

Türkiye’de İnsüline Ait Satış Verileri ve Referans İnsülin Aspart ile Biyobenzerinin Analitik Karşılaştırılması

Onur Hakkı Dal, Ali Demir Sezer

ÖZET

Son yıllarda ilaç sanayinin ve ilaç biyoteknolojisinin en popüler konularından biri biyobenzerlerdir.

Üretimleri daha karmaşık süreçler içeren biyoteknolojik ürünler, patentlerinin de bitmeye yaklaşması veya bitmesi ile ilgi odağı olmaktadır. Jenerik ürünler ile karşılaştırıldığında karmaşık süreçler sadece üretim ile sınırlı değildir. Geliştirme, klinik süreçleri ve pazara erişim süreçleri de zorlu ve maliyetlidir. Bu zorluklara rağmen biyobenzer geliştiren ve geliştirme çalışmaları devam eden birçok şirket bulunmaktadır.

Jenerikler ile ilişkili olarak geçtiğimiz uzun yıllara ait net veriler olmasına rağmen biyobenzerler için birçok başlık jeneriklere kıyasla yeni tartışılmaya başlanmıştır. Bu başlıklar arasında

biyobenzerlerin ekonomik katkısı, kamu maliyetine etkileri, hasta erişimi, klinik çalışmalar ve referans ürün ile karşılaştırma çalışmalarını sayabiliriz.

Bu araştırma kapsamında 1982 yılında ilk onay alıp, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş biyolojik ürün olan insülin içeren ürünlerin küresel ve Türkiye’deki satışları ele alınmıştır. Araştırmada ayrıca referans insülin aspart ürünü ile insülin aspart biyobenzerinin analitik olarak karşılaştırılması ele alınmıştır, geliştirme ve ruhsat süreçlerinde kullanılabilecek olası başlıklar irdelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoteknolojik ilaç, Biyobenzer, insülin, insülin aspart, peptid haritalama

1. GİRİŞ

Biyoteknolojik ilaçlar, patent sürelerinin sona ermesi ve bitmeye yaklaşması ile birlikte ilaç sektörünün ilgi odağı olmuştur (1).

Biyolojik/biyoteknolojik ilaçlar canlı organizmalardan üretildiği için, üretim konuları kimyasal ilaç pazarı ile kıyaslandığında daha önemlidir. Ayrım sadece üretim ile değildir: Biyobenzer ürünlerin pazara erişimindeki engeller jenerik üreticilerin karşılaştıklarından çok daha zorludur. Ürün güvenliği, fiyatlandırma, üretim, pazara giriş engelleri, doktorların kabulü ve pazarlaması gibi çeşitli faktörler biyobenzer pazarının jenerik pazarından farklı gelişmesine neden olmaktadır (1).

Biyoteknolojik ürünler birçok açıdan ele alınabilir. Bu başlıklar arasından, özellikle kamuyu ve sağlık harcamalarını etkilediği için, en önemlilerinden biri ekonomidir.

Jeneriklerin kamu yararına ve ekonomiye katkıları konusunda net bir oran ve yarar sağladığı bilinmesine rağmen, mevcut biyobenzer ürünler ile sağlanan ekonomik yararın tam bir karşılığı bilinmemektedir. Her ne kadar biyobenzerler konvansiyonel jenerik ilaçlar kadar fiyat düşüşü

Onur Hakkı Dal, Ali Demir SEZER
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 34668, Haydarpaşa, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar:
Ali Demir SEZER
e-posta: adsezer@marmara.edu.tr

Submitted / Gönderilme: 31.01.2017 **Revised / Düzeltme:** 30.04.2017
Accepted / Kabul: 04.05.2017

sağlayamasa da sağlık maliyeti açısından daha kârlı oldukları görülmektedir (4). Ekonomik olarak da katkı sağladığını düşünebiliriz: Biyobenzerlerin kalitesi ile ilgili soruların ekonomi başlığından sonra gelmesi ile ilişkili olarak; çalışma kapsamında 1982 yılında ilk onay alıp, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş biyolojik ürün olan, küresel satışları 2011 itibariyle 16,7 milyar \$'a ulaşan insülin için referans bitmiş ürün ve insülin aspart biyobenzerinin analitik olarak karşılaştırılması ele alınmıştır (2, 3).

Bugün piyasada, üretiliş ve kullanım açısından 5 tip insülin bulunmaktadır ve önümüzdeki birkaç yılda patentlerin bitmesi ile biyobenzer insülinlerin pazara gireceği öngörülmektedir. Biyobenzer insülinler diyabet tedavi maliyetini düşürme potansiyeline sahiptirler, insülin tedavisine erişimi kolaylaştıracak ve diyabetliler için mevcut insülin markalarının sayısını arttıracakları öngörülmektedir. Diğer yandan biyobenzer insülinler küresel pazarda başarılı olmadan önce ruhsatlandırma ile ilgili pazara giriş engellerinin, çeşitli ticari taleplerin, hem yerleşmiş hem de yeni jenerasyon markalı insülin ürünlerinin etkin karşı rekabetinin üstesinden gelmeleri gerekecektir (2). Bu faktörler dışında bir üretici, henüz bir biyobenzer insülin (aspart) olmayan Avrupa'da veya Amerika'da onay alabilmek için pazarda mevcut insülin formülasyonlarına benzer olan bir etkinlik ve güvenlik profili vermesi gerekmektedir. Marvel'in klinik çalışmada biyobenzer ürünün referans ürüne benzer etkinlik göstermemesi göz önünde bulundurularak EMA tarafından reddedilen biyobenzer insülin başvuru örneği insülin biyobenzerlerinin karşılaşıcağı mevzuat veya klinik başlıklarındaki zorluklara bir bakış sağlamaktadır (5).

Biyobenzerlerin Ekonomisi Hakkında Genel Bilgiler

Biyobenzerlerin geliştirilmesi yaklaşık olarak 7-8 sene sürmektedir ve 100 milyon dolar ile 250 milyon dolarlık bir geliştirme ve pazarlama yatırımı gerektirmektedir. Bu rakam 1 milyon dolar ile 4 milyon dolar arasında değişen jenerik yatırımı ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. 2009 satışları 51 milyar doları bulan 32 biyolojik ürünün patenti 2015 itibariyle bitmiştir. Bu sürenin sona ermesi ile biyobenzer ürünlerin bu ürün gamları açısından avantaj sağladığı düşünülse de, kimyasallar ile karşılaştırıldığında zorluklar, pazara biyobenzerlerin girişini engelleyecektir (1).

