

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSULİNİN POLİMERLERLE (örn:POLİETİLEN GLİKOL)
OLAN KONJUGATLARININ DİYABETİK HASTALARDA
UYGULANMASI**

ECZ. SEVAL ÖZCAN

**F.B.E Biyomühendislik Ana Bilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: PROF. DR. M. MUSTAFAEV AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. DİABETES MELLİTUSA GENEL BAKIŞ	12
1.1 Giriş	12
1.2 Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus, IDDM).....	13
1.3 Tip II Diyabet (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus, NIDDM)	13
2. İNSÜLİN	15
2.1 Kimyasal Yapısı ve Biyosentezi	16
2.2. Salgılanmasının Düzenlenmesi	19
2.3 İnsülinin Biyotransformasyonu	21
2.4 İnsülin Kaynakları	22
2.4.1 İnsülin müstahzarlarının kaynaklarına ve saflaştırılma derecelerine göre sınıflandırılması	22
2.4.1.1 İnsan insülini.....	23
2.4.1.2 Regüler ve modifiye edilmiş insülin müstahzarları ve uygulanmaları	24
2.4.1.3 İnsülin Analogları	25
2.4.2 İnsülin Preparatlarının Etki Sürelerine Göre Sınıflandırılması	27
2.4.2.1 Kısa Etkili İnsülin Preparatları	27
2.4.2.1.1 Nötral Regüler İnsülin	27
2.4.2.1.2 Semilente İnsülin veya Çabuk Etkili İnsülin Çinko Süspansiyonu	28
2.4.2.2 Uzun Etkili İnsülin Preparatları	28
2.4.2.2.1 Protamin Çinko İnsülin.....	28
2.4.2.2.2 Ultralente İnsülin	28
2.4.2.3 Orta Süre Etkili İnsülin Preparatları	28
2.4.2.3.1 İzofan İnsülin (NPH insülin, Nötral Protamin Hagedorn İnsülin)	29
2.4.2.3.2 Karma Lente İnsülin	29
3. İNSÜLİNİN HÜCREDEKİ HAREKETİ	31
4. GLUKOZ TAŞIYICILARI VE PATOFİZYOLOJİK AŞAMALAR	32
5. GÜNÜMÜZDE İNSÜLİN YAPISINDA UYGULANAN DEĞİŞİKLİKLER	34

5.1	İnsülin konjugatlarının sentezi ve saflaştırılması	34
5.1.1	Glikozillenmiş insülin türevlerinin sentezi ve saflaştırılması.....	34
5.2	PEG konjugasyonunun insülinin özelliklerine etkisi.....	36
5.2.1	PEG-insülin birleşmelerinin hazırlanması ve açıklanması.....	39
5.2.1.1	Hazırlama.....	39
5.2.1.2	Fizikokimyasal açıklama	41
5.2.1.3	Fiziksel stabilite	44
5.2.1.4	In vivo biyolojik etkinlik	44
5.2.2	PEG-insülin birleşmelerinin immünojenik özellikleri.....	45
5.2.2.1	Hümmoral immünojenite ve antijenlik	46
5.2.2.2	Hüccresel immünojenite	51
5.2.2.3	Alerjenlik	52
5.2.3	PEG-insülin konjugatlarının farmakolojik özellikleri	54
5.2.3.1	Biyolojik etkinlik ve farmakodinamik parametreler.....	54
5.2.3.2	Farmakokinetik parametreler.....	56
5.2.4	Sonuçlar	60
5.3	PLGA mikro parçacıklarında PEGile (polietilenglikolize) edilmiş insülin.....	64
5.3.1	In vivo ve in vitro analiz.....	64
5.3.2	Malzemeler ve yöntemler	65
5.3.2.1	Malzemeler	65
5.3.2.2	İnsülinin metoksi polietilen glikol (mPEG) ile alana-özel değıştirmesi.....	66
5.3.2.3	mPEG-insülin konjugasyonunun açıklaması.....	66
5.3.2.3.1	İyon-değıştirici-FPLC.....	66
5.3.2.3.2	RP-HPLC.....	66
5.3.2.3.3	MALDI-TOF kütle spektrometresi.....	66
5.3.2.3.4	N-terminal protein dizini analizi (Edman düzey düşürme)	67
5.3.2.3.5	Uzak-UV dairesel dikroizmi.....	67
5.3.2.4	Mikrosfer hazırlanması.....	67
5.3.2.5	Mikro parçacıklara özellik verilmesi	67
5.3.2.5.1	İlaç yükleme	67
5.3.2.5.2	Parçacık büyüklüğü dağılımı	68
5.3.2.5.3	SEM analizi	68
5.3.2.5.4	In vitro çözölüm	68
5.3.2.6	Biyo-analitik yöntemler	68
5.3.2.6.1	Glukoz incelemesi	68
5.3.2.6.2	İnsülin incelemesi	68
5.3.2.7	In vivo çalışmalar	68
5.3.2.7.1	PEG-insülin konjugatının normal aç sıçanlarda etkinliğı.....	69
5.3.2.7.2	Diyabetik sıçan modelinde PEG-insülin mikrosferlerinin etkinliğı	69
5.3.2.7.2.1	Tek doz farmakokinetik.....	69
5.3.2.7.2.2	Tek doz farmakokinetik ve farmakodinamik; 3 ayrı partinin karşılaştırılması	69
5.3.2.7.2.3	Tekrar edilen doz farmakokinetiğı	70
5.3.2.7.2.4	Çoklu doz farmakokinetiğı	70
5.3.3	Sonuçlar ve tartışma	71
5.3.3.1	PEG-insülin konjugasyonu	71
5.3.3.1.1	Laboratuvar analizi	71
5.3.3.1.2	PEG-insülinin in vivo etkinliğı.....	72
5.3.3.2	PLGA mikro parçacıklarında PEG-insülin.....	72
5.3.3.2.1	In vitro özellikler	71
5.3.3.2.1.1	İlaç içeriğı ve kapsülleme etkinliğı.....	71
5.3.3.2.1.2	Mikro parçacık büyüklüğü ve morfoloji.....	71

5.3.3.2.1.3	In vitro eriyik	74
5.3.3.2.2	PLGA mikrosferlerde PEG-insülininin vivo özellikleri	75
5.3.3.2.2.1	Tek doz farmakokinetik	75
5.3.3.2.2.2	Tek doz farmakokinetik ve farmakodinamik; 3 ayrı partinin karşılaştırılması	76
5.3.3.2.2.3	Tekrar eden doz farmakokinetiği	78
5.3.3.2.2.4	Çoklu dozda farmakokinetik	78
5.3.3.2.2.5	İnsan bazal insülin doz gereklilikleri	729
5.3.4	Sonuçlar	80
5.4	Oral insülin-PEG salınım sisteminin geliştirilmesi ve in vivo değerlendirilmesi	81
5.4.1	Malzemeler ve yöntemler	82
5.4.1.1	İnsülin-PEG sentezi	82
5.4.1.2	Proteolitik çalışmalar	83
5.4.1.3	Sentez ve poliakrilik asit-sisteine özellik verilmesi	84
5.4.1.4	Salıverme sisteminin hazırlanması	84
5.4.1.5	İlaç salıverme çalışmaları	84
5.4.1.6	PEGile insülinin FITC etiketlenmesi	84
5.4.1.7	Sızma çalışmaları	85
5.4.1.8	Biyolojik etkinlik değerlendirmesi	85
5.4.1.9	İstatistiksel veri analizi	86
5.4.2	Sonuçlar	86
5.4.2.1	İnsülin-PEG preparatı hazırlanması	86
5.4.2.2	Polimer açıklaması	87
5.4.2.3	Sızma çalışmaları	87
5.4.2.4	İlaç salıverme çalışmaları	87
5.4.2.5	Biyolojik etkinlik	87
5.4.3	Tartışma	88
5.4.4	Sonuçlar	90
5.5	Sürdürülebilir-salıverme insülini için optimum formülasyon	90
5.5.1	Malzemeler ve yöntemler	91
5.5.1.1	Yeniden taşıyıcılar	91
5.5.1.2	İnsülin içeren PLGA mikro kapsüller	92
5.5.1.3	Elektron mikroskopisi	92
5.5.1.4	Hayvanlar	92
5.5.1.5	Hayvan deneyleri	92
5.5.1.6	Hücre büyüme incelemesi	93
5.5.1.7	İstatistik analiz	93
5.5.2	Sonuçlar ve tartışma	93
5.5.2.1	Katkı maddesi	93
5.5.2.2	Çinko eklenmesi	94
5.5.2.3	İlaç parçacıklarının büyüklüğü	96
5.5.2.4	PLGA mikro parçacıklarının büyüklüğü	97
5.5.2.5	Optimum formülasyon	98
5.5.2.6	İnsülinin biyolojik etkinliği	100
5.5.3	Sonuç	101
KAYNAKLAR		102
ÖZGEÇMİŞ		104

KISALTMA LİSTESİ

AUC	Area Under Curve
BGL	Blood Glucose Level (Kan Şekeri Düzeyi)
BOC	Bütüloksikarbonil
DAG	Diaçil gliserol
DM	Diabetes Mellitus
FDA	Food and drug Administration
IP ₃	İnozitol trifosfat
LLS	Laser Light Scattering
MA	Molekül ağırlığı
NIDM	İnsüline bağımlı diabetes mellitus (Tip 1 Diyabet)
NIDDM	İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (Tip II Diyabet)
NPH	Nötral protamin Hagedorn İnsülin
PD	Farmakodinamik
PEG	Polietilen glikol
pI	İzoelektrik nokta (kolloidal taneciklerin elektriki alanda hareket etmediği ortamın pH değeri)
PK	Farmakokinetik
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asid
RES	Retiküloendotel sistem
sAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
s.c.	Subkutan (kas altına)
SEM	Scanning Electron Micrograph (Taramalı elektron mikroskobu)
STZ	Streptozotosin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 İnsülin hekzamerinin üç boyutlu görünümü. Ortada Zn^{+2} iyonu ve etrafında 3 H_2O molekülü ile birlikte [1].	15
Şekil 2.2 Domuz proinsülininin ve insülininin kimyasal yapısı (Kayaalp, S.O., 2000).	16
Şekil 2.3 İnsülinin sentezi [2].	17
Şekil 2.4 Sığır pro-insülinin sentezi [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].	19
Şekil 2.5 İnsülinin dimer ve hekzamer yapısı [2].	21
Şekil 2.6 Sığır insülininin yapısı [2].	21
Şekil 2.7 İnsan insülini ve insülin lispro' nun yapısı [3].	26
Şekil 2.8 İnsan insülini ve insülin lispro nun uygulandıktan sonra kan şekerinin artmasına olan etkisi [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].	27
Şekil 2.9 Çeşitli insülin tiplerinin etkilerinin derece ve süreleri(diyabetik bir hastada açlık durumunda verildiğinde). NPH= Nötral Protamin Hagedorn [Champe, P.C., Harvey, R.A., (1997)].	30
Şekil 3.1 İnsülinin hücredeki aksiyonu [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].	31
Şekil 4.1 Glukoz taşınmasını patofizyolojisi [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].	32
Şekil 5.1 SAPG- insülin türevinin şematik görünümü [3].	35
Şekil 5.2 mPEG monoasidi ile PEG-insülin konjugatlarının şematik görünümü [3].	36
Şekil 5.3 İnsan insülininin primer yapısı MA: 5807, pI: 5.3- 5.4 [3].	40
Şekil 5.4 İnsülin ve pegile edilmiş türevlerinin morötesi UV spektrumu [5].	42
Şekil 5.5 C57BL/ 10 farelerinde 0 ve 3. haftanın immünojenizasyonunun sonunda insülin spesifik antikörlerin seviyeleri [5].	47
Şekil 5.6 A/J farelerinde 0 ve 3. haftanın immünojenizasyonunun sonunda insülin spesifik antikörlerin seviyeleri [5].	48
Şekil 5.7 Erkek köpekler i.v. 0.3U/ kg HumulinR veya F750 veya F2000 injeksiyonundan sonra kandaki şeker düzeyleri[5].	54
Şekil 5.8 Erkek köpekler s.c. 0.3U/ kg HumulinR veya F750 veya F2000 injeksiyonundan sonra kandaki şeker düzeyleri [5].	55
Şekil 5.9 Erkek köpekler i.v. 0.3U/ kg HumulinR veya F750 veya F2000 injeksiyonundan sonra serum şeker (mPEG-B1-insülin) düzeyleri [5].	57
Şekil 5.10 Erkek köpekler i.v. 0.3U/ kg HumulinR veya F750 veya F2000 injeksiyonundan sonra serum şeker (mPEG-B1-insülin) düzeyleri [5].	58
Şekil 5.11 mPEG birleşmesinin ve PLGA mikro kapsüllenmesinin insülinin uzak UV dairesel dikroizm spektrumuna etkileri [6].	70
Şekil 5.12 Normal aç farelerde tek bir i.v. PEG-insülin veya HumulinR injeksiyonundan sonraki serum şeker düzeyleri [6].	71
Şekil 5.13 PEG-insülin mikrosferlerinin SEM ve laser ışığı (LLS)görüntüsü [6].	73
Şekil 5.14 PLGA mikrosferlerinden PEG-insülinin in vitro salınımı [6].	74
Şekil 5.15 (A) PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri [6].	76
(B) PLGA/PEG-insülin mikrosferlerinin diyabetik farelere tek bir s.c. dozdan sonraki serum insülin düzeylerinin tedavi almayan koldaki serum insülin düzeyleriyle karşılaştırılması [6].	76
Şekil 5.16 (A) PLGA/PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri.	77
(B) PLGA/PEG-insülin mikrosferlerinin diyabetik farelere tek bir s.c. dozdan sonraki serum insülin düzeylerinin tedavi almayan koldaki serum insülin düzeyleriyle karşılaştırılması [6].	77

Şekil 5.17 PLGA/PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri [6].	78
Şekil 5.18 PLGA/PEG-insülin mikrosferinin 0. ve 7. günlerdeki s.c.injeksiyonundan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri [6].	79
Şekil 5.19 ZnO in Mikrokapsüllerden insülin salınımının başlangıç profili üzerine etkisi (in vivo)[8]	93
Şekil 5.20 Başlangıç insülin salınım profili üzerine ZnO içeriği ve PLGA türünün etkisi (in vivo)[8]	95
Şekil 5.21 İnsülin partikül boyutunun etkisi [8]	96
Şekil 5.22 Mikrokapsül boyutunun etkisi [8].	97
Şekil 5.23 PLGA nın kimyasal formülü [9]	98
Şekil 5.24 İnsülin içeren PLGA mikrokapsüllerinin tek bir s.c. dozundan sonra plazma insülin seviyeleri [8].	98
Şekil 5.25 Normal insülin ile mikrokapsüllerden ekstrakte edilen insülinin biyolojik aktivitelerinin kıyaslanması [8].	99
Şekil 5.26 %30 PEG içeren insülin/PLA nanopartiküllerinin SEM da görünümü (MA:6000Da, 10000×) [14]	100

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1 Diyabetes Mellitusun iki tipinin karşılaştırılması (Champe, P.C., Harvey, R.A.,1997).	14
Çizelge 2.1 Pankreas adacık hücreleri ve salgıladıkları hormonlar (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).	16
Çizelge 2.2 İnsülin preparatlarının etki sürelerine göre sınıflandırılması ve bazı özellikleri (Kayaalp, S.O., 2000)..	18
Çizelge 2.3 İnsülinin genel özellikleri (Novo Nordisk).	18
Çizelge 2.4 İnsülin Preparatlarının Etki Sürelerine göre Sınıflandırılması ve Bazı Özellikleri (Kayaalp, S.O., 2000)	29
Çizelge 5.1 A/J ve C57BL/10 farelerinde insülin (PEG- insülin) in antijenliği [5].	49
Çizelge 5.2 Çalışmada kullanılmış insülin içeren PLGA mikrokapsül formülasyonları [8].	90

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarına yön veren, benden bilgisini, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve Biyomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste ve eşi Sayın Doç. Dr. Zeynep Akdeste' ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen annem Nihal Özcan'a ve babam Seyit Özcan'a minnet duyuyorum. Biricik ailemin sabırsızlıkla bitirmemi beklediği yüksek lisansımın tamamlanmasında bana yön gösteren ve devamında da desteğini esirgemeyen dayım Dr. Sebati Yağanoğlu' ya sonsuz ve kucak dolusu sevgilerimle...

ÖZET

Diabetes Mellitus, günümüzde en sık rastlanan hastalıklardan biridir. İstatistiksel sonuçlar, diyabet hastalığına yakalanan hastaların sayısının arttığını göstermektedir. Ancak tedavi metodları, tedavi yolu ve insülin molekülünün tipi ilaç firmaları tarafından geliştirilmektedir. Günümüzde artık immunojen olmayan insülin çeşidi kullanılmaktadır. Bugün pazarda, diyabet hastaları tarafından kullanılan çok çeşitli insülin formülasyonları bulunmaktadır. Bu insülinler rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmektedir.

Bu araştırmada; Tip 1 ve tip II diyabet, mevcut insülin tedavileri, insülinin hücredeki etki mekanizması, insülin konjugatlarının sentezi, PEG konjugasyonunun insülinin özelliklerine etkisi, PEG-insülin konjugatlarının hazırlanması ve bunların immünojenik özellikleri, hümmoral ve hücressel antijenliği, alerjenliği, biyolojik etkinlikleri, farmakokinetik ve farmakodinamik parametreleri incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Diyabet, insülin, insülin- PEG, konjugat, immünojen, antijenite.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is one of the most common diseases nowadays. Statistics shows that the percentage of people suffers from this disease is increasing. However, the treatment methods, the way and also the type of insulin molecule is getting developed by the pharmaceutical companies. Recently, the most non-immunogen insulin type is being used. There have been several formulas used by diabetic patients in the market. These insulins are being produced by recombinant DNA technology.

In this study; Type I and Type II diabetes, recently used insulin therapies, insulin mechanism in a cell, synthesis of insulin conjugates, effect of PEG conjugation on insulin mechanism, preparation of insulin- PEG conjugate and their immunologic characteristics, humoral and cellular antigenicity, allergenicity, biological effects, pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters were investigated.

Anahtar kelimeler: Diabetes, insulin, insulin- PEG, conjugate, immunogenicity, antigenicity.

1. DİABETES MELLİTUSA GENEL BAKIŞ

1.1 Giriş

1900'lü yılların başında hipofiz ekstreleri endokrin tedavide kullanılmalarına karşın aslında çağdaş anlamda endokrin farmakoloji insülinin bulunuşu ile birlikte başlamıştır. Banting ve Best in pankreastan insülinin elde edilmesini sağlayan çalışmaları, sonuçta hormonlarla yapılan yerine koyma tedavisi kavramının yerleşmesine yol açmıştır. 1950'li yıllar ise ardı ardına çeşitli hormonların izolasyon ve sentezlerinin başarılmasına tanık olmuştur. Hayvansal kaynaklardan ya da insan otopsi materyalinden hormon elde edilmesinde karşılaşılan güçlükler, hormon benzeri etkinlik gösteren sentetik bileşiklerin yani hormon analoglarının bulunmasına yönelik araştırmaların hızlandırılmasını sağlamıştır. Hormon analogları yapısal olarak doğal bileşiklerle benzerlik göstermelerine karşın bazı önemli özellikleri yönünden onlardan ayrılırlar. Araştırmacıların bu tür bileşiklerin sentezine yönelmelerindeki temel amaç, doğal hormonlarla tedavide zaman zaman gözlenen sakıncaların ortadan kaldırılmasıdır. Çok yoğun ve özen gerektiren çalışmalar sonucu endokrin bezlerden izole edilen bazı hormonların oral verilişlerinde etkisiz olmaları ya da çok çabuk metabolize edilmeleri nedeniyle etki sürelerinin kısalması sık rastlanan örneklerdir. Sentetik analogların kimyasal yapıları ise sözü edilen olumsuzlukları olabildiğince giderecek şekilde tasarlanmıştır.

Son yıllarda endokrin hastalıklardaki terapötik potansiyelleri nedeniyle hipotalamik hormonlar ve özellikle bunların uzun etkili analoglarının sentezlenmesine ilişkin oldukça fazla sayıda araştırma gerçekleştirilmektedir. Günümüzde bu hormonlardan bazıları esas olarak tanı amaçlı kullanılmaktadırlar.

Teknolojinin gelişimine koşut olarak endokrin farmakolojiye ilişkin araştırmalarda da çok duyarlı yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda, sözü edilen yöntemlerin kullanıldığı araştırmalardan elde edilen deneysel sonuçlar ve bunların kliniğe uyarlanmalarında oldukça çarpıcı gelişmeler sağlanmıştır. Artık immunoeseay ile çok sayıda hormonun plazma düzeylerinin kolaylıkla ölçümlenebilmesi, hekimlere hastalarının hormonal durumlarını kısa sürede ve sağlıklı bir biçimde öğrenebilme olanağını sunmaktadır. Peptid ve protein kimyasındaki atılımlar ise amino asit dizilimlerinin belirlenebilmesini ve peptid sentezinin gerçekleştirilebilmesini sağlamış ve bunun sonucunda da azımsanmayacak sayıda peptid klinikteki yerin almıştır. Diğer yandan, moleküler biyoloji alanında rekombinant DNA teknolojisinin uygulanabilirliğini sağlayan gelişmeler yaşanmış ve 1980'lerin ortalarında ilk kez bakteriyel sistemlerden elde edilen insan insülini pazarlanarak tedaviye girmiştir. Böylece

hayvansal kaynaklı insülinlerle tedavi edilen diyabetik hastalarda gözlenen alerjik sorunlar en aza indirilmiştir (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).

Diabetes mellitus, ABD nüfusunun %2-3'ünü etkileyen büyük bir halk sağlığı sorunudur. Bu hastalık, yetişkin körlüğü, amputasyon (Kol, bacak gibi bir organın veya uzantı şeklinde bir oluşumun kesilip çıkarılması) (Kocatürk, U. 2000), böbrek yetmezliği, kalp krizleri ve felçlere neden olmaktadır. Diyabet, insülinin kısmen veya tamamen eksik olmasına bağlı gelişen, açlık kan glukozunun yüksekliğiyle karakterize sendromlardan oluşmaktadır. Yetersiz insülin salınımı nedeniyle oluşan metabolik değişiklikler, glukagonun artışıyla daha da şiddetlenir (Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997). Diyabetin olgularını kapsayan iki ana tipi ve daha seyrek görülen bazı özel tipleri vardır. İki ana tipin ayırtettirici temel özellikleri hastanın insüline bağımlı olup olmamasıdır: İnsüline bağımlı diabetes mellitus (insulin-dependent diabetes mellitus= IDDM) ve insülin bağımsız diabetes mellitus (non-insulin dependent diabetes mellitus= NIDDM) (Kayaalp, S.O., 2000).

Diyabetin yukarıda söz edilen iki tipinin Dünya' daki sıklığı değişkenlik gösterir. ABD' de diyabetik hastaların yaklaşık %80- 90 ını Tip II diyabetikler, geriye kalanların büyük çoğunluğunu ise Tip 1 diyabetikler oluşturur; oysa bazı tropikal ülkelerde besinsel ya da toksik faktörlerin eşlik ettiği kronik pankreatit diyabetin en yaygın nedenidir Çok seyrek olarak, diyabet insülin genindeki mutasyon sonucu da ortaya çıkabilir. Bu tür mutasyonlardaki amino asit değişimleri, daha düşük etkinlik gösteren insülinlerin oluşumuna ya da proinsülinin insüline dönüşüm prosesinde bir bozukluğa yol açar (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).

1.2 Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus, IDDM)

Tip 1 diyabet, juvenil diyabet, gençlikte başlayan diyabet ve ketoza yatkın diyabet diye de adlandırılır. İnsülin salgılayan beta-hücreleri harap olmuş ve insülinemi azalmıştır. Olguların çoğunda adacık hücrelerine karşı otoantikör hastalığın başlangıç dönemi hariç bulunmaz ve hastalık genellikle bir virüs enfeksiyonu sonucu oluşur; geri kalanlarda otoantikör titresi yüksektir ve diyabetle birlikte diğer bazı otoimmün hastalıklar da bulunur. Glisemiye kontrol altına almak, ketozu önlemek ve hastanın yaşamını sürdürmek için dışarıdan insülin verilerek, **mutlak insülin eksikliğinin giderilmesi** gerekir (Kayaalp, S.O., 2000).

1.3 Tip II Diyabet (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus, NIDDM)

Tip II diyabet, erişkinlikle başlayan diyabet veya ketoza- rezistan diyabet diye de adlandırılır.

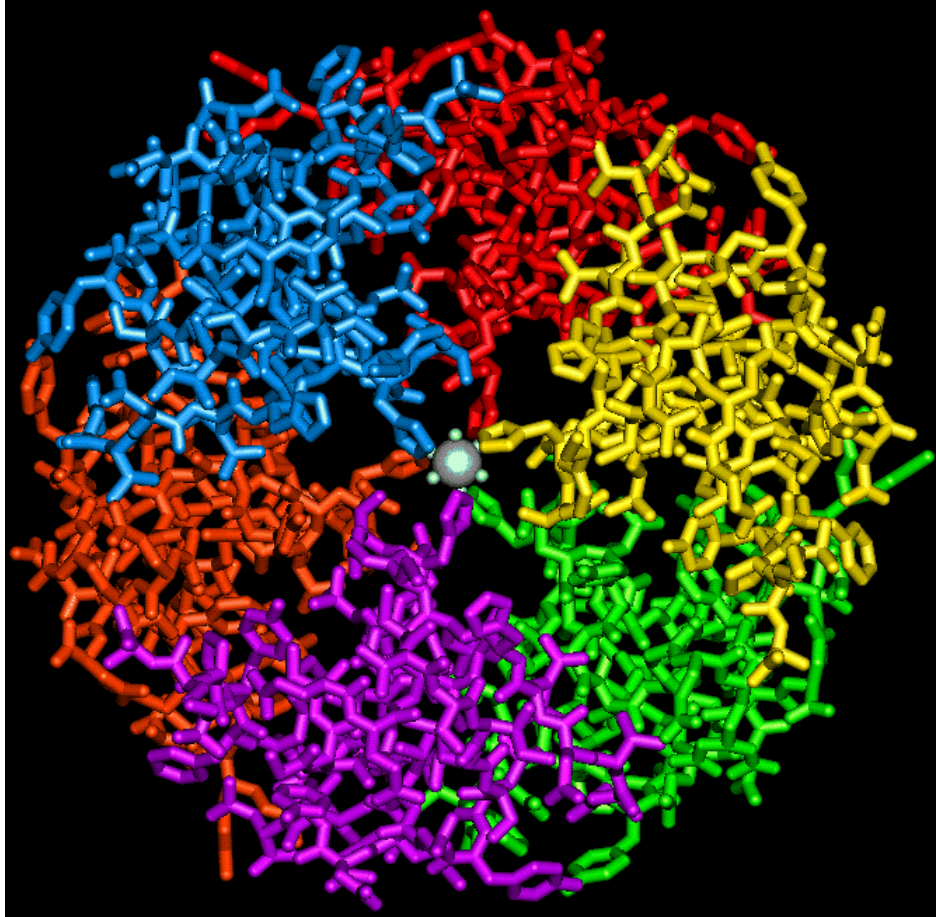
Bu tip diyabet olgularında beta-hücrelerde insülin yapılması ve depolanması genellikle bozulmamıştır; salgılanmada genellikle azalma yoktur. İnsülinemi biraz azalmış, normal veya artmış bulunabilir. Önemli bir temel bozukluk hedef hücrelerde insülin reseptör sıklığının azalması veya hücre içinde postreseptör düzeyde insülin etkinliğinin azalması ve direnç gelişmesidir. Tip II diyabet kalıtımla yakın bir ilişki gösterir (Kayaalp, S.O., 2000).

Çizelge 1.1 Diabetes mellitusun iki tipinin karşılaştırılması (Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997).

	İnsüline bağlı DM (IDDM)	İnsülininden bağımsız DM (NIDDM)
Eşanlamlısı	Tip 1; genç tip diyabet	Tip II; erişkin tip diyabet
Başlama yaşı	Genellikle çocukluk veya erişkin dönemde	Sıklıkla 35 yaşından sonra
Hastalığın başlangıcındaki beslenme durumu	Sıklıkla iyi beslenmiş	Obezite genelde bulunur
Görülme sıklığı	Diyabetlilerin %10-20'sini oluşturur.	Diyabetlilerin %80-90'ını oluşturur.
Genetik yatkınlık	İlımlı, vasat	Çok güçlü
Kusur veya eksiklik	B-hücreleri yıkılmıştır, insülin üretimi yoktur.	B- hücreleri uygun nicelikte insülin üretemez; insülin direnci vardır.
Ketozis	Sıktır	Nadirdir
Plazma insülini	Düşük veya yoktur	Normal veya yüksek
Akut komplikasyonları	Ketoasidoz	Hiperozmolar koma
Oral hipoglisemik ilaçlar	Yanıt vermez	Yanıt verir
İnsülin tedavisi	Her zaman zorunludur	Genellikle gerekmez

2. İNSÜLİN

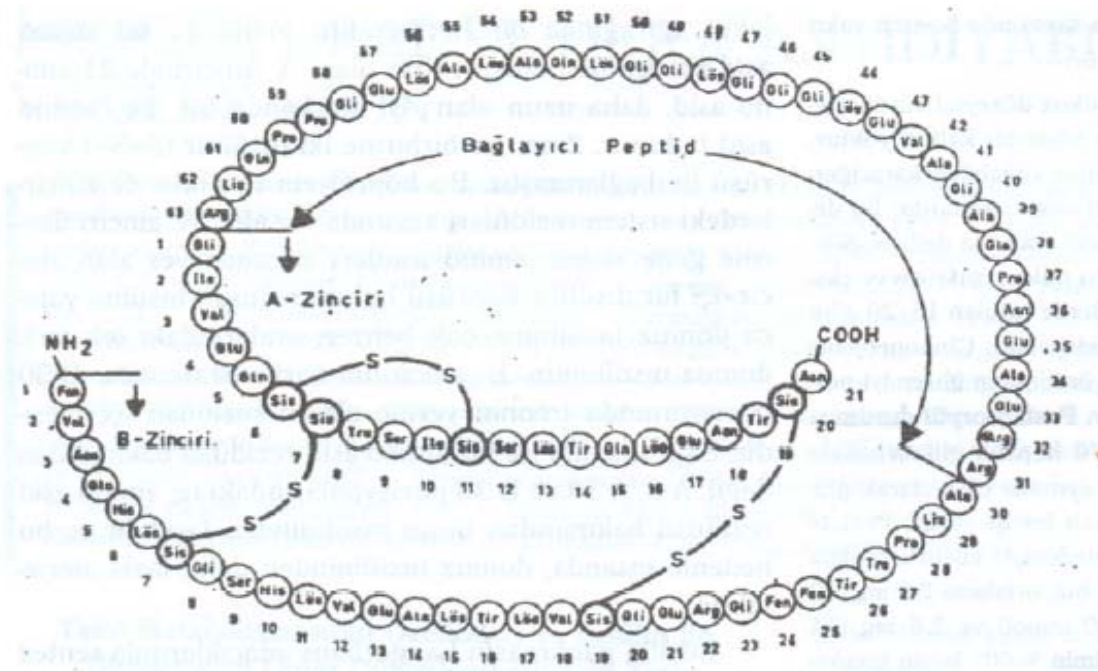
İnsülin pankreasın Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinde sentezlenen ve M.A. yaklaşık 5800 olan polipeptid bir hormondur. İlk kez 1922 yılında, Kanada da, köpek pankreasından elde edilen bir ekstre şeklinde 14 yaşındaki Leonard Thomson adlı Tip 1 diyabetik çocuğa uygulanmış ve sonrasında saflaştırılarak, bugüne dek tıp tarihinin tanıdığı en etkin terapötik ajanlardan biri olarak klinikteki yerini almıştır (Kayaalp, S.O., 2000). İnsülin birbirine disülfid bağlarıyla bağlı iki polipeptid zincirinden oluşan küçük bir proteindir. Bir öncü protein (pro-insülin) olarak sentezlenir. Bu protein proteolitik yıkıma uğrayarak insülin ve peptid C' ye ayrılır. Her ikisi de pankreasın β -hücrelerinden salgılanırlar (Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., 1998).



Şekil 2.1 İnsülin heksamerinin üç boyutlu görünümü. Ortada Zn^{+2} iyonu ve etrafında 3 H_2O molekülü ile birlikte [1].

2.1 Kimyasal Yapısı ve Biyosentezi

İnsan insülin molekülü, disülfür köprüleri ile birbirine bağlanmış iki peptid zincirinden oluşmuştur. A zinciri 21, B zinciri ise 30 amino asit içerir. Çeşitli hayvanlarda sentezlenen insülinler, yapısal olarak insan insülininden farklılık gösterirler. Sözü edilen insülinlerden bazılarının 15- 20 amino asidinin insan insülininden farklı olduğu anlaşılmıştır. Yapıca insan insülinine en fazla benzerlik gösteren ise domuz insülinidir. Domuz insülininin yalnızca bir sığır insülininin ise üç amino asidi insan insülininden farklıdır. Bu nedenle domuz insülini, sığır insülinine oranla daha az alerjiktir. İnsülin, adacık dokusundaki β hücrelerinin granüler endoplasmik retikulumundaki ribozomlarda sentezlenir. Langerhans adacıklarının ortasında toplanan β hücreleri adacık dokusunun % 60-80' ini kapsar. Langerhans adacıkları, her biri bir başka hormon sentezleyen ve salgılayan dört farklı hücre tipinden oluşur. B hücreleri insülin, α hücreleri glukagon, δ hücreleri somatostatin ve PP hücreleride pankreatik polipeptid salgılar (Kayaalp, S.O., 2000).



Şekil 2.2 Domuz proinsülini'nin ve insülini'nin kimyasal yapısı (Kayaalp, S.O., 2000).

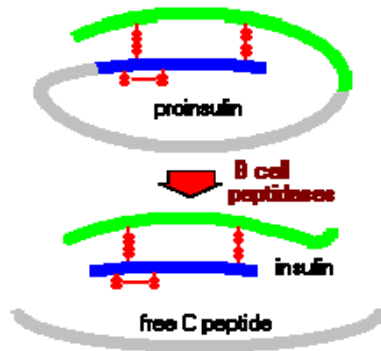
Çizelge 2.1 Pankreas adacık hücreleri ve salgıladıkları hormonlar (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000)

Hücre tipi	Salgılanan Hormon
Alfa Hücresi (α)	Glukagon

Beta Hücresi (β)	İnsülin
Delta Hücresi (δ)	Somatostatin
PP Hücresi (PP)	Pankretik polipeptid (PP)

İnsülin sentezi, ilk basamaklarının β hücrelerinin mikrozomal fraksiyonlarında gerçekleşmesi dışında, öteki proteinlerin sentezinden önemli bir farklılık göstermez. Sentez, DNA insülin geninin hücre çekirdeğinde mRNA'ya transkripsiyonu ile başlar. İnsülin β hücrelerinde önce tek zincirli bir prekürsör, yani proinsülin şeklinde sentezlenir. Proinsülin insülinden farklı olarak, insanda 35 amino asitten oluşan ve C-peptid (Connecting peptide) adı verilen bir segment içerir. İnsülinin biyosentezine yönelik araştırmalar, proinsülinin de "preproinsülin" denen prekürsöründen oluştuğunu göstermektedir. Ribozomlarda 110 amino asitli bir polipeptid olarak sentezlenen preproinsülin, endoplazmik retikulumda 24 aminoasidini yitirerek proinsüline dönüşür. Proinsülin de golgi cihazında kalsiyum bağımlı endopeptidazların etkisiyle insülin ve C-peptid dönüştürülür ve veziküller içinde depolanır. Böylece insülin salgılanmasına yol açan tüm uyaranlara yanıt olarak insülin ile birlikte ekimolar derişimde C-peptid de salgılanır. C-peptid biyolojik etkinlikten yoksundur; ancak bu peptidin plazma düzeylerindeki değişiklik insülinin salgılanma hızının göstergesi olarak değerlendirilir.

Veziküllerde depolanan insülin çinko iyonu ile kompleks yapmış durumdadır. Proinsülinin tümü enzimatik çevirimle insüline dönüştürülemediğinden veziküller içinde proinsülin de bulunur. Bu nedenle β hücrelerinden çok az miktarda proinsülin de salgılanır (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).



Şekil 2.3 İnsülinin sentezi [2].

glukozun β -hücrelerinin içine girerek etkinlik gösterdiğini öne sürmektedir.

Glukoz hücre içine kolaylaştırılmış taşınmayla girer ve burada glukokinaz enziminin etkisiyle fosforilasyona uğrar. Şekerlerin fosforilasyon ve sonrasında glikolizise uğrama kapasiteleri ile insülin salgılanmasını uyarabilme yetenekleri arasında çok yakın bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Bu noktadan yola çıkarak, bir ya da daha fazla sayıda glikolitik ara ürün ya da kofaktörün insülin salgılanmasının gerçek uyarıcıları olduğu düşünülmektedir.

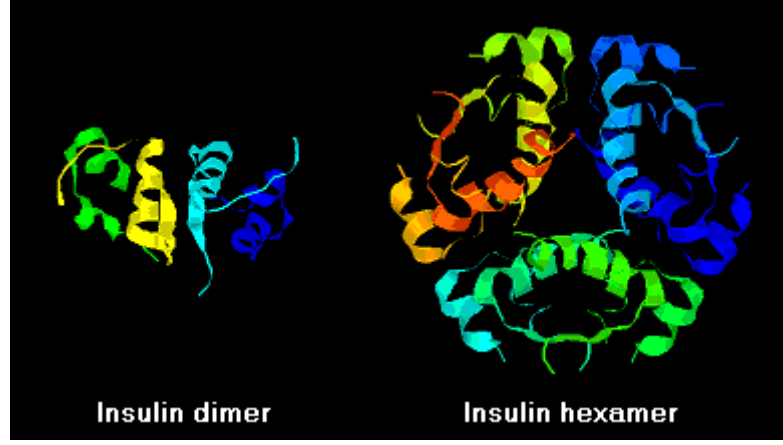
β -hücrelerinden insülin salgılanması hücre içi kalsiyum derişimlerine bağımlıdır. Glukoz ve metabolitlerinin voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını açarak hücre içine kalsiyum girişini arttırdıkları gösterilmiştir. Kalsiyum, fosfolipaz A_2 ve fosfolipaz C' yi aktive ederek arakidonik asit, inozitol polifosfatlar ve diaçilgliserol (DAG) oluşumuna yol açar. İnozitol trifosfat (IP_3) endoplazmik retikulumdan kalsiyum mobilizasyonunu sağlayarak sitozolik kalsiyum derişimlerinin daha da artmasına neden olur. Öte yandan hücre içi siklik adenosin monofosfat (sAMP) düzeylerindeki artışın da serbest kalsiyum derişimlerini yükselttiğine ilişkin deneysel bulgular elde edilmiştir.

