



EQUIDYNE SYSTEMS, INC.
TECHNISCHER REPORT TR-105

**Beibehaltung der strukturellen
Eigenschaften/Wirksamkeit von Insulinen**

REFERENZ: PROTOKOLL DER ANALYTISCHEN UNTERSUCHUNG #EquA-003

Autor: Mark Sarno, Vision Biotechnology Consulting, 7. April 2000

Vision Biotechnology Consulting
306-N West EL Norte Pkwy. PMB 311
Escondido, CA 92026
Phone/Fax: 760-634-2999
misarno@aol.com
<http://members.aol.com/lDsarno>



INNALT

- I. EINFÜHRUNG UND ZWECK**
- II. GELTUNGSBEREICH**
- III. AKRONYME UND BEGRIFFSDEFINITIONEN**
- IV. DURCHGEFÜHRT VON**
- V. REFERENZEN**
- VI. GERÄTE, MATERIALIEN UND METHODEN**
- VII. ERGEBNISSE**
- VIII. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND ANMERKUNGEN**

I. EINFÜHRUNG UND ZWECK

Das Injektionsgerät **INJEX™** der Equidyne Systems, Inc. ist ein von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (für subkutane Injektionen) genehmigter nadelloser Injektor, der eine mechanische Drucktechnologie nutzt, um 0,05 - 0,5 ml einer Lösung durch eine Öffnung von 0,006" (0,1524 mm - Anm. d. Ü.) mit einem Druck von ca. 3000 psi (210,92 kg/cm² - Anm. d. Ü.) zu spritzen. In der Vergangenheit wurden sowohl von verschiedenen pharmazeutischen Unternehmen als auch von Equidyne Untersuchungen durchgeführt, um zu ermitteln, ob die Prüfsubstanzen durch den bei der Injektion auftretenden Druck "gespalten", deaktiviert oder anderweitig beschädigt werden. Eine vorangegangene, von Equidyne (Protokoll EquA-001) durchgeführte Studie zeigte, dass die Jet-Injektion auf die Struktur verschiedener Modellverbindungen mit einem Molekulargewicht von 700 bis ca. 1 Million Dalton keine erkennbaren Auswirkungen hatte.

Seitdem wurde in verschiedenen Publikationen die Befürchtung geäußert, dass Insuline, insbesondere solche Präparationen, die aus kristallinen Zink-Insulin-Suspensionen bestehen oder die Protaminsalze im isophanen Verhältnis enthalten, mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Jet-Injektionsverfahren denaturiert werden könnten. Derartige Informationen waren jedoch entweder anekdotisch oder beruhten auf Erfahrungen mit anderen Jet-Injektoren als **INJEX™**.

Daher hatte diese Studie zum Ziel, bei einer Vielzahl unterschiedlicher Insulinzubereitungen zu ermitteln, ob deren Molekularstruktur und/oder Wirksamkeit nach der Injektion mit dem nadellosen **INJEX™**-System erhalten bleibt. Hierzu wurden Vergleiche zur Applikation mit einer Standard-Spritze sowie einem jeweiligen Kontroll-Rückstellmuster durchgeführt.

II. GELTUNGSBEREICH

Die Methoden, Beobachtungen, Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieses Berichtes sind zur Beurteilung molekularer Schäden an verschiedenen schnell, kurzfristig, mittelfristig und langfristig wirkenden Insulinen nach Injektion mit dem **INJEX™**-Injektor im Vergleich zu einem Kontroll-Rückstellmuster und einer Standard-Spritze mit Nadel geeignet.

