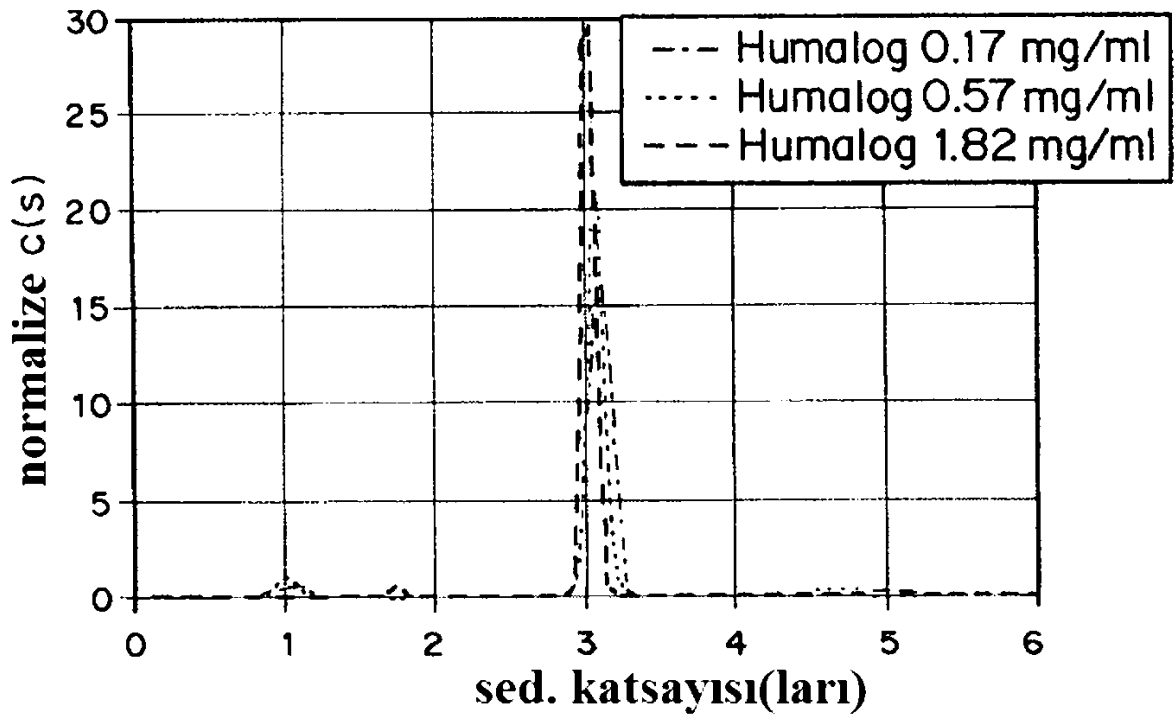
ŞEKİL 9C



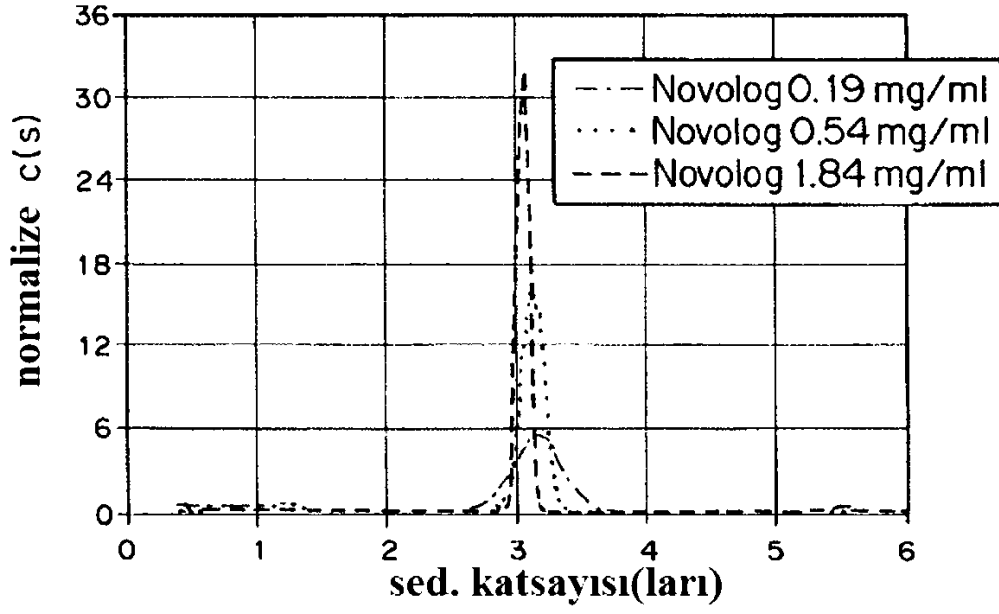