Biyobenzerlerin Avrupadaki Güncel Durumu

Avrupa Birliği'nde ilk biyobenzer 2006 yılında onaylanmıştır. Bu erken girişe rağmen 2011 Haziran sonuna kadar sadece

16 biyobenzer onaylanmıştır ki bu ürünler 3 sınıfta temsil edilmektedir: Büyüme hormonu, kısa etkili eritropoetin ve günlük kullanılan granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) Bu 3 sınıf, hastaların %11'ini ve tüm biyolojik ürünlerin satışının %18'ini temsil etmektedir. Avrupada satılan biyobenzerler referans ürünlerden %30 daha ucuzdur. Bu 3 sınıftan sonra onaylanan ilk ürün Remsima®, Infliksimab biyobenzeri olan Celltrion ve Hospira ürünüdür. Bu onaylanan ilk monoklonal antikor biyobenzeridir. Avrupada biyobenzer ürün geliştiren firmaların başında Sandoz, Teva ve Hospira gibi firmalar bulunmaktadır (1).

Rekabet üretimde de devam etmektedir çünkü biyobenzer üretimi için daha yeni teknolojiler kullanılmaktadır. İlaç sanayi, terapötik protein üretimi için ucuz ve etkili ekspresyon sistemlerine ihtiyaç duymaktadır. Mikrobiyal fermantasyondan farklı olarak bitki ekspresyon sistemleri büyük boyutta biyofarmasötikleri daha ucuza ve insana özgü virüssüz ve prionsuz üretebilir. Ayrıca mikrobiyal fermantasyonda gerçekleştirilemeyen post-translasyonel modifikasyonlar bitki ekspresyon sistemlerinde yapılabilir (6).

Avrupada ilk kabul edilen insülin, insülin glarjindir ve 2014 yılında kabulü gerçekleşmiştir. Küresel satışları 2013 verileri ile 7.8 milyar doları bulmaktadır (7, 8).

İnsülin

İnsülin doğrudan veya dolaylı olarak vücuttaki tüm dokuları etkileyen ve besin olarak alınan maddelerin çoğunun hücre içine alınarak depo edilmesini sağlayan antikatabolik ve anabolik hormondur. Hücre içine alınan bu maddelerin homeostazına katkıda da bulunmaktadır. İlaç olarak tedaviye girmesi 1922 yılında olmuştur (9).

Rekombinant İnsülin Üretimi

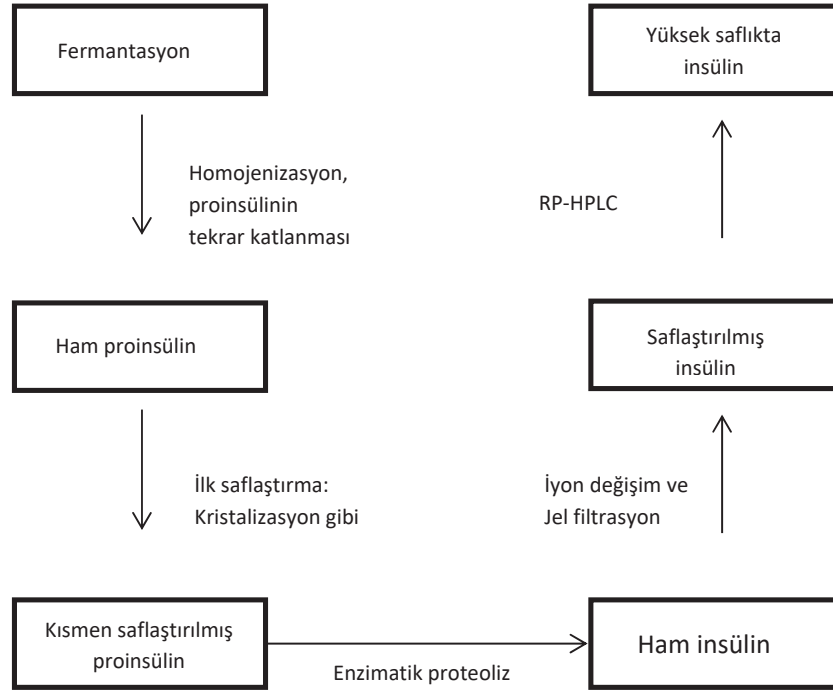
Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen insan insülini ilk kez 1982'de öncelikle ABD, Batı Almanya, İngiltere ve Hollanda'da ilaç olarak onaylanmıştır. Bu ilaç aynı zamanda insanlarda tedavi amaçlı kullanım için onay alan ilk rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş ilaçtır. Sonraki yıllarda çeşitli yollarla insülin preparatları da üretilmiştir ki bunlar Tablo 1'de belirtilmiştir.

Rekombinant insülin üretiminde ilk yaklaşım, A ve B zincirlerinin 2 farklı *E. coli* hücrelerinde yapılması (insan insülin crb) olsa da Eli Lilly tarafından geliştirilen alternatif yöntem insan proinsülinin *E. coli*'de kodlanıp, proinsülin ve sonrasında

C peptidinin proteolitik eksizyonunun *in vitro* saflaştırılmasıdır (insan insülin prb). Bu yaklaşım tek bir fermentasyon adımıyla yapıldığı için tercih sebebi olmuştur (10).

Saflaştırma adımları, üretim sürecinde immunojenik birçok impürite oluşabileceği için çok önemlidir. Saflaştırma sıklıkla

jel filtrasyon ve iyon değişim ve ters-faz kromatografi gibi birkaç kromatografik adımdan oluşmaktadır: Bu süreçte genelde C18 ve C8 kolonlar kullanılmaktadır. Bu süreç sonunda impürite hastalarda immunojenite yaratmayacak orana düşürülür (10).



Şekil 1. İnsan insülin, rekombinant bakteriyel proinsülin için saflaştırma şeması.

Aşağıdaki tabloda insülin tipleri ve jenerik isimlerine göre sınıflandırma yapılarak temel özellikleri verilmiştir (11).

Tablo 1. İnsülin tipleri ve etki profilleri

İnsülin tipi	Jenerik adı	Piyasa adı	Etki başlangıcı	Pik etki	Etki süresi (Saat)
Kısa etkili (Human regüler)	Kristalize insan insülin	Actrapid HM	30-60 dk	2-4 saat	5-8
		Humulin R			
Hızlı etkili (Prandiyal analog)	Glulisin insülin	Apidra	15 dk	30-90 dk	3-5
	Lispro insülin	Humalog			
	Aspart insülin	NovoRapid			
Orta etkili (Human NPH)	NPH insan insülin	Humulin N	1-3 saat	8 saat	12-16
		İnsulatard HM			

İnsülin tipi	Jenerik adı	Piyasa adı	Etki başlangıcı	Pik etki	Etki süresi (Saat)
Uzun etkili (Bazal analog)	Glarjin insülin	Lantus	1 saat	Piksiz	20-26
	Detemir insülin	Levemir			
Hazır karışım insan (Regüler+NPH)	%30 kristalize + %70 NPH insan insülin	Humulin M 70/30	30-60 dk	Değişken	10-16
		Mixtard HM 30			
Hazır karışım analog [Lispro + Nötral Protamin Lispro (NPL)]	%25 insülin lispro + %75 insülin lispro protamin	Humalog Mix25	10-15 dk	Değişken	10-16
	%50 insülin lispro + %50 insülin lispro protamin	Humalog Mix50			
Hazır karışım analog [Aspart + Nötral Protamin Aspart (NPL)]	%30 insülin aspart + %70 insülin aspart protamin	Novomix 30	10-15 dk	Değişken	10-16

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Peptit Haritalama

Peptit haritalamada Agilent (1260, Almanya) (Cihaz-A) ve Shimadzu (LC2030C, Japonya) (Cihaz - B) marka HPLC cihazları kullanılmıştır.