Bu gözlemler, insülin salgılanmasının düzenlenmesinde sAMP' nin de rol oynadığını düşündürmektedir. Kalsiyum hücre içinde kalmodulin ve ona bağımlı bir protein kinaz aracılığıyla insülin içeren veziküllerin hareketlenerek hücre membranına taşınmasını sağlar. Hücre membranına yapışan veziküller daha sonra ekzositoza uğrar.

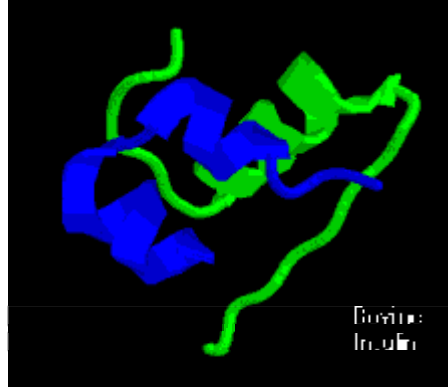
İnsülin salgılanmasını uyarıcı çok sayıda hormon ve besin ögesi aynı zamanda insülinin biyosentezini de artırır. İnsülin biyosentezi ve salgılanması arasında çok yakın bir ilişki bulunmasına karşın bazı faktörler bunlardan yalnızca birini etkileyebilirler. Örneğin; hücre dışı kalsiyum derişiminin azalması insülin biyosentezini etkilemeksizin yalnızca salgılanmasını inhibe eder. Diğer yandan, insülin, glukagon ve somatostatin arasındaki pankreatik iletişimin, bu hormonların salgılanma hızları üzerinde düzenleyici bir etkinliği olduğuna ilişkin deneysel kanıtlar giderek artmaktadır.

Günde pankreastan salgılanan insülin miktarı yaklaşık 2 mg (50 Ü) dir. Bu miktar, pankreası çıkarılmış bir insanda normoglisemiyi sürdürmek için gerekli olan miktardır. Açlıkta pankreastan portal vene 40 μ g (1 Ü)/saat hızında insülin salgılanır. Bu durumda portal vendeki insülin içeriği 2-4 ng (50-100 μ Ü)/ml, periferik dolaşımda ise 0.5 ng (12 μ Ü)/ml'dir. Yemekten sonra insülinin portal vendeki derişimi hızlı bir şekilde yükselir. Periferik dolaşımdaki insülin derişimin de buna bağılı olarak, ancak daha az oranda bir artış gösterir. Klinikte de insülin tedavisi ile portal ve periferik dolaşımda fizyolojik insülin salgılanmasının

oluşturduğu derişimlerin sağlanması amaçlanmalıdır. (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).



Şekil 2.5 İnsülinin dimer ve hekzamer yapısı [2].



Şekil 2.6 Sığır insülininin yapısı [4].

2.3 İnsülinin Biyotransformasyonu

İnsülinin plazmadaki yarı ömrü, normal bireylerde ve komplikasyonsuz diyabetiklerde yaklaşık 5-6 dakikadır. Antiinsülin antikor oluşmuş diyabetiklerde ise bu süre uzayabilir. İnsülin başta karaciğer, böbrek ve kas olmak üzere öteki hedef dokularda ve plazmada yıkılır. Portal ven yolu ile karaciğere gelen insülinin yaklaşık yarısı burada biyotransformasyona uğradığı için genel dolaşıma ulaşamaz.

İnsülin böbreklerde glomerüler filtrasyondan sonra tübüllerden reabsorbe edilir. İnsülin yıkımı tübül hücrelerinde de gerçekleştirilir. Ağır renal disfonksiyon, insülinin dolaşıdaki

eliminasyon hızını hepatik disfonksiyona oranla daha fazla etkilemektedir. Karaciğerde insülin yıkımı maksimum düzeyde gerçekleştirildiğinden hormonun renal eliminasyonundaki herhangi bir azalmayı dengeleme olasılığı düşüktür.

İnsülinin biyotransformasyonunu sağlayan enzimlerin sayısı büyük olasılıkla birden fazladır. Bunlar arasında en etkin, özellikle hepatositlerde yoğun bir yerleşim gösteren tiyolmetaloproteinazlardır. Bu enzimin kas, böbrek ve beyinde de bulunduğu gösterilmiştir. Karaciğerde insülinin biyotransformasyonunda önemli rolü olan bir başka enzim de glutatyon-insülin dehidrojenazdır. Glutatyon-insülin dehidrojenaz enziminin katalitik etkisi altında insülin molekülünün A ve B zincirleri arasındaki disülfür köprüleri yıkılmakta, sonrasında birbirinden ayrılan zincirler proteolitik enzimler tarafından parçalanmaktadır.

1950' lerde, diyabetin dokularda insülin yıkılmasından sorumlu enzimlerin yüksek afinite göstermesinin bir sonucu olarak gelişebileceği öne sürülmüştür. Ne var ki, bunu izleyen yıllarda yapılan çalışmalarda sözü edilen yaklaşımı doğrulayacak sonuçlar elde edilememiştir. Ancak diyabetik hastaların büyük çoğunluğunda bir sorun oluşturmamasına karşın; bunların bazılarında s.c. enjeksiyondan sonra insülin yıkılmasının hızlandığı ve bu duruma insülin direncinin eşlik ettiği saptanmıştır. Bir proteaz inhibitörü olan apoproteinle yapılan tedavinin ise bu hastalarda insülin direncini kırarak insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).

2.4 İnsülin Kaynakları

İnsülin sığır ve domuz pankreasından elde edilir. Ancak artık insan insülini tedavide hayvan kaynaklı insülinin yerini almaktadır. Özel olarak genetik yapısı modifiye edilmiş insan insülini genini taşıyan bir *Escherichia coli* suşu tarafından üretilir. İnsan insülinine yapısal olarak en çok benzeyen domuz insülinidir, sadece bir amino asidi farklıdır (Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., 1998).

Tıpta kullanılan insülin müstahzarlarının bir kısmı, domuz ve/veya sığır pankreaslarından ekstraksiyon veya saflaştırma yoluyla elde edilirler. Domuz insülini, sığır insülinine oranla insanlarda daha az alerjenik olduğundan sadece domuz insülini içeren müstahzarlar sığır insülini içeren veya karma olan müstahzarlara tercih edilirler (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.1 İnsülin müstahzarlarının kaynaklarına ve saflaştırılma derecelerine göre sınıflandırılması

Eskiden kullanılan ve rekristalize insülin veya konvansiyonel insülin denilen müstahzarlarda,

günümüzdeki müstahzarlardan farklı olarak, insülin yaklaşık %90 oranında saflaştırılmıştır. %10 luk kontaminasyon; insülin polimerleri, pro-insülin, proinsülininden insüline geçerken oluşan ara ürünler ve parçalanma ürünleri ile pankreas kaynaklı diğer peptidler olan VIP, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptid den ibaretti.

Günümüze ticari insülin türlerinin çoğunda, **Sephadex kromatografisine** tabi tutulmak suretiyle insülininden daha büyük moleküller tamamen veya büyük ölçüde elimine edilmiş ve insülin %99 oranında saflaştırılmıştır. Sephadex kromatografisi ile insülin preparatı üç komponente (a, b ve c komponenti) ayrılır. Saflaştırma işlemine iyon-değiştirme kromatografisi yöntemini de eklemek suretiyle, yaklaşık olarak insülin büyüklüğünde moleküle sahip olmaları nedeniyle Sephadex kromatografisi ile uzaklaştırılamayan insülin türevlerinin de uzaklaştırılması mümkün olmuştur. Böylece **yüksek derecede saflaştırılmış (highly purified, HP) insülin** preparatları hazırlanmıştır; bunlar %99 dan fazla insülin içerirler. HP insülin preparatları genellikle tek hayvan türünden hazırlanır. HP domuz insülini müstahzarları hayvansal kaynaklı insülin müstahzarları içinde en lokal ve sistemik reaksiyon yapanlardır. HP insülin preparatları Türkiye de son yıllarda pazarlanmıştır. Yüksek derecede saflaştırılmış insülin preparatları yeterli derecede stabil olduklarından, buzdolabı dışında, fazla ısıya veya soğuğa maruz kalmamak koşuluyla, haftalarca saklanabilirler (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.1.1 İnsan insülini

İnsan insülini preparatları ilke olarak 1982 de İngiltere de ortaya çıkarılmıştır. İnsan insülininin amino asitlerden başlayarak sentezi 1963 yılında yapılmıştır; fakat maliyeti çok pahalı olduğu için bu yöntemin ticari değeri yoktur. **İki yöntemle** endüstriyel ölçüde insan insülini yapılmaktadır; bunun maliyeti, mezbaa kaynaklı pankreastan üretilene göre pek yüksek sayılmaz. Birinci yöntemde; domuz insülininde, insan insülininden farklı olan bir amino asid rezidüsü değiştirilmek (transpeptidasyon) suretiyle sentez yapılır. Bu yöntemle elde edilen insan insülinine **yarı-sentetik insan insülini** veya enzim-modifiye domuz insülini (enzyme modified porcine yani emp insülin) adı verilmektedir. İkinci yöntemde **DNA rekombinasyonu teknolojisi** (Recombinant DNA technology) sayesinde geni klonlanmış E.coli bakterilerinin veya maya mantarlarının kültürlerinde A ve B zinciri sentez ettirilir, sonra bu iki zincir birbirine eklenerek **rekombinant (biyosentetik) insan insülini** yapılır.

İlginç olarak, ilk denemeler insan insülininin, yüksek derecede saflaştırılmış ve daha ucuz olan domuz insülini müstahzarlarına göre, diyabetli hastalarda gliseminin kontrolü yönünden

bir üstünlüğü olmadığını göstermiştir; hatta, insan insülini domuz insülinine göre biraz daha az etkin bulunmuştur (açlık kan şekerinin daha yüksek kalması gibi). Regüler insan insülini cilt altına enjekte edildiğinde, çözünürlüğünün daha fazla olması sebebiyle hayvan kaynaklı insülinlerden biraz daha çabuk absorbe edilir. İnsan insülininin en önemli üstünlüğü **immünojnitesinin daha düşük** olmasıdır. Bu nedenle diğer insülinlere allerji göstermiş olan veya böyle bir risk altında bulunan hastalarda, gebelik diyabeti veya cerrahi strese maruz kalma gibi geçici durumlarda ve ilk kez insülin tedavisi yapılacak hastalarda insan insülini tercih edilir. İnsan insülininin, antikor meydana gelmesi sonucu zamanla insüline rezistans (direnç) oluşması sorunu da daha seyrek ortaya çıkar. Diğer insülinlerle tedavi edilip de anti-insülin antikor oluşan hastaların insan insülini ile tedaviye transferi durumunda antikorun kaybolma olasılığı fazla değildir (Kayaalp, S.O., 2000).

Yarı sentetik ve biyosentetik insan insülinlerinin regüler insülin, izofan insülin, lente ve ultralente insülin şeklindeki müstahzarları çıkarılmıştır.

2.4.1.2 Regüler ve modifiye edilmiş insülin müstahzarları ve uygulanmaları

İnsülin müstahzarları ya yukarıdaki şekillerde ve saflık derecelerinde hazırlanmış, **modifiye edilmemiş, kısa etkili insülin** içerirler ya da onun yapısına başka bir madde sokmak veya kristal büyüklüğünü değiştirmek suretiyle hazırlanan ve etki süresi daha uzun olan **modifiye insülinleri** içerirler (protamin çinko insülini, globin çinko insülin ve lente insülinler gibi). **Modifiye edilmemiş insüline, bayağı insülin (regüler insülin)** adı verilir. İnsülin maddesinin elde edilmesi sırasında insülin genellikle çinko klorür içeren bir ortamda çöktürülür; böylece **kristal regüler insülin**, diğer adıyla kristal çinko insülin elde edilir. Kristaller, genellikle altı insülin molekülü içeren heksamerler şeklindedir. Çöktürme ortama çinko iyonu katılmadan yapılırsa amorf regüler insülin oluşur; günümüzde artık amorf regüler insülin kullanılmaz. Her heksamerde iki çinko iyonu bulunur. Bunlar insülin molekülü ile serbest karboksil grubu ve iki imidazol grubundan biri aracılığıyla bağlanmak suretiye koordinasyon kompleksi yapar. Regüler insülin solüsyonları, modifiye, insülin süspansiyonları gibi bulanık görünümlü değil, berraktır. Regüler insüline **çözünür insülin** adı da verilir (Kayaalp, S.O., 2000).

İnsülinin izoelektrik noktası 5.3- 5.5 tir. Sudaki solüsyonunun pH sı bu değere yakınsa (pH 4.5 -7 arası) insülin çöker. Bu pH aralığı dışında kalan asidik veya bazik ortamda insülin çözünmüş durumdadır. Bazik ortamda oldukça stabildir. İnsülin müstahzarları miyadlıdır (kullanım süreleri vardır); miyadları genellikle iki yıl kadardır (Kayaalp, S.O., 2000).

İnjesiyonluk regüler insülin solüsyonları eskiden fosfat tamponu ile $\text{pH} = 3$ olacak şekilde hazırlanırdı. 1970 lerin başından itibaren insülin' in kontaminasyon (kirlenme) ürünlerinden temizlenmesine endüstriyel ölçüde olanak veren yöntemler geliştirilmesi sonucu, regüler insülin in pH si 7 olduğu halde çökmeyen luk solüsyonu yapılmıştır; buna nötral insülin solüsyonu denilir. **Nötral regüler insülin** müstahzarı gerek yerinde ağrı ve gerekse diğer lokal reaksiyonları asidik insülin müstahzarlarına göre daha az yapar; ayrıca etkiler biraz daha çabuk başlayabilir. Asidik insülin preparatları artık kullanılmamaktadır; onların yerini nötral insülin preparatları almıştır (Kayaalp, S.O., 2000).

Modifiye insülinler, protamin çinko insülin ve lente insülinlerdir. Bunlar **uzun veya orta süre etkili** türlerdir. Diğer bir modifiye insülin türü olan globin çinko insülin artık kullanılmamaktadır. Çinko kompleksin stabilitesini artırır ve etkisi süresini daha da uzatır. İnsülinin protamin veya globin ile birleştirilmesi sonucu oluşan kompleksler, geniş bir pH aralığında suda çözünmezler ve süspansiyon oluştururlar. Bu preparatların pH 'sı (7.1- 7.5) vücut sıvılarının pH 'sine eşit veya ona yakındır. Süspansiyon şeklindeki preparatlar i.v. verilmezler, sadece cilt altına injekte edilirler. Doku içindeki yerinde insülin, kompleksten yavaş olarak açığa çıkar ve böylece yavaş absorbe edildiği için etki süresi uzar. İnsülinle kompleks oluşturmak için kullanılan protamin, Salmonide familyasındaki bazı balıkların sperminden elde edilen bazik bir polipeptiddir. İnsülin kompleksi süspansiyonlarında pH , regüler insülin solüsyonlarında olduğu gibi, fosfat tamponu kullanmak suretiyle ayarlanmıştır (Kayaalp, S.O., 2000).

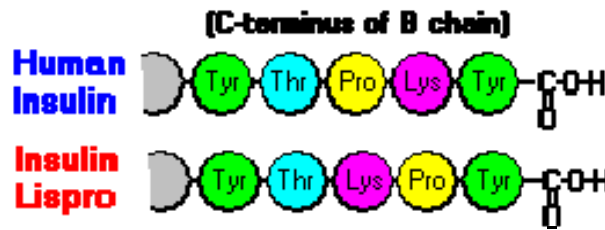
İnsülin, başka bir organik madde ile birleştirilmesine gerek kalmaksızın, asetat tamponlu ortamda aşırı miktarda çinko klorür (100 Ü insülin için 2 mg Zn^{+2}) karşısında büyük kristaller halinde çökebilir. Bu işlem, gene asetat tamponu ile, fakat daha az çinko klorür kullanılarak ve yüksek pH 'de yapılırsa insülin, amorf çinko insülin partikülleri şeklinde çöker. Böylece elde edilen insülinlerden hazırlanan preparatlara **insülin çinko süspansiyonları veya lente insülinler** adı verilir. Bunların etki sürelerinin uzunluğu, protamin veya globin gibi başka bir yabancı protein katılarak sağlanmış olmadığından alerjik etkinlikleri azdır. Lente insülin müstahzarları, kendi aralarında veya regüler insülin ile aynı injektörde karıştırılarak uygulanabilirler; fakat fosfat tamponu içeren diğer modifiye insülin müstahzarları ile karıştırılmazlar (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.1.3 İnsülin Analogları

İnsan insülini molekülünde belirli amino asitlerin yerine başkalarını sokmak suretiyle yapılan

yapı- etki araştırmaları sonucunda elde edilen iki insülin, insülin lispro ve insülin aspart tıbbi kullanıma girmiştir.

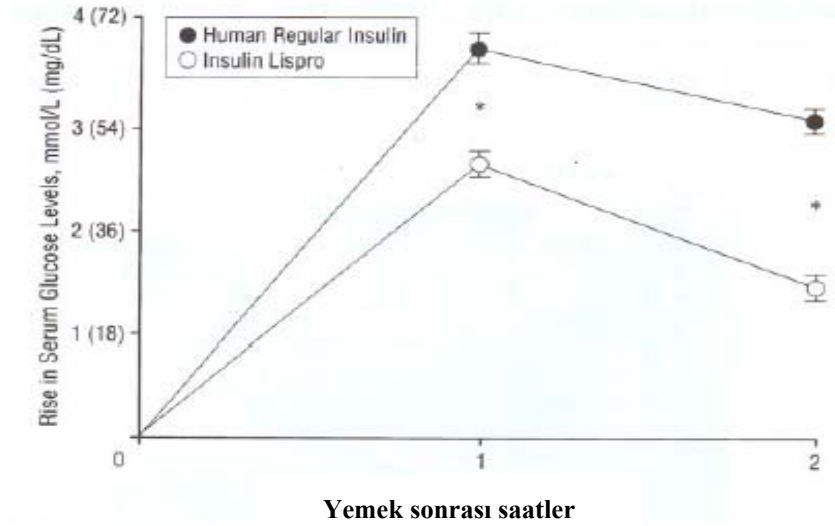
İnsülin lispro, insan insülininin B zincirinde 28 ve 29 numaralı pozisyonlardaki lizin ve prolin'in birbiriyle yer değiştirmesi suretiyle elde edilir. **İnsülin aspart**, bir amino asidi aspartik asitle yer değiştirmek suretiyle elde edilir. Her iki insülinin de cilt altından enjeksiyonunun ardından etkileri, regüler insülininkine göre daha erken başlar ve **daha kısa** sürer. Bu nedenle bu iki analog yemekten önce enjekte edildiğinde yemek sonrası (postprandiyal) hiperglisemi regüler insülin enjeksiyonuna kıyasla daha düşük olur; ancak açlık glisemisi ve daha sonraki yemekten önceki (preprandiyal) glisemi biraz daha yüksek olur (Kayaalp, S.O., 2000). Etkinin başlama süresi lispro için 0.3- 0.5 saat; insülin için 0.5- 1.0 saat olarak belirlenmiştir. Etki süresi de daha kısadır. Yemeklerden 15 dakika önce enjekte edilir. Öte yandan, etkisinin çok çabuk başlaması nedeniyle lispronun belirgin hipoglisemi oluşturma potansiyeli taşıdığı düşünülerek yaklaşık 1000 hastada 6 ay süreli klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. İlginç olarak, lispronun yol açtığı hipoglisemik epizodların regüler insan insülininkinden anlamlı olarak daha az olduğu bulunmuştur. Sözü edilen araştırmada, lispro ile tedavi sürecinde toplam 19.106 hipoglisemik epizod oluşmasına karşın regüler insülin ile tedavi edilen hastalarda toplam 21.522 hipoglisemik epizoda rastlanmıştır. Bu nedenle, Tip 1 diyabetik bireylerin yoğun insülin tedavi programı çerçevesinde lispronun postprandiyal hipoglisemi sıklığında bir artışa yol açmaksızın kan glukozunu daha etkin bir şekilde denetleyebileceği düşünülmektedir (Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M. 2000).



Şekil 2.7 İnsan insülini ve insülin lispronun yapısı [2].

Son dönemde yapılan bir klinik çalışmada, regüler insüline kıyasla insülin lispronun kas altına uygulandıktan bir saat sonra kandaki şeker düzeyini %30, 2 saat sonra ise %53 oranında düşürdüğü görülmüştür. Ek olarak, lispro tedavisiyle gece ve tüm gün boyunca hipoglisemi görülme riski regüler insan insülinine kıyasla daha az gerçekleşmiştir. Başka çalışmalarda, lispro antikor –mediated insülin direncini düşürmüş ve tip II diyabetik hastalarda glisemik

kontrolü arttırmıştır. Burundan inhale uygulanan insülinlerin daha üstün farmakokinetik özellikleri olduğu bilinmektedir ve bunların faz III denemeleri yapılmaktadır [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].



Şekil 2.8 İnsan insülini ve insülin lispro nun uygulandıktan sonra kan şekerinin artmasına olan etkisi [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].

2.4.2 İnsülin Preparatlarının Etki Sürelerine Göre Sınıflandırılması

İnsüli preparatları etki sürelerine göre kısa etkili, uzun etkili ve orta etkili olarak üç gruba ayrılırlar. Bu üç grup arasında sadece etkinin devam süresi bakımından değil fakat doğal olarak etkinin başlama süresi ve doruğa erişme süresi bakımından da fark vardır. Bu süre , belirli bir hastada dozun büyüklüğüne, bölgesine, egzersiz derecesine ve bazen kanda dolaşan anti-insülin antikorlarının afinitesine göre ve tam olarak bilinmeyen diğer bazı faktörlere göre farklılık gösterebilir (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.1 Kısa Etkili İnsülin Preparatları

Etkileri cilt altından injekte edildikten en geç 30 dakika sonra başlar ve preparatın türüne göre 5-16 saat arasında değişen bir süre devam eder. Bunlardan biri nötral regüler insülin, diğeri semilente insülinidir.

2.4.2.1.1 Nötral Regüler İnsülin

Berrak solüsyon halindedir. Solüsyonun pH'si 7'dir. Cilt altından injekte edilir. İntravenöz verilebilen tek insülin türüdür. Modifiye insülin preparatları da (orta ve uzun etki süreli insülinler) aynı pH de olduğu için, onlarla istenilen her oranda karıştırılabilir. Artık pek

kullanılmayan, amorf ve kristal diğer regüler insülinler asid solüsyon şeklinde hazırlandıklarından cilt altına larını takiben yerinde pH'leri doku pH'sine yükselir ve orada çökerler; bu nedenle onların etki süreleri uzayabilir. Nötral regüler insülinin böyle bir sakıncası yoktur. İnjesiyon yerinde diğer regüler insülinlere göre daha az tahriş yapar. Nötral regüler insülinin etkisi cilt altına dan 15- 30 dakika sonra başlar. 1- 3 saatte doruk düzeye erişir ve etkisinin devam süresi 5- 7 saattir (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.1.2 Semilente İnsülin veya Çabuk Etkili İnsülin Çinko Süspansiyonu

Amorf lente insülin preparatıdır. Solüsyonu bulanıktır. Etki süresi, kısa etki süreli diğer insülinlerinkinden daha uzundur. Sadece diğer lente insülinlerle ve regüle insülin ile karıştırılabilir (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.2 Uzun Etkili İnsülin Preparatları

Etkileri geç başlar ve yaklaşık 36 saat kadar devam eder (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.2.1 Protamin Çinko İnsülin

Oldukça fazla çinko içerir (40 Ü insülin için yaklaşık 0.1 mg). İçindeki protamin miktarı insülini nötralize etmek için gerekenin üstündedir. Bu nedenle serbest protamin içerir. Regüler insülinle karışımı bekletilirse, protaminin fazlası bu insülinle birleşir ve kısa süreli regüler insülinde beklenen çabuk etki gelişmez. Bunun için protamin çinko insülinle birlikte adı geçen kısa süreli insülin preparatlarını vermek gerekirse ya ayrı yerlere injekte edilirler ya da karıştırma dan hemen önce yapılır. Protamin çinko insülininin etkisi, dan 7 saat sonra başlar. Bu preparat, glukozüriyi (idrara şeker çıkması) 24 ssat boyunca ortadan kaldıracak dozda verilirse, genellikle bu sürenin sonuna doğru belirgin hipoglisemi (kandaki şeker miktarının aşırı düşmesi) yapar. Bu nedenle kısa etkili bir insülin preparatı ile birlikte azaltılmış dozda verilir. Etki süresinin 24 saatin üstünde (36 saat) olması pratikte sakınca teşkil eder. Bu tür insülin preparatı fazla kullanılmaz (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.2.2 Ultralente İnsülin

En uzun etkili kristal lente insülin süspansiyonudur. İnsülinde başka bir yabancı protein içermediği için, kombine insülin preparatlarına göre alerjenliği daha azdır. Semilente ve kısa etki süreli diğer insülinlerle karıştırılabilir(Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.3 Orta Süre Etkili İnsülin Preparatları

Etkileri İnjesiyondan iki saat sonra başlar ve 18- 24 saat kadar sürer. Sık kullanılan modifiye

insülinler bu gruptakilerdir (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.3.1 İzofan İnsülin (NPH insülin, Nötral Protamin Hagedorn İnsülin)

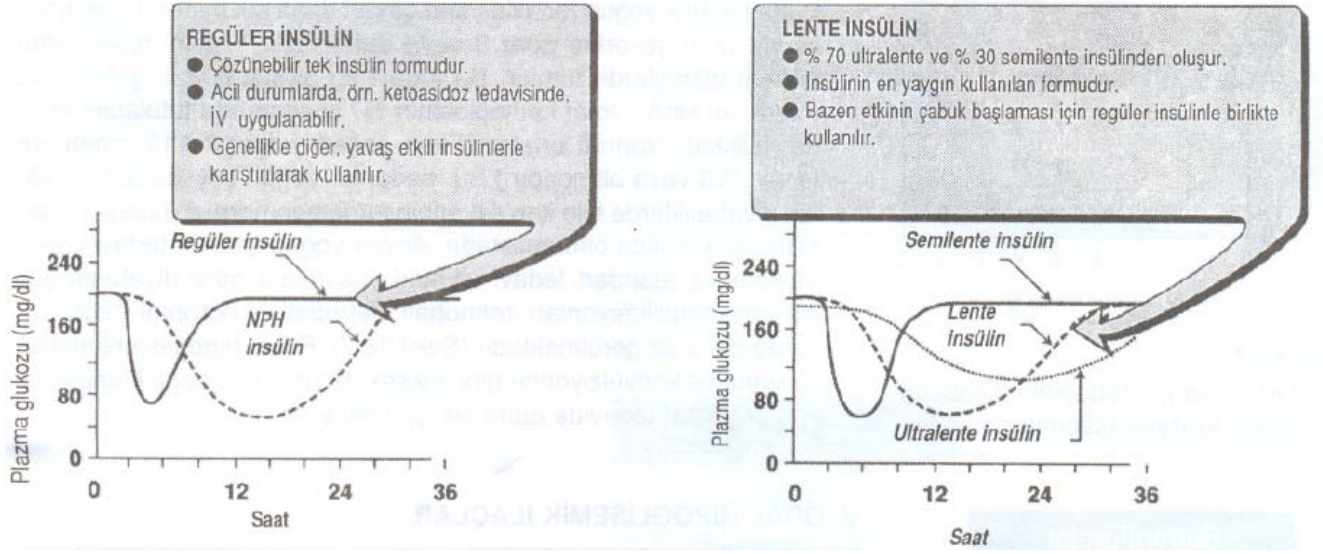
İnsülini nötralize etmeye ancak yetecek kadar protamin içeren ve mutad protamin çinko insüline göre çok daha az çinko ile hazırlanan insülin preparatıdır. Gerçekte bir protamin çinko insülin türü olmasına rağmen serbest protamin içermediği için, daha kısa etkili nötral regüler insülinle kolayca karıştırılabilir. En sık kullanılan modifiye insülin türüdür (Kayaalp, S.O., 2000).

2.4.2.3.2 Karma Lente İnsülin

Lente insülinleri iki türünün karışımından ibarettir. %70 oranında ultralente ve 30 oranında amorf semilente insülin içerir. Yabancı protein içermez (Kayaalp, S.O., 2000).

Çizelge 2.4 İnsülin Preparatlarının Etki Sürelerine göre Sınıflandırılması ve Bazı Özellikleri (Kayaalp, S.O., 2000).

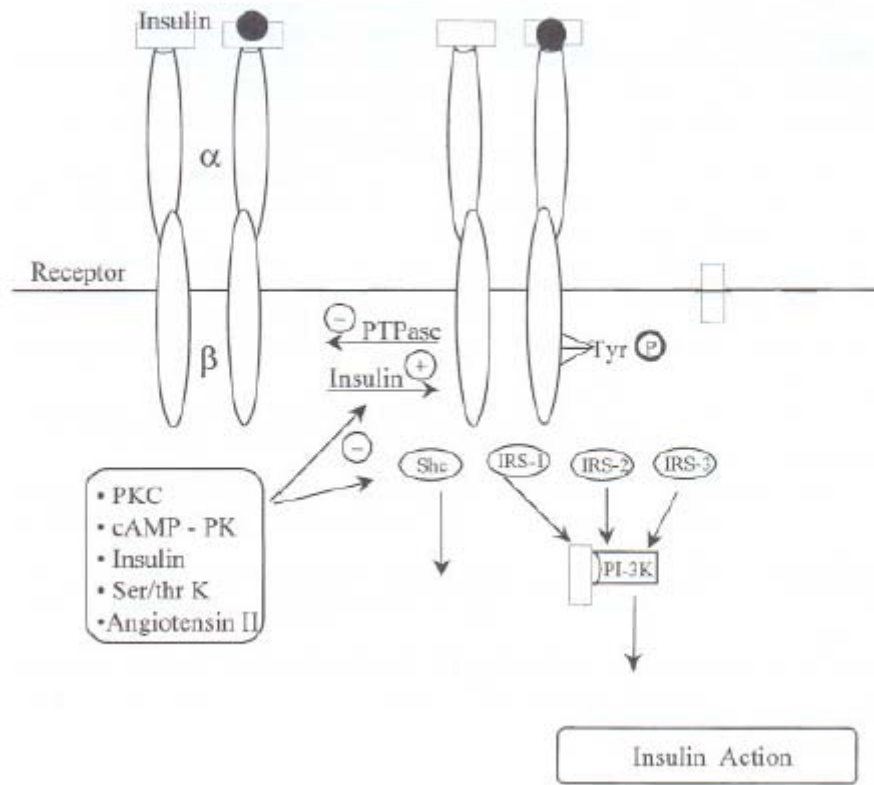
Tür	Preparat	Etkinin başlama süresi	Doruğa erişme (sa)	Yaklaşık devam süresi (sa)	Karışabilme
Kısa etkili ¹	Nötral regüler insülin	15-30 dak	1-3	5-7	Hepsi ile Sadece lente'lerle ve regüler ile
	Semilente insülin	30-60 dak	4-6	12-16	
Orta etkili	İzofan insülin (NPH insülin)	2-4 sa	8-10	18-24	Regüler ile
	Karma lente insülin	2-4 sa	8-10	18-24	Regüler ile ve lente'lerle
Uzun etkili	Protamin çinko insülin	7 sa	16-18	32-36	Regüler ile
	Ultralente insülin	7 sa	8-14	25-36	Regüler ile ve lente'lerle



Şekil 2.9 Çeşitli insülin tiplerinin etkilerinin derece ve süreleri (diyabetik bir hastada açlık durumunda verildiğinde). NPH= Nötral Protamin Hagedorn [Champe, P.C., Harvey, R.A., (1997)].

3. İNSÜLİNİN HÜCREDEKİ HAREKETİ

İnsülinin hücredeki ilk aksiyonu onun hücredeki yüzey reseptörüne bağlanmasıyla başlar. İnsülin reseptörü, insülin bağlayıcı kısmı içeren iki ekstraselüler α -alt ünitesi ile insülini regüle eden tirozin protein kinaz içeren iki transmembran β - alt ünitesinden oluşur. α -alt ünitesi, β - alt ünitesine disülfid bağlarıyla bağlıdır. β - alt ünitesi, adenosin trifosfat (ATP)-bağlayıcı bölgesi vardır ve jukstamembranda otofosforilasyon bölgeleri, düzenleyici ve COOH- ile sonlanan bölgeleri vardır [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].

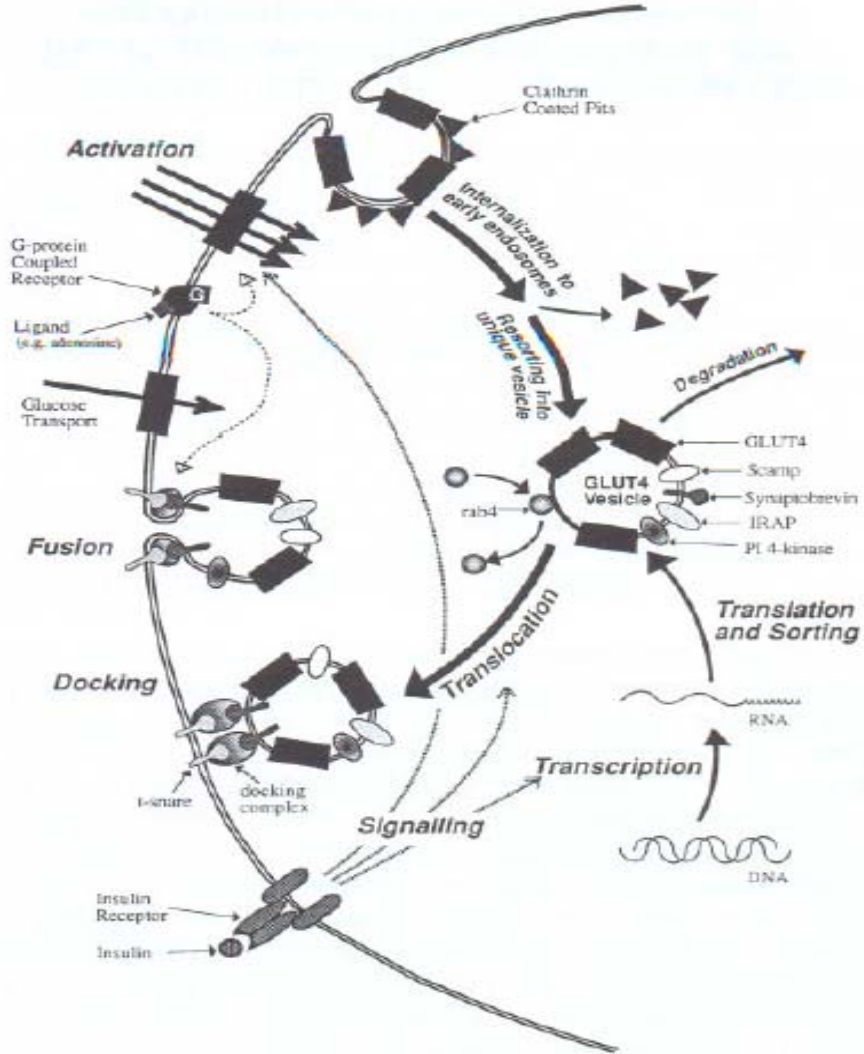


Şekil 3.1 İnsülinin hücredeki aksiyonu [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].

İnsülin, $\alpha\beta$ -dimerinin önce α -alt ünitesine bağlanır ve kovalan bağlı β - alt ünitesinin transfosforilasyonu stimüle eder. Düzenleyici bölgedeki 3 tirozin rezidüsünün otofosforilasyonu kinaz aktivitesini stimüle eder.

4. GLUKOZ TAŞIYICILARI VE PATOFİZYOLOJİK AŞAMALAR

Normal glukoz hemostazının bir gereği olarak insülinin etkisi, kas ve yağ dokularından hızlıca glukoz alımını arttırmak şeklindedir.



Şekil 4.1 Glukoz taşınmasını patofizyolojisi [LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000)].

Yukarıdaki şekilde yağ ve kas hücresindeki glukoz taşınmasının insülin ile stimüle edilmesi sırasındaki olaylar dizisini görebilirsiniz. İnsülin yokluğunda, GLUT-4 glukoz taşıyıcı proteini hücre içinde kalıyor. Sinaptobrevin, insülinin sorumlu amino peptid (IRAP), PI4-kinaz, rab4 ve SCAMPS' i de gibi diğer proteinler GLUT-4 vezikülü ile birleşirler. İnsülin plazma membranındaki reseptörüne bağlandığı zaman, transkripsiyon, translokasyon ve glukoz taşıyıcısının aktivasyonunu da etkileyen bir sinyaller kaskadı (dizini) başlatır. Rab4 vezikülden ayrılır, vezikül eriyerek kaynaştığı plazma membranına yerleşir ve glukoz

transportu başlar. GLUT-4 vezikülleri endositoza uğrar ve endozomlarda tekrar işlenip kullanılır hale getirilirler.

5. GÜNÜMÜZDE İNSÜLİN YAPISINDA UYGULANAN DEĞİŞİKLİKLER

İnsülin yapısında amino asitlerin yer değiştirilmesiyle elde edilen çeşitli farmasötik preparatların, hayvan insülininden elde edilen preparatlara kıyasla daha az immünojenik ve insan yapısına uygun olduğu bilinmekte ve buna göre rekombinant DNA teknolojisiyle analog insülinler kullanılmaya başlanmıştır.

Bundan sonraki bölümlerde ise in vivo ve in vitro çalışmalarla yapılmış insülin- polimer konjugatların (özellikle polietilen glikolün) insanlara uygulandıktan sonraki immünojenitesini ve etki profilini araştıracağız.

İnsan insülin analogu hazırlama konusunda rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği çok başarılı yöntemlerdir. Bu insülin analogları ya monomer-monomer veya dimer-dimer ara yüzeylerindeki polipeptid zinciri üzerinde bazı anahtar amino asit rezidülerinde değişiklik yapılarak oluşmuş kararlı monomerik veya dimerik formlardır.