ŞEKİL 9D



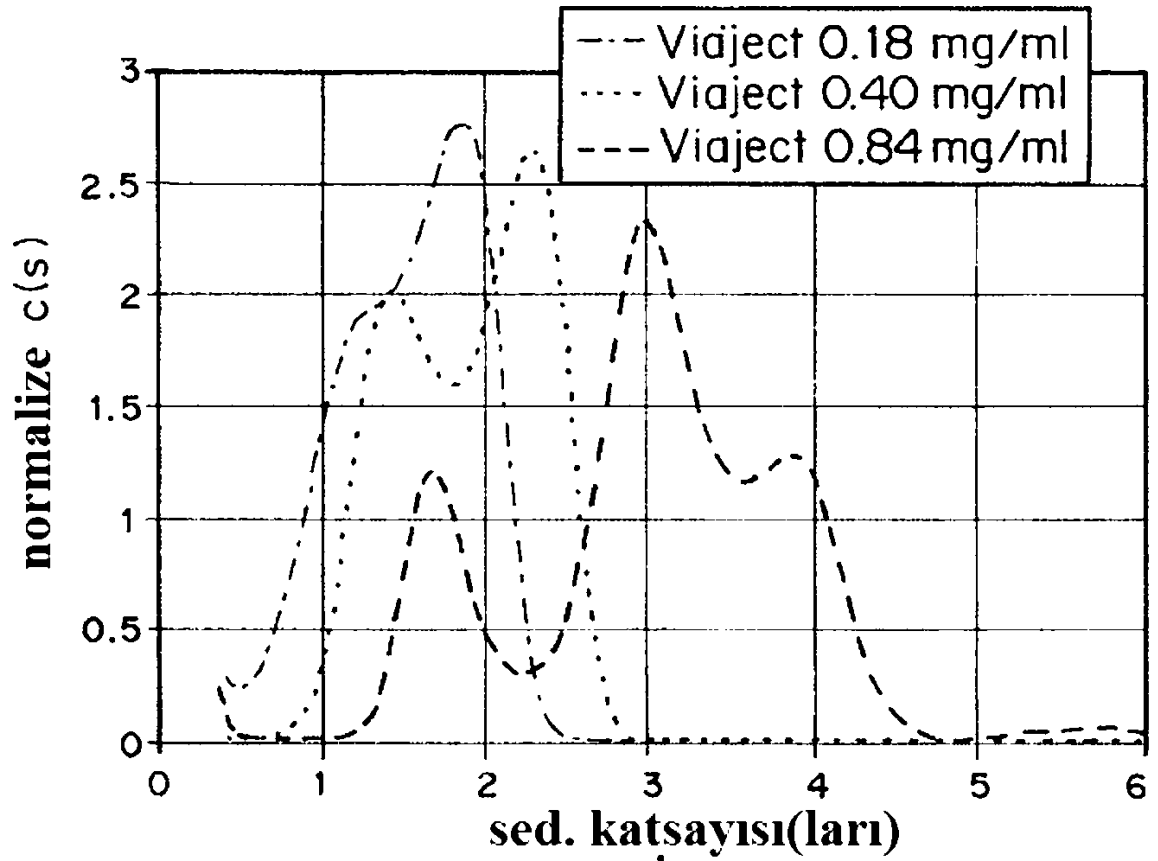
ŞEKİL 10A