Maddeler

İnsülin aspart referans standardı EP'den satın alınmıştır. Referans insülin aspart, Novo Rapid eczaneden satın alınmıştır. Biyobenzer insülin aspart Hindistan merkezli bir firmadan tedarik edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik kalitedir.

pH:7.5 HEPES tamponunun hazırlanması

2.38 g HEPES 90 mL su içerisinde çözülür 5 M Sodyum hidroksit ile pH:7,5'e ayarlanır ve 100mL'ye seyreltilir.

Sülfat tamponunun hazırlanması

2.0 M Amonyum sülfat çözeltisi ile 0.5 M sülfürik asit çözeltisi 1:1 oranında karıştırılır.

Enzim solüsyonunun hazırlanması

1 mg/mL konsantrasyonda *Staphylococcus aureus* suşu V8 proteaz enzim çözeltisi su ile hazırlanır.

Boş çözeltinin hazırlanması

25 µL 0.01 N HCl temiz bir tüpe aktarılır. 100 µL HEPES tampon çözeltisi pH 7.5 R ve 20 µL 1 mg/mL *Staphylococcus aureus* suşu V8 proteaz, tip XVII-B R eklenir. Tüp kapatılır ve 25°C'de 6 saat inkübe edilir. 145 µL sülfat tampon çözeltisi pH 2.0 R ekleyerek reaksiyon durdurulur.

Referans standardın hazırlanması

5 mg insülin aspart CRS 2,5 mL'lik balon içerisine dikkatlice tartılır ve 0.01 N HCL ile çözülür, hacmine tamamlanır, çözeltilerden 25µL temiz bir tüpe aktarılır. 100 µL HEPES tampon çözeltisi pH 7.5 R ve 20 µL 1 mg/mL *Staphylococcus aureus* suşu V8 proteaz, tip XVII-B R eklenir. Tüp kapatılır ve 25°C'de 8 saat inkübe edilir. 145 µL sülfat tampon çözeltisi pH 2.0 R ekleyerek reaksiyon durdurulur.(2 adet paralel çözelti hazırlanır).

Numunelerin hazırlanması

5 mg insülin aspart'a eşdeğer numune (yaklaşık 1.42 ml) 2,5 mL'lik balon içerisine dikkatlice tartılır ve 0.01 N HCL ile çözülür, hacmine tamamlanır, çözeltilen 25µL temiz bir tüpe aktarılır. 100 µL HEPES tampon çözelti pH 7.5 R ve 20 µL 1 mg/mL *Staphylococcus aureus* suşu V8 proteaz, tip XVII-B R eklenir. Tüp kapatılır ve 25°C'de 6 saat inkübe edilir. 145 µL sülfat tampon çözeltisi ekleyerek reaksiyon durdurulur (2 adet paralel numune çözeltisi hazırlanır).

Yöntemler

Peptit haritalama için analitik yöntemlerde Amerikan Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi yöntemleri araştırılmıştır. Amerikan Farmakopesi 38, insülin aspart analiz yöntemleri referans alınarak yöntem için spesifiklik ve kesinlik baz alınarak kısmi validasyon yapılmıştır. Peptit haritalama HPLC kullanılarak yapılmıştır.

Peptit haritalama kısmi validasyon parametreleri

Bütün parametreler HPLC yöntemi için değerlendirilir: Spesifiklik, Kesinlik (Yöntem kesinliği ve cihaz kesinliği yada enjeksiyon tekrarlanabilirliği)

Spesifiklik

Standart ve test çözeltileri yöntemde belirtildiği gibi hazırlanır.

Prosedür:

Seyreltme çözeltisi enjekte edilir. Standart çözeltisi enjekte edilir. Test çözeltisi enjekte edilir.

Enjeksiyon yapılan çözeltilerin alıkonma ve bağıl alıkonma zamanları ile pik saflığı açısı ve eşiği hesaplanır.

Spesifiklik Kriterleri:

Etkin madde alıkonma zamanında başka pik görülmemelidir ve bütün bileşenlerin pik saflıkları uygun olmalıdır.

Sistem Uygunluğu Kriterleri:

Standart 1 çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen alanların %RSD değeri en fazla %2.0 olmalıdır.

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği homojen numunenin tekrarlanan analizlerinden elde edilen sonuçlarının dağılım miktarıdır.

Cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği:

Test, %100 konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltinin en az 4 enjeksiyonu ile yapılır.

Standart çözeltisi yöntemdeki gibi hazırlanır.

Kriter: Bağıl standart sapmanın %2.0'den fazla olmamasıdır.

2.1.Pazar verileri

İnsülin ile ilgili pazar verileri Intercontinental Marketing Services-IMS'ten alınıp ilgili tablolar bu veriler kullanılarak oluşturulmuştur.

2.2.1 İstatistiksel analizler

HPLC analizleri ile ilgili istatistiksel değerlendirmelerde Excel ve Agilent Yazılımı, ChemStation kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır.

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada görülmüştür ki: İncelenen insülin glarjin, insülin aspart, insülin aspart+Protamin, insülin detemir, insülin lispro, İnsülin lispro+protamin, insülin glulisin, insan insülini, izofan insülin'in toplam satış cirosu 2014 yılı için 554.515.557 TL'dir (12). Hesaplanan bu miktar firmaların kurum iskontolu imalatçı satış fiyatları baz alınarak hesaplanmıştır. Kamu fiyatları düşünüldüğünde bu rakam çok daha yukarıya çıkacaktır.

Tablo 2'de IMS Türkiye'den ilgili yıllar için elde edilen veriler, Türkiye'de satışı yapılan insülin türevlerinin ticari isimlerine göre paylaşılmıştır.

Tablo 2. Çalışma kapsamında incelenen, Türkiye'de satışı yapılan insülin türevlerinin satış miktarı ve kurum iskontolu imalatçı satış fiyatı ile satış ciroları (12).