III. AKRONYME UND BEGRIFFSDEFINITIONEN

- Schnell wirkende Insuline - Insulin-Formulierungen, die aufgrund ihres pharmakokinetischen Profils innerhalb von 8 Stunden völlig eliminiert werden (aus euglykämischen Clamp-Studien an gesunden Probanden)
- Kurzfristig wirkende Insuline - Insulin-Formulierungen, die aufgrund ihres pharmakokinetischen Profils innerhalb von 12 Stunden völlig eliminiert werden (euglykämische Clamp-Studien)
- Mittelfristig wirkende Insuline - Insulin-Formulierungen, die aufgrund ihres pharmakokinetischen Profils innerhalb von 20 bis 22 Stunden völlig eliminiert werden (euglykämische Clamp-Studien)
- Langfristig wirkende Insuline - Insulin-Formulierungen, die aufgrund ihres pharmakokinetischen Profils innerhalb von 24 bis 26 Stunden völlig eliminiert werden (euglykämische Clamp-Studien)

IV. DURCHGEFÜHRT VON

Diese Studie wurde von Mark J. Sarno, wissenschaftlicher Berater für Equidyne Systems und Gründungsmitglied der Vision Biotechnology Consulting, durchgeführt, gemanagt und ausgewertet.





V. REFERENZEN

Protokoll EquA-003

VI. GERÄTE, MATERIALIEN UND METHODEN

Studienübersicht

Die Studie wurde als in vitro Untersuchung unter Verwendung einer immunometrischen Methode zur Beschreibung der Ergebnisse angelegt.

Geräte

Für die Studie waren Equidyne **INJEX™**-Injektoren (0,3 und 0,5 ml), Reset-Boxen, Ampullen geeigneter Größe und kleine Flaschen-Adapter erforderlich. Zusätzlich wurden Becton-Dickinson-Spritzen (0,5 ml) sowie 28-er Nadeln benötigt.

Zusammenfassung der Methoden

A. Materialien

Die untersuchten Insuline stammen von verschiedenen Spezies bzw. Expressionssystemen (Schwein, Rind, human rekombinant) und von verschiedenen Herstellern (Eli Lilly, Novo Nordisk), besitzen unterschiedliche Wirkungsdauer (schnell wirkend, kurzfristig wirkend, mittelfristig wirkend und langfristig wirkend) und bestehen aus unterschiedlichen Formulierungen (Lösungen, Kristallsuspensionen). Die Nenn-Konzentration (Etikett-Angabe) für alle Arzneimittel betrug 100 Einheiten/Milliliter (I.E./ml).

Diese Präparate werden in untenstehender Tabelle genauer beschrieben.

TABELLE I/A: Beschreibung der in der Studie verwendeten Arzneimittel (amerikanische Präparatenamen)

INSULIN	WIRKUNGSDAUER	QUELLE	FORMULIERUNG	HERSTELLER
Humalog	Schnell	Mensch	Lösung	Eli Lilly
Velosulin	Schnell	Mensch	Lösung	Novo Nordisk
Humulin R	Kurz	Mensch	Lösung	Eli Lilly
Novolin R	Kurz	Mensch	Lösung	Novo Nordisk
Lente Iletin I	Mittel	Rind/Schwein	Kristallsuspension	Eli Lilly
Humulin N	Mittel	Mensch	Kristallsuspension	Eli Lilly
Humulin L	Mittel	Mensch	Kristallsuspension	Eli Lilly
NPH Iletin I	Mittel	Rind/Schwein	Kristallsuspension	Eli Lilly
Humulin U	Lang	Mensch	Kristallsuspension	Eli Lilly

TABELLE I/B: Beschreibung der in der Studie verwendeten Arzneimittel (deutsche Präparatenamen)

INSULIN	WIRKUNGSDAUER	SPEZIES	FORMULIERUNG	HERSTELLER
Humalog	Schnell	Mensch	Lösung	Eli Lilly
Velasulin	Schnell	Mensch	Lösung	Novo Nordisk
Huminsulin N	Kurz	Mensch	Lösung	Eli Lilly
Actrapid	Kurz	Mensch	Lösung	Novo Nordisk
*Lente Iletin I	Mittel	Rind/Schwein	Kristallsuspension	Eli Lilly
Huminsulin Basal	Mittel	Mensch	Suspension (NPH)	Eli Lilly
Huminsulin long	Mittel	Mensch	Kristallsuspension	Eli Lilly
*NPH Iletin I	Mittel	Rind/Schwein	Kristallsuspension	Eli Lilly
Huminsulin Ultra	Lang	Mensch	Kristallsuspension	Eli Lilly