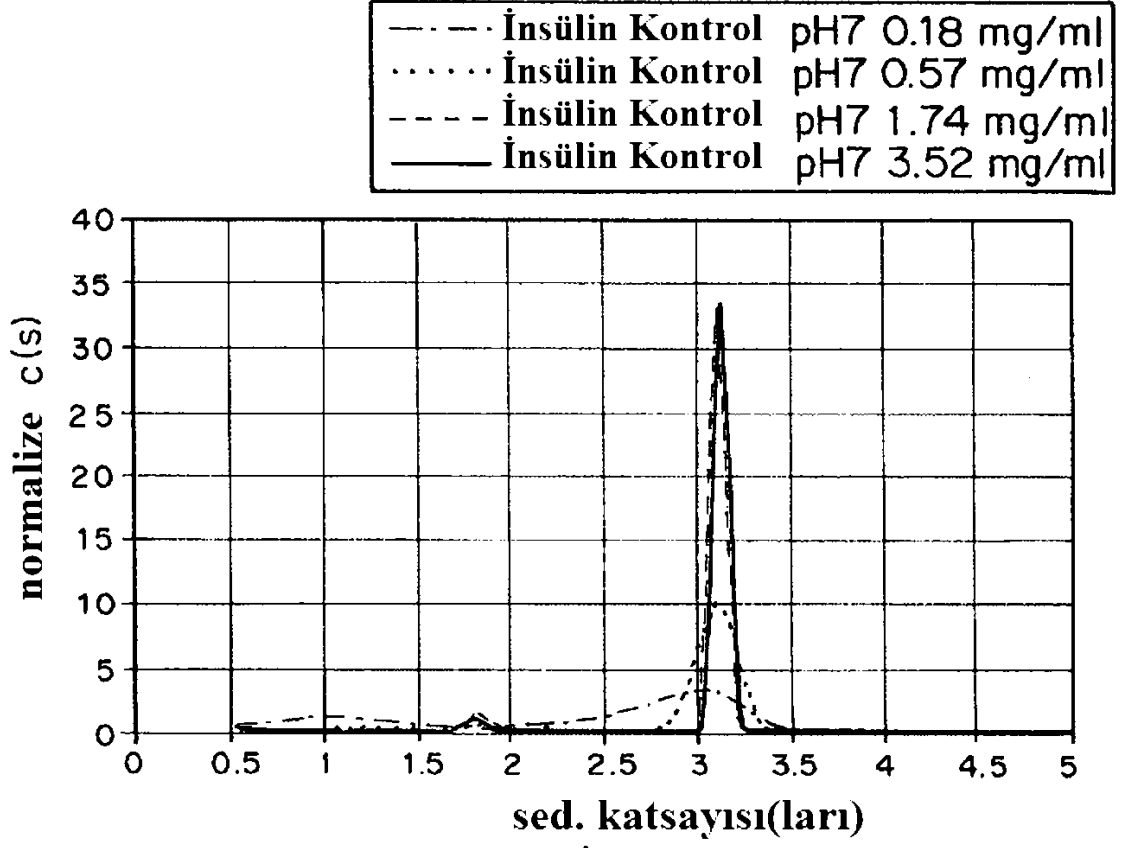
ŞEKİL 10B



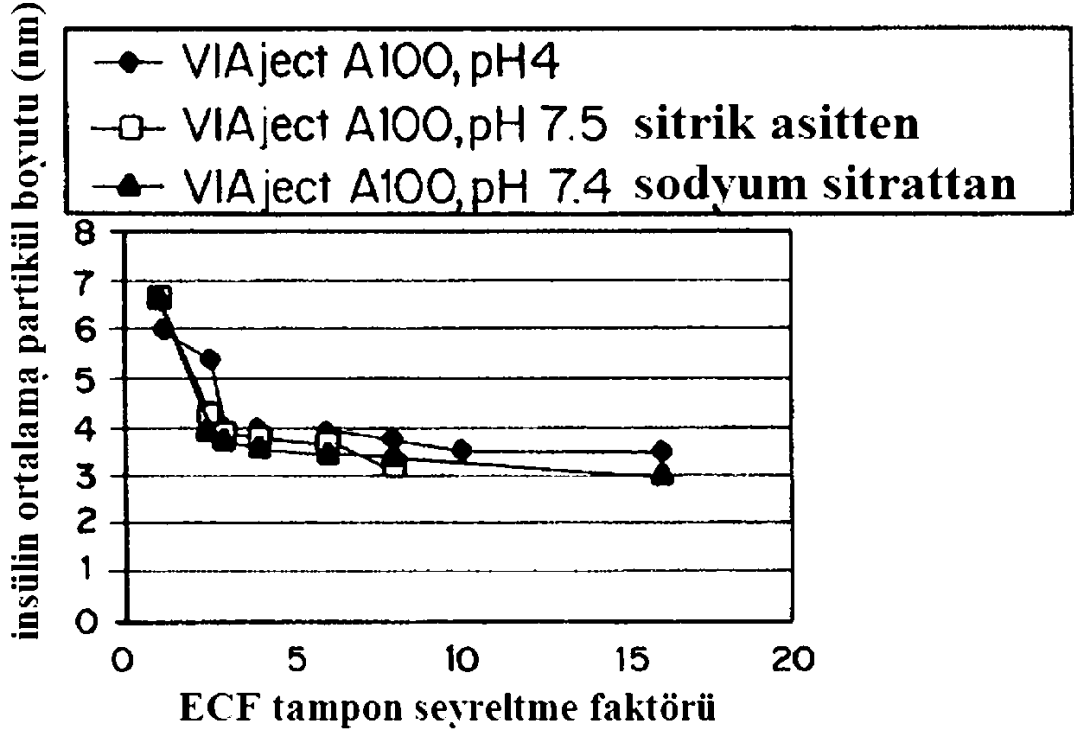
ŞEKİL 10C