ÜRÜN	2012 Kutu Satışı	2013 Kutu Satışı	2014 Kutu Satışı	2012 Satış Miktarı TL	2013 Satış Miktarı TL	2014 Satış Miktarı TL
LANTUS	1.636.280	2.054.488	2.381.661	93.063.289	120.202.630	152.682.020
SOLOSTAR 100 IU 5 3 ML	1.636.276	2.054.369	2.381.661	93.062.933	120.195.978	152.682.020
OPTIPEN 100 IU 5 3 ML	3	110	0	288	6.094	0
VIAL 100 IU 1 10 ML	1	9	0	68	558	0
NOVOMIX 30	2.315.801	2.573.631	2.585.191	93.468.423	109.311.153	116.775.080
FLEXPEN 100 IU 5 3 ML	2.307.473	2.565.242	2.574.835	93.165.341	108.991.624	116.362.913
PENFILL 100 IU 5 3 ML	8.328	8.389	10.356	303.082	319.529	412.167
NOVORAPID	1.435.088	1.782.082	2.070.243	55.680.976	75.130.211	92.787.527
FLEXPEN 100 IU 5 3 ML	1.421.810	1.767.992	2.055.105	55.427.565	74.847.434	92.464.269
VIAL 100 IU 1 10 ML	13.278	14.090	15.138	253.411	282.777	323.258
PENFILL 100 IU 5 3 ML	0	0	0	0	0	0
LEVEMIR	761.139	890.072	1.008.740	48.348.129	61.805.153	74.172.324
FLEXPEN 100 IU 5 3 ML	761.200	890.127	1.008.755	48.352.261	61.808.879	74.173.340
PENFILL 100 IU 5 3 ML	-61	-55	-15	-4.132	-3.726	-1.016
HUMALOG MIX 25	825.799	986.850	1.052.140	29.937.064	39.847.703	45.431.704
KWIKPEN 100 IU 5 3 ML	553.711	788.144	919.195	20.510.218	32.488.459	40.214.382
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	272.088	198.695	132.945	9.426.846	7.358.970	5.217.322
VSC 100 IU 1 10 ML	0	11	0	0	274	0
HUMALOG	400.854	517.436	641.383	13.603.393	19.291.736	26.244.482
KWIKPEN 100 IU 5 3 ML	0	118.997	337.586	0	5.106.717	15.009.283
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	395.554	392.750	298.577	13.505.257	14.068.176	11.119.682
VIAL 100 IU 1 10 ML	5.300	5.689	5.220	98.136	116.843	115.517
APIDRA	237.309	366.459	535.973	7.732.479	11.947.333	18.794.440
SOLOSTAR 100 IU 5 3 ML	237.309	366.459	535.973	7.732.479	11.947.333	18.794.440
HUMALOG MIX 50	253.574	305.965	312.622	9.254.731	12.400.031	13.514.128
KWIKPEN 100 IU 5 3 ML	193.247	260.987	280.653	7.162.499	10.752.435	12.282.163
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	60.327	44.978	31.969	2.092.232	1.647.596	1.231.965
HUMULIN REGULAR	273.407	301.390	274.349	5.802.208	6.493.796	6.033.649
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	175.355	192.019	182.787	4.562.832	5.061.061	4.813.849
VIAL 100 IU 1 10 ML	98.052	109.371	91.562	1.239.376	1.432.735	1.219.800
HUMULIN M 70/30	218.656	190.120	150.802	5.688.634	5.026.841	3.971.494
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	218.656	190.119	150.802	5.688.634	5.026.823	3.971.494
VIAL 100 IU 1 10 ML	0	1	0	0	18	0
HUMULIN NPH	121.137	126.886	114.130	2.925.250	3.104.462	2.806.111
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	103.997	107.825	97.632	2.710.163	2.859.733	2.588.887
VIAL 100 IU 1 10 ML	17.140	19.061	16.488	215.087	244.729	217.138
CARTRIDGES 100 IU 5 1.50 ML	0	0	10	0	0	86
INS INSULAT.HM PEN	29.433	24.810	18.883	869.955	733.239	563.661
CARTRIDGES 100 IU 5 3 ML	29.433	24.810	18.883	869.955	733.239	563.661
NOVOMIX 50	0	3.662	11.790	0	162.950	535.262
FLEXPEN 100 IU 5 3 ML	0	3.662	11.790	0	162.950	535.262
NOVOMIX 70	0	1.022	2.779	0	46.701	128.736
FLEXPEN 100 IU 5 3 ML	0	1.022	2.779	0	46.701	128.736
INS INSULATARD HM	2.743	3.099	4.416	37.358	42.412	59.247
VSC 100 IU 1 10 ML	2.743	3.099	4.416	37.358	42.412	59.247
INS MIXTARD 30 HM	2.667	2.441	1.224	36.399	34.544	15.692
VSC 100 IU 1 10 ML	2.667	2.441	1.224	36.399	34.544	15.692

Biyoteknolojik ilaçlar, dolayısıyla biyobenzerler, sağlık hizmet sektörünün önemli bir parçası haline geleceği için onaylı bir referans ürün kontrol olarak kullanılarak, biyobenzer ürünün prelinik ve klinik çalışmaları yapılmalıdır (13). Gelecekte karşılaştırmalı çalışmalar, bağımsız bir "farmakoeconomik araştırma enstitüsü" çerçevesinde yürütülebilir. Hastaların küresel çapta tedavi süreçlerinde etkinliği/eylemciliği arttığı için bu yönelim, firmaları hasta destek dernek veya hasta destek grupları ile hastalık bilinci, teşhis, klinik destek konularında iş birliklerini yönlendirecektir (14).

Diyabetin prevalansı dünya çapında belirgin bir biçimde yükselmektedir. İnsülin ürünleri asla tek başına tedavi edici ajanlar olarak düşünülemez. Kullanımı için bir araç gerekmektedir ve total bir kalite söz konusudur. Günümüzde ürünlerin ve araçların (kalem) kalitesi, üreticinin kendi yönetimlerine ve kullanım sonrası yan etkilerin bireysel raporlanması yaklaşımına güvenilmektedir. Bu yaklaşım oral tedaviler ve bazı medikal cihazlar için yeterli olmasına karşın, insülin, insülin kalem, kan ölçüm sistemleri gibi kritik kullanılan ürünler bireysel ve/veya büyük boyutlu felaketleri önlemek için etkin bir yönetim gerektirmektedir (15, 16)