* in Deutschland nicht erhältlich

B. Meßverfahren

Die Insuline wurden mittels Radioimmunassay (RIA) gemessen. Der Assay verwendet als primären Antikörper ein für Insulin spezifisches Meerschweinchen-Antiserum sowie ein mit radioaktivem Jod markiertes rekombinantes menschliches Insulin als Tracer. Ein zweiter Antikörper, der für Meerschweinchen-Immunglobulin spezifisch ist, wird zur Präzipitation der Immunkomplexe genutzt. Jede Probe wurde zweifach (parallel) bestimmt. Die Bestimmungen wurden von der Esoterix Unit of Endocrine Sciences (Calabasas, CA) ausgeführt. Alle Proben mußten verdünnt werden, um Konzentrationen zu erreichen, die innerhalb des linearen quantitativen Bereichs des Assays (0 - 60µE/ml) lagen.

C. Test-Injektionen

Mit jedem Insulin wurden pro Applikationsmethode sechs Verabreichungen durchgeführt, d. h. 0,3 ml wurden drei mal mit einer 0,5 ml Becton-Dickinson-Spritze mit 28er-Nadel in zwei Typ-I-Glasbehälter gegeben; weitere sechs Aliquote von 0,3 ml wurden mit dem **INJEX™**-Injektor (0,3 ml) in zwei Typ-I-Glasbehälter appliziert und sechs weitere Aliquote von 0,5 ml wurden mit dem **INJEX™**-Injektor (0,5 ml) in zwei Typ-I-Glasbehälter gegeben. Von jedem Präparat wurde vor der Applikation ein Kontrollmuster einbehalten. Die **INJEX™**- und Spritzen-Aliquote wurden dann mit Hilfe des oben beschriebenen Radioimmunassays mit den Rückstellmustern verglichen.

D. Statistische Verfahren

Zum Vergleich der Ergebnisse (I.E./ml), die mit den **INJEX™**- (0,3ml- und 0,5ml) Modellen, den Nadelspritzen und den Kontrolllösungen erhalten wurden, kamen statistische Standardverfahren zum Einsatz. Die Durchschnittswerte und die Standardabweichungen sowie die prozentualen Schwankungskoeffizienten (% CV) werden angegeben. Zusätzlich wurden die mit **INJEX™** (0,3 ml- und 0,5 ml-Modelle), mit der Spritze und die aus den Kontrollmustern erhaltenen Insulinwerte mit Hilfe des Student-t-Test parametrisch verglichen. Angegeben wurden die Unterschiede zwischen den Applikationsmethoden und gegenüber den Kontrollmustern. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.





VII. ERGEBNISSE

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Immunoassay-Analyse. Für jede Insulin-Injektion mit dem **INJEX™**-Injektor (0,3 ml- und 0,5 ml-Modell) und der Spritze sowie für die Kontrollen werden das Mittel und die Standardabweichung (SD) angegeben.

TABELLE 2: Immunassay-Ergebnisse aufgeschlüsselt nach Insulin und Injektor bzw. Kontrolle

INSULIN	KONTROLLE Mittl. E/ml (SD)	0,3 ml-Injex Mittl. E/ml (SD)	0,5 ml-Injex Mittl. E/ml (SD)	Spritze Mittl. E/ml (SD)
Humalog	89,94 (4,64)	86,54 (9,35)	88,39 (7,79)	87,94 (5,77)
Velosulin	88,98 (4,61)	98,94 (6,30)*	100,45 (2,41)*	90,47 (2,71)
Humulin R	93,33 (2,36)	94,53 (4,84)	102,70 (2,50)*	89,79 (1,81)
Novolin R	91,42 (0,28)	99,20 (4,86)	92,36 (10,25)	92,79 (0,76)
Lente Iletin I	96,16 (3,62)	86,34 (13,51)	83,60 (3,31)	92,72 (9,61)
Humulin N	104,86 (0,11)	92,57 (11,34)	89,87 (4,83)	93,88 (10,58)
Humulin L	104,77 (3,01)	97,66 (14,57)	99,67 (10,00)	101,08 (10,85)
NPH Iletin I	87,19 (0,46)	88,29 (13,86)	89,45 (6,89)	78,21 (5,0)
Humulin U	110,33 (1,89)	109,52 (0,88)	101,01 (10,19)	103,35 (6,51)