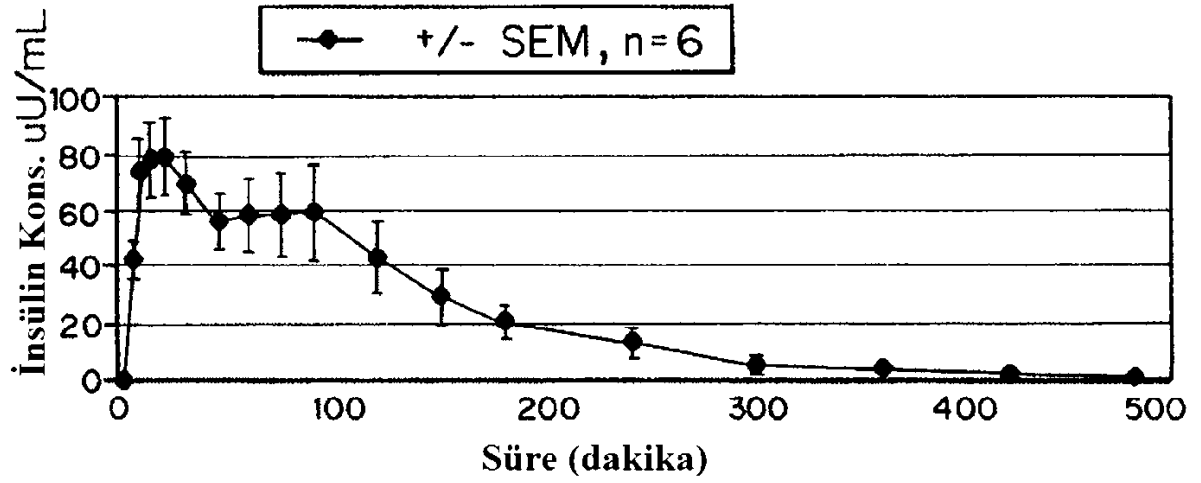
ŞEKİL 10D



ŞEKİL 11



ŞEKİL 12



ŞEKİL 13