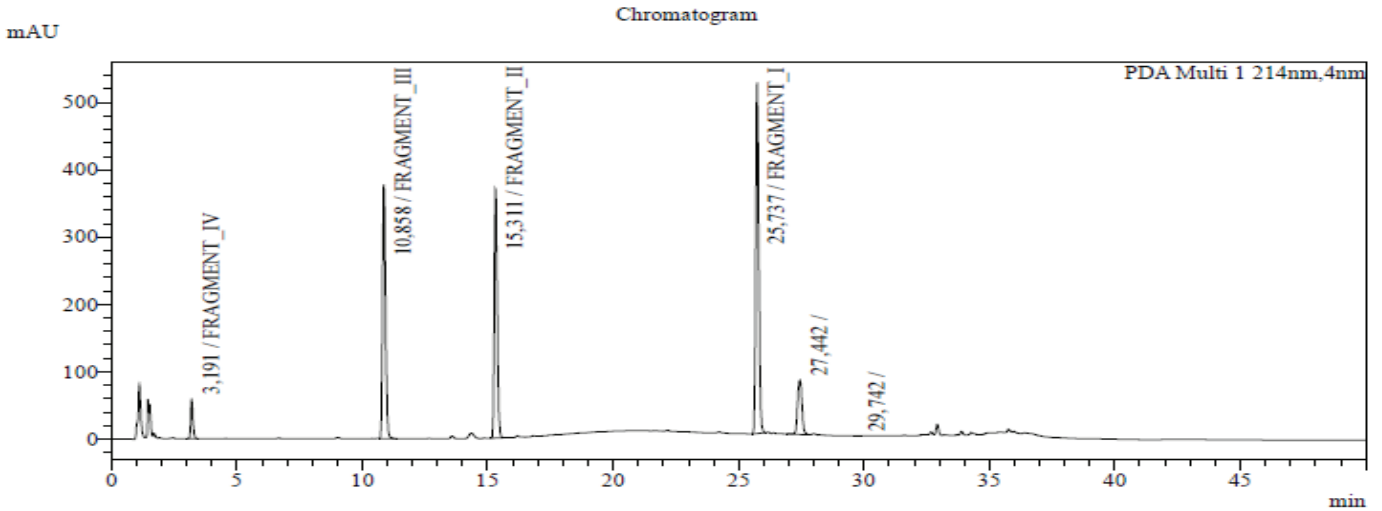
Biyobenzer insülin için ruhsat onaylanmasında kullanılacak olası ana ürün geliştirme soruları aşağıdaki gibi olabilir:

- 1) İnsülin biyobenzeri için en ihtiyatlı ürün geliştirme yolu nedir?
- 2) Diyabet Tip I ve Tip II hastaları arasında, etkinlik ve güvenilirlik sonuçları tahmin edilebilir mi?
- 3) Periferik insülin direnci belirlemede kullanılan, hiperinsülinemik bir ortam yaratarak bu ortamda normoglisemi sağlamak amacıyla verilen glukozun kullanım hızını saptamak amacıyla yapılan Klemp çalışmaları etkinliği göstermek için kullanılabilir mi?
- 4) İnsülin biyobenzer ve referans ürün arasında değiştirilebilirliği göstermek için en uygun tasarım nedir? HbA1c 'yi mi FPG'yi mi baz almalıdır (17)?

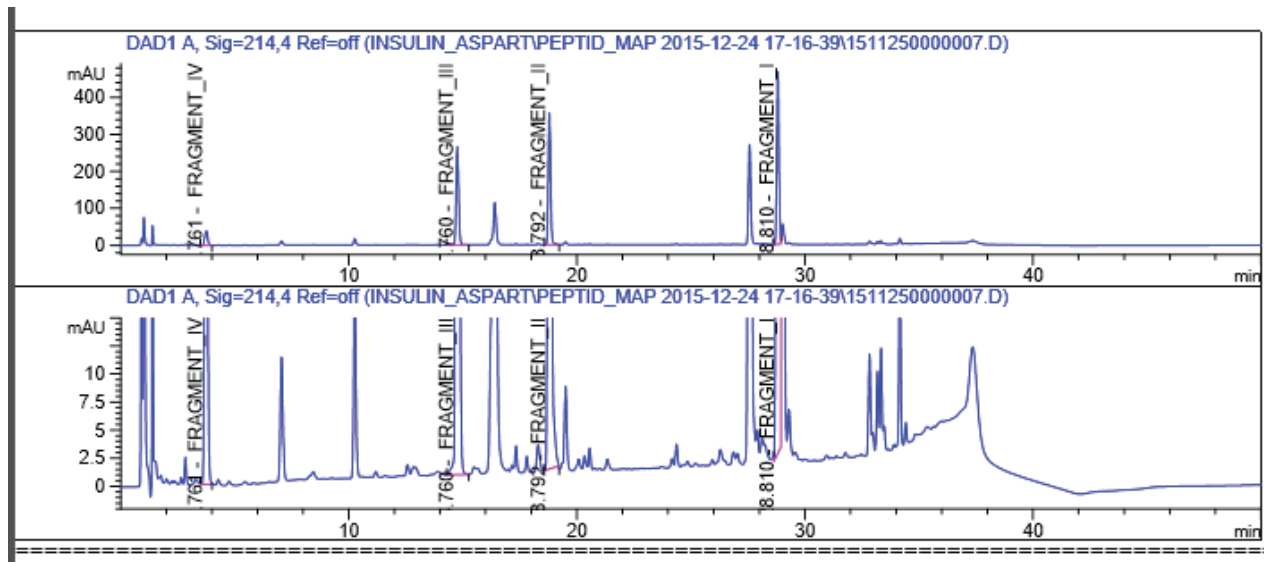
Peptit haritalama sonucu

Bu çalışma kapsamında peptit haritalama HPLC kullanılarak yapılmıştır. Avrupa Farmakopesi peptit haritalama için HPLC yöntemi vermiştir. Yapı için daha kesin verilere ihtiyaç duyulacağı düşünülmektedir.

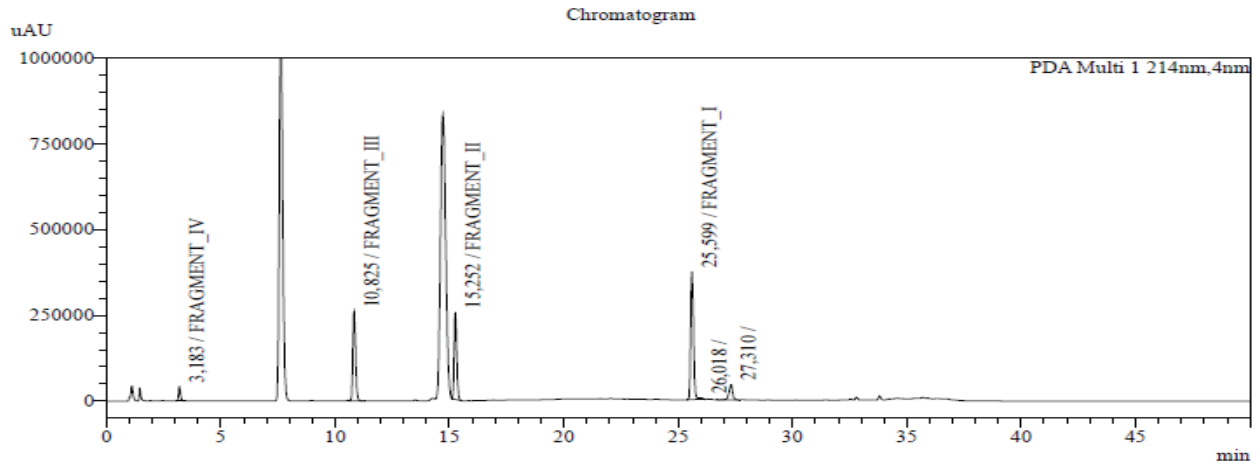
Şekil 3-Şekil 7 arasındaki şekillerde paylaşılan HPLC kromatogramlarına bakarak iki ürünün fragmanlarının alkonma sürelerini karşılaştırabiliriz.