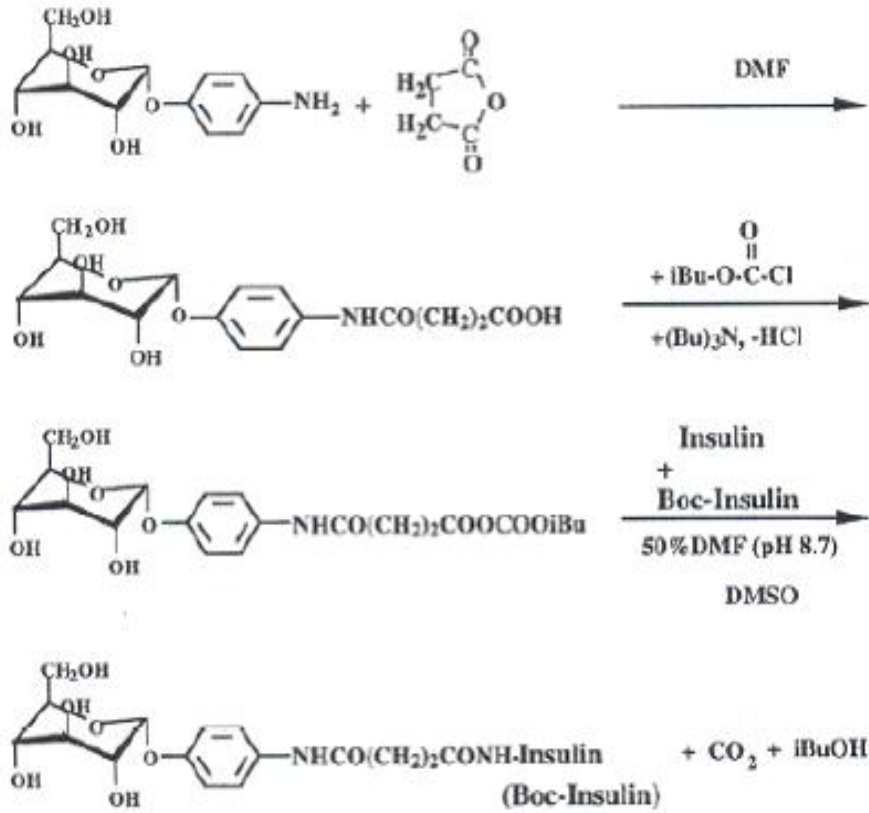
İnsülin analogları düşük pH da saklama durumunda çözünür fakat yapıldıktan sonra nötral pH da çökecek şekilde dizayn edilmiştir. Bu, insüline iki pozitif yük eklenerek isoelektrik noktasının 5.4 ten 7.3 e çıkarılmasını sağlayarak başarılmıştır. Buna rağmen, bu türev klinik ortamda başarısızlığı getirmiştir. Benzer deneyim, klinik çalışmalarda bazal insülin yerine insan proinsülini kullanıldığında da elde edilmiştir. Son yıllarda, domuz ve diyabetik köpeklerde etkisi belirlenmiş çözünebilir, yağ asidi-açillenmiş insülin tanıtılmaya başlandı. Bu analoglar nötral pH' da çözünür saklanabilir ve daha sonrada çözünür kalabilir. Bu gecikme prensibi, yağ asidi-insülin konjugatının vücut iç sıvısındaki serum albuminine spesifik bağlanmasına dayanır. Bu da insülin türevini kan akımındaki absorpsiyon zamanını uzatır ve kandan temizlenme oranını düşürür. Sonuç olarak, kasa uygulanan yağ asidi-açillenmiş insülin, kan şekeriindeki düşme zaman profilini orta süreli etkili konvansiyonel insülin formülasyonlarından (NPH) daha uzamış gösterir.

5.1 İnsülin konjugatlarının sentezi ve saflaştırılması

5.1.1 Glikozillenmiş insülin türevlerinin sentezi ve saflaştırılması

Yapılan bir deneyde, insülin molekülünün PheB1 ve/ veya LysB29 amino grubundan glikozillenmesi, kendileri içinde birleşme eğilimini önleyen insülin türevlerine yol göstermiş ve sonuç olarak subkutan absorpsiyonu hızlandırdığı düşünülmüştür. Bu, LysB29 un monomerin dimerizasyon yapan yüzeyinin kenarında olmasına ve PheB1 rezidüsünün hekzamer yapının dimer-dimer etkileşiminin içinde bulunmasına bağlıdır.

Öncelikle, p-süksinamidofenil (SAPG) glukopiranosid (SAPG) in serbest karboksil grubu karma anhidrid metodu ile aktive ediliyor ve aktif ara ürün insülin ile 3:1 molar oranında, %50 lik kuru dimetil formamid (DMF) içeren ortamda pH=8' de etkileşiyor. Bu şartlar altında, insülinin amino gruplarının relatif reaktiviteleri şu sıra ile azalıyor; GlyA1>LysB29>>PheB1. Halbuki pH= 9,5 ve üzerinde LysB29 un reaktivitesi baskın hale geliyor. PheB1 amino grubunun düşük reaktivitesi, GlyA1 ve/veya LysB29 un t-butiloksikarbonil grubu tarafından (Boc) tersinir korumasıyla gerçekleşmiştir.

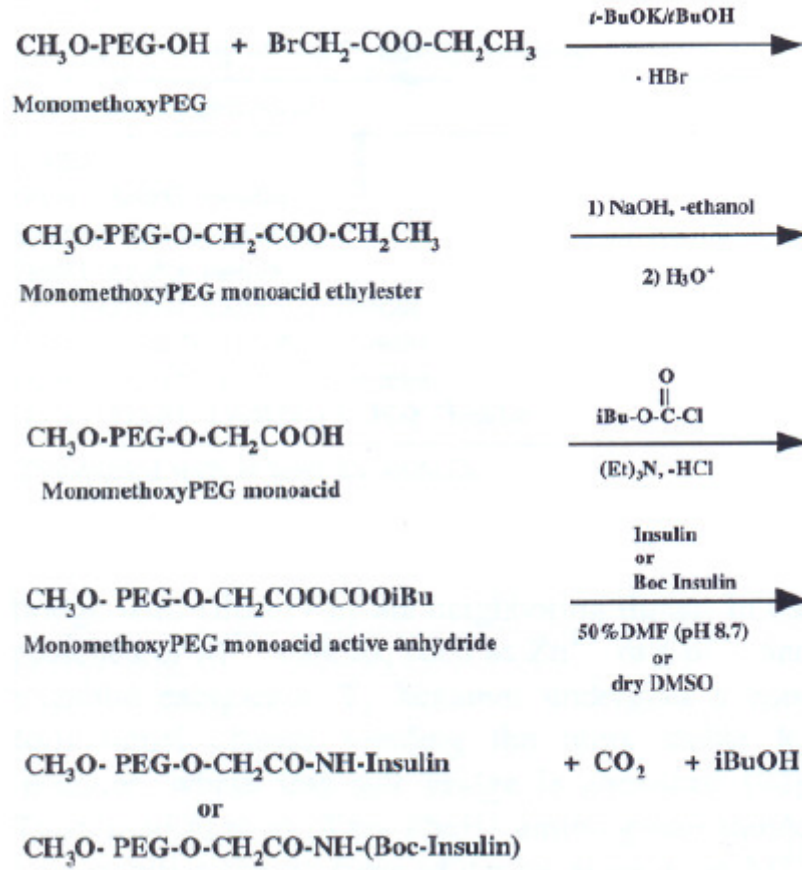


Şekil 5.1 SAPG- insülin türevinin şematik görünümü [3].

İki farklı hidrofilik kısım insülinin GlyA1, PheB1 ve/ veya LysB29 amino gruplarına kovalan bağla bağlanabilir. Bunlar monosakkaridik glikozidlerin karboksil türevleri (glukoz, galaktoz, mannoz ve fruktoz) ve çeşitli molekül ağırlığındaki metoksipolietilen glikollerdir.

mPEG ün monokarboksil türevleri, süksinikanhidrid ile serbest -OH gruplarının reaksiyona sokulmasıyla hazırlanmıştır. Karboksil grubu süksinile mPEG molekülü ile aktif hale geliyor ve insülinin amino gruplarıyla reaksiyona giriyor. Süksinil-mPEG türevlerinde bulunan ester bağı, bu PEG-insülin konjugatlarını kimyasal olarak kararsız kıldığı bulunmuştur. Bunun

üzerine araştırmacılar, mPEG molekülü etil bromoasetat ile alkiliyor ve mPEG ün karboksil türevleri sentezleniyor. Reaksiyona girmemiş mPEG ve arta kalan ürünler, basık su fazından kloroform ve toluen içeren organik faza ekstrakte ediliyor. Bazık fazı asitleştiriliyor ve mPEG ün karboksilik asit ürünü (mPEG-O-CH₂-COOH) kloroforma ekstrakte ediliyor.



Şekil 5.2 mPEG monoasidi ile PEG-insülin konjugatlarının şematik görünümü [3].

5.2 PEG konjugasyonunun insülinin özelliklerine etkisi

İnsülin formülasyonlarının parenteral uygulaması 75 yıldan fazla bir süre önce insülinin bulunuşundan beri insüline-bağımlı diyabetes mellitus (IDDM)'un tedavisinde kullanılan başlıca tedavi olmaya devam etmektedir. Mevcut tedavileri yetersiz kılan unsurlardan çoğu insülin molekülüne özel eksikliklerdir. Çağdaş araştırmacılar, insülinin doğal salgılanmasını yakın şekilde taklit eden ve dolayısıyla diyabetli olanlarda euglycemic duruma ulaşma durumu ihtimalini azamiye çıkaran farmasötik insülin preparatları üretme arayışı boyunca insülinin yapı-işlev ilişkilerini daha da araştırmak için genetik ve protein mühendisliği tekniklerini uygulamaktadır. Özellikle insülin protein ilaçlarına özgü olan zayıf fiziksel ve kimyasal stabilite, proteolize uğrama ihtimalinin artması, bağışıklığın ve antijenliğin artması

ve nispeten kısa plazma yarı-ömrü dahil birçok sorunla karşılaşır [5].

Polietilen glikol (PEG) doğrusal ya da dallanmış nötr bir polieterdir ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$). PEG yüksek derecede suda ve birçok organik çözücünde (örn. metilen klorid, etanol, toluen, aseton ve kloroform) çözünürdür ve çeşitli büyüklüklerde (moleküler ağırlıklarında) ve işlevselleştirilmiş yapılarda (örn: amino-, karboksil-, ve sülfhidril-ekli) mevcuttur. Düşük molekül ağırlıklı (< 1000 Da) PEG'ler, kaynama noktaları 67°C civarında üst sınırlı moleküler ağırlığa orantısal viskoz ve renksiz maddelerdir. PEG'nin zehirli olmadığı bulunmuştur ve ilaçlarda, gıdalarda ve kozmetik ürünlerde kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan PEG'nin moleküler ağırlıkları genellikle birkaç yüz ile 20 000 Da arasında değişmektedir. Bu PEG polimerlerin moleküler ağırlık dağılımı genellikle düşüktür, fakat PEG'nin yaygın olarak kullanılan monometil eterleri daha geniş moleküler ağırlık dağılımı sergilemektedir. Çözeltide PEG aynı zamanda her bir monomerin (etilen oksit biriminin) üç su molekülünü bağlayabildiği yüksek derecede sulandırılmış bir polimerdir. Lim ve Herron adındaki bilim adamları, tek yüzey-bağlı PEG zincirlerinin sudaki davranışının moleküler simülasyonlarını gerçekleştirdi. Bunun sonuçları, polimerin sulu çözeltide büyük ölçüde bölüm esnekliği sergilediğini göstermektedir. Ek olarak, PEG'nin daha gevşek bağlanmış su moleküllerinin birkaç moleküler katmanın yapısını etkileme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular birlikte ele alındığında PEG'nin diğer polimerleri (doğal ve sentetik) sulu ortamlardaki varlığından dışlamada fark edilir biçimde neden daha etkin olduğunu açıklayabilir. Diğer polimerlerin dışlanması, PEG'nin proteinleri reddetme, diğer sentetik polimerlerle iki-aşamalı sistemler oluşturma yeteneğinin arkasındaki başlıca itici güçtür ve bu polimeri hem anti-immünojen ve anti-antijen yapar. PEG bir proteine kovalan bağlandığında, normalde polimerin tercih edilir özelliklerinden birçoğunu sonuçta ortaya çıkan konjugata aktarır. Yukarıda bahsedilen olumlu özelliklerin çoğundan ötürü PEG, protein modifikasyonu için idealdir [5].

Bu birleşme teknolojisi, rekombinant insan proteinlerinin tedavi etkinliğini artırmak için kullanılmıştır çünkü tedavisel protein formülleriyle ilgili birçok sorunu hafifletmektedir. İlk olarak, birçok parenteral uygulanan proteinler retikuloendotel sistem (RES), böbrek, dalak ya da karaciğerle bedenden hızla temizlenmektedir. Ayrıca, bu temizlenme molekül büyüklüğüne, yüküne ve ilgi duyulan proteinler için özel hücresele reseptörlerin bulunmasına bağlıdır. PEG'nin bir proteine eklenmesi moleküler büyüklüğünü, yükünü ve reseptör-bağlayıcılığını etkiler. İkinci olarak, enzimler yoluyla proteinlerin metabolizması tedavisel proteinlerin biyolojik etkinliğinin hızlı kaybına yol açar. Üçüncü olarak, yeniden

kombinasyona giren insan proteinleri dahi tekrar kullanımdan sonra bağışıklık çıkarsamaktadır. Yine tedavisel proteinin immünojenik/ antijenik belirleyicilerini sterik olarak maskelemek yoluyla, PEG-eklenmesi yaygın biçimde antiimmünojenik ve antiantijenik konjugatlarla sonuçlanır. PEGizasyon (polietilenglikolizasyon) yoluyla parental proteinin özelliklerindeki değişikliklerin sonucu neredeyse değişmez biçimde plazma yarı-ömrünü ve proteolitik bozulmaya direnci artırır ve sonuçtaki PEG-protein konjugatının immünojenliğini ve antijenliğini azaltır [5].

İnsülin, üzerinde çalışılmış en yüksek derecede özellikli maddelerden biridir. 1922'deki bulunuşundan bu yana binlerce araştırma makalesi insülin yapısının, işlevinin ve hem krisalin hem de çözelti durumlarındaki özelliklerinin neredeyse her yönünü açıklamıştır. İnsan insülin molekülü iki polipeptid zincirinden (A- ve B- zincirleri) oluşur, A-zinciri 21 amino asitten (A1-A21 olarak gösterilir) oluşur ve daha uzun olan B-zinciri 30 amino asitten (B1-B30) oluşur. Genelde, insülin monomerinde 23 kutupsal kalıntı bulunmaktadır ve hepsi molekülün yüzeyinde uzanmaktadır. Kutupsal olmayan yüzey kalıntıları, insülin monomerinin her iki yüzünde yaygın bölgeler oluşturmaktadır. Bir yüz tamamıyla B-zinciri kalıntılarından oluşmaktadır ve diğer yüz neredeyse tamamen B-zincirinden kalıntılardan oluşmaktadır. Bu iki yüzey mekanik olarak molekülün daha yüksek düzenli durumlara yapılanmasına dahildir [5].

Diğer birçok globüler protein gibi, insülin katlanma ya da kendinden bağlanma mekanizmaları yoluyla üç-boyutlu bir uyum uyarlama eğilimindedir. Ancak, insülinin katlanma ve kendinden bağlanmadaki değişiklikleri birtakım fiziksel ve kimyasal unsurlarla gerçekleştirilebilir. İnsülin aynı zamanda doğrusal toplanmayla (fibrilasyon), akışkan jellerin oluşumuyla ya da özellikle ısıнын etkisi altında çözülemez kalıntıların oluşumuyla sonuçlanan uyum değişiklikleriyle sonuçlanabilir. İnsülinin fiziksel stabilliği, diyabetli hastalar üzerinde uygun insülin dozu rejimleri tasarlama yeteneği üzerinde inanılmaz bir etkiye sahiptir. Çözümeyen insülin lifçiklerinin artan immünojen tepkilerini giderdiği görülmüştür ve biyolojik olarak etkin değildir. Lifçik oluşumunun sonucu olarak, insülin hazırlanmasında birçok istenmeyen özellikler oluşabilir ve bir preparatın istenen ve yeniden üretilebilir farmakolojik etkiler oluşturmaları için lifçiklenmenin engellenmesi gereklidir [5].

İnsülin immünojenliğinin sonucu olarak birçok hasta anti-insülin antikoru üretmektedir. Yüksek düzeylerde anti-insülin IgE antikoru, insülin alerjili diyabetik hastalarda bulunmuştur ve yüksek düzeylerde anti-insülin IgE antikoru, 200 U'dan fazla günlük insülin ihtiyacı olarak tanımlanan insülin direnç sendromuyla bağlantılıdır. Sonuç olarak, insülinin tedavisel etkinliği, bağışıklık kompleksleri biçiminde hastanın dolaşımından hızla

giderilmesi yoluyla karşılanabilir ve tekrarlanan uygulama alerjik ve/veya anafilaktik semptomlara yol açabilir. Ayrıca, rekombinant insan insüliniyle tedavi edilen 500 insülin-bağımlı diyabetik içinde 1'i lokal insülin alerjisi geçirmektedir ve nadir durumlarda (1000'de 1) sistemik alerjik reaksiyonlar meydana gelebilir. Anti-insülinle bağlantılı ek sorunlar antikor-araçlı insülin direncini, bölgesinde lipoatrofiyi, endojen insülin yalıtımının antikor-araçlı bastırılmasını ve mikrovasküler ve makrovasküler hastalıkları içermektedir. Dolayısıyla, yüksek düzeylerde insüline-özel antikorların varlığının mevcut insülin tedavilerini kullanarak glukoz kontrolünü artırmak için herhangi klinik deneme üzerinde ciddi tahrip edici etkisi olabilir [5].

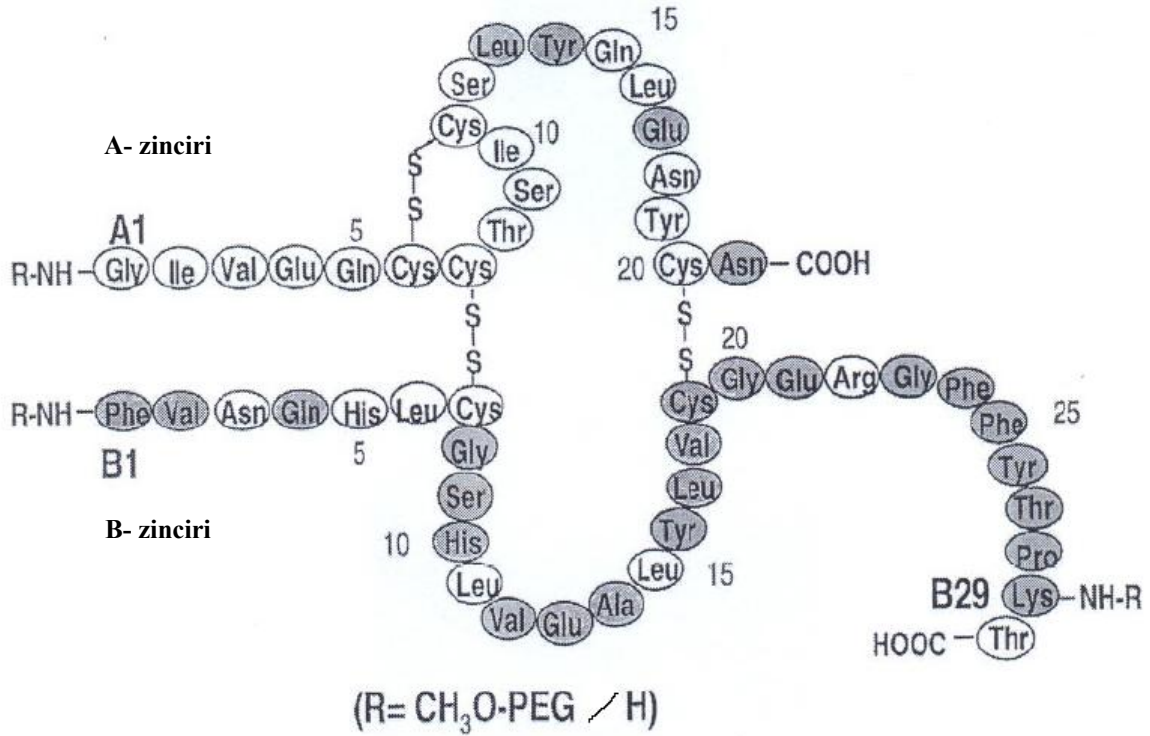
Modern insülin yenileme tedavisinin amacı dozaj biçiminde insülin yalıtımının normal fizyolojik düzenlerini taklit ederek normal kan glukozu düzeylerini normalleştirmektir. Bugüne kadar, literatürde insülin pegilasyonunun bu çok önemli tedavisel proteinin özelliklerini nasıl etkilediğine dair birkaç rapor öne çıkmıştır. Ancak insan insülinine PEG birleşmesinin fizyokimyasal, immunolojik, farmakolojik özellikleri üzerine etkileri üzerinde hiçbir kapsamlı çalışma bildirilmemiştir. Bu gözden geçirmede açıklanan çalışma, geliştirilmiş fizyokimyasal, bağışıklık ve farmakolojik özelliklerde insülin preparatları geliştirme gereksinimiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların nihai amacı insan insülinin özel pegilasyonunun kendisine atfedilen ters etkili özelliklerden herhangi birini birleşmenin etkinliğini olumsuz olarak etkilemeksizin tercih edilir biçimde değiştirip değiştiremeyeceğidir. Bu gözden geçirme bölgeye-özel PEG birleşmenin insülinin fiziksel stabilliği artırmak, immünojenliği ve antijenliği azaltmak ve dolaşım yarı-ömrünü uzatmak üzere kullanımını sergilemektedir. Aşağıdaki konular bundan sonraki bölümde ele alınacaktır: (1) PEG-insülin birleşmelerinin hazırlanması ve farklılaşan moleküler ağırlıklarla ve yer değiştirme alanlarıyla fizyokimyasal açıklanması; (2) birleşmelerin fiziksel stabilliğinin ve in vivo biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesi; (3) birleşmelerin immünojenik (immünojenlik, antijenlik ve alerjenlik) özelliklerinin incelenmesi; (4) seçilen konjugatların farmakodinamik ve farmakokinetik parametrelerinin bir köpek modelinde belirlenmesi [5].

5.2.1 PEG-insülin konjugatlarının hazırlanması ve açıklanması

5.2.1.1 Hazırlama

Bu bölüm laboratuarda yapılmış moleküler ağırlık ve/veya yer alma alanında farklılaşan bir takım PEGile (polietilenglikolize) edilmiş insülin konjugatlarının sentezini, saflaştırılmasını, fizyokimyasal açıklanmasını ve biyolojik etkinliğini açıklamaktadır. Amaç, insan insülinin

fiziksel özelliklerini biyolojik etkinliğini ciddi biçimde değiştirmeksizin geliştirmektir. Şekil 5.3, bu insan insülini molekülünün ve özel değiştirme alanlarının şemasını göstermektedir. İnsülinin üç amino grubu tarihsel olarak transferin, poli-N-vinilpirolidon (PVP), dekstran ve PEG ya da diğer organik küçük moleküller gibi makromoleküllerle birlikte değiştirme alanları olarak kullanılmıştır [5].



Şekil 5.3 İnsan insülininin primer yapısı MA: 5807, pI: 5.3-5.4 [3].

İnsülin metoksi polietilenglikol (mPEG) amino grupların biyoetkinliğini olumsuz etkilemek üzere birleşmesini beklenmiyordu, zira bu kalıntılardan hiçbirinin biyoetkinliği için temel olmadığı biliniyordu. B1 ve B29 pozisyonlarında değiştirilen birleşmeler hazırlanmıştı.

N-metoksi polietilenglikol-insülinlerin hazırlanması di-N-boc-insülin aracını daha önce açıklanan işlemlere göre saflaştırma yoluyla başlamıştır. Kısacası, dimetil sülfoksit trietilamin (DMSO-TEA) karışımı içinde tert.-boc insülin ile reaksiyona sokulmuştur. Ham reaksiyon karışımı diboc-insülin yalıtımından önce kapsamlı bir biçimde dializ ve liyofilize edilmiş. Hazırlayıcı katyon-değiştirici sütunu tutturulmuş hızlı bir protein kromatografi (FPLC) sistemi 7 M üre – 1 M asetik asit mobil fazla dengelenmiş ve çeşitli boc-insülin türlerini gidermek üzere 0.1 ile 0.3 M NaCl gradyanı kullanılmış. Aynı şartlarda Mono S analitik katyon-değiştirme sütunu kullanılarak Diboc-insülinin saflığı değerlendirilmiştir. Diboc-insülinin yüksek derecede saf olduğu bir kere belirlendiğinde PEGizasyon için hazır hale

gelmiştir [5].

750 ya da 2000 Da mPEG-SPA (Shearwater, AL, USA) ile diboc-insülin DMSO-TEA içinde reaksiyona sokularak mPEG(750)-PheB1-insülin (F750) ve mPEG(2000)-PheB1-insülin birleşmeleri hazırlanmıştır. mPEG (750 ya da 2000)-PheB1-diboc-insülin çözeltileri daha sonra kapsamlı biçimde diyaliz ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilmiş ürünün niceliksel korunma kaldırılması 0°C’de %10 anisol içeren trifluoroasetik asit (TFA) ile reaksiyona sokularak elde edilmiştir. Nihayet, birleşmeler yukarıda diboc-insülin için açıklanan aynı kromatografik süreç kullanılarak homojenliğe saflaştırılmıştır [5].

N-metoksipolietilen glikol-insülin (mPEG-LysB29-insülin) birleşmelerinin her ikisi de insülinin yağlı asit asetilasyonu için kullanılan bir yöntemin değiştirilmiş versiyonuna göre sentezlenmiştir. Kısaca, Zn^{+2} -insülin oda sıcaklığında %60 dimetilformamid içinde çözülmüş. Bu pH’da LysB29 amino grubu elektrofilikal etkinleştirilmiş PEG ile reaksiyona en iyi girebilen olmalıydı. NaOH eklenmesi yoluyla reaksiyonunun görünürdeki pH’ını stabil tutarak Zn-insülin çözeltilisine fazlaca mPEG-SPA (750 ya da 2000 Da) eklenmiş. mPEG-insülinin ve türevlerin her iki türünü (PheB1 ve LysB29) yalıtım için aynı yöntemler kullanılmış. Bundan sonraki tüm çalışmalarda konjugatlara aşağıdaki gibi atıfta bulunulacaktır: mPEG(750)-PheB1-insülin için F750; mPEG(2000)-PheB1-insülin için F2000; mPEG(750)-LysB29-insülin için K750 ve mPEG(2000)-LysB29-insülin için K2000 kullanılacaktır [5].

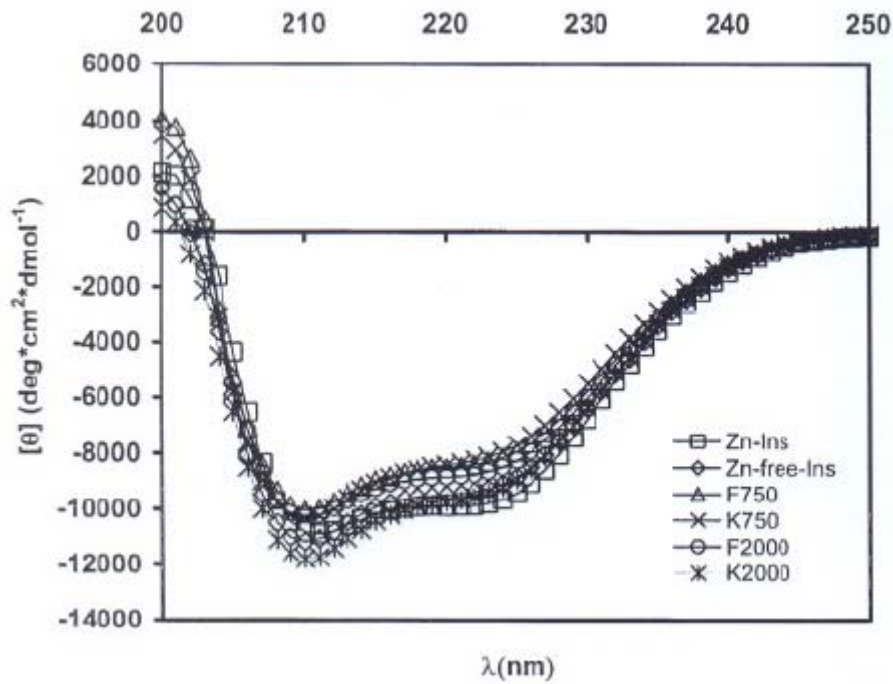
5.2.1.2 Fizikokimyasal açıklama

Her bir konjugatın saflığı, analitik C sütünü tutturulmuş ters-aşamalı yüksek-performans sıvı kromatografi (RP-HPLC) kullanılarak değerlendirilmiş. Tek kromatografik zirvenin varlığı konjugatın saflığının her durumda >%95 olduğunu teyit etmekteymiş. Eklenen mPEG zincirlerinin sayısını ve birleşmenin moleküler ağırlığını belirlemek üzere matriks-destekli lazer dönüşüm iyonlaşması analizi kullanıldı. Monomerik insülinin 5807.2 Da hesaplanmış moleküler ağırlığı bulunmaktadır ve birleşme reaksiyonlarında kullanılan mPEG(750)-SPA ve mPEG(2000)-SPA’nın sayı-ortalama moleküler ağırlıkları sırasıyla 827 ve 2006 Da idi. mPEG(750)-insülin ve mPEG(2000)-insülin birleşmelerinin kitlesel spektrumu açıkça sergilemiştir ki insüline sadece bir mPEG zinciri eklenmiştir. Ayrıca, bireysel iyon zirveleri sürekli olarak 44 Da (bir etilen oksit monomer biriminin moleküler ağırlığı) farklılık göstermiştir. Bu sonuçlar hazırlanan birleşmelerin tamamında sadece bir mPEG zincirin insüline eklendiğini ve çoklu yayılmalarının sadece PEG’ye özel çoklu yayılmadan

kaynaklandığını teyit etmektedir [5].

PEG birleşmesinin alanını belirlemek üzere N-Terminal protein dizini analizi kullanılmıştır. Kombine edilmiş MALDI-TOF kütle spektrometresi ve Edman kademe kaybı sonuçları her bir insülin molekülüne sadece bir mPEG zincirinin eklendiğine ve uygun yer değiştirme alanının yüksek derecede saflıkla elde edildiğine dair belirleyici deliller sağlamaktadır [5].

İnsülinin iki farklı alanda pegilizasyonunun üç boyutlu yapısını nasıl etkilediğine dair yarı-niceliksel anlayış elde etmek için dairesel dikroizm çalışmaları kullanılmıştır. Birçok çalışma insülinin uyumunu incelemek üzere uzak-morötesi aralıkta ölçülen dairesel dikroizm spektroskopisini kullanmıştır. Şekil 5.4, çeşitli konjugatların ve iki kontrol türünün uzak-morötesi CD spektrumlarını göstermektedir. Genelde, insülin spektrumunun ve pegile edilmiş türevlerinin özellikleri benzerdir. Bazı durumlarda spektrumların dikroik yoğunluğunda hafif farklılıklar bulunmaktadır [5].



Şekil 5.4 İnsülin ve pegile edilmiş türevlerinin morötesi UV spektrumu, PBS te 1×10^{-4} M [5].

İnsülin preparatının ortalama bağlantı-durumunun farmakolojik durumunu köklü biçimde etkilediği yaygın olarak bilinmektedir. Sulu insülin çözeltileri dinamik bir dengede birlikte bulunan monomerik, dimerik ve hekzamerik bağlantı karışımları içermektedir. İnsülin preparatlarındaki ortalama bağlantı-durum(lar)ı protein konsantrasyonlarına, sıcaklığa, iyonik güce ve Zn^{+2} , fenol, klorid ya da m-krezol gibi stabilleyici moleküllerin varlığına bağlıdır. İnsülin monomerlerinin ters çevrilebilir kendinden bağlanma sürecine doğrudan katılan iki

kutupsal olmayan (non-polar) yüzeyi bulunmaktadır (ValB12, TyrB16, PheB24, TyrB26 ve ProB28). Hidrofobik taraf zincirlerinin gömülmesi ve PheB24'ten ProB28'e dört karşılıklı monomer hidrojen bağların yaratılması monomeler arasında paralel olmayan B-tabakası oluşumuyla sonuçlanır. İnsülin hegzamerleri, kalıntılarla oluşan yüzeyler arasında hem hidrojen bağlanması hem de hidrofobik karşılıklı etkileşimler yoluyla oluşur. Zn^{+2} iyonlarının eklenmesi tek bir Zn^{+2} iyonunun insülin hegzamerini oluşturan üç dimerin her birinden imidazol grubuyla kompleksleştirilmesi yoluyla insülin hegzamerini daha da stabilize eder. İnsülinin hegzamerik biçiminin biyoaktif olmadığını ve kapiller (damar) endotelyum boyunca sistemli dolaşıma sadece kısmen emildiğini kaydetmek önemlidir. Ayrıca, insülin hegzamerlerin dimerlere ve monomerlere bağlarının çözülmesi preparatın farmakolojik tepkisini doğrudan etkileyen deri-altı emilimine oran-sınırlayıcı engel olarak görülür [5].

İnsülin pegilasyonunun kendi kendine bağlanmasına etkileri üzerine araştırmalar analitik ultrasantrifüj kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dört mPEG-insülin türevi içeren çeşitli insülin preparatlarının bağlanma durumları hakkında daha fazla bilgi edinmek için çökelme dengesi deneyleri kullanılmıştır. Konsantrasyon dağılımını açıklayan veri analizi, doğrusal olmayan en az karesi teknikleri ve analiz programı NONLIN kullanılması suretiyle çeşitli insülin kendinden-bağlanma modellerine nihai emilime karşı yarıçap verileri konularak elde edilmiştir. Bu yazılım eşzamanlı doğrusal olmayan en az kareleri bir ya da daha fazla ultrasantrifüj verilerine aşağıdaki formüle göre bağlar:

$M = dC/dr$ santrifüj hücresi içerisindeki radyal konumunun işlevi olarak çözen konsantrasyon, w açılma hızı, v çözenin kısmi özel hacmi, p çözeltinin yoğunluğu, R gaz sabitesi, T termodinamik sıcaklık, M çözenin moleküler ağırlığı ve r ölçümün santrifüj hücresi içerisindeki radyal konumudur. Kısmi özel hacim (v) insülin için ölçülen değeri temsil edecek şekilde 0.72 ml/g'da stabilenmiştir [5].

Çinko olduğunda, insülin çözeltide öncelikle hegzamerik görünmektedir. Zn^{+2} insülinde veriler bağlantı durumunun dimerik olduğunu belirtmektedir. Çinko olmadığında insülin dimer olarak mevcuttur. Lispro (Lilly, ABD) insülinin iki amino asit kalıntısının (ProB28 ve LysB29) artan biçimde emilimle sonuçlanacak şekilde karşılıklı düzenlendiği dönüşen biçimdir. Beklendiği gibi, Lispro çözeltide daha fazla monomerikti. Bu, Lispro'nun yüksek konsantrasyonlarda fenol, Zn^{+2} ve gliserol gibi stabilize ediciler eklenmeksizin hakim biçimde monomerik olduğunu belirten birçok raporla uyumludur. En sonunda, mPEG insülin türevlerinin hepsi moleküler ağırlıklarına ya da yer alma alanına bakılmaksızın çözeltide dimerik görünmektedir [5].

Kıvrım uygunluklarından kalıntıların, seçilen modelin verileri hassasiyetle açıklayacak şekilde küçük ve sıfır etrafında rastgele dağıtılmış olduğu gözlemlenmiştir. PEG'nin varlığı pegile edilmiş insülin türevlerine kesin bir v değeri atamayı zorlaştırmıştır. Çünkü kontrol numuneleri için elde edilen moleküler ağırlıklar önceden yayınlanmış raporlarla karşılaştırılabilirdi ve birleşmelerin ağırlıkları makuldü, doğal insülinin v değerinin kullanımı, ortalama bağlantı durumu hesaplama ortamında doğrulanmış görünmektedir. Bunun için muhtemel bir açıklama mPEG'in protein üzerinde tesadüfi-folyo eklemesi olarak davrandığı ve v 'yi ciddi biçimde değiştirmedir [5].

5.2.1.3 Fiziksel stabilite

Dört PEG-insülin konjugasyonunun stabilitesini hem Zn^{+2} hem de Zn 'siz insüline karşılık değerlendirmek üzere hızlandırılmış bir sarsıntı testi kullanılmıştır. Bu test literatürde yaygın biçimde insülin preparatının fiziksel stabilitenin hassas bir ölçümünü sağlıyor olarak açıklanmaktadır. Çözeltileri $37^{\circ}C$ 'de yatay çalkalamaya (100 sallama/dk.) tabi tutarak dört insülin birleşmesinin, Zn^{+2} ve Zn 'siz insülinin (kontrol numuneleri) lifçiklenme kinetiği incelenmiştir. Önerilen zaman noktalarında, bireysel örnekler çekilmiştir, (çözümeyen toplamaları yok etmek üzere) filtre edilmiştir ve daha sonra RP-HPLC kullanılarak kalıntı insülin (birleşme) konsantrasyonu için analiz edilmiştir. Başlangıçtaki protein konsantrasyonunun %50'si çözeltide kalıncaya kadar geçen zaman numunelerin fiziksel stabilliğinin göreceli bir ölçümü olarak alınmıştır [5].

F750 ve F2000'in artan lifçiklenme direncinin iki tamamlayıcı etkiden kaynaklandığını önerilmektedir. Biri B-zinciri içindeki N-terminus'un bu yüzeyin hidrofobik karşılıklı etkileşimlere katılmasının önlenmesiyle sonuçlanarak mPEG birleşmesi yoluyla özel sterik engellenmesidir. PheB1-insülinin artan fiziksel stabilliğine katkı sağlayıcı ikinci etki özel ve doğasıyla sterik değildir ve mPEG moleküler ağırlığın artmasıyla yükselir. Hem K750 hem de K2000 lifçiklenmeye artan direnç sergileyerek fiziksel stabilite de artışlar sergilemiştir, fakat birleşmeler PheB1'de yer değişikçe aynı ölçüde olmamıştır. Bu LysB29'un lifçiklenmede bulunan moleküller arası reaksiyonların özel olmayan sterik engellemesi yoluyla herhangi stabilleyici etki olmaksızın lifçiklenme reaksiyonlarına katılma eksikliğiyle açıklanabilir [5].

5.2.1.4 In vivo biyolojik etkinlik

Birleşmelerin in vivo biyolojik etkinliği, sıçan modelinde kan glukozu bastırma denemesi kullanılarak ölçülmüştür. Male Spague-Dawley (SD) sıçanları hayvan tesisinde özel patojensiz şartlarda tutulmuştur. Boyun damarlarına 0.3 U/kg dozunda HumulinR (Lilly) ya

da kojugatları injekte edilmiştir. Kan numuneleri önerilen zaman noktalarında elde edilmiş ve ticari olarak mevcut glukometre kullanılarak glukoz konsantrasyonunda denenmiştir. Ortalama deneysel verilerden kan glukozu düzeyine (BGL) karşı eğriler altındaki süre alanı ve süre belirlenmiştir. Farklılıkların istatistiksel anlamının değerlendirilmesinde, Öğrenci t-testi uygulanmıştır ve anlamlılık için P-değerleri 0.05'e ayarlanmıştır [5].

F750 ve K750 birleşmelerinin intravenöz (i.v.) uygulamadan sonra HumulinR'ye denk biyoetkinlikleri bulunmuştur. Ancak, F2000 ve K2000 kojugatları HumulinR'ninkinden hafifçe düşük biyoetkinlikler taşımaktadır. F2000 ve K2000 kojugatlarının hafifleştirilmiş glukoz baskılandırılması daha geniş polimerin artan sterik engellemesi nedeniyle en muhtemeldir. Beklendiği gibi, farklı yer-değiştirmeli kojugatlar arasında biyoetkinlikte hiçbir farklılık gözlemlenmemiştir çünkü ne PheB1 ne de LysB29 reseptör bağlamaya doğrudan dahil değildir [5].