*# p<0,05 gegenüber Kontrolle

Die Ergebnisse zeigen, dass nach der Injektion weder mit dem **INJEX™**-Injektor noch mit der Spritze im Vergleich zur Kontrolle ein Verlust an Wirksamkeit des Insulins eingetreten ist. Tatsächlich wurden als einziger statistisch signifikanter Unterschied (Student-t: p<0,05) *höhere* Insulinwerte bei Velosulin- und Humulin R-Lösungen, die über **INJEX™**-Injektoren injiziert wurden, gegenüber den Kontrollmustern festgestellt.

Die Abbildungen 1 - 4 erläutern die Ergebnisse in grafischer Form für die einzelnen Insulinpräparate unterschiedlicher Aktivität (schnell, kurzfristig, mittelfristig, langfristig); Fehler-Balken = 1 SD.

ABBILDUNG 1:

Werte (I.E./ml) nach der Injektion von schnell wirkenden Insulinen aufgeschlüsselt nach Injektionsmethode

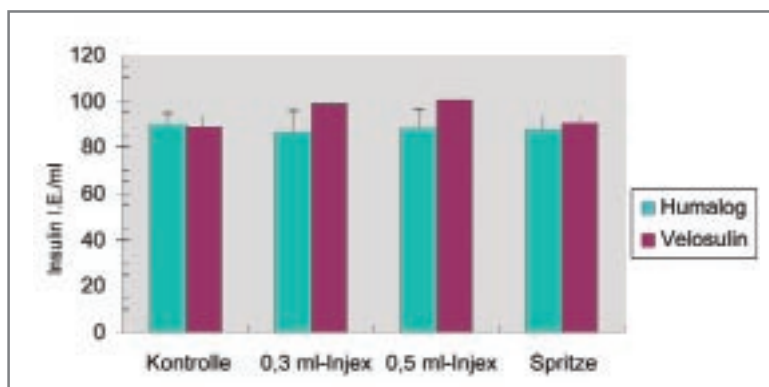


ABBILDUNG 2:

Werte (I.E./ml) nach der Injektion von kurzfristig wirkenden Insulinen aufgeschlüsselt nach Injektionsmethode

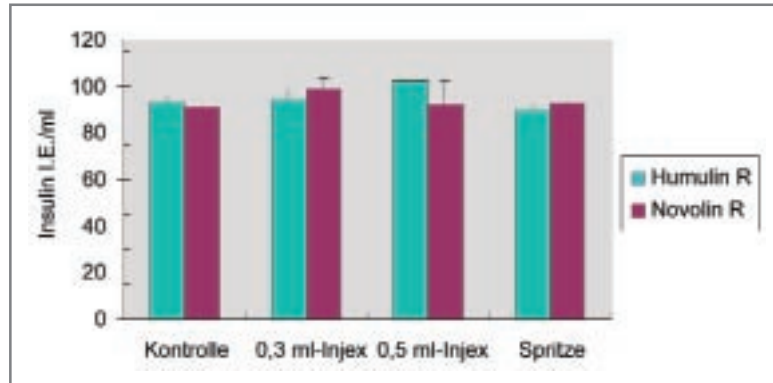


ABBILDUNG 3:

Werte (I.E./ml) nach der Injektion von mittelfristig wirkenden Insulinen aufgeschlüsselt nach Injektionsmethode