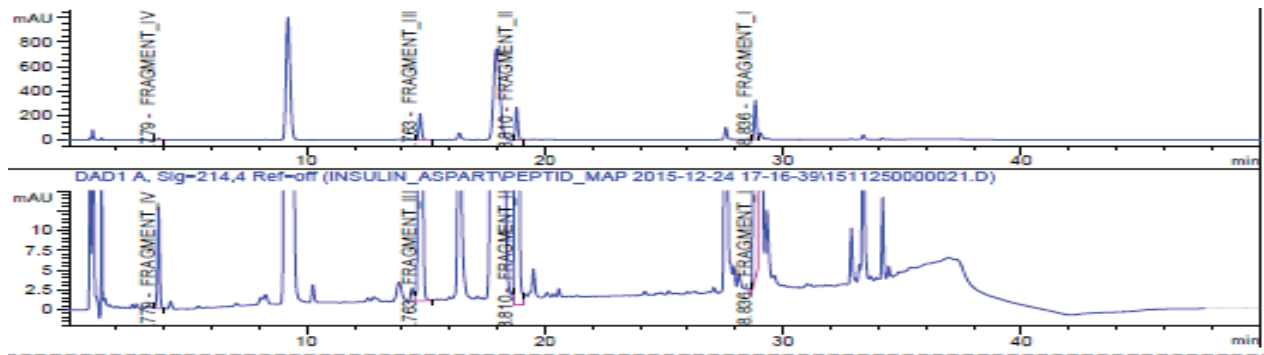
Şekil 2. 50 µL enjeksiyon hacimli Avrupa Farmakopesi referans standardına ait cihaz-B'de yapılan analize ait kromatogram.



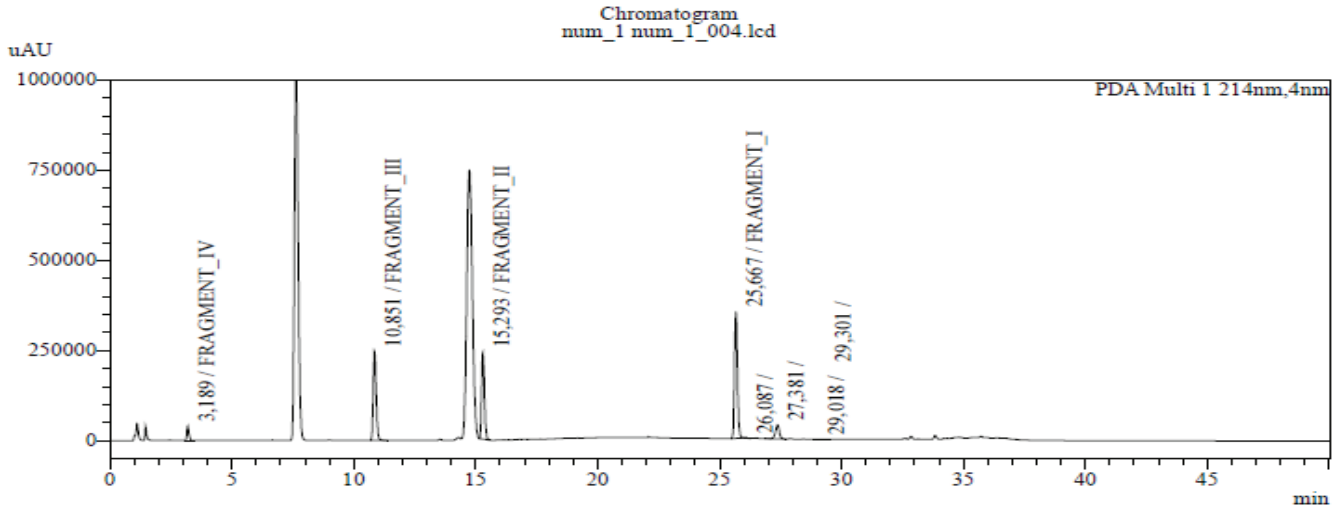
Şekil 3. Standart çözeltiye ait cihaz-A' da yapılan analize ait kromatogram.



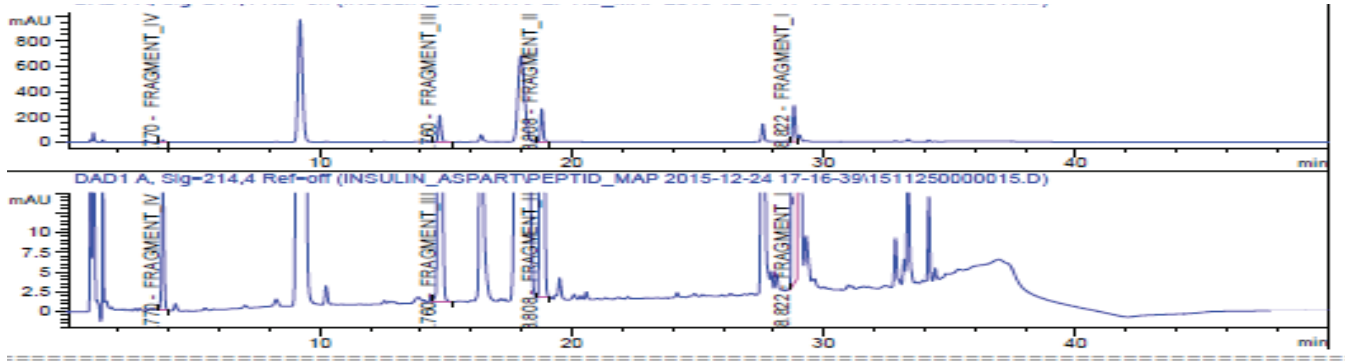
Şekil 4. 50 µL enjeksiyon hacimli biyobenzer insülin asparta ait cihaz-B' de yapılan analize ait kromatogram..