5.2.2 PEG-insülin birleşmelerinin immünojenik özellikleri

İnsülin diyabetlilere normal olarak injeksiyon yoluyla uygulanır ve bu insülin injeksiyon alanından sistemli dolaşımda bir kere emildiğinde başlıca reseptör-bağlanılı olaylar yoluyla hedef dokulardan temizlenir. Klinik tecrübe birçok insüline bağımlı diyabet hastasının çoğu IgC ve IgE alt sınıflarında anti-insülin antikorı ürettiğini göstermiştir. Yüksek düzeylerde anti-insülin IgE ve IgG antikorları insüline alerjik ve insülin direnç sendromlu diyabetli hastalarda yaygın biçimde bulunmaktadır. Sonuç olarak, farmasötik insülin preparatlarının tedavisel etkinliği hastanın dolaşımından immün kompleksleri biçiminde hızla giderilmeleriyle karşı etkiye girebilir ve tekrar edilen uygulama alerjik ve/veya anafilaktik semptomlara yol açabilir [5].

mPEG-insülin kojugatlarının iki tür faredeki immünojenik özellikleri incelenmiştir: A/J (insüline düşük cevap vericiler) ve C57BL/10ScSn (insüline yüksek cevap vericiler). Farklı yer değiştirme alanlı kojugatların hümmoral bağışıklığı, hüccresel bağışıklığı, antijenliği ve alerjenliği ve ekli mPEG'nin moleküler ağırlıkları değiştirilmemiş yeniden kombine edilmiş insan insülininkilerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar anlamında herhangi bir karışıklığı önlemek için immünojenlik, antijenin ya da alerjenin ilgili bağışıklık tepkisini harekete geçirme in vivo yeterliliği olarak tanımlanmıştır. Benzer biçimde, bu belgenin içeriğinde, antijenlik bir antijenin dolaşım içindeki antikorlara bağlanması olarak tanımlanmıştır. Son olarak, alerjenlik bir alerjenin in vivo olarak homolog reajinik antikorlarla kombine olma, dolayısıyla sistematik anafilaksi ya da doğrudan cilt testlerinde lokal-cilt reaksiyonları

başlatma yeterliliği olarak tanımlanmıştır [5].

Burada, konjugatların immünolojik özellikleriyle yer değiştirmenin farklı alanlarını ve çeşitli büyüklükleriyle ve düşük-moleküler ağırlık mPEG'nin çeşitli büyüklüklerini rekombinant insan insülinininkiyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada sadece bir mPEG zinciri/ insülin monomeriyle türevler kullanılmıştır çünkü iki ya da üç mPEG zinciri/ insülin monomeri içeren konjugatların biyolojik etkinliklerini ciddi biçimde azalttığı ve dolayısıyla daha ayrıntılı çalışma için klinik olarak ilgili aday kabul edilmediği daha önceden bulunmuştur. Bunun gibi, bu çalışmada sadece iki düşük moleküler ağırlık mPEG-insülin konjugatı kullanılmıştır çünkü daha yüksek-moleküler-ağırlık mPEG (5000 Da) eklenmesinin ciddi biçimde konjugatın biyolojik etkinliğini bastırdığı bulunmuştur [5].

Öznelerin insüline ya da PEG-insülin immünojenitesine immünolojik tepkisini belirlemek üzere dört deneysel sonlanım-noktası gözlenmiştir. İlk olarak, insülinin hümmoral immünojenliği üzerine alana özel pegilasyon etkisi bağışıklık sağlanmış fare serumlarında antijene-özel antikor (IgC ve IgE) miktarının ölçülmesiyle doğrulanmıştır. İkinci olarak, insülin pegilasyonunun insülinin anti-insülin IgC antikorlarıyla ile karşılıklı etkileşime girme yeteneği (antijenite) üzerindeki etkisi insülin ya da pegile edilmiş türevleri kullanılarak enzimle bağlantılı inceleme (ELISA) ölçümleriyle değerlendirilmiştir. Üçüncü olarak, insülin pegilasyonunun geciktirilmiş- tip aşırı duyarlılık reaksiyonları (hüccresel bağışıklık sağlayıcılık) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Son olarak, pegilasyonun lokal alerjiyi ve sistemli anaflaksisi içeren anlık-tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına etkisini belirlemek üzere Profesör Blanka Rihova'nın gözetiminde Prag'da Çek Bilimler Akademisi'nde Mikrobiyoloji Enstitüsü'ndeki laboratuvarlarında pasif bir derisel anaflaksis testi kullanılmıştır. G600 haricinde bu birleşmelerin hepsi önceki bölümde tavsiye edildiği gibi hazırlanmıştır [5].

5.2.2.1 Hümmoral immünojenite ve antijenlik

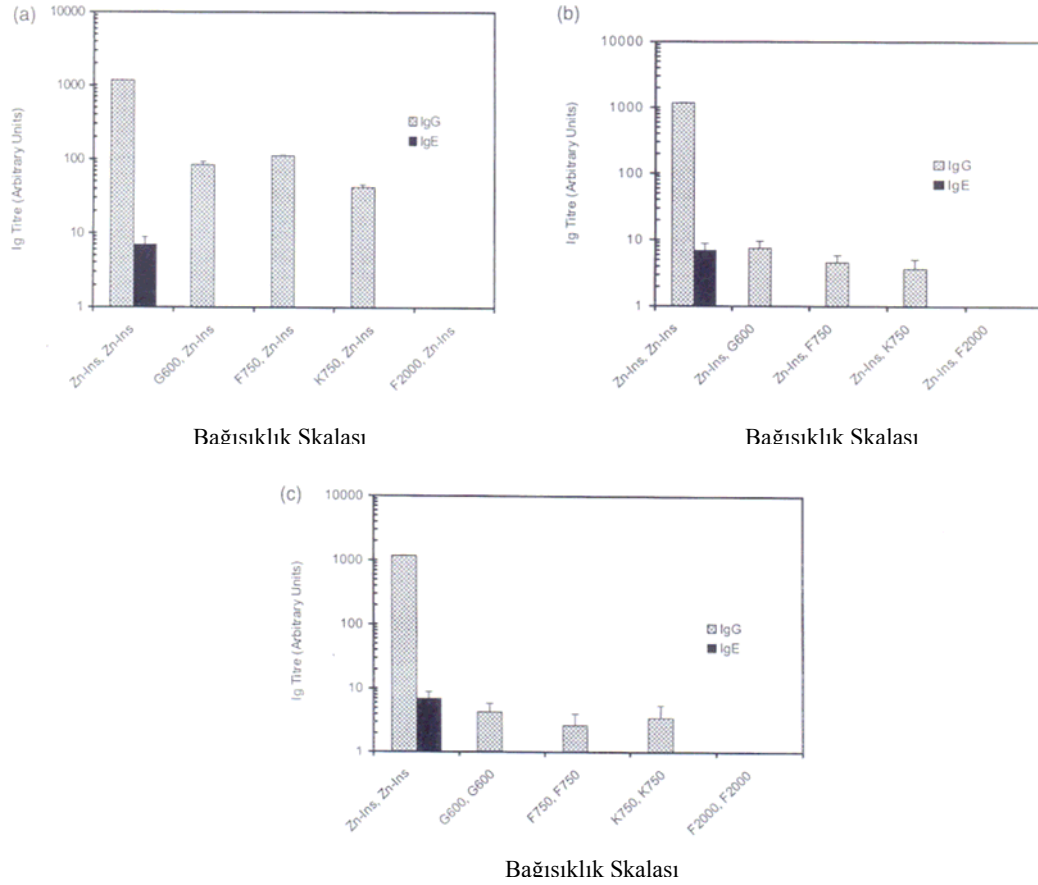
Deneysel fare grupları seçilmiştir ve kontrol olarak bağışıklık sağlamadan önce 100 µl kan alınmıştır. Antikorların ön bağışıklık sağlama düzeyleri temel olarak alınmıştır ve daha sonra test edilen tüm serumlardan çıkarılmıştır. 5 µg numune/fare/bağışıklık sağlama dozunda ilk bağışıklılaştırma (hayvanların immünojeniteye tepkisini artırmak üzere) periton boşluğu içine alum kalıntısı olarak verilmiştir. İkinci doz 3 hafta sonra verilmiştir ve 12 gün sonra fareler kan kaybetmiştir. İnsüline özel IgC ve IgE antikorlarının süzeyleri ELISA dolaylı çift katman yöntemiyle ölçülmüştür.

Konjugatların herhangi biriyle bağışıklılandırılmış farelerin tamamında hem rekombinant

insülin (Zn^{+2} -Ins) hem de mukabil PEG-insülin birleşmeleri (G600, F750, K750, F2000) ELISA testlerinde ayırıcı antijenler olarak kullanılmıştır. Ancak (farelerin Zn^{+2} -Insülin ile iki defa bağışıklandırıldığı durum haricinde) bu örneklerin hepsinde, ölçülebilir düzeyde hiçbir antikor ölçülmemiştir. Bu nedenle, bu bölümde sunulan verilerin hepsi (antijenisite verileri hariç) rekombinant insülin kullanılarak ayırt edilen insüline-özel IgC ve IgE antikorlarına atıfta bulunmaktadır.

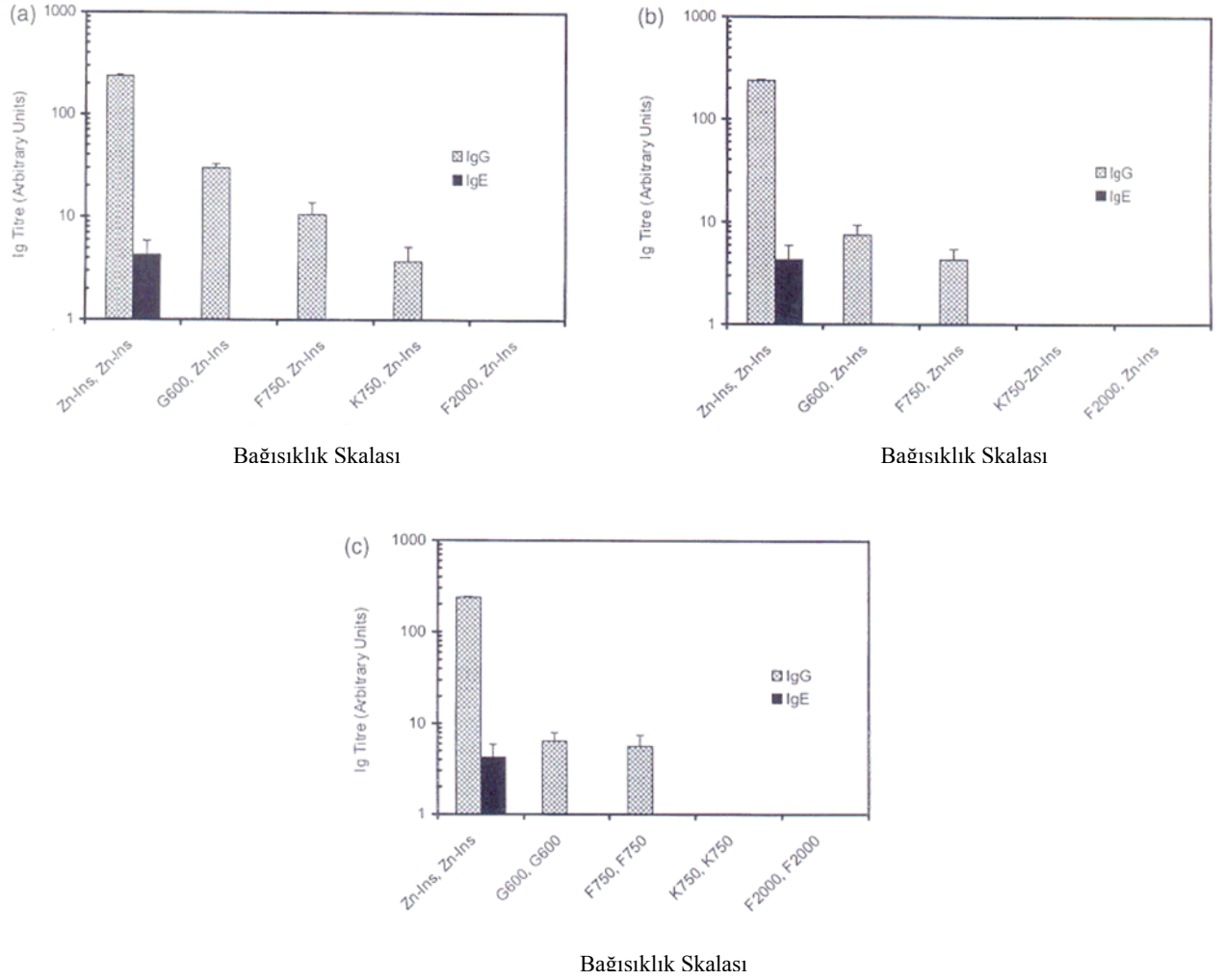
Son bağışıklılaştırmadan sonra 12 gün süreyle test ettiğimiz her iki türde farede de, sadece rekombinant insan insüliniyle bağışıklılaştırılmış farelerde en yüksek düzeyde insüline-özel IgC ve IgE antikorları bulunmuştur. Anlamlı biçimde, en az bir defa F2000 ile bağışıklılaştırılmış farelerde hiçbir insüline özel IgG ya da IgE antikor tepkisi gözlemlenmemiştir.

C57 farelerinde (yüksek insülin cevap vericileri), sadece rekombinant insülin ile bağışıklılaştırılmış deneysel grup, incelenen başka gruplara göre 14 ile 315 defa daha fazla insüline özel IgC antikorlar üretmiştir (Şekil 5.5 a-c). C57 farelerinde, insülin ardından birleşme (G600, F750, K750, F2000) ile bağışıklılaştırılmış gruplarda ters sırayla bağışıklılandırılmış gruplara göre en az 10 defa daha fazla insüline-özel IgC antikor vardır. Ayrıca, tamamıyla farklı yer değiştirme (A-zinciri N-termin, B-zinciri N-termin ve B-zinciri C-termin) alanlarına sahip düşük-molekül ağırlık (600 ya da 750 Da mPEG) konjugatların bağışıklılığında hiçbir ciddi farklılık bulunmamaktadır. C57 farelerde bulunan dolaşan insüline-özel IgE antikorlarının ölçülebilir düzeyleri rekombinant insülinle münhasıran bağışıklılandırılmıştır [5].



Şekil 5.5 a-c. C57BL/ 10 farelerinde 0 ve 3. haftanın immünojenizasyonunun sonunda insülin spesifik antikorların seviyeleri [5].

A/J farelerde (düşük insülin cevap vericiler), sadece rekombinant insülin ile bağışıklaştırılmış deneysel grup incelenen başka gruplara göre 8 ile 64 defa daha fazla insüline özel IgC antikorları üretmiştir (Şekil 5.6 a-c). Her ne kadar farklılıklar C57 farelerinde bulunanlar kadar farklı olmasa da insülin ve ardından da birleşmeyle bağışıklaştırılmış A/J fareleri her zaman ters düzende bağışıklaştırılmış farelere göre daha yüksek çözelti konsantrasyonu üretmiştir. Her ne kadar bu farklılıklar ciddi olmasa da düşük molekül ağırlık mPEG-insülin birleşmeleriyle PEG-yer değiştirmenin farklı alanları arasında farklılıklar mevcuttur [5].



Şekil 5.6 a-c. A/J farelerinde 0 ve 3. haftanın immünojenizasyonunun sonunda insülin spesifik antikorların seviyeleri [5].

Genelde, insan insülinin pegilasyonunun yer değiştirme alanına ya da eklenmiş mPEG moleküler ağırlığına bakılmaksızın dolaşan insüline özel IgC antikorlarında miktarında 10-1000 defa azalmayla sonuçlandığı bulunmuştur. Bu bulgular, diğer gruplarıkiyle tam uyumluluk içerisinde. Aynı zamanda, rekombinant insan insülinin pegilasyonu, ölçülen test serumlarında fark edilebilir IgE antikor tepkisinin giderilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu sonuçların her ikisi de insan insülinin pegilasyonunun birleşmenin bağışıklık sağlamanın özel olmayan azalmasıyla sonuçlandığı olgusunu desteklemektedir. Tüm bu sonuçlar pegilasyonun protein antijenlerinin immünojenliğinin üzerine etkilerini inceleyen diğer grupların bulgularıyla desteklenmektedir ve artan miktarlarda konjugatların daha az değiştirilmiş ya da değiştirilmemiş karşılıklarına göre daha düşük immünojenlik sergilediğini bulmuştur.

PEG-insülin konjugatlarının modifiye edilmemiş insüline göreceli antijenliğini ölçmek için

sadece rekombinant insülin ile bağışıklaştırılmış farelerde anti-insülin IgC antikor miktarlarını nicelikselleştirmek üzere kullanılan ELISA testlerinde ayırıcı antijenler olarak konjugatların (G600, F750, K750, F2000) hepsi ve Zn-Ins kullanılmıştır. Bu deneylerin sonuçları Çizelge 5.3'te verilmiştir ve insüline PEG eklenmesinin birleşmelerin anti-insülin IgC antikorlarına bağlanma yeteneğini köklü biçimde azalttığını açıkça göstermektedir [5].

Antigen	IgG titer	Relative antigenicity ^a (%)
A/J mice		
Zn-Ins	1176.3±13.93	100
G600	5.66±2.64	0.48
F750	2.14±1.41	0.18
K750	4.0±1.52	0.34
F2000	0	0.0
C57BL/10 mice		
Zn-Ins	238.86±4.92	100
G600	3.73±1.87	1.56
F750	2.83±1.41	1.18
K750	2.30±1.52	0.96
F2000	0	0.0

Çizelge 5.1 A/J ve C57BL/10 farelerinde insülin (PEG- insülin) in antijenliği [5].

B hücresi epitopları ya da antijenik belirleyiciler, antikorların bağlandığı antijen molekülü üzerindeki bölgelerdir ve genellikle protein antijenlerinin yüzeyinde bulunur. Protein antijenleri üzerindeki B hücresi epitopları 20'ye kadar amino asit içeren çeşitli büyüklüklerdedir. Protein antijenlerine karşı özel antikorların üretimi uyumsal olarak farklı bölgelerin tanınması yoluyla olur. PEG-insülin konjugatlarıyla bağışıklaştırılmış farelerde azalan sayıda dolaşan antikorların bir ya da daha fazla insülinin B hücresi tanınması epitoplarının polimer tarafından özel olmayan 'maskelenme'sinden kaynaklanıyor olabileceği çıkarılabilir. Dolayısıyla, moleküler ağırlıkta ya da insüline eklenmiş PEG zincirlerinin sayısındaki artışın bu çalışmada görüldüğü gibi sterik 'maskeleme' etkisi ile sonuçlanacağı beklenebilir [5].

Konjugatların hümmoral immünojenitesinin en yüksekten en düşüğe niceliksek sıralaması şöyledir: G600>F750=K750>>F2000. Elde edilen sonuçlardan ekli mPEG'nin konjugatının moleküler ağırlığı ile hümmoral immünojenitesinin arasında doğrudan bir korelasyon olduğu görülmektedir. Ekli mPEG miktarı 2000 Da'ya (F2000) yaklaştığında, konjugatın

immünojenitesi tamamıyla yoktur (örn. belirlenemez). Kabaca 2000 Da'lık mPEG ekli / insülin monomeri eşiğinin bir konjugatın bağışıklık tepkilerini gidermek ya da anti-insülin antikorları tarafından burada test edilen hayvan modellerinde tanınmak için gerekli olduğunu vurgulanıyor. Bu vurgulama PEG-protein konjugatlarının immünojen etkilerinin diğer analizleriyle desteklenmektedir. Bu gruplar aynı zamanda asgari miktarda PEG gereksiniminin konjugatın immünojen olmayan ve antijenik olmayan hale getirilmesi için proteine ikiye katlanmasının gerektiğini bulmuştur. Aksine, bir konjugatın yer değiştirme alanıyla immünojenitesi/ antijenliği arasında herhangi ilişki gözlemlenmemiştir [5].

5.2.2.2 Hücresel immünojenite

İnsülinin ve pegile edilmiş türevlerinin hücresel bağışıklık sağlayıcılığı farelerde gecikmeli türde aşırı duyarlılık (DTH) reaksiyonlarının neden olduğu arka ayak desteği şişmesinin ölçülmesiyle incelenmiştir. Gecikmeli-tür terimi tip IV aşırı duyarlılığıyla bağlantılı gecikmeli deri reaksiyonlarını içerir ve bağışıklık yönünden özel enflamatuvar reaksiyon olarak tanımlanır. İnsülin ile son bağışıklılaştırmadan sonraki ondördüncü günde, DTH tepkisi arka ayak desteği şişme testiyle değerlendirildi. Bu inceleme kemirgenlerde DTH'ı belirlemek için yaygın biçimde kullanılmakta ve DTH reaksiyonlarının büyük ölçüde sergilenmesini ölçmektedir.

Antijene özel IgC ve IgE deneylerinde görüldüğü gibi, F2000 ile bağışıklandırılmış farelerin hiçbirinde hiçbir DTH reaksiyonu yoktur. En anlamlı DTH tepkisi sadece Zn^{+2} -İnsülin ile bağışıklandırılmış hayvanlarda ölçülmüştür, fakat mPEG-insülin türevlerinden (G600, F750, K750, F2000) biriyle bağışıklılaştırma öncesinde rekombinant insülin ile bağışıklandırılmış hayvanlarda düşük tepkiler de gözlemlenmiştir. Fareler konjugatların biriyle bağışıklılaştırıldığında sonraki bağışıklılaştırmalarda kullanılan antijen türüne bakılmaksızın hiçbir ölçülebilir DTH reaksiyonu meydana gelmemiştir. Dolayısıyla rekombinant insülin, deri içine injekte edilmiş tek antijendir.

Çünkü DTH, T hücre-araçlı olaydır, bu deneylerin sonuçları rekombinant insülin ile pegile edilmiş türevlerinin ya tanınma, ya hücreler arası olarak işleminden geçirilme ya da antijene özel T hücrelerine sunulma biçimi arasında farklılıklar olması gerektiğini önermektedir. Her ne kadar mPEG-insülin konjugatlarının DTH tepkilerini harekete geçirmede bilinmektedir ve pegilasyonun insülinin T hücresi epitoplarından bir ya da daha fazlasını 'maskeleyebileceği' ve dolayısıyla hücresel bağışıklık sisteminde normal olarak tanınmasını önlediği sonucuna varabilmektedir. Etkilerin özel olmadığına inanılmaktadır çünkü

konjugatlarla bağışıklandırılmış farelerle hiçbir gözlemlenebilir farklılık bulunmamaktadır. Ayak desteği testinin, her ne kadar kemirgenlerde DTH tepkilerini bulmada yaygın biçimde kullanılsa da, hassasiyet ve nesnellik eksikliği nedeniyle makul biçimde eleştirilebileceği kabul edilmektedir [5].

5.2.2.3 Alerjenlik

PCA, tip I anlık aşırı duyarlılığı yöneten homositotrofik antikorların deri arasına injekte edilmesi yoluyla duyarlılaştırılmış bir hayvandan önceden duyarlılığı alınmış bir bireye in vivo pasif transferini içeren bir cilt testidir (örn: bireyde IgE). İnjesiyondan sonra, bu antikorlar Fc reseptörleri üzerinden besleme hücrelere çapalanır. Bunu Evan's Blue gibi boyayla karıştırılmış antijenin intravenöz injeksiyonu izler. Hücre-karıştırılmış antikor reseptörlerin injekte edilmiş antijen yoluyla çapraz bağlanması histamin ve diğer farmakolojik araçların serbest bırakıldığı tip I aşırı duyarlılık reaksiyonunu harekete geçirir. Damar geçirgenliği unsurları plazmanın ve boyanın kaliperlerle ölçülebilecek mavi bir alan oluşturarak damar dışı alana sızmasına izin verecek şekilde damarlar üzerinde hareket eder [5].

İnsülin ya da mPEG-modifiye insüline özel reajenik (IgE) antikorlarının varlığını teyit etmek için, temsil edici numuneler aynı zamanda PCA testine tabi tutulmuştur. İnsüline özel IgE ELISA'da pozitif olan serumlar aynı zamanda hafifçe pozitif PCA sonuçları sergilemiştir. IgE ELISA testlerinde negatif ya da çok düşük pozitif tepkileri olan diğer tüm serumlar da aynı zamanda PCA testinde negatif çıkmıştır [5].

IgE'nin hayvan modellerinin yanı sıra insanlarda antijene tepki olarak anlık aşırı duyarlılık aracılığı yapmada önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Anlık türün alerjik reaksiyonları, besleme hücrelerine ve bazofillere stabillenmiş IgE antikorlarını çapraz bağlama yetenekleri adına çok değerli alerjenler yoluyla başlatılır. Pegile edilmiş alerjenlerin (insülin gibi) klinik ortamda etkin biçimde kullanılması için sadece devam eden IgE tepkisini bastırmaları değil fakat aynı zamanda IgE antikorlarını çapraz bağlama ve istenmeyen alerjik reaksiyonlarını giderme yeteneğini bastırmaları arzu edilir[5].

İnsüline IgE tepkilerinin giderilmesi burada değerlendirilen örneklerin hepsinde elde edilmiştir. İncelenen her iki modelden PCA reaksiyonları sergileyen fareler sadece rekombinant insülin (Zn-Ins) ile münhasıran bağışıklaştırılmış donör farelerden serum alan hayvanlardı. Dolayısıyla rekombinant insan insülininin incelenen ekleme alanlarının herhangi birinde pegilasyonunun alerjik-olmayan ve anlık-türde aşırı duyarlılık reaksiyonlarını

gidermeyen konjugatlar ürettiği görülmektedir. Bu bulgular pegile edilmiş ovalbuminin alerjenliğini inceleyen başka bir grubunkıyla büyük ölçüde aynı çizgidedir ve her ne kadar doğal protein güçlü PCA reaksiyonlarını teşvik ettiyse de PEG-modifiye ovalbuminin ciddi PCA reaksiyonlarını gidermede başarısız olduğunu bulmuştur. Mevcut çalışmanın sonuçları teşvik edicidir çünkü mPEG-insülin konjugatlarının insülin alerjileri ya da yüksek düzeyde dolaşan büyük dozlarda IgE antikorları bulunan hastalara sistemli anafilaktik reaksiyonlar salıvermeden uygulanabileceğini önermektedir[5].

Mevcut çalışma aynı zamanda mPEG ile modifiye edilmiş insan insülininin bağışıklık sağlayıcılığını (hümmoral ve hüccresel), antijenliğini ve alerjenliğini ölçmeye teşebbüs etmiştir. Başlangıçtaki varsayım, farklı yer değıştirme alanları olan konjugatların bağışıklılık özellikleri arasında farklılıkların gözlemlenebileceğiydi. Ancak bu çalışmaların sonuçları göstermektedir ki mPEG-birleşmesinin insülinin bağışıklık özellikleri üzerindeki etkileri doğası itibarıyla özel değildir. Bu çıkarsamanın incelediğimiz deneysel uç noktalarının hepsinde doğru olduğu görülmüştür. mPEG insülin türevlerinin hümmoral (dolaşan IgG ve IgE düzeyleri) ve hüccresel (DTH reaksiyonu) bağışıklık sağlayıcılığını açıklamak için yapılan deneylerde, konjugasyonlar arasında hiçbir anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Bunun yanı sıra, birleşmeler arasında anti-insülin IgC antikorlarıyla karşılıklı etkileşime girme yeteneklerinde hiçbir ciddi farklılık gözlemlenmemiştir. Bunun gibi, mPEG-değıştirmenin insülinin alerjenliği (PCA) üzerindeki etkileri incelendiğinde tüm birleşmeler için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla, insan insülininin alana-özel pegilasyonunun birleşmelerin farklı bağışıklık özellikleriyle sonuçlanacağına dair asıl varsayımın doğru olmadığı görülmüştür[5].

Çünkü protein antijenleri genellikle hem B hüccresine hem de T hüccresi epitoplarna sahiptir, bu çalışmaların sonuçlarından görünmektedir ki insüline düşük-moleküler-ağırlık mPEG'nin (600-2000 Da) her iki tür epitopu özel olmayan biçimde 'maskelemeye' hizmet edebilir. Ayrıca, hümmoral (B hüccresi-araçlı) bağışıklık sağlayıcılığı ve antijenliği değerdendiren çalışmalarda bir takım moleküler ağırlık-bağımlılığı gözlemlenmiştir fakat birleşmelerin ya hüccresel (T hüccresi araçlı) bağışıklık sağlayıcılığı ya da alerjenliği özellikli deneylerde böylesi hiçbir ağırlık gözlemlenmemiştir. Bu insülinin alansal olarak ayrıştırılmış iki ya da daha fazla B hüccresi epitopu içerebileceğini ve bu epitopların mPEG yoluyla etkin maskelenmesinin polimerin büyüklük olarak 2000 Da olmasını gerektirdiğini önermektedir [5].

Dolaşan anti insülinin iki klinik görünümü, postprandial hiperglisemi ve uzatılmış hiperglisemi dönemleridir. Ayrıca insülin preparatının bağışıklık sağlayıcılığının ve

alerjenliğinin bu preparatın tedavisel etkinliğini artırmada önemli bir unsur olduğu açıktır. Bu sonuçlar, her ne kadar mekanik özellikte olsa da, rekombinant insan insülininin pegilasyonunun bu önemli tedavisel proteinin bağışıklık sağlayıcı özelliklerini güvenli, zehirli olmayan ve önceden ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bir yolla etkinlikle bastırdığını ima etmektedir. Son olarak, burada incelenen PEG-insülin konjugatları aşırı düşük antijenlikleri nedeniyle diyabet hastalarında güvenle kullanılabilir [5].

5.2.3 PEG-insülin konjugatlarının farmakolojik özellikleri

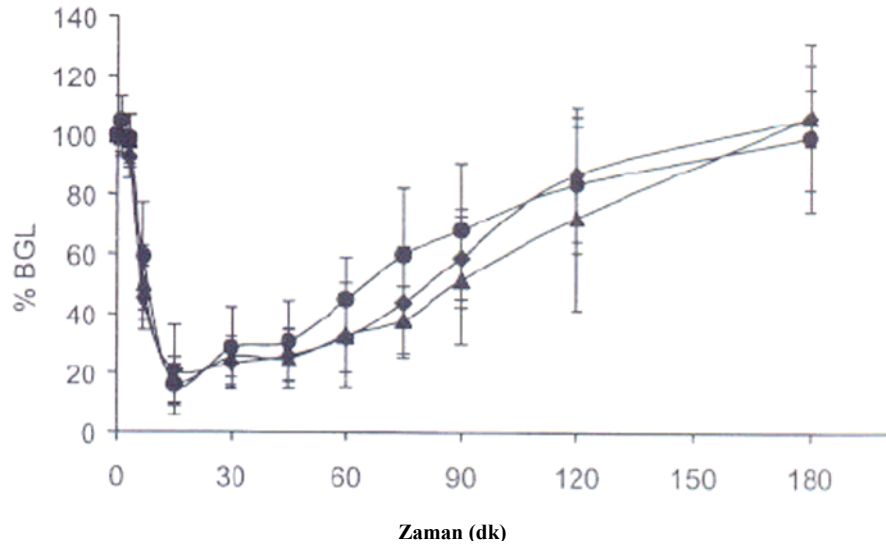
Hem intravenöz hem de deri altı yollarla erkek av köpeklerine iki PEG-insülin birleşmesi (F750 ve F2000) injekte edilmiştir ve biyolojik etkinlikleri ve farmakokinetik parametreleri Lilly'nin olağan insan insülin formülasyonu HumulinR (Hum) ile karşılaştırılmıştır. Modelden-bağımsız bölümsüz yöntemler insülin preparatlarının farmakokinetik parametrelerini hesaplamak için yaygın biçimde kullanılmaktadır ve bu çalışmada aynı zamanda insülinin farmakolojik özellikleriyle pegile edilmiş türevlerinden ikisini karşılaştırmak için bu yaklaşım kullanılmıştır. İnsülinin kalıntı PheB1'de 750 ya da 2000 Da mPEG ile değiştirilmesinden kaynaklanan bazı farmakokinetik (PK) ve farmakodinamik (PD) parametrelerdeki değişiklikleri değerlendirmek için kronik köpek modeli kullanılmıştır. Sağlıklı av köpekleri (13-18 kg) Hayvan Kaynak Merkezi'nde tutulmuş ve en az 2 hafta boyunca tedavi uygulanmıştır [5].

İnsülin (konjugatı) injeksiyonundan önce insülinin (konjugatı), kanin c-peptidinin ve glukozun bazal düzeylerini belirlemek üzere kan numuneleri alınmıştır. İnsülin preparatlarının biyolojik varlığını değerlendirmek için i.v. injeksiyon yoluyla Hum, F750 ve F2000 preparatları (0.3 U/kg) uygulanmıştır. Üç insülin preparatı (0.3 U/kg) da deri altı depodan emilme özelliklerini incelemek üzere köpeklerin boynuna injekte edilmiştir. İnsülin, glukoz ve c-peptid içeriği için serum numuneleri aşağıda açıklanan yöntemlere göre analiz edilmiştir.

5.2.3.1 Biyolojik etkinlik ve farmakodinamik parametreler

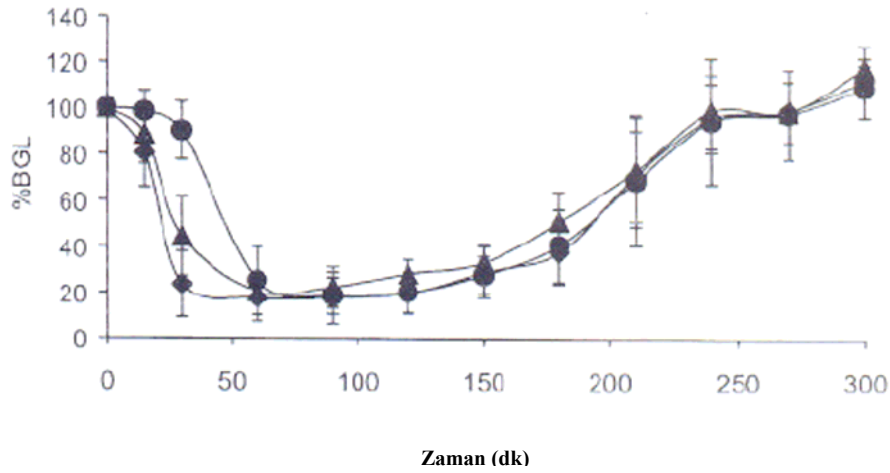
Tedavi edilen hastalardan elde edilen serum numuneleri glukoz konsantrasyonu için dondurmadan önce incelenmiştir. İnsülin türevlerinin damar içi uygulamadan sonraki kan glukozu bastırma yeterliliği Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Bu çizim köpeklere damar içi injeksiyondan sonra doğal insülin ile pegile edilmiş türevleri arasında düşürme yeteneği arasında ufak farklılıklar olduğunu göstermiştir. Eylemin başlangıcı (kan glukozunun düşürülmesi) ve HumulinR (Hum), F750 ve F2000 için hareket süresi benzerdir. Bu insülin türevlerinin damar için uygulamasından sonra köpeklerin glukoz düzeyleri yaklaşık 3 saat

içerisinde başlangıç düzeylerine geri dönmüştür [5].



Şekil 5.7 Erkek köpeklere i.v. 0.3U/ kg HumulinR (◆) ve ya F750(▲) veya F2000(●) injeksiyonundan sonra kandaki şeker düzeyleri[5].

0.3 U/kg deri altı injeksiyonundan sonra Hum, F750 ve F2000'in kan glukozu düşürme etkileri Şekil 5.8'de gösterilmiştir. Bu verilerden çıkarılabilecek ana sonuçlar insülinin kalıntı B1'de pegilasyonunun incelenen hayvan modelinde glukoz bastırmanın daha yavaş başlangıcıyla sonuçlanmasıdır. Daha yüksek moleküler ağırlık birleşmesi (F2000) kan glukozu düzeylerini artırmak için en uzun süreye gerek duyulmuştur. Tam eylem için başlangıçtaki bekleme süresinden sonra, biyolojik etkinlik (kan glukozunu düşürebilme yeteneği) süresi üç insülin türevi arasında karşılaştırılabilir. Dolayısıyla, konjugatlar ve rekombinant insülin sistemli dolaşıma ulaştığında benzer biçimde davranmaktadır [5].



Şekil 5.8 Erkek köpeklere s.c. 0.3U/ kg HumulinR (◆) ve ya F750(▲) veya F2000(●) enjeksiyonundan sonra kandaki şeker düzeyleri [5].

Trapezoidal yöntemle BGL'e karşı AUC değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamın değerlendirilmesi için, iki-kuyruklu Öğrenci t-testi kullanılmıştır ve $P < 0.05$ iken orta değerler istatistiksel olarak farklı kabul edilmiştir.

Damar içi ya da deri altı uygulamadan sonra üç türev için kan glukozu bastırma eğrileri (AUC) altındaki alan hesaplandığında, F750, F2000 ve Hum'un aynı biyolojik etkiyi ($\pm 10\%$) ortaya çıkardığını bulunmuştur. Kaydedilir biçimde Hum, F750 ve F2000'in biyolojik etkinliklerindeki farklılıklar istatistiksel olarak birbirinden ayırt edilemez; bu nedenle tüm damar için ve deri altı uygulamalar ölçüm hatalarıyla birlikte biyolojik olarak eşit kabul edilir. İnsan insülininin pegilasyonu deri altı uygulamadan sonra biyolojik etkinliğe (glukoz bastırma) olan süreyi değiştirmiştir [5].

Her iki mPEG-insülin konjugatı ile rekombinant insan insülini arasında bulunan eşit biyolojik etkinlikler benzer PEG-insülin konjugatları inceleyen başka bir grubun bulgularıyla uyumludur. Bu yazarlar aynı zamanda konum PeB1'e PEG ile yerleştirilen konjugatların damar içi uygulamadan sonra eşit olarak hayvanların kan glukozu düzeylerini düşürmeye yeterli oldukları bulunmuştur. İki bağımsız araştırma grubunun farklı hayvan modellerinde aynı sonuçlarla ortaya çıkması düşük-moleküler-ağırlık PEG'nin insüline kalıntı PheB1'den konjugasyonunun in vivo biyolojik etkinliğini tersi biçimde etkilemediğini önermektedir [5].