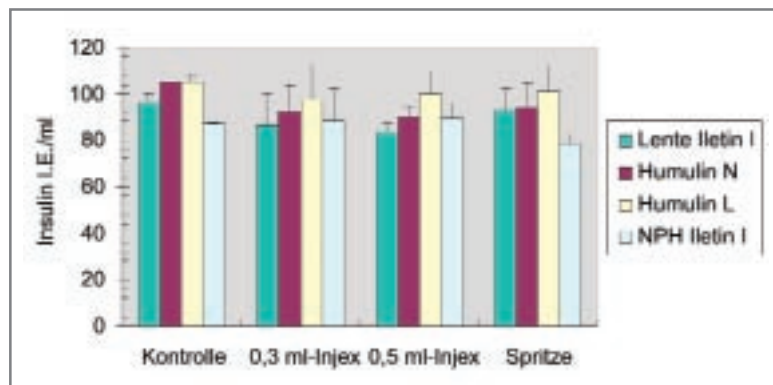
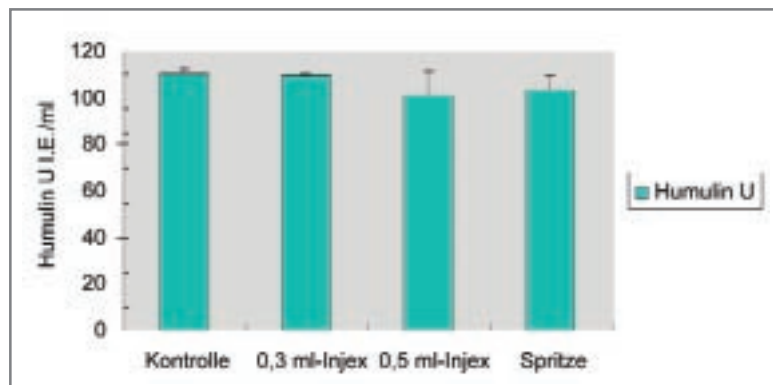


ABBILDUNG 4:

Werte (I.E./ml) nach der Injektion von langfristig wirkendem Humulin U aufgeschlüsselt nach Injektionsmethode





VIII. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND ANMERKUNGEN

Diese in vitro Studie weist die vollständige Beibehaltung der molekularen Identität der mit dem **INJEX™**-Injektor applizierten Insuline nach. Es wurden mehrere Insulinarten verschiedener Hersteller untersucht. Dabei handelte es sich um Prüfpräparate unterschiedlicher Wirkdauer und Zubereitung aus unterschiedlichen Spezies. In jedem einzelnen Fall wurde die Immunreaktivität bewahrt, was darauf schließen lässt, dass trotz des vom **INJEX™**-Verfahren angewandten hohen Injektionsdrucks die Epitop-Anteile intakt blieben. Es ist daher erlaubt, anzunehmen, dass, wenn die Epitope unversehrt bleiben, aller Wahrscheinlichkeit nach auch die gesamte Primär- und Sekundärstruktur des Moleküls erhalten bleibt. Die molekularen Epitope von Peptid-/Protein-Molekülen liegen im allgemeinen in der Größenordnung von einigen zehn Aminosäuren. Da Insulin ein Dipeptid in der Größenordnung von 50 Aminosäuren ist, ist es unwahrscheinlich, dass eine Aufspaltung erfolgte.

Weiterhin müssen Protein-Epitope im allgemeinen eine dreidimensionale Konformation aufweisen, die der des ursprünglichen Antigens, das zur Produktion und Auswahl der Antikörper diene, entspricht. Da diese Studie keinen Verlust der Immunreaktivität feststellen konnte, bleibt die dreidimensionale Konformation (Tertiärstruktur) des Moleküls auch nach der Injektion erhalten. Dies ist ein wichtiges Resultat, da Insulin ein komplexes Dipeptid mit zwei Disulfid-Brücken ist, die die Polypeptid-Ketten verbinden. Daher ist die Schlussfolgerung zulässig, dass es zu keiner Beschädigung der Molekülstruktur (Spaltung der Disulfid-Brücken oder Auflösung der Tertiärstruktur) als Folge der Injektion gekommen ist.

Um jedoch die Fähigkeit des **INJEX™**-Systems zur sicheren und wirksamen Applikation von Insulin weiter zu untersuchen, sind Prüfungen am Menschen angezeigt. Diese sollten am geeignetsten als euglykämische Clamp-Studien an gesunden Erwachsenen erfolgen. Für das sowohl über **INJEX™** als auch über eine Standard-Spritze mit Nadel applizierte Insulin müsste dann die Pharmakokinetik ermittelt werden.

Hochachtungsvoll

Mark J. Sarno

Vision Biotechnology Consulting