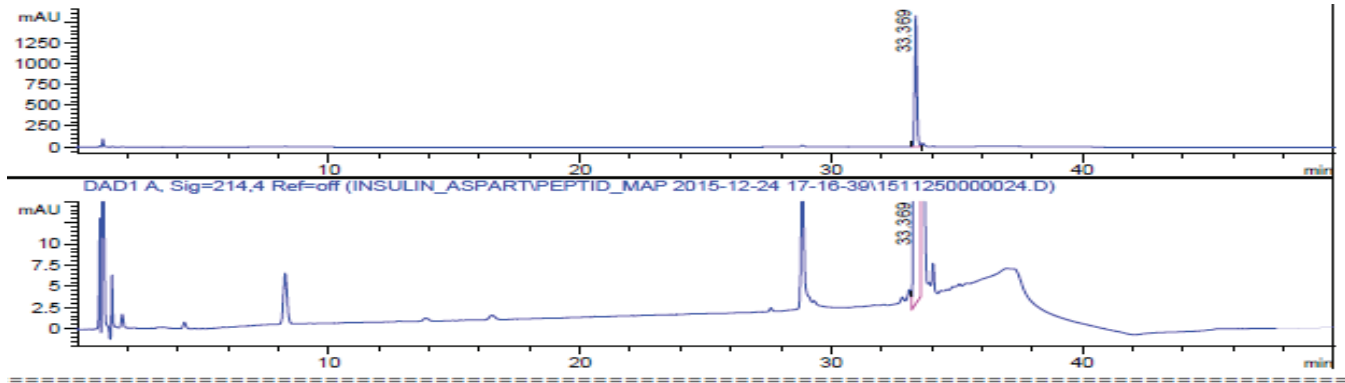
Şekil 5. 50 µL enjeksiyon hacimli biyobenzer insülin asparta ait cihaz-A' da yapılan analize ait kromatogram.



Şekil 6. 50 µL enjeksiyon hacimli referans insülin asparta ait cihaz-B' de yapılan analize ait kromatogram..



Şekil 7. 50 µL enjeksiyon hacimli referans insülin aspart'a ait cihaz-A' da yapılan analize ait kromatogram.



Şekil 8. 50 µL enjeksiyon hacimli EP referans standardına ait cihaz-A' da yapılan analize ait kromatogram

Yöntemin seçiciliğine ilişkin bulgular Tablo 3'te paylaşılmıştır. Seçicilik dışında sistemin uygunluğuna ilişkin veriler de aşağıda yer almaktadır. Tablo 4 ve Tablo 7 arasında

fragmanlara ait kesinliğe ilişkin bulgular paylaşılmıştır. Tablo 8'de de yöntemin doğrusallığı ve çalışma aralığına ilişkin bulgulara yer verilmiştir.

Tablo 3. Yöntemin seçiciliğine ilişkin bulgular

Aşağıdaki sonuçlara dayanarak, peptid haritalamada bu yöntemin seçicilik parametresi uygundur.

Bileşenler	Alıkonma zamanı dk	Bağlı alıkonma zamanı	Pik saflığı
Seyreltme çözeltisi	-	-	-
Standart çözeltisi Fragman I	28,810	1,00	999,950
Standart çözeltisi Fragman II	18,792	0,65	997,747
Standart çözeltisi Fragman III	14,760	0,51	999,649
Standart çözeltisi Fragman IV	3,761	0,13	999,683
Test çözeltisi Fragman I	28,822	1,00	999,991
Test çözeltisi Fragman II	18,808	0,65	999,987
Test çözeltisi Fragman III	14,760	0,51	999,993
Test çözeltisi Fragman IV	3,770	0,13	999,669

Sistem uygunluğu kriterlerine ilişkin bulgular

Standart 1 çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen alanların %RSD değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibi listelenmiştir:

Fragman I % 1,13

Fragman II % 0,24

Fragman III % 0,84

Fragman IV %0,20

Yukarıda belirtilen sonuçlara göre sistem uygunluğu kriterleri uygundur.

Tablo 4. Fragman I'e ait kesinliğe ilişkin bulgular

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı dk
1	3258,614	28,810
2	3216,600	28,817
3	3189,630	28,816
4	3176,232	28,819
Ortalama	3210,269	28,816
Standart sapma	36,34	0,15
Bağlı std. sapma	1,13	0,52

Tablo 5. Fragman II'ye ait kesinliğe ilişkin bulgular

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	2685,256	14,760
2	2691,215	14,758
3	2678,114	14,76
4	2678,114	14,761
Ortalama	2683,175	14,760
Standart sapma	6,33	0,001
Bağlı std. sapma	0,24	0,000

Tablo 6. Fragman III'e ait kesinliğe ilişkin bulgular

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	2358,256	18,792
2	2326,321	18,800
3	2366,412	18,803
4	2369,485	18,807
Ortalama	2355,119	18,801
Standart sapma	19,77	0,006
Bağlı std. sapma	0,84	0,03

Tablo 7. Fragman IV'e ait kesinliğe ilişkin bulgular

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alınma Zamanı
1	348,633	3,761
2	347,568	3,771
3	348,005	3,773
4	347,030	3,772
Ortalama	347,809	3,769
Standart sapma	0,67	0,005
Bağıl std. sapma	0,20	0,13

Sonuç olarak: Fragman bazında pik alanının ve pik alınma zamanının bağıl standart sapması %2'den küçük olduğu için yöntemin cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği uygundur diyebiliriz.

Tablo 8. Yöntemin doğrusalılığı ve çalışma aralığına ilişkin bulgular

	Derişim (%)	Fragman_IV	Fragman_III	Fragman_II	Fragman_I	Tartım (mg)
80%	1,3793E-01	275,236	1752,546	2193,461	2383,981	5
		278,145	1752,376	2197,988	2389,941	
100%	1,7241E-01	348,633	2358,256	2685,256	3258,614	
		347,568	2326,321	2691,215	3216,600	
		348,005	2366,412	2678,114	3189,630	
		347,03	2369,485	2678,114	3176,232	
120%	2,0690E-01	410,678	2895,496	3253,484	3926,615	
		409,018	2894,720	3272,791	3887,306	
140%	2,4138E-01	469,777	3404,771	3753,509	4861,764	
		463,476	3404,697	3723,814	4760,895	

Tablo 9. Ortalama alınarak güncellenen Tablo 3

Seviye	Derişim (%)	Fragman_IV	Fragman_III	Fragman_II	Fragman_I
80	1,3793E-01	276,69	1752,46	2195,72	2386,96
100	1,7241E-01	347,81	2355,12	2683,17	3210,27
120	2,0690E-01	409,85	2895,11	3263,14	3906,96
140	2,4138E-01	466,63	3404,73	3738,66	4811,33
		Fragman_IV	Fragman_III	Fragman_II	Fragman_I
Eğim		1832,356	15940,745	15105,444	23112,411
Kesim		27,728	-421,389	105,349	-804,508
Koreasyon		0,999	0,999	0,999	0,999
R2		0,997	0,999	0,999	0,998

Tablo 11. Ürünlere göre Fragman I, II, III ve IV'ün pik alanlarına ait analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.