5.2.3.2 Farmakokinetik parametreler

İnsülinin serum konsantrasyonlarını ve endojen insülin ayrıştırmasını ölçmek için ticari olarak

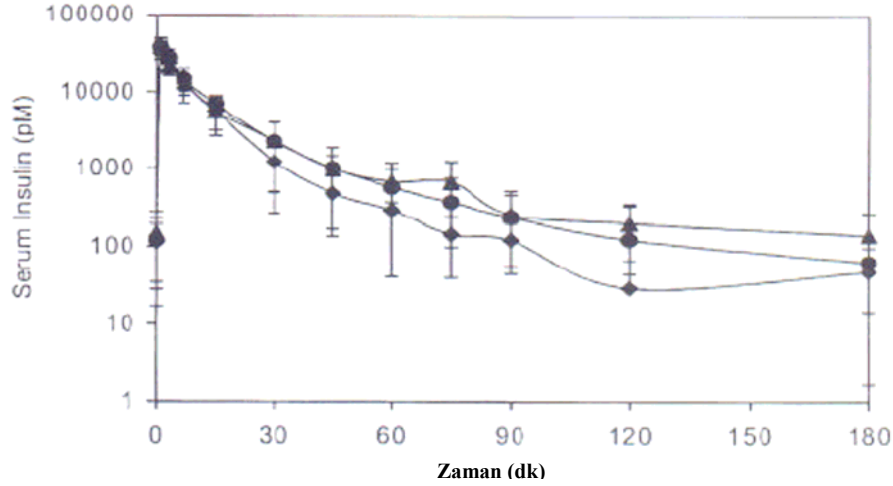
mevcut olan insülin ve kanin C-peptid radyo bağışıklık inceleme takımları kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan insülin takımlarının her biri, insülin-siz matrikste hazırlanan uygun referans çözeltileri kullanılarak rekombinant insan insülininin, F750 ve F2000'in analizi için dikkatlice geçerli kılınmıştır. Her iki tür inceleme kontrol numunelerinin iki düzeyinin hesaplanan değerlerinin bilinen değerlerinin 2 standart sapması içinde düştüğünün görülmesi halinde bireysel uygulama için geçerli kabul edilmiştir [5].

Serum insülin (mPEG-insülin) konsantrasyonları, endojen insülin ayrıştırmasının göstergesi olarak kanin c-peptid konsantrasyonları kullanarak endojen insüline göre ayarlanmıştır. Bu gereklidir çünkü insan ve kanin insülini benzer birincil dizinlere sahiptir. Rekombinant insülin injekte edilmiş hayvanlardan ya da pegile edilmiş türevlerinden temsili serum numuneleri kanin C-peptid konsantrasyonları ile incelenmiştir. i.v. ya da s.c. injekte edilen hayvanlar arasında gözlemlenen serum C-peptid düzeylerinde ayırt edilebilir hiçbir farklılık bulunmadığından ve insülin ya da pegile edilmiş türevleri ile tedavi edilen hayvanlar arasında hiçbir farklılık gözlemlenmediğinden, endojen insülin ayrıştırılması adına serum C-peptid konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, şekillerde gösterilen serum insülin düzeylerinin haricen uygulanmış insülinin (Hum) ya da pegile edilmiş türevlerinin (F750 ve F2000) düzeyleri oldukları gerçekten kabul edilmektedir [5].

Görünürdeki dağılım hacmi, görünürdeki toplam sistemli açıklık, son orantı sabitesi ve yarı-ömür dahil birkaç farmakokinetik parametre hesaplamak için endojen insülin ayrıştırmasının düzeltilmesinden sonra insülinin (mPEG-insülin konjugatları) serum konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca, zamana karşı serum insülin (birleşme) eğrileri altındaki alan ve insülin ve pegile edilmiş türevleri için MRT'ler belirlenmiştir. Bu değerlerin hesaplanması WinNonlin'in (Pharsight, ABD) bölümsel olmayan analiz özellikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamın değerlendirilmesi için, iki-uçlu Öğrenci t-testi kullanıldı ve $P < 0.05$ iken orta değerler istatistiksel olarak farklı kabul edildi [5].

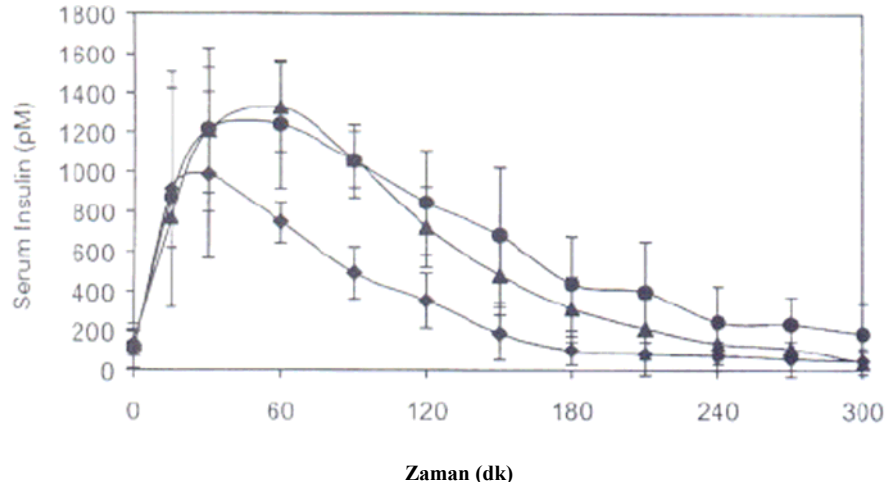
Şekil 5.9 damar için uygulamanın ardından serum insülin (PEG-insülin) düzeylerini göstermektedir. Her iki birleşmenin (F750 ve F2000) dolaşım düzeyleri 15-dakika injeksiyon sonrası nerdeyse her zaman noktasında Hum'unkine göre biraz yüksektir, bu da konjugatların Hum'a göre daha yavaş temizlenebileceğini göstermektedir. Bunun iki istisnası vardır: (1) F750'nin Hum'a göre ciddi biçimde daha uzun giderme yarı-ömrü vardır ve (2) damar içi injeksiyondan sonra her iki birleşmenin orta ikamet süreleri Hum'a göre ciddi biçimde daha uzundur. Hum'a nispeten konjugatların artan MRT'leri PEG'nin hücre zarlarıyla karşılıklı etkileşim yeteneğiyle açıklanabilir. PEG-SOD'nin PEG-zincirlerinin ve hücre zarlarının

karşılıklı etkileşimi yoluyla kırmızı kan hücrelerine bağlanabildiğini göstermiştir. Hayvanların kırmızı kan hücreleriyle etkileşerek, birleşmeler sonuçlarımızda görüldüğü gibi muhtemelen dolaşımda rekombinant insüline göre daha uzun kalacaktır [5].



Şekil 5.9 Erkek köpeklere i.v. 0.3U/ kg HumulinR (♦) ve ya F750(▲) veya F2000(●) enjeksiyonundan sonra serum şeker (mPEG-B1-insülin) düzeyleri [5].

0.3 U/kg deri altı uygulamasını izleyen serum-insülin (PEG-insülin türevi) düzeyleri Şekil 5.10'da gösterilmiştir. Bu çizim köpeklere deri altı enjeksiyondan sonra (Hum biçimindeki) doğal insülinin ve pegile edilmiş türevlerinin (F750 ve F2000) dolaşım düzeylerinde köklü farklılıklar olduğuna dair açık delil sağlamaktadır. Konjugatların her ikisi test edilen çoğu noktada artan serum konsantrasyonları sergilemiştir. Konjugatlar Hum'a göre ciddi biçimde daha yüksek C_{max} düzeylerine ulaşmıştır ve birleşmeler için maksimum konsantrasyonlarına ulaşmak Hum'a göre daha uzun sürmüştür. Ancak, hesaplanan T_{max} değerlerindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. F750 ve F2000 için hesaplanan AUC/D değerlerinin analizi her iki birleşmenin deri altı enjeksiyonun ardından Hum insülin hegzaomerlerine göre ciddi biçimde daha yüksek ölçüde emildiğini önermektedir. İnsüline eklenmiş PEG'nin moleküler ağırlığı arttığından, türevin göreceli mevcudiyeti de artmıştır. Birçok PEG-protein konjugasyonunun rekombinant biçimlerine göre geliştirilmiş biyolojik varlık sergilediği göz önüne alındığında bu sonuçlar şaşırtıcı değildir [5].



Şekil 5.10 Erkek köpeklere s.c. 0.3U/ kg HumulinR (◆) ve ya F750(▲) veya F2000(●) injeksiyonundan sonra serum şeker (mPEG-B1-insülin) düzeyleri [5].

Her iki birleşmenin de Hum'a göre köklü biçimde daha yavaş terminal açıklık oranları bulunmaktaydı ve F2000 MRT'si hem F750 hem de Hum'dan ciddi biçimde daha uzundur. PEG-insülin konjugatlarının ve insülinin gözlemlenen farklılıkların muhtemel açıklamalarından biri konjugatların moleküler büyüklüğünün insüline göre arttığı dolayısıyla böbrek sızma şüphesinin arttığı mümkündür. Bunun ötesinde, insülinin PheB1'ine PEG eklenmesinin sıçan ciğer hücrelerinden ve adipositlerinden (yağ hücrelerinden) insülin reseptörleri için azalmış in vitro eğilimlerine sahip konjugatlar ürettiği bildirilmiştir. Literatür insülinin öncelikle reseptör-araçlı olaylar yoluyla temizlendiğini ve bu çalışmada kullanılan mPEG-insülin konjugatlarının reseptör-bağlayıcı yeteneklerinin (her ne kadar özellikle belirtilmemişse de) deri altı uygulamanın ardından daha yavaş açıklık oranlarına katkı sağlayıcı başka bir unsur olabileceği açıkça belirtmektedir. Ayrıca, konjugatların opsonizasyon yoluyla asgari antijenliklere sahip olduğu gösterildiğinden mekanizmalar engellenecektir. Bu etki önceden diğer PEG-protein konjugatları için literatürlerde bildirilmiştir. Konjugasyon olarak, PEG eklenmesinin bu üç protein etkisi (artan molekül büyüklüğü, azalan reseptör-bağlama yeteneği ve azalan antijenlik) rekombinant insüline göreceli konjugatlar için gözlemlenen istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) daha yavaş açıklık oranlarına yol açabilir. Son olarak, PEG'nin hücre zarlarıyla karşılıklı etkileşime girme yeteneğinden ötürü deri altı uygulamanın ardından bu konjugatların dolaşım yarı-ömürlerini uzatan bu karşılıklı etkileşim için aynı tezler öne sürülebilir [5].

İnsülinin deri altı depodan emilimi, insülin oligomerlerin çözülmesi, insülin oligomerlerin

kapiler duvarlar, lokal kan akışı ve lokal sıcaklık yoluyla enjeksiyon alanından yayılması gibi birçok unsura dayanan (insülin monomerleri haricinde) doğrusal olmayan bir süreçtir. Bu, PEG-insülin konjugatları için hesaplanan artan T_{max} değerlerinden sorumlu muhtemel mekanizmaların analizini Humuline'e göre zorlaştırmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan HumulinR formülasyonunun hegzamerik insülin içerdiği ve bu çalışmalarda kullanılan PEG-insülin preparatlarının dimerik biçimde insülin konjugatları içerdiği vurgulanmaktadır. Ancak, PEG eklenmesinin konjugatın moleküler büyüklüğünü artırdığı ve PEG'in hücre zarlarıyla köklü biçimde karşılıklı etkileşime geçtiği de bilinmektedir. Dolayısıyla deri altı emilim oranlarında birleşme bağlanma-durumu nedeniyle herhangi bir artış konjugatın genel büyüklüğündeki artışlarla ve konjugatların PEG kısmı ile kapiler hücre zarlarının özel etkileşimleriyle karşılanabilir. Konjugatların artan moleküler büyüklüğü ve kapiler hücre zarlı PEG, azalan bağlanma-durumu emilimini artırdığından daha büyük ölçüde deri altı emilimini engellemektedir. T_{max} değerlerindeki farklılıklar (sayılardaki yüksek düzeylerde farklılaşma nedeniyle) istatistiksel olarak anlamlı olmadığından, bu tez kanıtlanamaz. Ancak, yeniden belirtmek gerekirse, T_{max} 'ın orantısal olarak artırmasında açık bir eğilim görünmektedir [5].

Helmut Ringsdorf aslen birleşmiş çözülür polimerleri ilaç taşıyıcıları olarak kullanarak bir öneride bulunmuştur ve düşük zehirliliği ve dahili kullanımı için FDA onayı yoluyla PEG bugün ilaç taşıma sistemlerinde en yaygın biçimde kullanılan polimerlerden biri olmuştur. Özellikle, tedavisel proteinlere PEG birleşmesi bu açıklık mekanizmalarının etkilerini asgariye indirmek ve dolayısıyla biyolojik etkinliklerini ters biçimde etkilemeksizin proteinlerin dolaşımda kalış sürelerini artırmak için yaygın biçimde kullanılan bir tekniktir. Bu çalışmanın amacı insan insülinine PEG birleşmesinin, damar içi ya da deri altı yollarla uygulanmasının ardından biyolojik etkinliği ve farmakokinetik üzerindeki etkilerini belirlemektir. Bu çalışmaların sonuçları açıkça göstermiştir ki düşük-molekül-ağırlık PEG'nin N-terminal amino asitte insüline alana-özel eklenmesi, değiştirilmemiş kontrol numunelerine göre konjugatların biyolojik etkinliklerini ciddi biçimde değiştirmez. Konjugatlar damar içi ya da deri altı uygulanmış olsun, erkek av köpeklerinde kan glukozu düzeylerini düşürme yeteneği Lilly'nin HumulinR hızlı-hareket eden çözünür insülin preparatının %10'u içindeydi. Konjugatların damar içi (i.v.) enjeksiyondan sonraki farmakokinetik özellikleri Humulin ile karşılaştırıldığında hafifçe değişmiştir ve bu farklılıklar s.c. enjeksiyondan sonra daha da fazla vurgulanmıştır [5].

5.2.4 Sonuçlar

Yaklaşık 80 sene önce bulunmasına rağmen, insülin diyabetiklerin tedavisi için en önemli

tedavi olmaya devam etmektedir. Fiziksel, bağışıklık sağlayıcı ve farmakokinetik özelliklerini geliştirmek üzere insülini değiştirme çabaları yakın geçmişe kadar sınırlı bir başarı elde etti. Ayrıca, parental olmayan bir yolla uygulanabilir etkili insülin preparatları elde etmek neredeyse aşılamaz bir zorluk olarak görünmektedir. İnsülin tedavisinin karşılaştığı sorunlardan çoğu insüline özel istikrarsızlıktandır. İnsülin, diğer birçok tedavisel peptid ve proteinle birlikte, etkin tedavisel preparatların geliştirilmesini özellikle zor kılan birçok tercih edilmeyen özellik taşımaktadır. Bu tercih edilmeyen özellikler kimyasal ve fiziksel istikrarsızlık, doğal bağışıklık sağlayıcılık ve antijenlik ve sistemi dolaşımdan hızlı uzaklaşma içermektedir. Bu çalışmanın altında yatan temel varsayım PEG'nin insan insülinine alana-özel PEG eklenmesinin bu önemli tedavisel proteine yararlı fiziksel, bağışıklık sağlayıcı ve farmakolojik özellikler atayacağıdır. Bu amaçla, yer değiştirmenin farklı alanlarıyla konjugatlar ve ekli PEG'nin moleküler ağırlıkları hazırlanmıştır. Homojenliğe saflaştırmanın ardından, konjugatın fizyokimyasal, fiziksel, biyolojik, bağışıklık sağlayıcı ve farmakolojik özelliklerini değerlendirmek üzere geniş-yelpaze yaklaşımı kullanılmıştır [5].

Düşük-molekül-ağırlık PEG'nin N-Terminal (PheB1) amino grubu ve sonuncu öncesi C-terminal e-amino grubu yoluyla insüline eklenmesi, bu önemli tedavisel proteinin fiziksel, biyokimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirdi. Özellikle, PEG konjugatının doğal insülin uyumu, ortalama bağlanma durumu ve in vivo biyolojik etkinlik üzerindeki etkileri asgariydi. Ancak, insülin kalıntı PheB1'de pegile edildiğinde sonucundaki konjugatlar büyüklüğün fiziksel olarak daha istikrarlı iki düzneydi [5].

Konjugatların hümmoral bağışıklık sağlayıcılığı, hümmesel bağışıklık sağlayıcılık, antijenlik ve alerjenlik daha sonra iki fare modelinde incelendi. Düşük-moleküler-ağırlık PEG'nin kalıntılardan herhangi birine eklenmesi, konjugatların hümmoral ve hümmesel bağışıklık sağlayıcılıklarında ciddi bir azalmayla sonuçlandı. PEG-insülin konjugatları bağışıklılaştırılmış farelerde herhangi ölçülebilir alerjik reaksiyonu gidermede yetersiz kalmıştır. İnsan insülinine PEG eklenmesinin bu konjugatların herhangi ciddi biçimde anti-insülin ile karşılıklı etkileşime girmesini önlediği öngörülmektedir. Bu sonuçlar rekombinant insan insülininin bağışıklık sağlayıcılığını, antijenliğini ve alerjenliğini asgariye indirmek için güvenli bir yöntem bulma itibarıyla çok ümit vericidir. Dolaşan anti-insülin IgC ve IgE antikoları diyabetli hastalarda istenmeyen ve tehlikeli sorunlara neden olabilir ve ciddi sistemli anafilaktik reaksiyonlarla sonuçlanabilir. Daha genel olarak, anti-insülin antikolarının varlığı postprandial hiperglisemiye ve uzun süreli hiperglisemiye neden olarak insülin tedavisi rejimlerinin klinik etkinliğini olumsuz olarak etkilemektedir [5].

Son olarak, köpek modelinde damar içi ve deri altı uygulamadan sonra pegilasyonun insülinin biyolojik etkinliği ve farmakokinetik üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çözünebilir regüler insan insülinine eşdeğer konjugatların kan glukozu düşürme yeteneği konjugatların biyolojik dengelerini (biyoekivalans) belirlemek üzere kullanılmıştır. Ayrıca, birkaç farmakokinetik parametreyi hesaplamak üzere bölümsel olmayan yöntemler kullanılmıştır ve her bir tedavi grubu için hesaplanan parametrelerin değerleri arasında istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır. F750 ve F2000'in kan glukozu düşürme yeteneğinin damar içi ya da deri altı uygulamadan sonra istatistiksel olarak insülininden ayırt edilemez olduğunu bulduk. Bunun gibi, F750 ve F2000'in uç temizlenme oranları da damar içi uygulamadan sonra istatistiksel olarak insülininden ayırt edilemezdir, fakat pegile edilmiş insülin türevlerinin deri altı uygulamanın ardından ciddi biçimde daha düşük temizlenme oranları bulunmaktadır. F750'nin yarı ömrünün giderilmesi hem damar içi hem de deri altı uygulamadan sonra Humulin'e göre istatistiksel olarak ciddi biçimde daha uzundur. F2000'in MRT'si her iki yol üzerinden injekte edildikten sonra istatistiksel olarak Humulin'den ciddi biçimde daha uzundur. Bu çalışmalar PEG-insülin birleşmelerinin dolaşım yarı-ömrlerinde ölçülebilir artışlar olduğunu sergilemektedir. Ancak, bu deneylerde toplanan veriler yüksek derecede konu içi ve konular arası değişkenlik eksikliği taşımaktaydı, bu nedenle farmakokinetik parametrelerde daha belirleyici farklılıklar gözlemlendi. Fark edilir biçimde, birleşmeler ile insülin arasında bulunan biyolojik denge, erkek Wistar sıçanlarında ve erkek evcil tavşanlarda benzer birleşmeleri inceleyen başka bir grubun çalışmasıyla desteklenmektedir [5].

Birçok çözülmemiş konu, klinik olarak mümkün insülin yer değiştirmesinin geliştirilmesi için kritik kalmaya devam etmektedir. Birkaç konu bugüne kadar bildirilen çalışmalarla yeterince çözülmemiştir ve bu birleşmelerin Aşama I klinik denemeler (Faz1, sağlıklı gönüllülerde toksik düzey belirlenmesi) için değerlendirilebilmesinden önce çözülmesi gerekir. Bu konulardan bazıları şunları içermektedir: (1) konjugatların dallanmış PEG türleriyle hazırlanması; (2) optimize edilmiş formülasyon şartlarının değerlendirilmesi; (3) kimyasal stabiliteğin değerlendirilmesi; ve (4) optimal birleşme formülasyonlarının daha kapsamlı farmakolojik açıklaması.

Her ne kadar düşük-molekül-ağırlık PEG türleri yoluyla insüline yararlı özellikler atfedilmişse de, diğer türler ticari olarak mevcut şubeli PEG türevleri kullanılarak hazırlanmalıdır. Bu farklı PEG türleri, alana-özel olarak insüline eklendiğinde, burada incelenen birleşmelerle karşılaştırıldığında geliştirilmiş fiziksel, bağışıklık sağlayıcı ve farmakolojik özelliklerle anlaşılır biçimde birleşmelere yol açabilir [5].

Dolaşan insülin dinamik bir dengenin etkisi altında monomerlerin, dimerlerin ve hegzamerlerin karmaşık bir karışımı olarak mevcuttur. Ayrıca, protein konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyonik güç ve insülin oluşumunun tam içeriği gibi birçok değişken bu dinamik dengeyi etkilemektedir. Son üründe hangi özelliklerin istendiğine bağlı olarak, formülasyon şartları ve konjugatların buna göre ayarlanması gerekecektir [5].

Herhangi aday PEG-insülin konjugatı klinik geliştirme için değerlendirilmeden önce, özellikle ele alınması gereken başka bir önemli konu kimyasal stabilliktir. İnsülinin deamidasyon, B-izomerizasyon, oksitlenme, dimerizasyon ve polimerizasyon dahil birçok enzimatik olmayan reaksiyondan geçtiği bilinmektedir. Aynı zamanda formülasyon şartlarının bu reaksiyonlardan hangisinin ve ne ölçüde gerçekleştiğini etkilediği de bilinmektedir. Bu nedenle, optimal formülasyon şartlarının dikkatlice seçilmesi büyük ölçüde gerçek-zaman kimyasal stabillik çalışmalarının bulgularına bağımlı olacaktır [5].

Bu araştırmanın bugüne kadarki sonuçları rekombinant insan insülininin alana-özel pegilasyonunun fiziksel olarak daha stabil, bağışıklık sağlayıcı olmayan ve antijen olmayan, tamamıyla biyo etkin ve deri altı uygulamadan sonra dolaşımdan yavaşça temizlenmiş birleşmeler ürettiğini önermektedir. Dolayısıyla, proteinler için bildirilen yararlı özelliklerin çoğu aynı zamanda PEG-insülin konjugatları için de yaygındı. Bu kanıt, bu birleşmelerin bir gün tam klinik yararlarının gerçekleştirilebileceği ümidiyle sürekli geliştirilmesi için 'kavram delili' sağlamaktadır [5].

Kozlowski ve Harris'in yeni bir makalesi pegile edilmiş proteinlerin ya da peptidlerin klinik bağlantısının nihayet gerçekleştirildiği yönünde güçlü deliller sağlamaktadır. Halen Enzon (NJ, ABD) tarafından geliştirilmiş proteinlerin FDA-onaylı iki pegile edilmiş biçimi pazardadır: (1) ciddi kombine olmuş bağışıklık eksikliği sendromunun (SCIDS) tedavisi için kullanılan PEG-adenosin deamidaz (Adagen®) ve (2) akut limfoblastik lökemi tedavisi için pazarlanan PEG-asparaginase (Oncospar®). Bunun yanında, birkaç pegile edilmiş protein halen ileri-düzey klinik denemelerdedir ve bu birleşmelerden bazılarının önümüzdeki yıl onay alacağı beklenmektedir. Bu birleşmelerin örnekleri Amgen'den çözülür PEG-TNF-reseptör, pegile edilmiş antikor parçacık, göğüs kanserinin kemoterapisi için katkı olarak kullanılmak üzere Amgen'den PEG-G-CSF, Scering-Plough'dan PEG-IFN ve hepatit C'nin tedavisi için Hoffman-La Roche, Pharmacia-Sensus'tan PEG-hGH reseptör agonist içermektedir. Protein pegilasyonu alanında yakın geçmişte olan ilerlemelerin ışığında, bu teknik hem farmasötik sanayiden hem de federal mevzuat kurumlarından protein ilaçlarının tedavisel etkinliğini artırmada avantajlı bir yöntem olarak kabul görüyor görünmektedir [5].

5.3 PLGA mikro parçacıklarında PEGile (polietilenglikolize) edilmiş insülin

5.3.1 In vivo ve in vitro analiz

Diyabet, hastalık nedeni ve salgın oranlarında ölüm nedeni olmuştur. Amerikan Diyabet Derneği ABD’de 2002’de 18.2 milyon diyabetlinin olduğunu tahmin etmektedir ve hastalığın yayılmasının her yıl en az en az 1.3 milyon yeni hastayla artması bekleniyor. Yakın geçmişte yayınlanmış bir çalışma 2000 yılında ABD’de doğan bireyler için diyabet geliştirme beklenen yaşam boyu riskinin erkekler için % 32.8 ve bayanlar için % 38.5 belli etnik gruplar için ise daha da yüksek olduğunu belirtmektedir.

Bu artan diyabet yaygınlığıyla ilişkilendirilen hastalıklılık ve ölümcül hastalığı daha iyi yönetme stratejilerine odaklanmıştır. Büyük klinik denemelerde tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında oluşturulan veriler sıkı glisemik kontrolün diyabet komplikasyonunun meydana gelişini ve ciddiyetini azaltabileceğini açıkça göstermiştir. İnsülin formülasyonundaki ve verilmesindeki yakın geçmişteki çok hızlı hareket eden ve ortadan ‘uzun-vadeliye’ (bir gün) bazal enjeksiyonlar dahil gelişmeler, insülin ayrıştırmasının normal düzenini daha çok taklit eden bazal-bolus insülin uygulama programlarının geliştirilmesine imkan vermiştir. Mevcut uygulama teknolojilerini birleştirerek özel, tek haftalık düşük-hacim enjeksiyonla bazal insülin gereklilikleri sağlayan uzun-vadeli hareket eden insülin formülasyonu imal etmek için basit bir yöntem geliştirildi.

Biyolojik olarak ayrıştırılabilir polimerlere dayalı birkaç tedavisel protein ürünü ABD’de ve başka ülkelerde FDA onayı aldı. Önemli bir neden normalde geleneksel emülsiyon/çözücü çıkarma teknikleri kullanılarak mikro parçacık üretimi esnasında karşılaşılan şartlara maruz bırakıldıklarında proteinlerin doğal istikrarsızlığıdır. Yapısal ve kimyasal istikrarsızlık sıklıkla tedavisel proteinlerin ya da peptidlerin biyolojik olarak ayrıştırılabilir matrikslerden tamam olmayan serbest bırakılmasıyla sonuçlanır. Karşılaşılan diğer sorunlar her ikisi de aynı temel fenomenlerle ilişkilendirilebilecek olan, ilaçların düşük kapsülleme etkinlikleri ve yüksek başlangıç patlamasıdır. İnsülin dahil birçok tedavisel protein için tatmin edici salıverme kinetiğini (yani asgari patlama, kabul edilebilir süre) korurken kabul edilebilir bir doz hacmine (yani yüksek ilaç içeriğine) ulaşmak çok anlamlı bir formülasyon zorluğunu temsil eder. Biyolojik olarak ayrıştırılabilir polimer mikro parçacıkları üzerinde yirmi yıllık insülin çalışmaları bu konulara ışık tutmakta ve insülin uygulamasını geliştirmek için hareket noktası sağlamaktadır.

Hem kapsülleme süreci hem de ardından gelen biyolojik olarak ayrıştırılabilir matrikslerin

salıverilmesi sürecinde proteinlerin istikrarlılığını artırmak için başarısı sınırlı olsa da sayısız yöntemlere girişilmiştir. Bu gibi yöntemlerin örnekleri geleneksel stabilleştiricilerin, hidrofobik iyon-çiftleştirilmesinin kullanılması ve kapsülleme öncesinde protein çözeltisine sıvı gerilmesi azaltıcı eklenmesini içerir.

PEGilasyonun PLGA mikrosferlerinde kapsüllenmiş birkaç tedavisel proteinin (örn; EGF, insülin, α -interferon ve F_{ab} bölümleri) istikrarını etkin biçimde artırdığını gösteren yayınlanmış raporlarda gösterildiğine göre PEGilasyonun genelde protein istikrarını artırdığı bilinir. Maalesef bu teşebbüsler düşük ilaç patlamalı ve ideal salıverme profilli ürünler ortaya çıkarmamıştır. Protein mikro kapsüllemesinin yeni bir yöntemi burada açıklanmıştır. Bu yöntemden kaynaklanan monolitik mikro parçacıklar in vitro ve in vivo istisnai olarak düşük patlama salıverilmesi, istenen sıfıra yakın düzen kinetik profil ve kapsüllenmiş proteinin köklü biçimde tam olarak salıverilmesini sergilemektedir. Önemlisi, yöntem yüksek kapsülleme etkinliğine imkan vermektedir ve mikro parçacıkların insülin içeriği düşük doz hacmine ulaşılabilecek şekildedir ve mikro parçacıkların insülin içeriği düşük doz hacme ulaşılabileceği biçimindedir. Bu yeni teknoloji, haftada bir enjeksiyon programıyla bazal insülin düzeyleri sağlayabilecek sürdürülebilir salıverme insülin formülasyonu için temel sağlar [6].

5.3.2 Malzemeler ve yöntemler

5.3.2.1 Malzemeler

İnsan kristalin çinko-insülin (Insülin USP) Intergeren/ Serologicals'dan satın alınmış ve daha da saflaştırılmadan kullanılmıştır. HumulinR[®] Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN)'dendir. Metoksipolietilen glikol-suksinimidil propiyonat (mPEG-SPA) Nektar Therapeutics'ten elde edilmiştir. 45/55 mol laktik/ glikolik asit içeriği ve 0.15 dL/g (PLGA 4555-2A) doğal akışkanlığı bulunan polilaktik-ko-glikolik asit Alkermes'ten satın alınmıştır. 50/50 mol laktik/glikolik asit içeriği ve 0.17 dL/g (Resomer RG 502H) doğal akışkanlığı bulunan polilaktik-ko-glikolik asit Boeringer-Ingelheim'dendir. Accu-check kan glukozu ölçüm aleti Roche Diagnostics Corp.'un ürünüdür. İnsan insülini ELISA takımı (Active Insulin ELISA) Diagnostics Systems Laboratories, Webster, TX'tandır. Akrodiz LC-PVDF (0.2 μ m) şırınga filtreleri German Sciences'dan satın alınmıştır. Üre, sodyum klorid, metilen klorid, 2-propanol, asetonitril, asetik asit, sodyum fosfat monobaz ve sodyum fosfat dibazik Fisher Chemical'ın ürünleridir. Polivinilalkol (PVA; %88 hidrolize, Mw 13-23 kDa) ve trifluoroasetik asit (TFA) Aldrich Chemical Co.'dandır. Streptozotosin (STZ) sodyum sitrat,

sitrik asit ve Tween 20 Sigma'dan satın alınmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan su MilliQ kalitesinde imiş ve kullanılan tüm diğer taşıyıcılar ve organik çözücüler kimyasal taşıyıcı kalitesinde ya da daha iyisi imiş [6].

5.3.2.2 İnsülinin metoksipolietilen glikol (mPEG) ile alana-özel değiştirilmesi

PEGile edilmiş insülin yapıları hidrolitik olarak stabil amid bağı yoluyla hazırlanmıştır. Farklı moleküler ağırlıklarla ayrı deneylerde, PEG-5000 mevcut çalışmada istenen özellikler için optimal bulunmuştur. Zn^{2+} insülin, yayınlanan yöntemlere göre mPEG-5000 SPA ile reaksiyona sokulmuştur. İstenen PEGile edilmiş birleşme iyon değiştirici kromatografisi yoluyla diğer reaksiyon türlerinden ayrılmış ve daha sonra tuzlanmıştır. Liyofilize edilmiş numuneler kullanım öncesinde $-20^{\circ}C$ 'de saklanmıştır [6].

5.3.2.3 mPEG-insülin konjugasyonunun açıklaması

5.3.2.3.1 İyon-değiştirici-FPLC

mPEG'nin saflığı, analitik iyon-değiştirici sütunu tutturulan FPLC (AKTA) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Sütun 1.0 mL/dk. akıntı oranında 0.01 M NaCl içeren 1 M AcOH/7 M üre ile dengelenmiş ve 30 dakikanın üzerinde NaCl-gradyan kullanılarak bağ proteini yıkanmıştır. Ayırıştırma 280 nm'dedir. Bu gradyan başlıca PEG-insülin zirvesini sonraki yıkayıcı zirvelerden ayırır.

5.3.2.3.2 RP-HPLC

Konjugatın saflığı, Waters Alliance aleti kullanılarak ters faz HPLC ile daha ileri düzeyde 280nm de değerlendirilmiştir. Symmetry -300 C18 (Waters Alliance) ters faz HPLC kolonu (4.6mm×25cm, 5µm partikül çapı), 30% asetonitril içinde 1.0 ml/dk akış hızı içindeki 0.1% TFA çözücüsüyle dengelenmiştir. Numune enjeksiyonunun ardından, 2.0 %/dk. çözücü B doğrusal gradyanı 20 dk. süreyle uygulanmıştır.

5.3.2.3.3 MALDI-TOF kütle spektrometresi

İnsüline ekli PEG zincirlerinin sayısı PEGile edilmiş ve rekombinant insülinin moleküler ağırlıkları arasındaki farktan belirlenmiştir. Tüm numuneler doğrusal biçimde çalıştırılan Kavrayıcı Biyosistemler modeli DERP MALDI/TOF kütle spektrometresi üzerinde işletilmiştir ve pozitif iyonlar gözetlenmiştir. Tüm numuneler için matriks, α -siyano-4-hidroksisinnamik asit imiş ve son spektrum için ortalanan en az 64 vuruşla 337 m hatlı nitrojen lazer kullanılmıştır.

5.3.2.3.4 N-terminal protein dizini analizi (Edman düzey düşürme)

PEG konjugasyon alanını, Edman düzey düşürme reaksiyonunun N-terminal amino gruplarından birinin (ya da her ikisinin) PEG ile türevlenmesi halinde ilerlemeyeceği bilgisiyle dolaylı olarak değerlendirmek için bu teknik kullanılmıştır. Tüm numuneler Applied Biosystems 477A Protein Sequencer kullanılarak üç Edman düzey düşürme devirleri boyunca analiz edilmiştir.

5.3.2.3.5 Uzak-UV dairesel dikroizmi

Jasco J-720 Spektropolarimetre ile CD spektrumları elde edildi. PLGA mikrosferlerinden salıverilen PEG-insülin, insülin ve PEG-insülin eritme deneyinde test edilmiştir. In vitro salıverme numunesi 26 gün alınan liofilize edilmiş havuzda toplanmış alikotlarla elde edilmiştir. PBS tamponda eritilerek CD analizi numuneleri hazırlanmış ve analiz öncesinde filtrelenmiştir. Numune konsantrasyonları UV-spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. D-10-kamforsülfonik asit ile alet kalibrasyonunun ardından, yirmi tarama yapılmıştır. 1 cm yol uzunluğunda quartz hücresi kullanılmıştır ve numuneler 25°C’de analiz edilmiştir.

5.3.2.4 Mikrosfer hazırlanması

o/w tek emülsiyon çözücü alıntısı/buharlaştırması işlemi kullanılarak PEG-insülin konjugatı içeren mikro parçacıklar hazırlanmıştır. ‘Yağ fazı’ normalde %8.5 (w/v) PLGA polimer ve %1.5 w/v PEG-insülin içermektedir. Bu yöntemle %25 w/w’ye kadar hedef ilaç yükleme değerleriyle bazı preparatlar yapılmıştır. Yağ fazı emülsiyondan geçirilmiştir. Daha sonra %2 IPA’nın 30x fazlası yaklaşık 10 dk. sonra eklenmiştir ve çözücü buharlaştırması yoluyla mikrosfer sertleştirmesini kolaylaştırmak üzere süspansiyon karıştırılmıştır. 3 saatten sonra, büyük hacimde çift damıtılmış H₂O ile yıkanmıştır ve özellik verilmesi öncesinde havayla kurutulmuştur. Bu yöntemle paketli yatak emülsiyon edici malzeme kullanılarak 1.5 g’a kadar PEG-insülin mikrosfer lotları hazırlanmıştır ve diğer biyolojik etkin PLGA mikrosfer ürünleri aynı emülsiyon edici tasarım kullanılarak çoklu kilo ölçeğinde hazırlanmıştır.

5.3.2.5 Mikro parçacıklara özellik verilmesi

5.3.2.5.1 İlaç yükleme

PEG-insülin ilk olarak mikrosferler asetonitrilde çözülerek ve daha sonra polimer suyun damıtılması yoluyla çöktürülerek PLGA’dan çıkarılmıştır. Çıkarılmış konjugatı içeren süpernatant RP-HPLC ile analiz edilmiştir.

5.3.2.5.2 Parçacık büyüklüğü dağılımı

Küçük Hacim Modülüyle Coulter Parçacık Büyüklüğü Analizci Optik Modülü LS 100Q kullanılarak parçacık büyüklükleri ölçüldü. Hacim-ağırlıklı analizler için değerler bildirildi.

5.3.2.5.3 SEM analizi

Numuneler Anatech Hummer 6.2 kullanılarak altınla dağıtılmıştır. JEOL JSM-5600 tarama elektronu mikroskobu ile görüntüler oluşturulmuştur. Mikosferler L.R. Beyaz Reçine içine yatırıldıktan ve numune serpiştirildikten sonra dahili yapının SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

5.3.2.5.4 In vitro çözülüm

%0.02 Tween 20 ve %0.05 sodyum asidi içeren ve 150 rpm'de yatay sallamayla 37°C'de kuluçkaya alınan 1.5 mL PBS'te (pH 7.3) PEG-insülin mikrosferleri (~20 mg) askıya alınmıştır. Önerilen zamanlarda numuneler 2000 rpm'de 3 dk. boyunca sentrifüj edilmiş ve süpernatant madde kaldırılmış ve taze araçla değiştirilmiştir. Mikro parçacıklardan salıverilen birleşmen miktarını belirlemek için yüzeye çıkan maddenin RP-HPLC analizi kullanılmıştır.

5.3.2.6 Biyo-analitik yöntemler

5.3.2.6.1 Glukoz incelemesi

Ticari glukoz ölçer kullanılarak serum glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar mg/dL (10-600 mg/dL aralığı) birim olarak sunulmuştur.

5.3.2.6.2 İnsülin incelemesi

Ticari olarak mevcut insan insülini ELISA takımı kullanılarak sıçan serumunda PEG-insülin düzeyleri belirlenmiştir. Bu takımın belirlenme alt sınırı 0.26 μ IU/mL idi.

5.3.2.7 In vivo çalışmalar

Tüm çalışmalarda hayvanlar Laboratuar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberi, DHEW Yayın No. (NIH) 78-23, 1986 ile uygunluk içerisinde gerçekleştirilmiştir. Konut alanındaki nispi nem ve sıcaklık için çevresel şartlar, çalışma alanı SOP'ye göre gözetlenmiştir. Sıçanlar laboratuar hayvanı besinleriyle beslenmiş ve musluk suyu sağlanmıştır. Işıklandırma standart 12 saat açık / 12 saat kapalı devirle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların yürütülmesi için protokoller, çalışma alanının Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi tarafından çalışmalara başlanmasından önce onaylanmıştır.