		Referans I (n=6)	Biyobenzer II (n=3)
Fragman I	Ort±Ss	1985,16±15,06	2235,39±9,34
	Min-Maks (Medyan)	1965,35-2009,41 (1984,85)	2229,12-2246,12 (2230,92)
Fragman II	Ort±Ss	1864,72±4,27	1888,75±20,45
	Min-Maks (Medyan)	1860,88-1872,87 (1863,58)	1874,85-1912,23 (1879,18)
Fragman III	Ort±Ss	1618,78±0,66	1640,74±2,03
	Min-Maks (Medyan)	1618,12-1619,93 (1618,61)	1638,54-1642,54 (1641,15)
Fragman IV	Ort±Ss	98,88±3,25	80,07±0,53
	Min-Maks (Medyan)	95,67-104,45 (97,63)	79,47-80,45 (80,31)

Tablo 11'de yapılan ölçümlerin özet tablosu ve ortalamaları ve standart sapmaları verilmiştir. Pik saflık faktörü uygun bulunmuştur. Şekil 3-Şekil 7 arasındaki şekillerde paylaşılan HPLC kromatogramlarına bakarak iki ürünün fragmanlarının benzer alıkonma sürelerinde gözlemlendiğini söyleyebiliriz. Ancak daha net bir yorum için ileri yöntemler kullanılması gerekmektedir.

Yapı için daha kesin verilere ihtiyaç duyulacağı düşünülerek: HPLC dışında, peptit haritalamada güçlü bir araç olarak UV absorbans detektörlü kapiler elektroforez de denenebilir (18-20)

Biyobenzerler ile ilgili en çok üzerinde durulan konular arasında yapı karşılaştırılması ve referans ürün ve biyobenzer ürün arasındaki değiştirilebilirlik konusu yer almaktadır. Bu

kapsamda ürün için bize daha kesin yanıtlar verebilecek analitik yöntem ve cihazlar gündeme gelmeye devam edecektir. HPLC, kapiler elektroforez dışında, MS, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), MALDI TOF MS, CID-MS de yapı ve biyobenzerlik konusunda net yorumlamada ihtiyaç duyulan ileri analitik yöntemler olarak düşünülebilir (21-24)

Biyobenzerlere sadece kamu yararını sağlayıcı ürün olarak bakmaktan ziyade, ürünlere hasta erişiminin kolaylaştırması yönüyle bakıldığında, aslında amaçlanan, biyobenzerlerin daha çok pazar payı alması olmalıdır. İhtiyatlı yaklaşım ve zaman zaman gösterilen direnç düşünüldüğünde, yerli biyobenzerlerin de bu tür yaklaşımlarla karşı karşıya kalacağı düşünülebilir.

ABSTRACT

Analytical and Sales Data Comparison of Reference Product of Insulin Aspart and its Biosimilar in Turkey

In recent years, biosimilar products have become one of the most popular areas of pharmaceutical industry and pharmaceutical biotechnology.

As their patents have expired or are about to expire, biotechnology products, whose manufacture involves more complex processes, are becoming a focus of interest. Compared to generic products, complex processes are not limited to manufacture. Preclinical and clinical development as well as market access process for biosimilar biological products is also challenging and costly. Despite these challenges, many companies continue to develop biosimilar products.

Despite the fact that there are long-term robust data related to generics, the debate of many topics for biosimilar has just begun. These topics include the economic contribution of biosimilar, public cost effects, patient access, clinical trials and trials comparative with the reference product.

Within the scope of this study, global and Turkey sales data of biological products containing insulin which was initially approved in 1982 and was produced by recombinant DNA technology were reviewed. The study also covered the analytical comparison of the reference insulin aspart with insulin aspart biosimilar products and discussed the possible topics that could be used in development and registration processes.

Keywords: Biotechnological medicine, Biosimilar, insulin, insulin aspart, peptide mapping

4. KAYNAKLAR

- Blackstone E, Joseph F. The economics of biosimilars. *Am Health Drug Benefits* 2013; 6: 469-78.
- Rotenstein LS, Ran N, Shivers J, Yarchoan M, Close K. Opportunities and challenges for biosimilars: What's on the horizon in the global insulin market? *Clin Diabetes* 2012; 30: 138-50.
- Greer MF. Biosimilar development: From science to market. *Life Sci, SGS Tech Bull* 2011; 47: 1-6.
- Grabowski H, Long G, Mortimer R. Implementation of the biosimilar pathway. *Seton Hall Law Rev* 2011; 41: 511-57.
- Heinemann L, Hompesch M. Biosimilar insulins: How similar is similar? *J Diabetes Sci Technol* 2011; 5: 741-54.
- Faye L, Gomord V. *Recombinant Proteins from Plants*. Humana Press.2009.
- EMA, Human Medicines. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002835/human_med_001790.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (accessed July 3, 2015).
- GaBI Online, Biosimilars. <http://gabionline.net/Biosimilars/General/Top-8-blockbuster-biologicals-2013> (accessed July 3, 2015).
- Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji*, 11th ed. Hacettepe-Taş. 2005.
- Walsh G. *Pharmaceutical Biotechnology, Concepts and Applications*. John Wiley & Sons Ltd. 2007.
- Çakır B. İnsülin analoglarının diyabetes mellitus tedavisindeki rolü ve faydaları. *Ankara Med J* 2012; 2: 22-31.
- IMS verisi, Email A Ateş, IMS TURKEY 11.02.2015 elektronik posta görüşmesi
- Nacak M, Sezer Z, Erenmemişoğlu A. Biyobenzer ilaçlar. *J Clin Anal Med* 2012; 3: 251-6.
- Simon F. Market access for biopharmaceuticals: New challenges. *Health Aff* 2006; 25: 1363-70.
- Edelman S, Polonsky W, Parkin C. Biosimilar insulins are coming: what they are, what you need to know. *Curr Med Res Opin* 2014; 30: 2217-22.
- Carter A. Multiple source of biosimilar insulin, what's a provider to do? *J Diabetes Sci Technol* 2014; 8: 20-2.

17. Minocha M, Gobburu J. Drug development and potential regulatory paths for insulin biosimilars. *J Diabetes Sci Technol* 2014; 8: 14-9.
18. Bonneil E, Waldron KC. On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations. *Talanta* 2000; 53: 687-99.
19. Ortner K, Buchberger W, Himmelsbach M. Capillary electrokinetic chromatography of insulin and related synthetic analogues. *J. Chromatogr A* 2009; 1216: 2953-7.
20. Jars MU, Hvass A, Waaben D. Insulin aspart (AspB28 Human Insulin) derivatives formed in pharmaceutical solutions. *Pharm Res* 2002; 19: 621-8.
21. Favero-Retto MP, Palmieri LC, Souza TACB, Almeida FCL, Lima LMTR. Structural meta-analysis of regular human insulin in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 1112-21.
22. Kalman-Szekeres Z, Olajos M, Ganzler K. Analytical aspects of biosimilarity issues of proetin drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 69: 185-95.
23. Harazona A, Hashii N, Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N. Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 83: 65-74.
24. Holzgrabe U, Nap C, Almeling S. Use of collision induced dissociation mass spectrometry as a rapid technique for the identification of pharmacologically active peptides in pharmacopoeial testing. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55: 957-63.