5.3.2.7.1 PEG-insülin konjugatının normal aç sıçanlarda etkinliği

Erkek Sprague-Dawley sıçanlarında farmakodinamik bir çalışma gerçekleştirildi. Test maddesi uygulanması öncesinde hayvanlara gece boyunca yiyecek verilmedi. Her bir hayvana kuyruk damarından tek doz PEG-insülin birleşmesiyle ya da HumulinR ile bir defa her biri 0.3 IU/kg olan IV injeksiyonu uygulandı. Uygulamadan sonra, 6 saatlik süre boyunca serum numuneleri elde edildi. Glukoz eğrisi altındaki alan her bir sıçan için hesaplandı ve tedavi farklılıklarını değerlendirmek için tek-yol değişkenlik analizi kullanıldı. Ayrıca yenilenen ölçüm deneyi için ANOVA ile glukoz değerleri analiz edildi. Tedavi grubu, süresi ve süre karşılıklı etkileşimi itibarıyla grup istatistiksel modele dahil edildi. Kovaryans matriksinin bileşim simetrik yapısı varsayıldı. Eğer süre karşılıklı etkileşimi itibarıyla grubun anlamlı olması halinde ($P < 0.05$), t-testi kullanılarak zaman noktası içerisinde gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı. Karşılıklı etkileşimin anlamlı olmaması halinde, tedavinin ana etkisi değerlendirildi ve eğer anlamlıysa gruplar arasındaki farklılıklar t-testi kullanılarak değerlendirildi.

5.3.2.7.2 Diyabetik sıçan modelinde PEG-insülin mikrosferlerinin etkinliği

5.3.2.7.2.1 Tek doz farmakokinetik

Bu çalışma PLGA/PEG-insülin mikrosferlerinin tek injeksiyonunun farmakokinetik profilini ve farmakodinamik etkisini değerlendirmek üzere yürütüldü. Bu deney için 45:55 (lac:gly) PLGA'dan, IV=0.15 dL/g mikrosferler hazırlandı ve 58.1 μ m orta çala %14.1 PEG-insülin içeriği üretti. 1.Günde, tüm hayvanlara 40 mg/kg s.c. streptozotosin uygulandı ardından farklı bir s.c. yerleşkesinde 5 mL normal salin injekte edildi. Tedavi öncesinde 0.Gündeki glukoz düzeyleri 460-724 mgdL arasında değişmekteydi. Altı hayvana 0.Günde bir defa PLGA/PEG-insülini mikrosfer formülasyonunun 75 IU/kg doz düzeyinde s.c. injeksiyonu yapıldı ve altı hayvanlık bir grup negatif kontrol olarak uygulamasız bırakıldı. Bu ve diğer sıçan çalışmaları için tüm PEG-insülin dozu mikrosferlerine suda %2.5 karboksimetilselüloz içeren 1.0 mL/kg sulandırıcı verildi. 0.Günde uygulama öncesinde ve uygulama sonrası 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlerde ve 3, 5, 7, 9, 11 ve 13. Günlerde kuyruk damarı yoluyla insülin ve glukoz konsantrasyonu analizi için kan toplandı. İnjesiyon alanları nekropsi anında açık tutuldu ve injeksiyon alanı reaksiyonları için değerlendirildi.

5.3.2.7.2.2 Tek doz farmakokinetik ve farmakodinamik; 3 ayrı partinin karşılaştırılması

Bu çalışma insülin farmakokinetiğinin ve glukoz farmakodinamiğinin yeniden üretilebilirliğini STZ uygulanmış sıçanlarda 3 farklı PLGA/PEG-insülin mikrosferi

formülasyonu uygulanmasından sonra 16-günlük bir dönemde inceledi. Bu mikrosferler için polimer, 0.15 dL/g IV ile 45:55 (lac:gly) PLGA idi. Üç parti için formülasyon özellikleri şöyleydi: Parti 1 – PEG-insülin içeriği, %15.0; E, %100 ve orta mikro parçacık çapı, 54.2 µm; Parti 2 – PEG-insülin içeriği, %14.2; EE, %95 ve orta mikro parçacık çapı, 44.7 µm; Parti 3 – PEG-insülin içeriği, %12.7; EE, %85 ve orta mikro parçacık çapı, 47.9 µm. 1. günde tüm hayvanlara daha önce açıklandığı gibi streptozotosin uygulandı. Uygulama öncesi 0. gündeki glukoz düzeyleri 264-726 mg/dL arası değişmekteydi. Mikrosfer partisi başına on hayvana 0.Günde bir defa 75 IU/kg dozunda PLGA/PEG-insülin mikrosfer formülasyonunda s.c. enjeksiyonu uygulandı ve beş hayvanlık bir gruba negatif kontrol olarak bir şey uygulanmadı. 0.Günde uygulama öncesinde ve uygulama sonrası 1 saatlik zaman noktalarında 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14 ve 16.Günlerde kuyruk damarı yoluyla insülin ve glukoz konsantrasyonu ölçümü için kan toplandı [15].

5.3.2.7.2.3 Tekrar edilen doz farmakokinetiği

Bu çalışma diyabetik sıçanlarda PLGA/PEG-insülin mikrosfer formülasyonunun tekrar eden enjeksiyonları sonrasında insülin farmakokinetiğinin tekrar edebilirliğini değerlendirmek üzere yürütüldü. Bu çalışmadaki mikrosferler, 0.17 dL/g doğal akışkanlıkla 50:50 (lac:gly) PLGA'dan hazırlandı. PEG-insülin içeriği %13.8 (w/w), EE=%92 idi, ve orta parçacık çapı 58.1 µm idi. 1.Günde, tüm hayvanlara daha önce açıklandığı gibi streptozotosin uygulandı. Uygulama öncesi 0. günde glukoz düzeyleri 340-682 mg/dL arasında değişmekteydi. On hayvana 0. günde ve 19. günde 74 IU/kg doz düzeyinde s.c enjeksiyonu yoluyla bir defa PLGA/PEG-insülin mikrosfer formülasyonu uygulandı. 0. günde uygulama öncesinde ve (saatler parantez içinde) 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, [19 (1)], 20, 22, 24, 26, 27, 29, 31 ve 33 zaman noktalarında kuyruk damarı yoluyla insülin konsantrasyonu analizi için kan toplandı.

5.3.2.7.2.4 Çoklu doz farmakokinetiği

Bu çalışma, 3 doz PLGA/PEG-insülin mikrosferleri uyguladıktan sonra tekrar edilen enjeksiyonların stabil durum insülin düzeylerine etkisini değerlendirdi. Bu deney için mikrosferler 45:55 (lac:gly) PLGA, IV=0.15 dL/g ile hazırlandı. 1. günde tüm hayvanlara daha önce açıklandığı gibi streptozotosin uygulandı. Tedavi öncesi 0.Gündeki glukoz düzeyleri 344-702 mg/dL arası değişmekteydi. On hayvana 0, 7 ve 14. günlerde PLGA/PEG-insülin mikrosferi formülasyonu ile 37.5 IU/kg doz düzeyinde s.c. enjeksiyonu uygulandı. 0.Günde uygulama öncesinde ve (saatler parantez içinde) (1) 1, 3, 5, [7, (1)] 8, 10, 12, [14, (1)], 15, 17, 19 ve 21 zaman noktalarında kuyruk damarı yoluyla insülin konsantrasyonu

analizi için kan toplanmıştır.

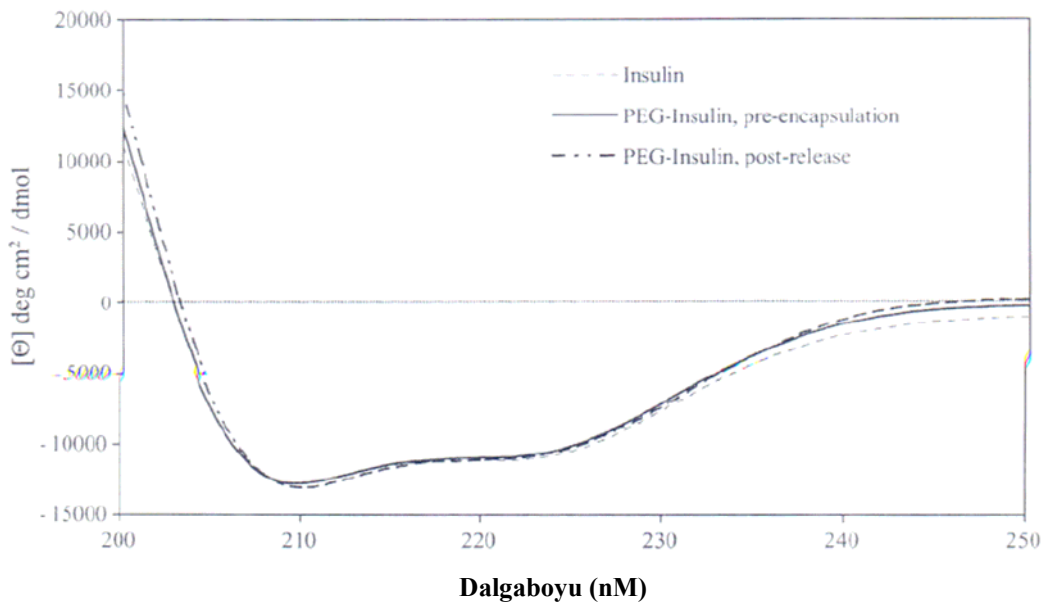
5.3.3 Sonuçlar ve tartışma

5.3.3.1 PEG-insülin konjugasyonu

5.3.3.1.1 Laboratuvar analizi

Yüksek performans ters fazı hem de iyon değiştirici kromatografisi, izole PEG-insülin birleşmesi için >%95 saflık sergiledi. MALDI-TOF kütle spektrometresi kütle 11,439'da ortalananmış PEG-bağlantılı proteinler zirve dağılımı özelliği gösterdi. Birleşmemiş insülin ya da çoklu birleşmiş protein için hiçbir sinyal gözlemlenmedi. İnsülin moleküler ağırlığı 5807 Da olduğu için sonuçlar M1=5632 Da ortalamalı tek bir PEG zincirinin eklenmesiyle tutarlıdır.

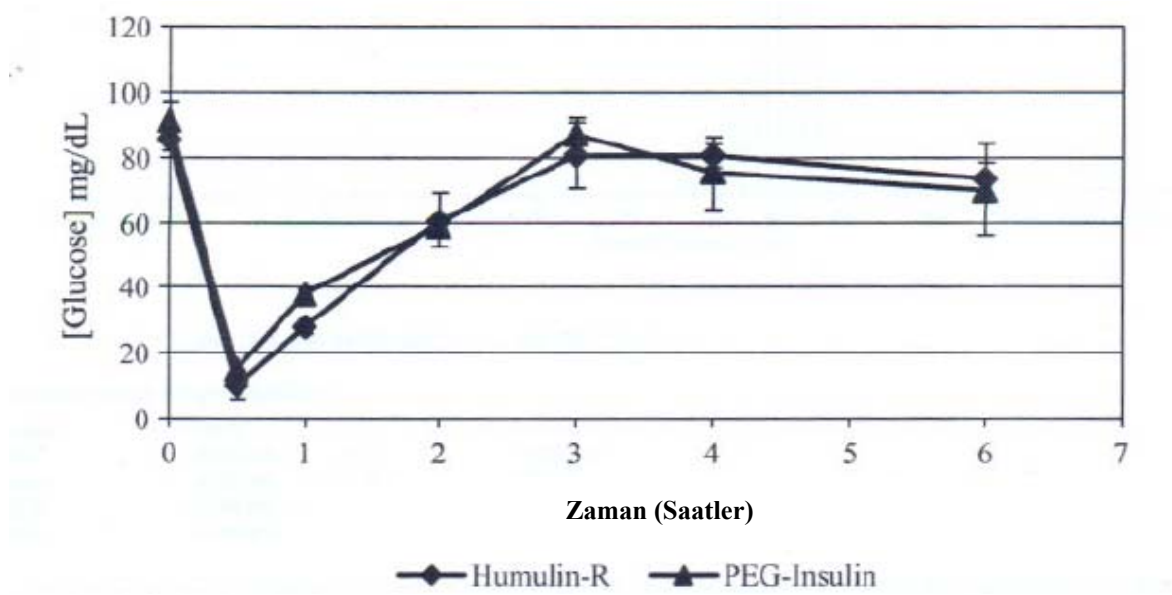
Edman düzey düşürmesinin N-terminal analizi PEG eklenmesinin alanını belirlemek için kullanıldı. İnsülin, sırasıyla N-terminal amino asitler Gly ve Phe ile A ve B adlı 2 zincirden oluşmaktadır. Edman düzey düşürme sonuçları birinci tur için Gly'nin 1 dengini ve Phe'nin tamamen olmamasını gösterdi. Bu sonuç B zinciri üzerindeki Phe'siz amino grubunun birleşmesiyle tutarlıdır ve PEG'nin PheB1 amino terminusta eklendiğini teyit eder. Şekil 5.11 mPEG birleşmesinin ve PLGA mikro kapsüllenmesinin insülinin uzak UV dairesel dikroizm spektrumuna etkilerini gösterir. PLGA mikrosferlerinden tampona salıverilmenin ardından PEG-5000 ile PheB1'de birleşmeden sonra insülin için ikincil yapı üzerindeki ihmal edilebilir etkiler görülmektedir.



Şekil 5.11 mPEG birleşmesinin ve PLGA mikro kapsüllenmesinin insülinin uzak UV dairesel dikroizm spektrumuna etkileri [6].

5.3.3.1.2 PEG-insülinin in vivo etkinliği

0.3 IU/kg PEG-insülin uygulamanın farmakokinetik etkisi aynı dozda HumulinR ile görülenle aynıydı (Şekil 5.12). Serum glukoz düzeyleri, değerlendirilen parametrelerde hiçbir ciddi farklılık yokmuş gibi PEGile edilmiş ve birleşmemiş insülinleri sıkı biçimde izler. Bu sonuç insüline karşı PEGile edilmiş insülin arasında hiçbir farklılık göstermeyen daha önceki çalışmalarla tutarlıdır.



Şekil 5.12 Normal aç farelerde tek bir i.v. PEG-insülin veya HumulinR injeksiyonundan sonraki serum şeker düzeyleri [6].

5.3.3.2 PLGA mikro parçacıklarında PEG-insülin

5.3.3.2.1. In vitro özellikler

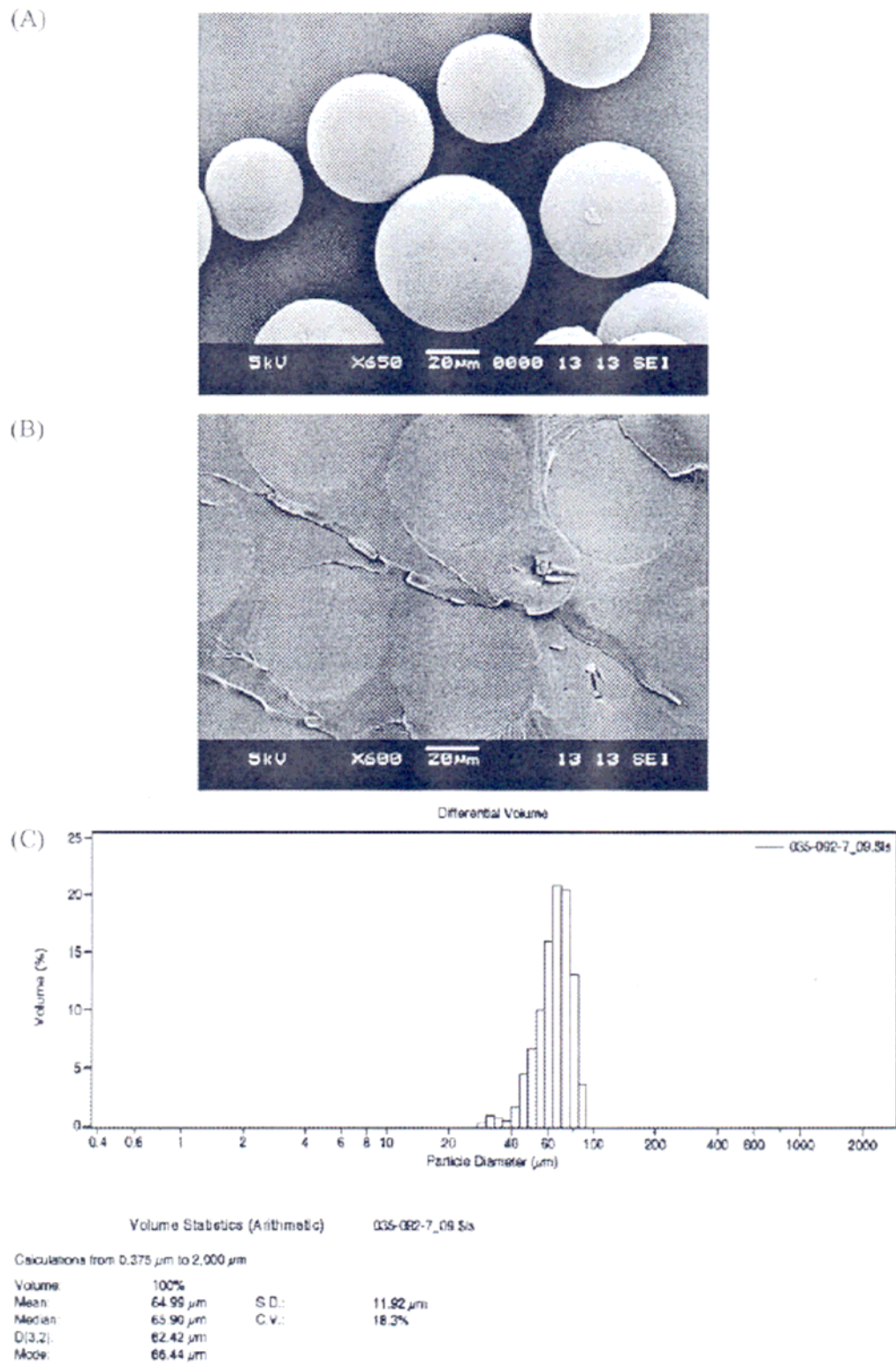
5.3.3.2.1.1 İlaç içeriği ve kapsülleme etkinliği

In vivo çalışmalar için %15 (w/w) hedef ilaç içeriğiyle PEG-insülin mikrosferleri hazırlanmıştır. Kullanılan çeşitli partiler için elde edilen fiili değerler (yukarıda) “Malzemeler ve yöntemler” bölümünde verilmiştir. Kapsülleme etkinlikleri %85 ile %100 arasında değişmekteydi.

5.3.3.2.1.2 Mikro parçacık büyüklüğü ve morfoloji

SEM analizi ve lazer ışığı serpiştirilmesinden parçacık büyüklüğü dağılımı Şekil 5.13’te

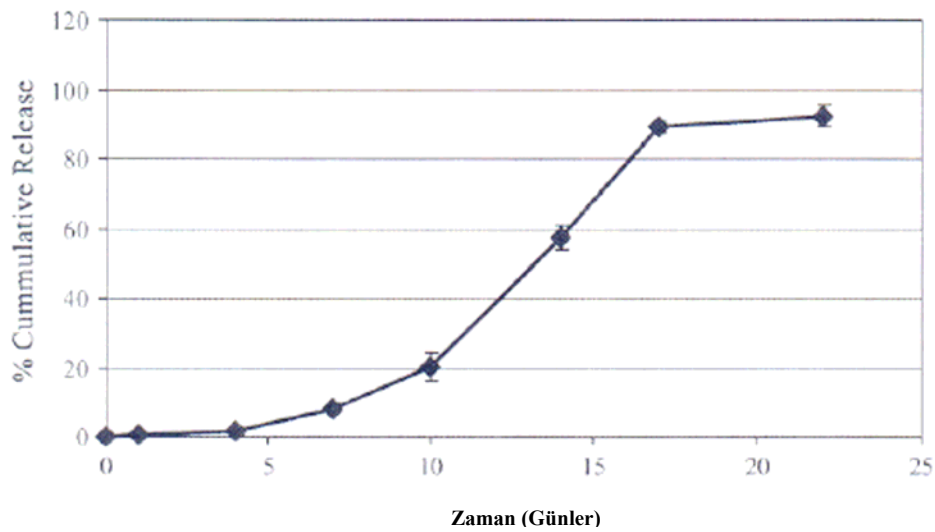
%20.4 (w/w) PEG-insülin içeriğiyle birlikte 0.15 dL/g doğal akışkanlığı olan 45:55 lac:gly PLGA'dan yapılan mikrosferler için gösterilmiştir. Bu morfoloji diğer polimerlerle ve ilaç içerik değerleriyle imal ettiğimiz PLGA/PEG-insülin mikro parçacıklarının temsilcisidir. Parçacıklar genelde şekil olarak küreseldir, nispeten düz yüzeyleri (SEM çözünürlüğünde pürüzsüz) vardır (Şekil 5.13A). L.R. Beyaz Reçine içinde yatırdıktan ve numuneyi serpiştirdikten sonraki dahili yapının SEM analizi tamamıyla tek tip, yoğun iç yapı göstermektedir (Şekil 5.13B). Bu numune için lazer ışığı serpiştirilmesinden orta mikro parçacık çapı, 35-90 μm dar aralığında 65 μm idi (Şekil 5.13C). In vitro salıvermede ve in vivo çalışmalarda kullanılan partiler için orta çaplar "Malzemeler ve yöntemler" bölümünde verilmiştir ve 45 ile 58 μm arasında değişmektedir. Orta çapın bu aralığın ötesinde ilaç salıverilmesi üzerinde hiçbir etkisi görülmemiştir [6].



Şekil 5.13 PEG-insülin mikrosferlerinin SEM ve laser ışığı (LLS)görüntüsü [6].

5.3.3.2.1.3 In vitro eriyik

Birinci günde <0.5 başlangıç salıvermesinin ardından 37°C'de PBS'de ve ardından 4-günlük sürede, mikro parçacıklar neredeyse tamamıyla (%93) içeriklerini sürekliye yakın bir düzende 16 gün boyunca salıverdi (Şekil 5.14). Veriler 45:55 lac:gly PLGA'dan (In vivo PK/PD çalışmasında aynı numuneler kullanılmıştır) yapılan 3 PEG-insülin mikrosferi numunesi için değerlerin ortalamasını temsil etmektedir. PLGA kapsüllenmiş protein için başlangıç patlaması eksikliği, müteakip neredeyse tamamıyla salıvermede olduğu gibi fark edilirdir. Bu da proteinin mikrosferlerdeki doğal, çözülür yapısının yüksek korunurluğunu gösterir. PEGile edilmiş proteinin çözünürlük özelliklerinin mümkün kıldığı faz karışımı, monolitik polimer-ilaç dahili yapının bu sonuçları teşvik edebileceğine inanılmaktadır. PLGA mikrosferlerdeki proteinlerde normal olarak görülen yüksek başlangıç ilaç salıverilmesi sıklıkla harici yüzeyde ya da yakınındaki moleküllere ve özellikle imalat esnasında oluşturulan dahili gözenekler ve kanallar yoluyla yüzeye kolay dağılıma atfedilir. Aksine, SEM'de gözlemlenen çapraz-bağlı PEG-insülin mikrosferleri aletin çözünürlüğü dahilinde tamamıyla homojendir, bu da gözenek ve kanal eksikliğini gösterir [6].



Şekil 5.14 PLGA mikrosferlerinden PEG-insülinin in vitro salınımı [6].

Başlangıçtaki deneylerde, %85 (w/w) PLGA ve %15 (w/w) PEG-insülinin fiziksel bir karışımın diferansiyel tarama kalorimetresi, aynı içerikte PEG-insülin mikrosferleri yoluyla karşılaştırıldı. Fiziksel karışımındaki PLGA ve PEG için ayrı aşama geçişleri mikrosfer numunesi için yoktur, bu da sadece tek cam geçiş gösterir. Bu sonuç PEG-insülinin ve

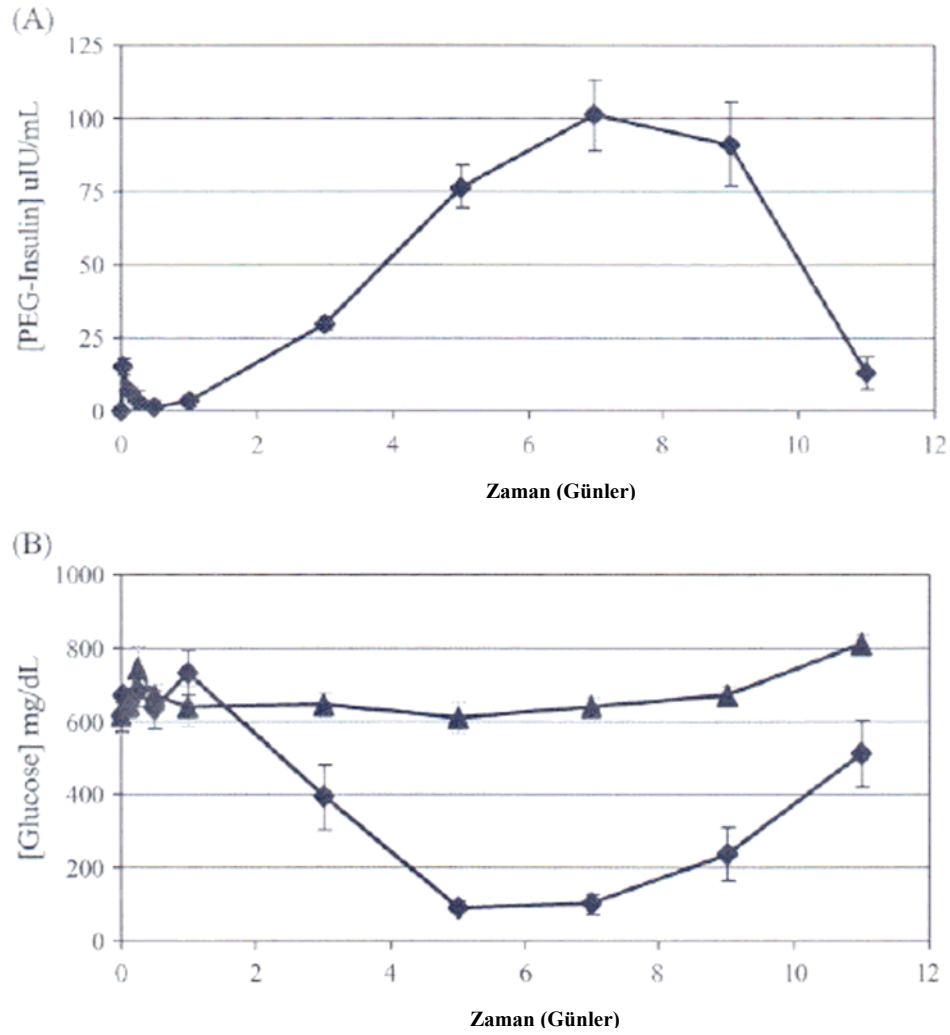
PLGA'nın hiçbir ayrı aşama olmaksızın gizlice çözüldüğünü gösterdiği şeklinde yorumlanır.

PEG-insülinin in vitro çözünürlük boyunca neredeyse tam salıverilmesi PEG birleşmesinin proteinin doğal özelliklerinden uzaklaştırılmasının önlenmesine yardımcı olduğunu önermektedir. Düzey düşürmenin ve dimer oluşumunun doğal yapı olarak proteinin çoğunun ya da büyük bölümünün salıverilmesini önlediği PLGA mikrosferlerde birleşmemiş insülin ile olan tecrübelerin tersinedir.

5.3.3.2.2 PLGA mikrosferlerde PEG-insülininin vivo özellikleri

5.3.3.2.2.1 Tek doz farmakokinetik

PLGA/PEG-insülin mikrosfer formülasyonu ile tedavinin farmakokinetik profili ve farmakodinamik etkileri Şekil 5.15A ve B'de gösterilmiştir. STZ uygulanmış sıçanlarda tek bir s.c. enjeksiyonundan sonra, mikrosfer enjeksiyonunun 1 saat ardından çok küçük bir başlangıç patlaması salıverilmesi görülmüştür. 24 saat enjeksiyon-sonrasında başlayarak, PEG-insülin düzeyleri 2 gün boyunca istikrarlı biçimde 3. günde yaklaşık 30 $\mu\text{IU/mL}$ 'e 7. Günde 85 $\mu\text{IU/mL}$ 'ye yükselmiştir. PEG-insülin düzeyleri 3. günden 10. güne kadar 7 gün süreyle korundu. Farmakokinetik tepki, sadece serum glukozun serum insülin düzeyleri arttıktan sonra belirli olduğu kinetik profili yansıtmaktaydı. 5. gün itibarıyla PLGA/ PEG-insülin uygulanmış sıçanlar için serum glukoz düzeyleri öglisemik aralıkta ve glukoz düzeylerinde 11. güne kadar düşük kalmaya devam etti. Bu günde glukoz düzeyleri uygulama-öncesi düzeylerine yükseldi. Hiçbir enjeksiyon alanı reaksiyonu bulunmamaktaydı ve 13. günde nekroskopide enjeksiyon alanlarının değerlendirilmesinde test maddesi bulunamadı. Önemlisi, in vitro ve in vivo deneylerde başlangıçtaki PEG-insülin patlama salıverilmesinin benzer miktarları bulundu [6].



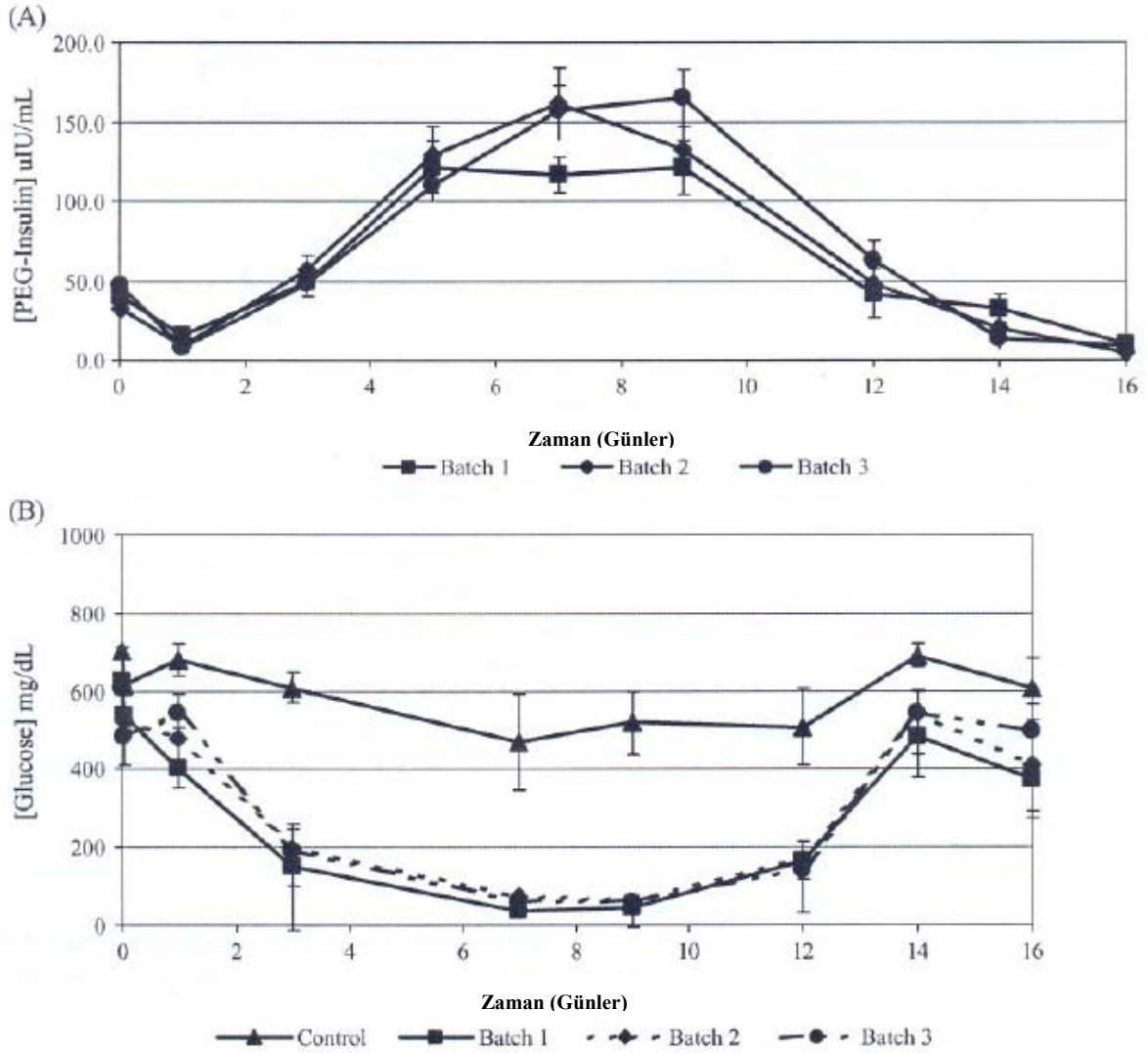
Şekil 5.15 (A) PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri.

(B) PLGA/PEG-insülin mikrosferlerinin diyabetik farelere tek bir s.c. dozdan sonraki serum insülin düzeylerinin tedavi almayan koldaki serum insülin düzeyleriyle karşılaştırılması [6].

5.3.3.2.2.2 Tek doz farmakokinetik ve farmakodinamik; 3 ayrı partinin karşılaştırılması

3 parti PLGA/ PEG-insülin mikrosfer formülasyonunun tek s.c. injeksiyonunun uygulanmasının farmakokinetik profili ve farmakodinamik etkileri Şekil 5.16A ve B’de gösterilmiştir. Farmakokinetik profil, düz ve tek tip ilaç salıverilmesinin ardından injeksiyondan sonra insülinin çok asgari patlamasını sergilemektedir. Glukoz düzeyleri 3. günden 10. güne kadar uygulama-öncesi değerleri olan ~600 mg/dL’den 200 mg/dL’nin altına indirildi, bu esnada kontrol grubu hiperglisemik kalmaya devam etti. Bu veriler, PEGile

edilmiş insülinin biyolojik etkinliğinin mikrosfer yapımı esnasında korunduğunu ve mikrosfer injeksiyonunun ardından salıverme süresi boyunca sürdürüldüğünü göstermektedir. Mikrosfer formülasyonlarının üç farklı partisi neredeyse mükemmel uygulanabilir insülin salıverilmesi ve glukodinamik profiller üretti. Bu güçlü yeniden üretebilirlik ve imalat süreci kontrolünü göstermektedir.

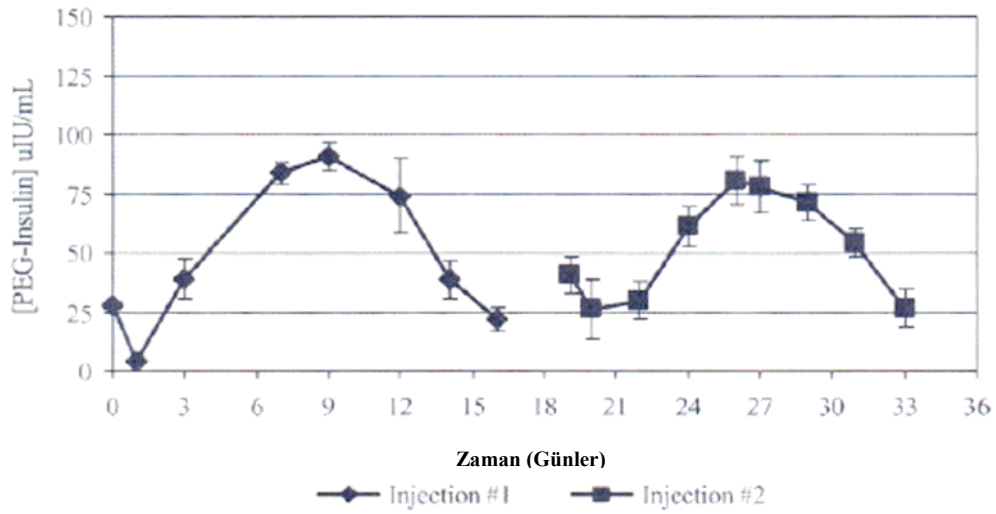


Şekil 5.16 (A) PLGA/PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri.

(B) PLGA/PEG-insülin mikrosferlerinin diyabetik farelere tek bir s.c. dozdan sonraki serum insülin düzeylerinin tedavi almayan koldaki serum insülin düzeyleriyle karşılaştırılması [6].

5.3.3.2.2.3 Tekrar eden doz farmakokinetiği

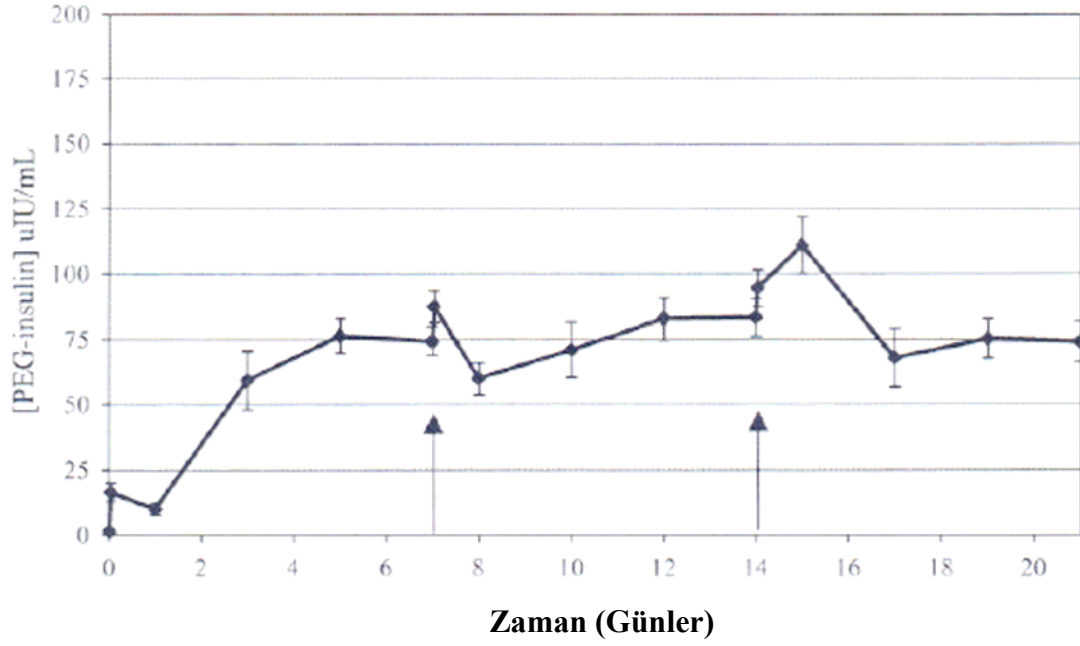
Diyabetik sıçanlara 0. günde ve yeniden 19. günde uygulama yapıldıktan sonra Serum PEG-insülin düzeylerinin farmakokinetik profili Şekil 5.17’de sunulmuştur. İnjesiyondan sonra hiçbir belirlenebilir ilaç patlaması olmamıştır ve yaklaşık 2-3 günlük aralıktan sonra her iki injesiyon sonraki 7-10 gün boyunca kolaylıkla PEGile edilmiş insülin salıvermiştir. İlaç salıverme düzeni ve büyüklüğü bir injesiyondan diğerine neredeyse benzerdi. Bu veriler farmakokinetik profile olumlu yeniden üretebilirlik göstermektedir.



Şekil 5.17 PLGA/PEG-insülin mikrosferinin tek bir s.c. dozdan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri [6].

5.3.3.2.2.4 Çoklu dozda farmakokinetik

0, 7 ve 14. günlerde doz verilen diyabetik sıçanlardaki serum düzeyleri Şekil 5.18’de gösterilmiştir. Birinci injesiyondan sonra 0-7 günler arasındaki kinetik profil, yukarıdaki çalışmalarda gözlemlenen ile aynıydı ve 3. gün itibarıyla tedavisel düzeyler elde edildi. 2. ci ve 3.cü injesiyonların ardından çok küçük düzeylerde arayışlar istisnasıyla, 50-75 μ IU/mL aralığında stabil durum serum insülin düzeyleri elde edildi ve sürdürüldü. Bu veriler stabil durum düzeylerinin çok hızlı (yani, sadece iki ya da üç dozdan sonra) elde edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 5.18 PLGA/PEG-insülin mikrosferinin 0. ve 7. günlerdeki s.c.injeksiyonundan sonra diyabetik farelerdeki serum insülin düzeyleri [6].

5.3.3.2.2.5 İnsan bazal insülin doz gereklilikleri

Bazal insülin gereklilikleri için doz düzeyleri bir hastadan diğerine makul biçimde farklılık göstermektedir fakat genel bir kural olarak tip 2 diyabetlerde insülin düzeylerini artırmak için başlangıç dozu 0.2 U/kg/gündür. 70 kg'lık bir kişi için, eğer biyolojik mevcudiyet %100 yakınındaysa bu haftada yaklaşık 100 U (yani 4 mg) insülini temsil eder. Bu çalışmada gözlemlenen kinetik profilin insanlarda tekrar edebilir olduğunu varsayarsak, %15 (w/w) PEG-insülin içeriğiyle tek doz 52 mg PLGA/ PEG-insülin mikrosferle 98 U insülin/hafta verilebilir. Bu doz düzeyi, 0.5 mL ya da daha az deri altı injeksiyonla kolaylıkla verilebilir.

5.3.4 Sonuçlar

PLGA tabanlı mikro parçacıklar hipoglisemiye neden olabilecek uygulamanın hemen ardından normalde yüksek düzeylerde insülin salıverir ve sıklıkla tam ve kontrollü bir biçimde yük salıvermede başarısız olur, bu potansiyel olarak zararlı bağışıklık tepkileriyle ve glukoz gezinmeleriyle sonuçlanır. Ancak, eğer böyle bir formülasyon belirlenebilir başlangıç patlaması olmaksızın kontrollü bir biçimde insülin açığa çıkaracaksa, diyabet hastalar için muhtemel yararları ciddi olacaktır. Bugüne kadar üretilen veriler burada açıklanan insülin PEGilasyon ve mikro kapsülleme yöntemlerinin proteini mikrosfer imalatının normalde ters etkili etkilerinden koruduğunu önermektedir. Ayrıca süreç yüksek ilaç yükleme, kapsülleme

etkililiği ve etkinliği, ihmal edilebilir başlangıç patlama salıverme ve nispeten sürekli (sıfır düzenine yakın) ilaç salıverme profili özellikle formülasyonla sonuçlanır. İki tamamlayıcı teknolojinin (yani, PEGilasyon ve mikro kapsülleme) birleşimi, bazal insülinin tek haftalık dozda sürdürülebilir olarak salınması için potansiyel sunmaktadır. Ayrıca, devam eden araştırmalar belirtmektedir ki bu yaklaşım diğer proteinlerin birkaç tedavisel uygulamada kontrollü verilmesi için yararlıdır.

5.4 Oral insülin-PEG salınım sisteminin geliştirilmesi ve in vivo değerlendirilmesi

DNA teknolojisinde yakın geçmişteki ilerlemeler, birçok proteinin ve peptidin farmasötik uygulamasına olan ilgiyi artırmıştır. Protein verilmesinde ‘bulaşıcıdan ağızdan olan dönüşüm’ gelişimi modern farmasötik teknolojide büyük bir zorluk olarak kalmaya devam ediyor. Aslında, yüksek yapısal incelik, hidrofillik ve moleküler ağırlık nedeniyle proteinler mukoza ve dolaşımdan hızlı giderme yoluyla tatmin edici olmayan emilimden geçmektedir. Ayrıca bağırsak yolu boyunca geçiş esnasında karnın yüksek asitliliğinin ve besinlerin ve gizli enzimlerin varlığıyla kimyasal ve enzimatik olarak etkisizleştirilir. Yine de, oral yolla verme, hormonlar, aşılar ve diğer biyolojik modülatörler gibi birçok proteinin uygulanması için çok çekici bir tercihtir.

Oral insülin formülasyonları geliştirmek üzere oral yolla vermenin avantajlarından yararlanmak için, birtakım çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Aslında, oral yolla verilen insülin diyabetli olmayan bireylerde insülin ayırıştırmanın fizyolojik yoluna benzer biçimde ilk olarak giriş dolaşımı üzerinden karaciğere verilir. Ayrıca, bu yolun potansiyel yararları geliştirilmiş hastalık yönetimini, genişletilmiş hasta uygunluğunu ve uzun-vadeli diyabet komplikasyonu indirimini içerir [7].

Oral yolla insülin vermeyi geliştirmek için, protez inhibitörler, tamponlar, sızma geliştiriciler, muko yapışkanlar, akıllı polimerler, kolon salıverme ya da mikro- ve nano- parçacıkların kullanımı gibi farklı stratejiler izlenmiştir. Proteinlerin biyo farmasötik özelliklerini değiştiren uygun bölümlerin eklenmesiyle protein yapısının değiştirilmesi de araştırılmıştır. Birleşme teknolojisi, lipofilik ya da glisolik moleküllerle türevlenen insülin dahil birkaç proteine uygulanmıştır. Yağlı asit birleşmesinin, örneğin biyolojik zarlar üzerinden protein emilimini artırdığı bulunmuştur, oysa polietilen glikol birleşmesi protein çözünürlüğünü artırmış ve enzimatik düzey kaybından korumuştur. Yakın bir geçmişte, B-zinciri Lys-29’a alkil grubuna bağlantılı kısa bir PEG zincirinin eklenmesiyle gelecek vadeden bir protein değiştirmesi üretilmiştir. Biyolojik etkinlik korunmuştur ve bu bileşim gastrointestinal yoldan kolaylıkla

emilmiştir [7].

Mevcut literatürler göz önüne alındığında her iki stratejinin bileşiminin, protein yapısı değişiminin uygun bir katı dozaj formülasyonu ile birlikte oral uygulama için etkin protein verme sistemlerinin üretilmesinde başarılı olabileceği açık görünmektedir.

Bu belgede hormon biyolojik birleşmesine ve muko yapışkan tabletler yüklemeye dayalı oral yolla insülin verilmesi için formülasyon çalışması hakkında bilgi veriyoruz. İnsülin hormonla geliştirilmiş stabiliteye proteazlara, pepsin ve elastaza doğru taşımak üzere bir ya da iki düşük moleküler ağırlık PEG'in eklenmesiyle modifiye edilmiştir. Pepsin ve elastaz, düşük özellikleri nedeniyle ve gastrik ve intestinal alanlarda gizlendiklerinden seçilmiştir. İnsülin-PEG biyo birleşmelerinin pepsin ve elastaza yönelik biyolojik istikrarı, tiolat poliakrilik asitin diğer çoğu gizlenmiş gastrointestinal egzo- ve endo-peptide yönelik koruyucu etki sağlayan ilaç taşıyıcı matriks olarak seçilmesiyle değerlendirilmiştir. Türev taşıyıcı IPEG molekülü muko yapışkan tablet olarak formüle edildi ve in vivo çalışmalar yürütüldü [7].

5.4.1 Malzemeler ve yöntemler

Sigma Chemical Co.'dan dana insülini, monometoksipoli(etilen glikol) 750 Da, domuz pankreasından elastaz (4 IU/mg), domuz gastrik mukozundan pepsin (3200 IU/mg), streptozotosin ve Trinder glukoz takımı elde edildi. Diğer tüm taşıyıcılar Fluka'dan temin edilmiştir.

Monometoksipolietilen glikol p-nitrofenilklorofonat olarak önceden açıklanan prosedüre göre etkinleştirildi. Polimerin saflaştırma aşamaları -20°C'de etil eterden çökeltme yoluyla gerçekleştirildi [7].

Analitik ve hazırlayıcı C18 RP sütunları Vydac tarafından temin edildi. Numune saflaştırması gerçekleştirildi. Analitik kromatografi H₂O/asetonitril ile C18 sütun yıkamayla yürütüldü. Jel sızması kromatografisi izokratik olarak 20 mM fosfat tamponla, 0.15 M NaCl, pH 7.2 ile yıkanan Superdex 75 sütunu kullanılarak gerçekleştirildi.

In vivo çalışmalar için kullanılan 23-25 g ağırlığında erkek Balb/C fareleri (Padua Üniversitesi) Farmasötik Bilimler Bölümünden temin edildi. Hayvan uygulamaları İtalya hukukuna ve Kurumsal Avrupa Kurallarına göre yürütüldü [7].

5.4.1.1 İnsülin-PEG sentezi

Önceden açıklanan yöntemle göre İnsülin-1BOC ve insülin-2BOC hazırlandı. Kısaca, dana

insülini (100 mg) 5 ml DMSO'da çözöldü ve trietilamin eklenmesiyle pH 8.5'te ayarlandı. 3:2 protein amio grubu/ di-terbutilkarbonat molar oranına ulaşmak için çözölti dimetilsulfoksitte 268 µl 0.05 M di-terbutilkarbonata eklendi. Çözölti 3 saat boyunca oda sıcaklığında korundu ve daha sonra 10 ml mineralsizleştirilmiş su eklendi, sıvı nitrojende jelatinleştirildi ve liofilleştirildi. Kuru ürün, 1 ml asetonitril / su / TFA'da eritildi ve hazırlayıcı ters faz-C18 kromatografiyle reaksiyon ürünleri saflaştırıldı. İnsölin-BOC (insölin-1BOC, insölin-2BOC ve insölin-3BOC)ye karşılık gelen zirveler toplandı, vakum altında konsantre edildi ve Kratos Kompact MALDI TOF kullanılarak kütle spektrometre ve türevlenmiş amino gruplarının belirlenmesi için spektrofotometrik analiz ile özellik verildi [7].

Yirmi miligram insölin-1BOC ya da insölin-2BOC, 1 ml DMSO içinde çözöldü ve 3:9 protein amino grubu/PEG molar oranı elde etmek üzere 23.5 mg etkinleştirilmiş 750Da PEG'e eklendi. Reaksiyon karışımı gece boyunca karıştırılarak korundu ve daha sonra 500 ml etil etere düşüröldü. Kalıntı öldüröldü ve katı ürün eritildi ve 12 saat oda sıcaklığında tutuldu. Vakum altında TFA giderildi ve kalıntı 1 ml 20mM fosfat tamponda çözöldü. İnsölin-PEG birleşmeleri FPLC üzerinde kullanılan ve aynı fosfat tamponla yıkanan Superdex 75 sütunu kullanılarak jel filtrelemeyle saflaştırıldı. İnsölin-1PEG'e ve insölin-2PEG'e karşılık gelen zirveler toplandı ve UV-Vis, dairesel dikroizm, kütle spektrometre, C18 RP-kromatografi, amino grup belirlemesi için kolorimetrik inceleme ile ve PEG belirlemesi için iodin testiyle analiz edildi. İnsölin-1PEG ve insölin-2PEG'in izomer içeriği tribütilfosfin / iodoasetamid ile insölin-PEG uygulamasıyla ve reaksiyon ürünlerinin RP-HPLC analiziyle incelendi. Yıkanan zirveler amino asit dizin analiziyle belirlendi [7].

5.4.1.2 Proteolitik çalışmalar

Doğal insölin (400 µg) ya da eşit molar miktarda insölin-1PEG ve insölin-2PEG, 988 µl 0.1M Tris HCl, 5 mM EDTA, pH 8.5 içinde eritildi ve aynı tampona 12 µl 152 µg/ml elastaz çözölti eklendi. Hormon / enzim çözöltileri 25°C'de sürdüröldü. Programlanan zamanlarda (0, 5, 20, 35, 60, 90, 120, 150, 180 dk.), 50 µl numuneler alındı ve 50 µl H₂O'ya eklendi. Numuneler liyofilize edildi ve daha sonra 50 µl H₂O/asetonitrilde yeniden eritildi (50:50). Çözölti RP-HPLC ile analiz edildi ve derecelendirilmemiş proteine karşılık gelen zirve altındaki alan standart eğriye atfedildi [7].

Doğal insölin (400 µg) ya da eşit molar miktarda insölin-1PEG 750 ve insölin-2PEG 750 eritildi ve pepsin çözöltisine eklendi. Hormon/enzim çözöltileri 25°C'de korundu. Programlanan zamanlarda (0, 5, 10, 35, 60, 90, 120 dk.) 50 µl numune çekildi ve borat

tampona eklendi. Numuneler liofile edildi ve derecelendirilmemiş protein konsantrasyonunun belirlenmesi için yukarıda bildirildiği gibi işleminden geçirildi [7].

5.4.1.3 Sentez ve poliakrilik asit-sisteine özellik verilmesi

Poliakrilik asit-sistein birleşmesi yukarıda açıklandığı gibi sentez edildi. Kısaca, L-sistein kovalans yoluyla 450 kDa moleküler kütleli poliakrilik asite eklendi. Amino asidin öncül amino grubu arasındaki karbodiimid ile vasıta yapılarak polimerin karboksilik asit grubu oluşturuldu. Sonucundaki birleşme izole edildi.

Kovalans biçiminde eklenen thiol gruplarının miktarı Ellman'ın taşıyıcıları kullanılarak belirlenmiştir [7].

5.4.1.4 Salıverme sisteminin hazırlanması

Birinci olarak, 20 mg poli(akrilik asit)-sistein birleşmesi, 2.5 mg insülin-1PEG, 0.5 mg sızma aracı glutathione ve 2 mg mannitol, 2 ml mineralsizleştirilmiş suda sulandırıldı. Karışım liofilize edildi ve 0.01 mbar (milibar) ve 2 mg mikro-tablet sıkıştırıldı. Sıkıştırma gücü tüm mikro-tabletlerin hazırlanması esnasında stabil tutuldu. Dozaj formu daha sonra önceden açıklanan bir yöntemle göre Eudragit L100-55 ile enterik kaplanmıştır [7].

5.4.1.5 İlaç salıverme çalışmaları

Enterik kaplamanın etkinliği önceden zaten sergilendiği için, ilaç salıverme çalışmaları intestinal pH şartlarında eritme davranışı üzerinde odaklandı. PEG ile insülinin oral yolla verme sisteminden in vitro salıverme oranı, tabletlerin küçüklüğü nedeniyle Birleşmiş Milletler Farmasopisiyle (USP) uygunluk içinde olmayan bir yöntemle belirlendi. Dozaj formlarının her biri 1.5-ml viyallere yerleştirildi. Kapalı tüpler daha sonra salınan su banyosuna yerleştirildi. 100 µl alikolar önceden belirlenmiş zaman noktalarında çekildi ve eşit hacimde taze salınma aracıyla değiştirildi. Küvet şartları çalışma boyunca korundu. Çekilen hacimler filtre edildi ve açığa çıkarılan insülin ters çevrili faz önceden açıklanan bir yöntemle göre HPLC kromatografiyle belirlendi. Açığa çıkarılan insülin konsantrasyonları bütünleştirilmiş zirve alanlarından çıkarıldı ve uygun bir standart eğriden karşılıklı kutuplulukla hesaplandı. Kaldırılan numuneler için kümülatif düzeltmeler yapılmıştır [7].

5.4.1.6 PEG ile insülinin FITC etiketlenmesi

İnsülinin ve PEG ile insülinin florasan etiketlenmesi önceden açıklanan bir yöntemle göre gerçekleştirildi. Bu önceki çalışmada FITC etiketli insülinin bu tür sızma çalışmaları boyunca

stabil kaldığı gösterilmiştir [7].

5.4.1.7 Sızma çalışmaları

Sızma çalışmaları, donorda ve akseptör-odacığında ve 0.64cm^2 sızma alanında 1 ml hacim sergileyen Ussing türü odacıklarda gerçekleştirildi. Kuluçka aracı 250 mM NaCl, 2.6mM MgSO_4 , 10mM KCl, 40mM glukoz ve 50 mM NaHCO_3 içermekteydi [7].

Gine domuzunu feda ettikten hemen sonra 15 cm küçük bağırsak uygulandı ve Ussing odacığına yerleştirildi. 37°C 'de %95 O_2 ve %5 CO_2 ortamında en az üç defa tüm deneyler uygulandı. Tampon çözeltisiyle 15-20 dakika ön kuluçkadan sonra, donörün kuluçka aracı aynı araçla değiştirildi. 100 μl numuneleri 2 saatlik süre boyunca her 30 dk. akseptör bölümünden çekildi. Numuneler derhal 37°C 'de dengelenen 100 μl tampon çözeltisiyle değiştirildi. Sızan ilacın miktarı fluorimetre kullanılarak belirlendi. Önceden kaldırılan numuneler için kümülatif düzeltmeler yapılmıştır [7].

Sızdırma çalışmalarından sonra araç donör odasından çıkarıldı ve 1 ml deneme mavi boya eklendi ve mukoza 30 dk. kuluçkaya yatırıldı. Mikroskopik araştırmalar mukuzun hala mevcut olduğunu ve intestinal zarın canlılığının garanti edildiğini göstermekteydi [7].

5.4.1.8 Biyolojik etkinlik değerlendirilmesi

Balb/C farelerine 65 mg/kg streptozotosin dozu uygulanmıştır. İlk uygulamadan itibaren üç gün sonra farelere aynı dozda streptozotosin uygulanmıştır. Bir hafta sonra, 30 μl kan numunesi alındı, santrifüj edilmiş ve Trinder glukoz takımı kullanılarak serumdaki glukoz düzeyleri tahmin edilmiştir. Farelerin diyabetik durumunu belirlemek için glukoz, müteakip 3 gün süreyle günde iki defa belirlenmiştir. Her biri beş fareli üç gruba deri altından 2 μg /fare doğal insülin (grup A) ya da molar denginde insülin-1PEG (grup B) ve insülin-2PEG (grup C) uygulandı. Programlanan zamanlarda serumdaki glukoz içeriği yukarıda bildirildiği gibi belirlenmiştir [7].

İnsülin-1PEG yüklü tabletler 10 diyabetli fareye (grup D) oral yoldan uygulanmıştır. Yutma refleksi mekanizmasını başlatmak için formülasyonlar boğazın çok derinine yerleştirilmiştir. Ayrıca 50 μl %0.2 (w/v) sulu askorbik asit çözeltisi uygulanmıştır. Kontrol olarak, farelere (sırasıyla grup E ve grup F) fosfat tamponda 200 μl insülin-1PEG ve insülin-2PEG çözeltisi, 0.15M NaCl, pH 7.2 (1 mg insülin dengi/ml) uygulanmıştır [7].

Kontrol olarak beş diyabetik hastalı bir grup kullanılmıştır. Hayvanlara insülin preparatları uygulanmadı ve glikemik düzeyleri 2 gün boyunca belirlenmiştir [7].

5.4.1.9 İstatistiksel veri analizi

Öğrencinin t-testi kullanılarak, aksi belirtilmedikçe asgari anlamlılık düzeyi olarak $P < 0.05$ ile istatistiksel veri analizi uygulanmıştır [7].

5.4.2 Sonuçlar

5.4.2.1 İnsülin-PEG preparatı hazırlanması

İnsülinin saflaştırılmasına göreceli di-terbütilkarbonat ile reaksiyona sokulan kromatografik düzen dört ana zirvenin varlığını göstermekteydi. Kolorimetrik analiz ve kütle spektrometre yoluyla serbest amino grubu belirleme dört insülin biçiminin belirlenmesine imkan verdi: doğal insülin, insülin-1BOC, insülin-2BOC ve insülin-3BOC. Ters aşama C18 kromatografik analiz hem saflaştırılmış insülin-1BOC hem de insülin-2BOC'un heterojen bileşimini kanıtladı. Ancak, izomerlerin niteliksel ayrıştırılması üretimden ciddi biçimde kayba neden oldu. Bu nedenle, insülin-1BOC ve insülin-2BOC etkinleştirilmiş PEG ile reaksiyondan önce daha fazla saflaştırılamamıştır [7].

Yüksek düzeyde mevcut protein amino grubu/ etkinleştirilmiş PEG molar oranı (3:9) kullanımı serbest protein amino gruplarının kapsamlı türevleştirmesine neden oldu. TFA'nın korumayı kaldırmasından sonra, insülin-1BOC-PEG'in insülin-2PEG ürettiği bulundu, öte yandan insülin-1PEG insülin-2BOC-PEG'den elde edilmekteydi. İnsülin-1PEG'in jel filtrasyonu ile saflaştırılma aşaması tamam değildir, zira küçük miktarda doğal insülin (toplam proteinin yaklaşık %10'u) kaldı. İnsülin-2PEG'in jel filtrasyon profili doğal insülin varlığını göstermemekteydi fakat insülin-2PEG'e karşılık gelen zirve küçük bir omuz sergiledi. İnsülin-1PEG'in varlığı serbest amino gruplarının koloritmik belirlenmesiyle teyit edildi. Spektrofotometrik veriler esasında, nihai üründeki insülin-1PEG içeriği %18 olarak hesaplanmıştır [7].

Tribütilfosfin/iodoasetamid uygulanan insülin-1PEG'in ve insülin-2PEG'in RP-C18 kromatografik analizi, saflaştırılmış biyo birleşmelerin heterojen bileşimini sergilemiştir. Aslında, PEG ile insülinin disülfid köprü indirimi zirvelerin eşzamanlı varlığını göstermekteydi. İnsülin B-merkaptetanol/ iodoasetamid reaksiyonundan sonra elde edilen zirvelerin analiziyle ve BOC-türevlerinin ters-faz analizine göre, insülin-1PEG'in başlıca denk molar miktarında insülin – Ly – 1PEG ve insülin-Gly-1PEG'den oluştuğu bulundu. İnsülin-2PEG örneğinde ürün başlıca insülin-Gly, Lys ve 2PEG'den oluşmaktadır [7].

5.4.2.2 Polimer açıklaması

Poliakrilik asit-sistein birleşmesi gram polimer başına 556 ± 98 tiyol grubu sergilemekteydi. Polimerin şişme davranışı ve muko yapışkan gibi özellikleri önceden sentez edilen ve açıklanan polimere göre olumlu korealasyon içindeydi [7].

5.4.2.3 Sızma çalışmaları

Sızma çalışmaları PEG'nin insülin taşınması üzerine etkisini doğrulamak üzere gerçekleştirilmiştir. PEG'nin insüline eklenmesi, bu tedavisel peptidin sızma davranışını ciddi biçimde değiştirmemiştir.

Aksine, yakın geçmişteki çalışmalar düşük molekül ağırlık PEG'lerin ilaçlara birleşmesinin Emilimi artırabileceğini sergiledi. PEG'nin ilaç sızdırıcılığına etkisiyle ve polimer büyüklüğü ve çok-noktalı birleşme durumunda birleşmenin polimer kütlesiyle sıkı biçimde ilişkilidir [7].

5.4.2.4 İlaç salıverme çalışmaları

İlaç salıverme oranı doğrudan tampon çözeltide belirlenmiştir. Sonuç olarak, PEGile edilmiş insülinin polimerik taşıyıcı matriksten sürdürülebilir salıverilmesini sergilemektedir. İlk 2 saatte nispeten düşük salıverme oranı enterik kaplama malzemesinin sulandırma süreciyle açıklanabilir. Bundan sonra, neredeyse sıfır düzen salıverme kinetiği plato fazının ardından 3 saat boyunca gözlemlenebilir. Plato aşamasına ulaşmanın bir açıklaması ilacın plastik kaba ve/veya polimerik taşıyıcı matrikse kısmen emici bağlamasıyla verilebilir [7].

5.4.2.5 Biyolojik etkinlik

Diyabetli farelere doğal insülin, insülin-1PEG ve insülin-2PEG çözeltilerinin deri altı ve oral yolla uygulanmasıyla ve tabletlerin oral yolla uygulanmasıyla *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir [7].

Glisemik profiller tüm insülin biçimlerinin benzer biyolojik ve biyofarmasötik davranış sergilediğini belirtilmektedir. Özellikle, insülin-1PEG ve insülin-2PEG çakışan profiller göstermiştir. İki PEGile edilmiş formula 180 dakika sonra gözlemlenen daha yüksek orta değer etkinliği doğal hormonla karşılaştırıldığında istatistiksek olarak anlamlı çıkmamıştır [7].

İnsülin-1PEG ve insülin-2PEG çözeltilerinin oral yolla uygulanması glukoz düzeylerini ciddi biçimde etkilememiştir. Aksine, diyabetli farelere oral yolla uygulanan poli(akrilik asit)-sistein tabletlerine formüle edilmiş insülin-1PEG'in uygulamadan sonraki 3 saat içerisinde %40 aralığında kan glukozu düzeyinde ciddi biçimde azalmayı tahrik edebilmektedir [7].

5.4.3 Tartışma

Oral yolla insülin verilmesi için etkin bir formülasyon geliştirmek üzere, bir ya da iki 750Da PEG molekülünün birleşmesiyle hormon türevleri hazırlandı ve daha sonra mukoz tabletlerine formüle edildi.

PEGilasyonun protein stabilliğini proteazlara doğru artırdığı, bağışıklık sağlayıcılığı ve anti-jenliği artırdığı ve kandaki protein sürekliliğini uzattığı bilinmektedir. Ancak, bu özelliklerin değiştirilmesi hem polimer molekül kütlesi hem de protein yüzeyine eklenmiş polimer zincirlerinin sayısı ile ilişkilidir. Önceki çalışmalar 5 kDa PEG birleşmesinin insülin biyolojik etkinliğini azalttığını ve protein emilimini geciktirdiğini sergilemiştir. PEG moleküler kütlesi arttıkça ve bunun yanı sıra protein yüzeyine bağlanan polimer zincirlerinin sayısı arttıkça protein emiliminde etkinlik azalması ve gecikmesi arttı. Bu nedenle, PEG'nin pozitif ve negatif etkilerini dengelemek için, birleşme 750Da oligomer kullanılarak gerçekleştirilmiştir [7].

Çok-aşamalı süreçle birleşmelerin hazırlanmasının, genelde protein PEGilasyonunda kabul edilen doğrudan polimer birleşmesine göre daha uygun olduğu görülmüştür. Yönlendirici çalışmalar, insülinin düşük moleküler kütle PEG'lerle farklı derece ve durumda reaksiyonunun türevlerin bir karışımını sağladığını göstermiştir. Birleşmelerin ayrıştırılması hazırlayıcı iyon değiştirici kromatografisi ya da ters-faz kromatografisi yoluyla zordu. Aynı zamanda, birleşmeler ve doğal insülin ve doğal insülin arasında ufak büyüklük farklılığı nedeniyle jel sızması kromatografisi ya da büyüklük dışlama teknikleri, mono-, di- ve tri-PEGile edilmiş insülin türevlerinin niceliksel ayrışmasına imkan vermedi. İnsülin-terbütilkarbonat türevleri belirlenmiş kütle spektrometresi vasıtasıyla niteliksel olarak izole edildi. Analitik ters faz C18 kromatografisi hem insülin-1BOC hem de insülin-2BOC'un izomerlerden oluştuğunu gösterdi. Ancak, izomer ayrıştırması son ürün düzeltmesini ciddi biçimde düşürdüğünden sonraki aşamada izomer karışımları kullanılmıştır. İzomer karışımlarının kullanımı insülin-PEG izomerleri elde etmeye yansdı. Her ne kadar literatürlerde bildirilen çalışmalar farklı biyolojik etkinlik sergileyebileceklerini gösterdiyse de izomerler daha ileri düzeyde ayrıştırılmamıştır [7].

Diyabetli farelere deri altından uygulanan doğal insülin, insülin-1PEG ve insülin-2PEG benzer hipoglisemik profiller sergiledi. Bir ya da iki 750Da PEG'in ne protein yapısını değiştirdiğini ne de reseptör karşılıklı etkileşimine müdahale etmediğini göstererek azami etkinlik, zirve zamanı ve AUC ciddi biçimde farklı değildi. Aslında doğal insülin ve bir ya da iki 750Da PEG zinciri ile modifiye edilmiş insülin benzer dairesel dikroizm yapısı

sergilemiştir [7].

Her ne kadar bir ya da iki 750Da PEG birleşmesinin reseptör karşılıklı etkileşimine müdahale etmediği bulunduysa da, protein yüzeyindeki polimerik bulut proteolitik enzimler yaklaşımını kısmen önledi. Şaşırtıcı biçimde, PEG'nin düşük moleküler kütesine rağmen, insülin-1PEG'in doğal proteinler karşılaştırıldığında ölçülebilir yüksek stabilite sergilediği görülmüştür. Hormon stabilitesindeki artış, bir 5 kDa PEG ile modifiye edilmiş insülinle elde edilenlere çok benzerdi. İki polimer zincirin eklenmesinin protein stabilitesini proteazlara doğru daha da artırdığı görülmüştür. Ancak bu sonuç literatürlerde bildirilen birçok çalışmayla uyum içerisindedir. Stabiliteğin aslında protein yüzeyindeki polimer kütesi arttıkça ya polimer molekülü kütesini artırarak ya da bağlanan polimer zincirleri sayısını artırarak artması beklenmektedir [7].

İnsülinin thiole edilmiş poliakrilik asitte yatırıldığı ve oral yolla verildiği önceki çalışmaların aksine bu çalışmada bedene verme sistemine hiçbir ek enzim engelleyici dahil edilmemiştir. Her ne kadar enterik kaplama, karındaki tedavisel taşıyıcının pepsinik düzey düşürmesi için çok katı biçimde gerekli olmasa da gastrit geçişi esnasında hormon stabilitesini artırmak için tabletler yine de polimetakrilat ile kaplanmıştır. Ayrıca yönlendirici çalışmaların ortaya çıkardığı gibi bedene aktarma sistemi intestinal mukozaya değil gastriğe bağlıdır [7].

In vivo çalışmalar insülin-1PEG içeren muko yapışkan tabletlerin oral yolla uygulanmasının diyabetli farelerde glukoz düzeylerini azaltmada başarılı olduğunu göstermiştir. Farmakolojik süre yaklaşık 3 saatlik gecikme süresi göstermiştir. Ancak hipoglisemik etki 26 saat boyunca sürdürülmüştür. Tedavisel taşıyıcının PEGilasyonundan sonra bu uzun süreli etkinlik bedene aktarma sisteminin kendisine atfedilemez. Tiyole edilmiş polimerlerin intestinal mukoz jel katmanı ile polimerik alıcı arasında disülfid bağların oluşumu nedeniyle güçlü muko yapışkan özellikler sergilediği görülmüştür. Sonuç olarak bedene aktarma sistemlerinin intestinal kalış süresi uzatılmalıdır. Ayrıca hidrofilik makro moleküllerin hücre sel benzeri alımı için thiole edilmiş polimerler güçlü sızma geliştirici özellikler göstermektedir. Önceki çalışmalar tiomerlerin bu sızma geliştirici etkisinin glutathion eklenmesiyle daha da geliştirilebileceğini ortaya çıkarmıştır. Gözlemlenen hipoglisemik etkinliğin doğal insülinin oral yolla uygulanışıyla elde edilene göre karşılaştırılabilir olduğu kaydetmeye değer. Ancak bu çalışmada beş-misli daha düşük insüline denk doz uygulanmıştır. Oral formülasyonun serum glukoz düzeylerinde indirim altındaki alanlar esasında hesaplanan farmakolojik etkinliğe karşılık uygulama dozuyla normalleştirilen enjeksiyonun %7 olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre, PEGile edilmiş insülinin thiole edilmiş polimerik taşıyıcı matris ile birlikte kullanımı

insülinin oral yolla uygulanması için ümit verici bir stratejiyi temsil etmektedir [7].

5.4.4 Sonuçlar

Eğer uygun bir formülasyon stratejisi kullanılırsa hastalıkların terapili tedavisi için peptidlerin ve proteinlerin oral yolla verilmesi mümkündür. Ümit veren bir tercih öyle görünüyor ki fiilen yeni kimyasal bütünlükler olan geliştirilmiş biyofarmasötik ve fiziksel/kimyasal özelliklerle protein türevleri kullanımını ve muko yapışkana formülasyonlarını ve enzim engelleyici katı formülasyonları içerecektir.

Mevcut çalışmada bildirilen sonuçlar bu stratejinin yüksek potansiyelinin altını çizmektedir. Aslında bu formülasyonların bunları esnekletmek ve birçok proteinin ve peptidin verilmesi için uyarlanabilir yapmak üzere geliştirmek için büyük potansiyelinin olduğunun altını çizmek ilginçtir. Özellikle, katı dozaj biçiminin fiziksel/kimyasal özelliklerinin çeşitli değiştirmeleriyle birlikte geniş çapta türevler elde etme imkanı bedene aktarma sistemlerinin yüksek tedavisel uygulamayla gerçekleştirilmesine imkan verebilir [7].

5.5 Sürdürülebilir-salıverme insülini için optimum formülasyon

İnsülin ayrıştırmayı mümkün olduğu kadar yakın olarak yeniden üretmek ve diyabet mellitus (DM) komplikasyonlarını asgariye indirmek için geliştirilmiş insülin formülasyonları için sürekli bir arayış vardır. İnsüline bağımlı DM (IDDM) hastaların genellikle bazal insülin tedarikini yemek zamanlarındaki dozlara ek olarak günde bir ya da iki defa artırması gerekir, çünkü insülin ayrıştırmasının sıfıra yakın fizyolojik düzenine ulaşmak için nispeten stabil insülin bazal düzeyine gereksinimleri vardır. Bu gibi tedaviler sadece genel şartlarını değil fakat aynı zamanda diyabetik komplikasyon olayını azalttığı görülmüştür. Eğer herhangi hızlı salıverme patlaması olmaksızın daha uzun sürelerle kontrollü bir biçimde ilacı açığa çıkaracak bir insülin formülasyonu mevcut olsaydı hastalar çoklu dozlar uygulamaktan serbest bırakılacaktı.

Herhangi hızlı salıverme aşaması olmaksızın uzun bir sürede kontrollü bir biçimde insülin açığa çıkaran bir preparat yapmak için mikrokapsüllerin kullanımını araştırıldı. Bu amaca ulaşmak için, kopoli asit uygulandı. Bu biyolojik olarak düzey düşürülebilir, injekte edilebilir, ilaçların sürdürülebilir açığa çıkarılması için uygun bir polimerdir. Daha önce bildirildiği gibi, uygun miktarda gliserin eklenmesi insülin ve PLGA karışımının bulanıklığını ciddi biçimde artırır ve sonucundaki formülasyon başlangıçtaki hızlı salıverme aşamasının çarpıcı biçimde azalmasını gösterir. Herhangi katkı maddesi olmaksızın insülin içeren PLGA mikro

kapsülleri, streptozotosin-tahrikli diyabetik sıçanlara 250U/kg uygulandığında plazma insülin düzeyini 2440.5 μ U/ml (6 saat)'e yükseltmiştir fakat düzey, en iyi formülasyonun uygulandığı sıçanlarda sadece 84.9 μ U/ml idi. Daha ileri düzeyde çalışmalar, mikrokapsül formülasyonun hazırlanması esnasında gliserin eklendiğinde az miktarda insülinin mikro kapsüllerin yüzeyinde lokalize edildiğini ortaya çıkarmıştır. Bu insülin ve PLGA'nın kompleks oluşturması ihtimalini yükseltmiştir ve yağ aşamasına gliserin eklenmesi yoluyla sıkı karşılıklı etkileşim göstermiştir. Yağ aşamasının bulanıklığını geliştirmek çabasıyla uygun miktarda gliserin, etanol ya da su eklenmiştir. Her bir durumda, insülin/PLGA karışımının sıkı parçacıklara homojenleşmesi teyit edilmiştir fakat diğer bileşimlerin daha iyi insülin formülasyonu oluşturması için hala imkan vardır. PLGA'nın moleküler ağırlığı ve mikro kapsüllerin büyüklüğü gibi diğer unsurların da değerlendirilmesi gerekir [8].

Bu çalışmada, çok daha uzun bir sürede kontrollü salıverme için insülinin mikrokapsüllerde optimum formülasyonunu hazırlamaya çalışıldı. İnsülin salıverme profilini değerlendirmek için streptozotosin-tahrikli diyabetli sıçanlarda çeşitli formülasyonlar test edilmiştir [8].

5.5.1 Malzemeler ve yöntemler

5.5.1.1 Yeniden taşıyıcılar

PLGA sentez edildi ve Wako Pure Chemical Industries Ltd. tarafından tedarik edilmiştir. Test edilen PLGA'ların özellikleri Çizelge 5.2'te gösterilmiştir.

Formulation	Insulin	PLGA Mean Mw	ZnO Fold mole to insulin	Additive	*
A	Zn-free insulin	6600 (6k)	1.2	Glycerin	
B	Zn-free insulin	6600	0	Glycerin water	Fig. 1
C	Zn-free insulin	6600	1.2	Glycerin water	Figs. 1 and 2
D	Zn-free insulin	6600	6	Glycerin water	Fig. 1
E	Zn-free insulin	6600	12	Glycerin water	Figs. 1-5
F	Zn-free insulin	4100 (4k)	1.2	Glycerin water	Fig. 2
G	Zn-free insulin	4100	12	Glycerin water	Fig. 2
H	Zn-free insulin	7900 (8k)	1.2	Glycerin water	Fig. 2
I	Zn-free insulin	7900	12	Glycerin water	Fig. 2
J	Human insulin	6600	12	Glycerin water	Fig. 3
K	Lyophilized human insulin	6600	12	Glycerin water	Fig. 3
L	Zn-free insulin	5800 (5k)	12	Glycerin water	Fig. 5

Çizelge 5.2 Çalışmada kullanılmış insülin içeren PLGA mikrokapsül formülasyonları [8].

Rekombinant insan insülini, streptozotosin ve diğer kimyasallar Wako'dan satın alınmıştır. Hücre kültürü için Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle's aracına dana cenini serumu ve antibiyotikler takviye edilmiştir [8].

5.5.1.2 İnsülin içeren PLGA mikro kapsüller

Daha önceden bildirildiği gibi Zn'siz insülin kullanılmıştır. Zn'siz insülin diyalizden sonra liofilleştirme ile elde edilmiştir. İnsan insülini ve liofile edilmiş insülin de test edilmiştir.

İnsülin (%3) içeren PLGA mikro kapsülleri, daha önce belirtildiği gibi çözücü buharlaşma yöntemi ile hazırlanmıştır. Örneğin, insülin çinko oksit ve PLGA, CH_2Cl_2 içinde çözölmüş, karıştırılmış ve S/O süspansiyonu oluşturmak üzere çalkalanmıştır. Daha sonra test katkı maddelerinden birinin uygun miktarı süspansiyonun bulanıklığını artırmak üzere eklenmiştir. Bu çözelti karıştırılarak polivinil alkol çözeltisine eklenmiştir. Sonucundaki emülsiyon organik çözücüyü buharlaştırmak ve mikro kapsüller elde etmek üzere 3 saat süreyle 1200 rpm'de karıştırılmıştır. Mikro kapsüller santrifüjlemeyle damıtılmış suyla üç defa yıkanmıştır ve daha sonra büyük parçacıkları çıkarmak için 125 μm ekran ile elenmiştir. Sonra, mikro kapsüllerin toplanmasını önlemek için mannitol eklenmiştir, bunlar da daha sonra liofile edilmiştir. Parçacık analizcisi kullanılarak parçacık büyüklüğü belirlendiğinde, orta çap $23.45 \pm 13.61 \mu\text{m}$ idi. Hazırlanan formülasyonların tamamı kullanılıncaya kadar 4°C 'de saklanmıştır.

Her bir mikro kapsül formülasyonunun insülin içeriği Lowry ve diğerlerinin insülini standart olarak kullanan bir yöntemine göre CH_2Cl_2 ve 0.01N HCL ile çıkarıldıktan sonra belirlenmiştir. İnsülinin yüksek bir yenileme oranıyla (>%98) mikrokapsüllerden çıkarılabileceği teyit edilmiştir. Kapsüllemenin etkinliği her bir formülasyon için >%90 idi [8].

5.5.1.3 Elektron mikroskopisi

İnsülin-içeren mikro kapsüller ve normal insülin SEM 4300 tarama elektron mikroskobu altında incelenmiştir [8].

5.5.1.4 Hayvanlar

SLC Deneysel Hayvanlar'dan (Shizuoka, Japonya) yedi-haftalık erkek Wistar sıçanları (220-240 g) satın alınmıştır. Hayvanlar sabit sıcaklıkta ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) ve nemde (%50-60) standart diyet ve suya serbest erişimde tutulmuştur. Hayvan odası 12 saat ışık/ karanlık döngüsünde tutulmuştur. Çalışma protokolü St. Marianna Üniversitesi Hayvan Deney Komitesi tarafından onaylanmıştır [8].

5.5.1.5 Hayvan deneyleri

Hayvan deneyleri streptozotosin (STZ)-tahrikli diyabetli sıçanlar kullanılarak yürütölmüştür.

Sıçanlar 10 mM sitrat-sitrat Na'da çözülmüş damar içi STZ injeksiyon aldıktan üç gün sonra kendilerine insülin içeren PLGA mikro kapsüllerinin tek deri altı injeksiyonu verilmiştir. Uygulamadan hemen önce mikro kapsül insülin formülasyonu %0.5 karboksimetil selülöz ve %0.1 Tween 80 içeren %5 mannitol (pH 6.5) ile dağıtılmıştır. Kan glukoz ve plazma insülin konsantrasyonlarını ölçmek üzere uygulamadan önce ve sonra alt optalmik damardan kan numuneleri toplanmıştır. Tüm numuneler 14. güne kadar sabah alınmıştır. Tüm hayvanlar standart diyet ve suya serbest erişimli tutulmuştur. Plazma insülin düzeyi RIA takımı kullanılarak belirlenmiştir ve kan glukozu düzeyi glukoz analizcisi kullanılarak glukoz oksidaz yöntemiyle kan toplamadan hemen sonra belirlenmiştir.

STZ-uygulanan sıçanların hepsi hiperglisemik idi ve plazma insülin düzeyleri 3.0 ile 5.6 $\mu\text{U/ml}$ arasında farklılık göstermekteydi. Normal uygulama yapılmamış hayvanlarda insülin düzeyi 20.4 ile 51.4 $\mu\text{U/ml}$ arasındaydı ve kan glukozu düzeyleri 98 ile 150 mg/dl arasındaydı [8].

5.5.1.6 Hücre büyüme incelemesi

NIH 3T3 hücreleri kültür aracında (%10 ısıyla etkinleştirilmiş dana cenini serumu ve anti-biyotiği takviye edilmiş DMEM) süspansiyona alınmış ve 24-kaynak doku kültür plakasına tohum ekilmiştir. Mikro kapsüllerden ya da mikro kapsüllenmemiş insülininden çıkarılan insülin hücrelere eklenmiştir ve 37°C'de havada %5 CO₂'li nemlendirilmiş bir atmosferde 24 saat kültür yapılmıştır. Daha sonra hücre büyümesi değerlendirilmiştir. Radyoaktivite sintilasyon sayacıyla hesaplanmıştır.

İnsülin asit fazlası eklenerek mikro kapsüllerden çıkarılmıştır ve NaOH ile nötralize edilmiştir.

Daha sonra çıkarılan insülin ileri liofilleştirmeye tabi tutulmuştur [8].

5.5.1.7 İstatistik analiz

Sonuçlar orta ($\pm\text{S.D.}$) olarak sunulmuştur. Farklılıkların anlamının belirlenmesi Mann-Whitney U-testi kullanılarak yapılmıştır ve $P<0.05$ gösterge anlam olarak alınmıştır [8].

5.5.2 Sonuçlar ve tartışma

5.5.2.1 Katkı maddesi

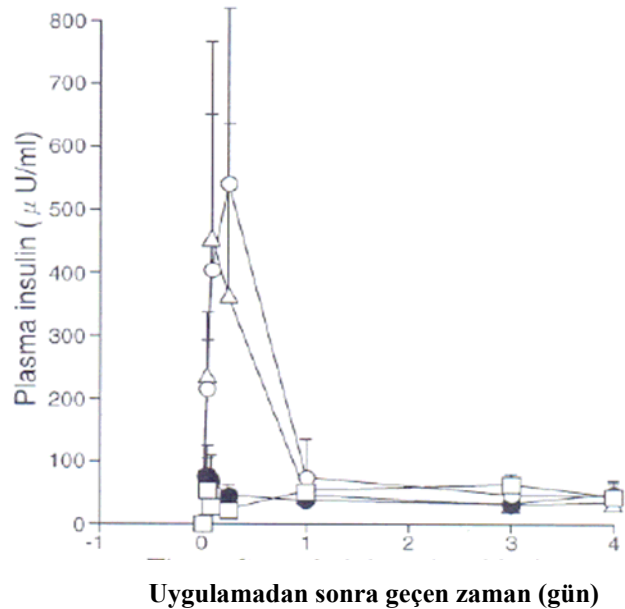
Gliserinin etkin bir katkı maddesi olduğu görülmüştür. Ancak, tek katkı madesi olarak gliserinle hazırlanan bir formülasyonun süspansiyon için büyük hacimde araca gereksinimi bulunmaktaydı. Gliserinin varlığı mikrokapsüllerin sulu araçla temasa geçtikten kısa bir süre

sonra şişmesine neden olmuş olabilir. Sonrasında, bu hızlı salıvermeye katkıda bulunmuş olabilir. Diyabetli hayvanlara formülasyonu aynı şartlar altında deri altından uygulamak da diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında daha zordu ve bu in vivo insülin salıverilmesinin büyük standart sapmasıyla sonuçlandı.

Su da, insülin ve PLGA içeren yağ aşamasının bulanıklığını geliştirmek için aynı zamanda etkin bir katkı maddesiydi. Ancak, 6.günde insülinin sonraki zirvesi 300.1 $\mu\text{U/ml}$ 'ye çıkarıldı, bu da anlamlı bir hipoglisemik etkiye sahip olmak için yeterince yüksekti. İnsülin katkı maddesi olarak sadece gliserinle karşılaştırıldığında mikro kapsüllerde daha merkezi olarak konsantre olmuştur. Ancak suyun bir avantajı liofilleştirmeye buharlaştırılabileceği, bir diğeri de sadece gliserin eklenmesiyle görülen mikro kapsüllerin şişmesini azalttığıdır. Her iki katkı maddesinin kullanımı yeniden üretilebilir injekte edilebilir bir insülin formülasyonu hazırlamamızı mümkün kıldı [8].

5.5.2.2 Çinko eklenmesi

Ancak, bu formülasyon hala ciddi miktarda erken salıverilmesine imkan verdi (Şekil 5.19). Mikro kapsüllerde bir doz 250 U/kg insülin diyabetli sıçanlara deri altından verildiğinde orta plazma insülin düzeyi 1 saatte 237.1 $\mu\text{U/ml}$ idi, oysa 2. ve 6. saatlerdeki düzey sırasıyla 455.2 ve 363.9 $\mu\text{U/ml}$ idi.



Şekil 5.19 ZnO in Mikrokapsüllerden insülin salınımının başlangıç profili üzerine etkisi (in vivo). ZnO in miktarı şu şekildedir: (○) ZnO yoktur (Formülasyon B), (Δ) 1.2-açılı molar fazla relatif insülin (Formülasyon C), (□) 6-açılı molar fazlalık (Formülasyon D), (●) 12- açılı

molar fazlalık (Formülasyon E) [8].

Yağ aşamasına tek katkı maddesi olarak suyla hazırlanmış bir formülasyon ciddi biçimde daha erken insülin açığa çıkarılması sergiledi, bu da insülin ve PLGA içeren yağ aşamasının geliştirilmiş bulanıklığının her zaman aynı etkisinin olmayabileceğini göstermekteydi. Daha küçük miktarlarda gliserin ve su ayrı ayrı yağ aşaması bulanıklığını artırabildi fakat insülinin mikro kapsüllerde lokalize olmasını tam olarak değiştirmede [8].

Yağ aşamasına çinko oksit (ZnO) eklenmesiyle bu sorunun üstesinden gelindi. ZnO olmaksızın hazırlanan bir formülasyon (Formülasyon B) çok daha büyük erken salınmaya neden oldu. Şaşırtıcı biçimde, insüline göre 12-misli molar fazlası ZnO eklendiğinde, formülasyon (Formülasyon E) erken salıvermede azalma elde etti [8].

İnsüline göre altı-misli molar ZnO fazlasıyla hazırlanan bir formülasyon (Formülasyon D) de aynı zamanda benzer insülin salıvermesi ($n=4$) gösterdi. Bu bulgular erken salıvermeyi azaltmada ZnO'nun önemli olduğunu açıkça göstermiştir. ZnO'nun kendisi gliserin ve su varken yağ aşamasında çözülmezdir. İnsülin ve PLGA da eklendiğinde, emülsiyon neredeyse açık hale geldi. Bu insülin, PLGA ve ZnO arasında birtakım karşılıklı etkileşimin insülinin mikro kapsüllerde lokalleşmesini değiştirmek için önemli olabileceğini önermektedir [8].

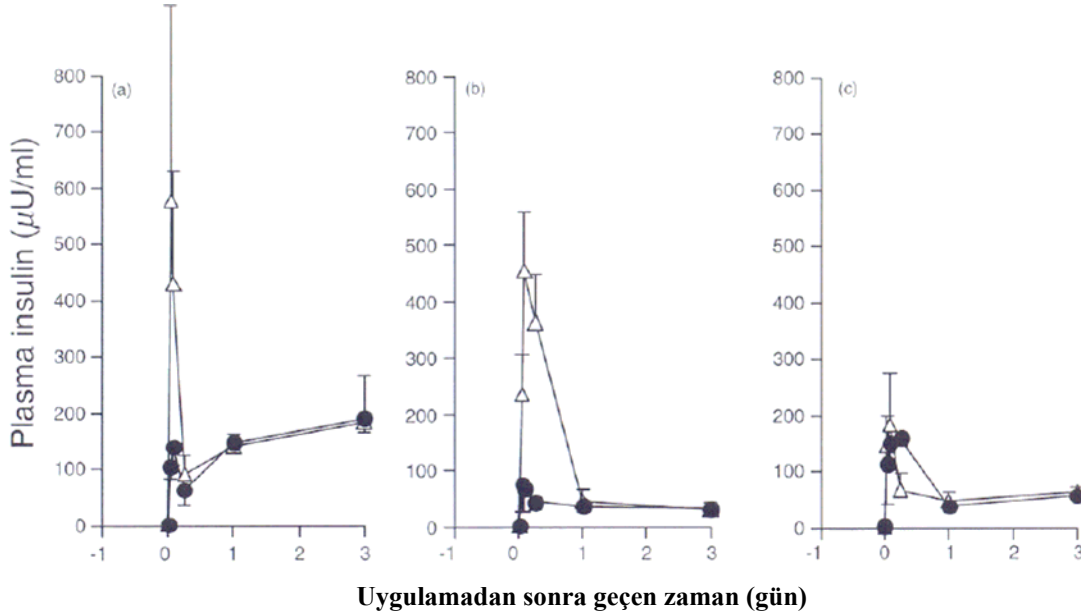
ZnO akışkanlığı arttırabilir, ve diş ve film malzemeleri gibi ürünlerde yaygın biçimde kullanılır. Gliserin eklenmesi yağ aşamasını daha akışkan yapar. Bu nedenle, hem ZnO hem de gliserin eklenmesi aralarında artan karşılıklı etkileşime yol açmış ve akışkanlığı daha da artırmış olabilir. Eğer daha az gliserin ya da su eklenmişse, mikro kapsüllerden erken salıvermeyi azaltmak üzere akışkanlığı korumak ve insülinin lokalleşmesini değiştirmek için ZnO gerekecektir [8].

Şekil 5.20'de gösterildiği gibi PLGA türü değiştirildiğinde ZnO'nun etkisi daha açıktı. 4k PLGA kullanıldığında, yüksek içerikte ZnO ile hazırlanan formülasyon insülinin hızla açığa çıkarılmasında azalma gösterdi. İnsülin içeren mikro kapsüller insülinin 1.2-misli molar fazlası ZnO ile hazırlandığında (Formülasyon F) ve diyabetik sıçanlara deri altından uygulandığında, plazma insülin düzeyi hızla yükseldi. Orta plazma insülin düzeyi 1 saatte 597.3 $\mu\text{U/ml}$ ve 2 saatte 430.4 $\mu\text{U/ml}$ idi. Aksine, 12-misli molar fazlasıyla hazırlanan bir formülasyon (Formülasyon G) 1 saatte 104.9 $\mu\text{U/ml}$ ve 2 saatte 141.6 $\mu\text{U/ml}$ plazma insülin düzeyi üretti [8].

6k PLGA (moleküler ağırlık: 6600) 1.2-katı molar fazlalı ZnO (Formülasyon C) ile

kullanıldığında plazma insülin düzeyi 455.2 $\mu\text{U/ml}$ 'ye çıktı, öte yandan 12 misli molar fazlalı ZnO (Formülasyon E) plazma insülin düzeyini ciddi biçimde azalttı.

Diğer yandan, muhtemelen daha yüksek moleküler ağırlık PLGA'ların daha yüksek doğal akışkanlığı olduğundan 8k PLGA (moleküler ağırlık: 7900) örneğinde ZnO'nun çok az etkisi gözlemlendi [8].



Şekil 5.20 Başlangıç insülin salınım profili üzerine ZnO içeriği ve PLGA türünün etkisi (in vivo). Yağ fazı içinde ZnO ile (Δ) 1.2-açılı molar fazla relatif insülin, ($\bullet$) 12- açılı molar fazlalık hazırlanan insülin içeren PLGA mikrokapsülleri hazırlanmıştır [8].

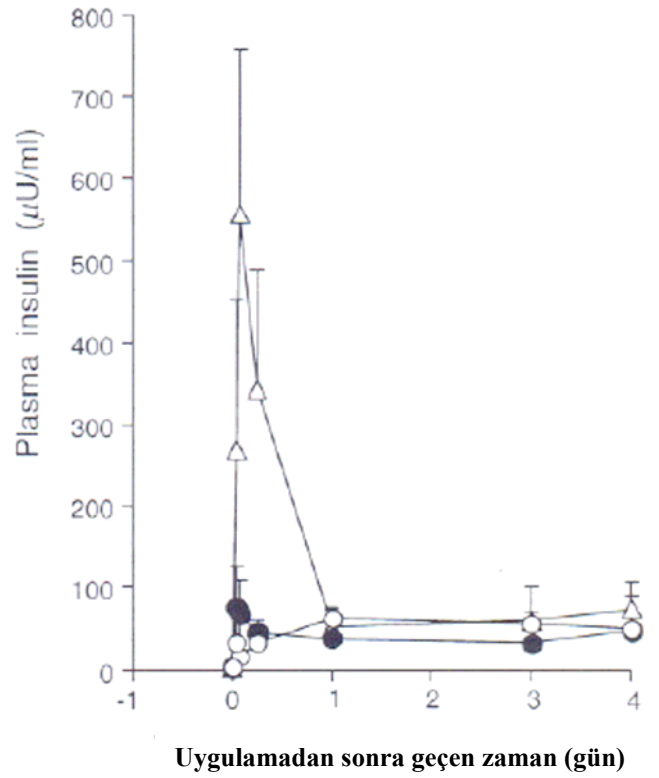
5.5.2.3 İlaç parçacıklarının büyüklüğü

Daha küçük ilaç parçacıklarının daha uygun olduğu bildirilmiştir, bu nedenle yukarıdaki tüm formülasyonlar için diyalizden sonra elde edilen liofile edilmiş insülin kullanılmıştır ve parçacık büyüklüğü genellikle 2-3 μm idi. Çinkonun proteinleri stabilizelediği bildirildiğinden, ZnO ve $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ yağ aşamasına ve su aşamasına sırasıyla eklendi.

Zn'siz insülinin istenen salıverme düzeni için uygun olduğunu teyit etmek hala gerekliydi. Test formülasyonlarının hazırlanması için sadece insan insülini değil fakat aynı zamanda liofile edilmiş insülin kullanıldı. İnsan insülini suda eritildikten ve nitrojen gazında dondurulduktan sonra yaklaşık 2-10 μm parçacık büyüklüklü liofile edilmiş insülin elde edilmiştir.

Formülasyon K (liofile insülin) ve Formülasyon E (Zn'siz insülin) çok az insülin erken salıvermesine neden oldu (Şekil 5.21) ve bu iki formülasyon arasında hiçbir ciddi farklılık

bulunmamaktaydı. İnsan insülini (20-20 μm parçacıkları) kullanılan formülasyon (Formülasyon J) erken salıvermeye imkan verdi, bu da daha küçük parçacıkların önemli olduğunu göstermektedir [8].

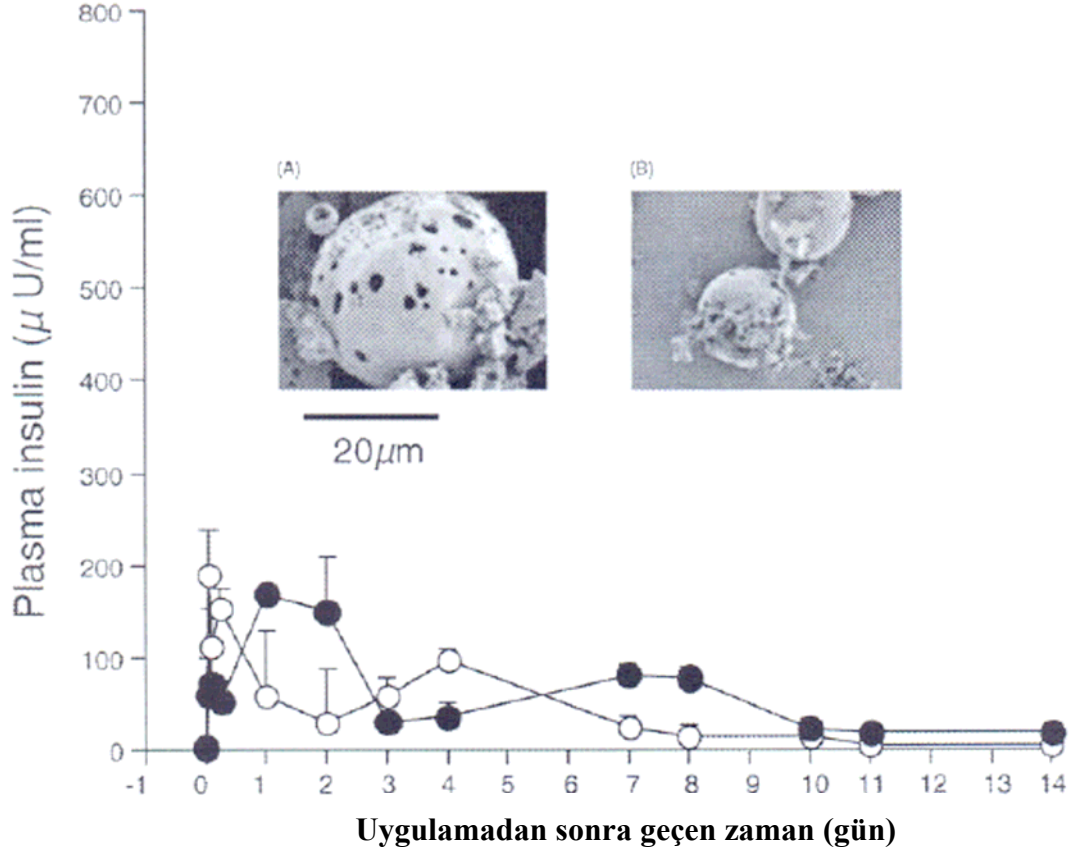


Şekil 5.21 İnsülin partikül boyutunun etkisi. İnsülin içeren PLGA mikrokapsülleri insan insülini kullanılarak hazırlanmıştır ($\diamond$) (J formülasyonu). Liyofilize insan insülini kullanılarak hazırlanan mikrokapsüller ($\circ$) (K formülasyonu), ZN- içermeyen insülin ($\bullet$) (E formülasyonu) [8].

5.5.2.4 PLGA mikro parçacıklarının büyüklüğü

Çözücü buharlaştırma yöntemimizle 15-30 μm ölçüsündeki PLGA mikro parçacıkları elde edildi. Daha küçük ve daha büyük parçacıkları Formülasyon E'nin çökeltmesi yoluyla ayırtırdık. Çökeltme Formülasyon E süspansiyonunun damıtılmış suda 10 dakika bırakılmasıyla gerçekleştirildi. Parçacıkların çapı sırasıyla $33.67 \pm 13.61 \mu\text{m}$ ve $10.98 \pm 11.21 \mu\text{m}$ idi. Şekil 5.22 her bir formülasyondan tek bir injeksiyondan sonra plazma insülin profilini göstermektedir. Daha küçük mikro kapsüllerden başlangıç insülin salıverilmesi daha büyük mikro kapsüllerle karşılaştırıldığında ciddi biçimde daha yüksekti. Büyük olanlarından injeksiyon yapılan diyabetli sıçanlarda 1 saatte, 1 günde ve 2 günde plazma insülin düzeyi sırasıyla 60.3, 168.4 ve 150.0 $\mu\text{U/ml}$ idi. Daha uzun ayrışma süresinin daha büyük mikro kapsüllerden insülinin kademeli salıverilmesine imkan verdiği görülmüştür. İkinci salıverme

aşamasının daha büyük mikro kapsüllerle ciddi olması ilginçti. Bu PLGA'nın hızla düzey kaybetmesinin hızlı insülin salıvermesine yol açtığı ihtimaliyle açıklanabilir. PLGA mikrokapsülleri benzeri in vitro ikinci salıverme profilleri göstermiştir [8].



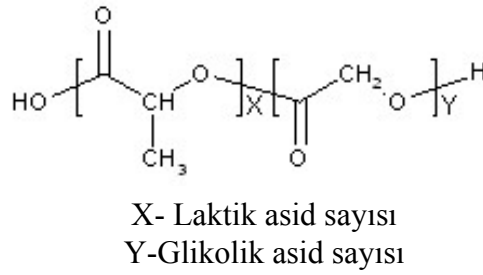
Şekil 5.22 Mikrokapsül boyutunun etkisi. İnsülin içeren PLGA partikülleri (Formülasyon E) sentifüj yöntemiyle daha büyük ve daha küçük parçacıklara bölünmüştür. (●) A; daha büyük parçalar, (○) B; daha küçük parçalar [8].

Çökeltiyle mikrokapsüllerin ayrıştırılmasından önce in vivo insülin salıverme profili sonraki deneyde gösterildiği gibi daha düzdü. Bu mikro kapsüllerin büyüklüğünde birtakım değişikliklerin hedeflenen salıverme profilini elde etmek için istenir olduğu sonucuna götürdü [8].

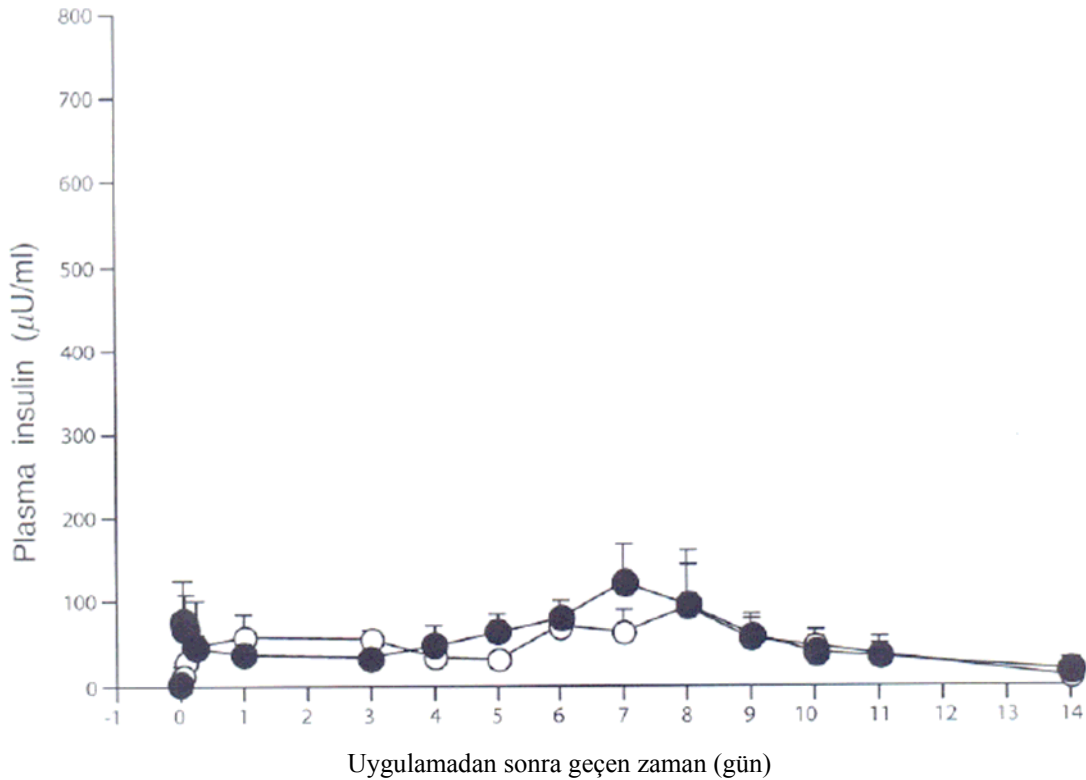
5.5.2.5 Optimum formülasyon

Diğer unsurlarla birlikte moleküler ağırlıkta, LA/GA oranında ve terminal %OH'da çeşitlilik gösteren sayısız PLGA'lar bulunmaktadır. Biyolojik olarak kademe düşürülebilir PLA ve PGAnın sonucundaki formülasyondan ilaç salıvermeyi etkileyebilecek çeşitli özellikleri bulunmaktadır. Bu çalışmada LA/GA oranı (50:50) stabillendiğinden yaklaşık 6000

moleküler ağırlıklı PLGA Şekil 2’de gösterildiği gibi istenir göründü (Formülasyon E). Formülasyon L (moleküler ağırlık: 5800) da test edildi (Şekil 5.24). Formülasyon E ve Formülasyon L’nin ürettiği ikinci salıverme zirvesi ikisi arasında hiçbir ciddi farklılık olmaksızın 122.2 µU/ml (7.Günde) ve 96.8 µU/ml (8.Günde) idi. Birinci zirve uygulamanın Formülasyon E ile 76.0 µU/ml ve Formülasyon L ile 47.9 µU/ml olduğu günde görüldü. Bu verilerden yaklaşık 6000 moleküler ağırlığın sürdürülebilir salıverme preparatı için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Yüksek insülin düzeyleri hipoglisemiye yol açabileceğinden daha düşük zirve/çukur oranı istenir. Formülasyon E 2.8 oranını ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç üzerinden hükümde bulunursak, mevcut formülasyonun optimuma yakın olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.23 PLGA nın kimyasal formülü [9].



Şekil 5.24 İnsülin içeren PLGA mikrokapsüllerinin tek bir s.c. dozundan sonra plazma insülin

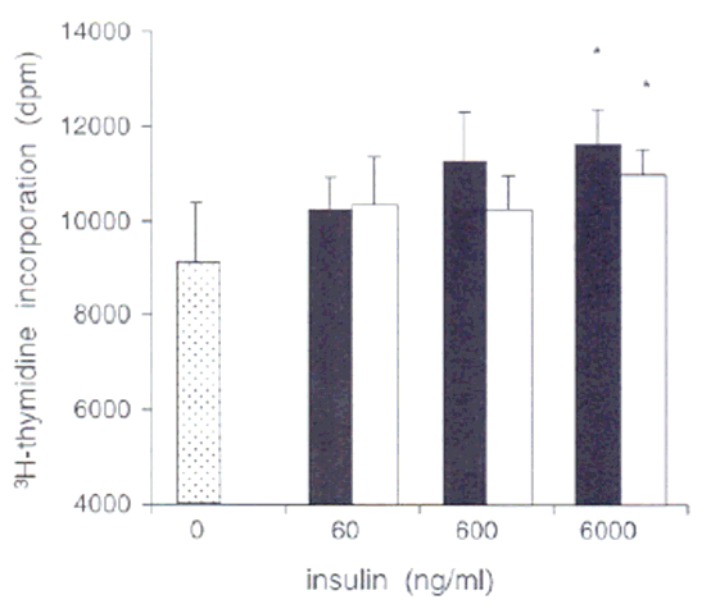
seviyeleri. (○)PLGA MA: 5800 (Formülasyon L), (●) PLGA MA: 6600 (Formülasyon E) [8].

5.5.2.6 İnsülinin biyolojik etkinliği

Mikro kapsüllerden çıkarılan insülinin hala biyolojik etkinliğini sürdürüp sürdürmediğini belirlemek hala önemliydi. İnsülin glukoz düzeylerini kontrol etmenin yanısıra büyüme unsuru olarak hareket eder. NIH 3T3 fare fibro patlamaları endojen insülin reseptörleri olmuştur ve insülinlere duyarsızdır fakat IGF-reseptörlerini ifade eder ve insülinlere karşı duyarsızdır. Hem insülin hem de IGF belli hücresel işlevleri hem çakışan reseptör hem de reseptör sonrası sinyalleme yollarıyla düzenler. Bu nedenle mikro kapsüllerden çıkarılan insülinin biyolojik etkinliğini normal insülininkiyile karşılaştırarak test etmek için bu hücreleri kullandık.

Kontrol hücrelerinde, thymidin alımı 9106 ± 1301.7 dpm idi (Şekil 5.25). İnsülin dozu timidin katkısını Şekil 6'da gösterildiği gibi bağımlı biçimde artırdı. $6 \mu\text{g/ml}$ 'de uygulanan hücrelerin radyoaktivitesi 11654.3 ± 1715.8 dpm idi (kontrole karşılık $P < 0.05$). Mikro kapsüllerden insülin de thymidine alımını artırdı. Güçlülük benzer fakat normal insüline göre hafifçe daha düşüktü. Bu kısmen çıkarılan insülinin nötrleşmeyle üretilen NaCl içermesinden olabilir fakat alıntı ve normal insülin nerdeyse eşitti [8].

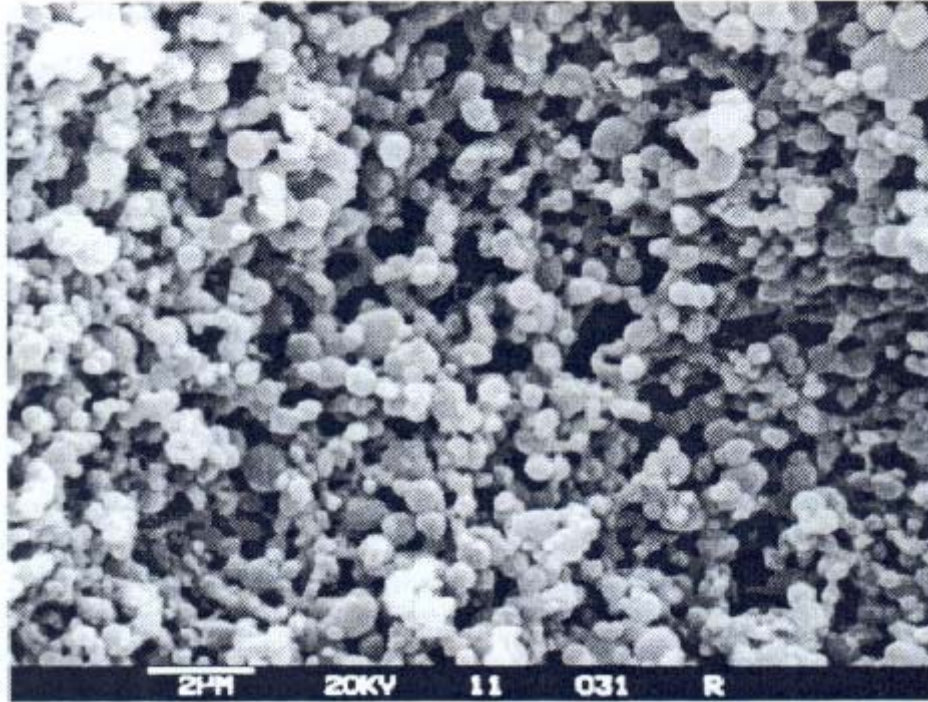
In vivo değerlendirme testi de gerçekleştirildi. STZ-tahrikli diyabetli sıçanlara 1.0 mg/kg eter insülin uygulandığında benzer bir hipoglisemik etki elde edildi [16].



Şekil 5.25 Normal insülin ile mikrokapsüllerden ekstrakte edilen insülinin biyolojik aktivitelerinin kıyaslanması [8].

5.5.3 Sonuç

Bu çalışma katkı maddeleri olarak gliserin artı suyun, yeniden üretilebilir injekte edilebilir formülasyon hazırlamamıza imkan vererek PLGA ve insülin içeren yağ aşamasının bulanıklığını azaltabileceğini göstermiştir. Başlangıçtaki hızlı insülin salıvermesini baskılamak için çinko (ZnO) eklenmesi ve daha küçük insülin parçacık büyüklüğü önemliydi. PLGA için uygun moleküler ağırlığı 6000 civarındaydı. Mikro kapsüllerin büyüklüğünde (10-30 μm) birtakım farklılıklar nispeten stabil insülin salıvermesine katkıda bulundu. Alçak zirve/çukur oranı istenir ve optimum formülasyon için bu sadece 2.8 idi. Ayrıca mikro kapsüllerden çıkarılan insülinin biyolojik etkinliğinin normal insülininkine benzer olduğu teyit edilmiştir. Dolayısıyla, şimdiki formülasyonun neredeyse optimal olduğu sonucuna varılmıştır [8].



Şekil 5.26 %30 PEG içeren insülin/PLA nanopartiküllerinin SEM da görünümü (MA:6000Da, 10000 $\times$) [14].

KAYNAKLAR

Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M., 2000, Farmakoloji Ders Kitabı, Türk Farmakoloji Derneği, Gazi Kitabevi, Ltd. Şti., Bölüm: 5.1, S: 327 ISBN: 975-7313-61-0, Ankara.

Champe, P.C., Harvey, R.A., (1997), Lippincott's Illustrated Reviews, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Konu: 24, s: 269- 279, Konu: 26, s: 291- 301, 2. Baskı, İstanbul.

Erol, M., (2001), Tus için Farmakoloji, Tıp & Teknik Yayıncılık, S: 278- 284, Ankara.

Kayaalp, S.O. (2000), Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 2. cilt, 9. Baskı, ISBN:975-95341-7-7, Konu: 76, 77: Sayfa: 1249- 1293

Kocatürk, U. (2000), Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü, Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 975-7695-03-3, İstanbul.

Koolman, J., Röhm, K.H. (2003), Renkli Biyokimya Atlası, Nobel Tıp Kitabevleri, Tic. Ltd. Şti., C: Savaş Ciltevi, S: 77- 165, ISBN: 975-420-248-6, İstanbul.

LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M., (2000), Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text, Ed: 2, ISBN: 0-7817-2058-3, USA.

Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., (1998), Lippincott's Illustrated Reviews, Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Konu: 26, s: 255- 261, 2. Baskı, İstanbul.

Novo Nordisk Sağlık Ürünleri Tic. Ltd. Şti., NovoMix 50 Flexpen 3ml, 100 U/ml, Modül 3.2.S.1 Genel Bilgiler, Versiyon:1

Novo Nordisk, 2001, "Interactive Diabetes Training Programme" Reference Text.

Steiner, D.F., (2005), Insulin Biosynthesis, Current Medicine Group Ltd., ISBN: 1-85873-856-3, London, UK.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1]<http://www.med.unibs.it/~marchesi/pps97/course/section11/insulin.html>

[2]http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_struct.html

[3]http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_Article

[4]<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin.html>

[5]<http://www.medscape.com>

[6]http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T3D-4G24X7P-2-M&_cdi=4944&user=2332707&_orig=search&_coverDate

[7]http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=291905757&-sort=d&_st=0l_acct=C000.html

[8]<http://www.medscape.com/medline/abstract/15129976?queryText=polymerinsulinconjugate.html>

[9]<http://en.wikipedia.org/wiki/PLGA>

[10] www.novoturk.com

[11] www.novonordisk.com

[12] [http://www.medscape.com/medline/abstract/12809778?queryText=polyethyleneglycol insulin.html](http://www.medscape.com/medline/abstract/12809778?queryText=polyethyleneglycol%20insulin.html)

[13] [http://www.medscape.com/medline/abstract/15147809?queryText=polyethyleneglycol insulin.html](http://www.medscape.com/medline/abstract/15147809?queryText=polyethyleneglycol%20insulin.html)

[14] <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/85512791/ABSTRACT>

[15] <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/content/full/295/2/594>

[16] <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-02-26-3/vet-26-3-18-0101-23.pdf>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1989-1997	Özel Kültür Fen Lisesi
Lisans	1998-2002	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Bölümü
Yüksek Lisans	2003-2006	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı