

胰岛素胶囊在 Beagle 犬体内的药动学和药效学研究

李亚卓¹, 李 薇¹, 张星艳², 赫宇霏³, 魏滋鸿¹, 武卫党¹, 慈小燕¹, 孙 磊⁴, 江立新⁴, 刘昌孝¹, 伊秀林^{1*}, 曾 勇^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300301
2. 安徽医科大学 药学院, 安徽 合肥 230032
3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016
4. 合肥天麦生物科技发展有限公司, 安徽 合肥 230601

摘要: 目的 研究胰岛素胶囊在 Beagle 犬体内药动学和药效学特征。方法 4 只健康 Beagle 犬 sc 重组人胰岛素注射液以及 po 和内窥镜给予胰岛素胶囊, 不同时间经静脉采集血浆标本, 同步测定血糖水平, 采用放射免疫分析法检测血药浓度。结果 4 只 Beagle 犬自身交叉分别 sc 胰岛素注射液和 po 胰岛素胶囊或内窥镜给予内容物后, 以血浆外源性胰岛素浓度计算得到的主要药动学参数, $t_{1/2}$ 分别为 (0.986 ± 0.185) 、 (0.649 ± 0.508) 、 (0.518 ± 0.187) h; $C_{\max}$ 分别为 (102.0 ± 45.7) 、 (625.0 ± 360.0) 、 (453.0 ± 636.0) $\mu\text{U/mL}$; $t_{\max}$ 分别为 (0.375 ± 0.224) 、 (0.750 ± 0.289) 、 (0.500 ± 0.601) h; AUC_{0-t} 分别为 (181.0 ± 42.6) 、 (414.0 ± 246.0) 、 (423.0 ± 526.0) $\mu\text{U}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 。胰岛素胶囊 po 和内窥镜插管给药的相对生物利用度分别为 $(5.41 \pm 2.26)\%$ 、 $(8.31 \pm 9.94)\%$ 。po 和内窥镜这两种途径的胰岛素胶囊在 0.5~1.0 h 浓度达到最大, 然后在血液中的外源性胰岛素浓度逐渐降低, 直至检测不到, 波动范围较大; $t_{1/2}$ 基本为 0.5 h 左右, 作用时间较短; 血糖值降低的维持时间较短, 回升速度快, 且血糖值的波动较大。结论 通过直接 po 和内窥镜给予胰岛素胶囊内容物, 与 sc 短效胰岛素的结果相比, 尽管口服胰岛素胶囊在 Beagle 犬体内吸收和消除均比较快, 动物的个体差异影响较明显; 但是仍然具有降糖的作用。

关键词: 胰岛素胶囊; 重组人胰岛素注射液; Beagle 犬; 药动学; 药效学; 生物利用度

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)11-2077-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.11.005

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Insulin Capsules in Beagle dogs

LI Ya-zhuo¹, LI Wei¹, ZHANG Xing-yan², HE Yu-feng³, WEI Zi-hong¹, WU Wei-dang¹, CI Xiao-yan¹, SUN Lei³, JIANG Li-xin³, LIU Chang-xiao¹, YI Xiu-lin¹, ZENG Yong¹

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Company Ltd, Tianjin 300301, China
2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China
3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
4. Tianmai Biological Technology Development Company Limited, Hefei 230601, China

Abstract: Objective To study the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of Insulin Capsules in Beagle dogs. **Methods** Four healthy Beagle dogs were given subcutaneous injection of Recombinant Human Insulin Injection and oral and endoscopic administration of Insulin Capsules. Plasma samples were collected at different time points and blood glucose levels were measured synchronously. Blood concentration of serum was determined by radioimmunoassay (RIA) method. **Results** After 4 Beagle dogs themselves crossed were given insulin preparations, $t_{1/2}$ were (0.986 ± 0.185) , (0.649 ± 0.508) , and (0.518 ± 0.187) h, the $C_{\max}$ was (102.0 ± 45.7) , (625.0 ± 360.0) , and (453.0 ± 636.0) $\mu\text{U/mL}$, $t_{\max}$ were (0.375 ± 0.224) , (0.750 ± 0.289) , and (0.500 ± 0.601) h, AUC_{0-t} was (181.0 ± 42.6) , (414.0 ± 246.0) , and (423.0 ± 526.0) $\mu\text{U}/(\text{mL} \cdot \text{h})$, F of oral and endoscopic administration of Insulin Capsules were $(5.41 \pm 2.26)\%$ and $(8.31 \pm 9.94)\%$, respectively. Insulin concentration of oral and endoscopic administration of Insulin

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFE0121400); 国家科技重大专项重大新药创制项目 (2012ZX09304002)

作者简介: 李亚卓 (1983—), 男, 山西太原人, 副研究员, 博士, 研究方向为药动学。Tel: (022)84845243 E-mail: liyz8@tjipr.com

*通信作者 曾 勇 (1965—), 男, 湖南人, 副研究员, 硕士, 研究方向药动学。Tel: (022)84845243 E-mail: zengy@tjipr.com

伊秀林 (1964—), 男, 天津人, 研究员, 博士后, 研究方向细胞生物学。Tel: (022)84845243 E-mail: yixl@tjipr.com

Capsules reached the maximum during 0.5 — 1 h, then the exogenous insulin concentration in the blood gradually decreased until undetectable and with larger range. $T_{1/2}$ was about 0.5 h with short response time. The maintenance time of blood glucose value was shorter, the recovery rate was faster, and the fluctuation of blood sugar value was larger. **Conclusion** Compared with subcutaneous injection of Recombinant Human Insulin Injection, Absorption and elimination of insulin in Beagle dogs by oral and endoscopic administration of Insulin Capsules are faster. and the individual difference of animals are more obvious, but there are still has hypoglycemic effect.

Key words: Recombinant Human Insulin Injection; Insulin Capsules; Beagle dogs; pharmacokinetics; pharmacodynamics; bioavailability

胰岛素是由胰岛 β 细胞分泌的多肽类激素(相对分子质量为5800),参与调节机体物质能量代谢和促进体内细胞对葡萄糖的摄取,达到体内代谢的平衡稳态^[1]。糖尿病是由于分泌胰岛素不足或不分泌所致的代谢性疾病^[2],自1922年Banting和Best首次从胰腺分离出胰岛素后,就迅速成为治疗1型糖尿病和2型糖尿病最有效的药物之一^[3]。临床上胰岛素的主要给药方式是sc,会给需要终生使用胰岛素治疗的糖尿病患者带来身体和心理上的痛苦,因而在很大程度上降低了患者治疗的依从性。口服胰岛素制剂是最理想的给药形式^[4-5],由于胰岛素经由肝门静脉到达体循环,肝脏器官能调整血液中的胰岛素浓度,防止胰岛素和血糖的峰谷值有较大的出入,符合正常生理状态下的模式^[1,5-7]。但由于胰岛素的生物利用度低,胰岛素口服制剂在临床上的使用受到限制。本实验研究了一种新型胰岛素胶囊在Beagle犬体内药动学和药效学特征,并计算胰岛素胶囊相对生物利用度,可以预测胰岛素胶囊在体内随时间的吸收、分布、代谢、排泄等过程以及药动学性质,判断胰岛素胶囊是否具有合适的口服生物利用度和半衰期,减少药物开发成本,为以后的研究提供理论基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

重组人胰岛素注射液:合肥天汇孵化科技有限公司出品,规格300 IU:3 mL/支,批号20140906,使用前4℃冰箱保存。Oramed口服胰岛素胶囊:Oramed Pharmaceuticals Inc提供,规格8 mg(约220 IU)/粒,批号0007040400,使用前4℃冰箱保存。人胰岛素放射免疫测定试剂盒(货号HI-14K, Merck公司,使用前-20℃保存);犬C肽放射免疫测定试剂盒(货号CCP-24HK,美国Millipore公司)。

1.2 动物

健康Beagle犬,雌雄各2只,体质量9.0~11.0 kg,购自北京玛斯生物技术有限责任公司,生产许可证编号SCXK(京)2016-0001,动物合格证编号

SYXK(津)2011-0005。

1.3 仪器

WIZARD22470自动伽马计数仪,美国PE公司。真空采血管(肝素抗凝),规格3 mL,批号150301,江苏康健医疗用品有限公司。DL-5型冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司。卓越型ACCU血糖测试仪及配套血糖试纸,罗氏诊断有限公司;卓越金锐血糖试纸,批号473340。

2 方法与结果

2.1 动物分组

试验前对动物编号为1~4号,其中单号雄性,双号为雌性。第1次实验时1~4号sc给予胰岛素注射液(5 U/只),依据成人单次口服剂量折算。第2、3次实验时分别po(8 mg/只)和内窥镜(8 mg/只)给予胰岛素胶囊内容物;实验之间洗脱期设定为1周。

2.2 血样采集和检测

实验给药前1天晚上21:00动物进食晚餐后禁食(采血结束后第2次进食)。于次日9:00开始,分别给予胰岛素胶囊或重组人胰岛素注射剂,完整胶囊给药和内窥镜给药于给药前0 h,给药后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、6 h取全血约2.5 mL。sc于给药前0 h,给药后0.167、0.333、0.5、1、1.5、2、3、4、6 h取全血约2.5 mL,肝素抗凝3500 r/min离心5 min,分离出血浆,立即-80℃冰冻保存待测。在上述时间点采血,同时取一滴全血立刻用血糖仪和试纸测定动物的血糖值。

2.3 犬血浆胰岛素测定的本底扣除

健康动物体内有内源性胰岛素分泌,会干扰外源性胰岛素的浓度测定,因此需要扣除内源性胰岛素,排除对外源性胰岛素浓度检测的影响。动物体内胰岛素和C肽是等分子分泌,测定血浆中犬C肽水平可用于校正内源性胰岛素的水平。实验使用犬C肽放射免疫测定试剂盒和胰岛素放射免疫测定试剂盒同步检测血浆中犬C肽浓度;使用高灵敏度的放射免疫法(RIA)测定各时间点采集血浆样品的

总胰岛素和犬 C 肽浓度, 计算外源胰岛素。

$$I_{\text{ex}(t)} = I_{0(t)} - [C_{(t)} I_{(t=0)} / C_{(t=0)}]$$

$I_{\text{ex}(t)}$ 是注射后 t 时间的外源性胰岛素浓度, $I_{0(t)}$ 是注射后 t 时间的总胰岛素浓度, $C_{(t)}$ 是 t 时的 C 肽浓度, $I_{(t=0)}$ 是初始内源性胰岛素浓度, $C_{(t=0)}$ 是初始时 C 肽浓度^[13-14]。

2.4 犬血浆中人胰岛素药物浓度的放射免疫测定

2.4.1 样品测定方法 试剂盒室温平衡 30 min 后, 取出有一抗的放射免疫试管, 按试剂盒说明书进行操作, 测得放射计数每分钟衰变次数 (CPM), 计算各管计数与总放射管 (T 管) 计数的比值 $B/T-B_0/T$ 。

2.4.2 标准曲线与样品浓度计算 用标准稀释液将试剂盒人胰岛素标准溶液 (200 $\mu\text{U/mL}$) 稀释成质量浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{U/mL}$ 的标准工作液, 测定各标准管的 CPM 值, 平行测定 2 管, 取平均值。结果经 Origin 7.0 软件进行处理。在 3.125~200 $\mu\text{U/mL}$ 时, 药物浓度与 $B/T-B_0/T$ 符合四参数方程 $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^P]$, 每次试验均制备 1 条标准曲线。

X 为待测血浆样品浓度, Y 为测得的 $B/T-B_0/T$ 值, X_0 为 $B/T-B_0/T = 50\%$ 对应的样品浓度, P 为标准曲线 $Y = 50\%$ 处斜率, A_1 、 A_2 分别是 S 型曲线下渐进线和上渐进线的估计值 (根据标准品测量值计算机能自动算出)。最低定量限即为标准曲线最低浓度 3.125 $\mu\text{U/mL}$ 。

2.4.3 精密度与准确度试验 在犬血浆中加入不同浓度的人胰岛素后得到 14.4、24.4、44.4、114.4 $\mu\text{U/mL}$ 浓度的血样, 测得批内 RSD 值为 2.70%~5.80%, 批间 RSD 值为 1.71%~5.05%。

2.4.4 稳定性试验 将 0、30、100 $\mu\text{U/mL}$ 人胰岛素加入到犬血浆中, -80°C 保存 60 d 后相对误差 (RE) 为 -3.45%~3.61%。

2.4.5 回收率试验 在犬血浆中加入 0、10、30、100 $\mu\text{U/mL}$ 人胰岛素, 测定后扣除本底 10~100 $\mu\text{U/mL}$, 测定的相对回收率为 106%~108%。

2.5 犬血浆样品中犬 C 肽浓度的放射免疫测定

2.5.1 样品测定方法 取放免试管编号, 然后按试剂盒说明书进行操作, 最后在伽马计数器上测得各管放射计数 CPM, 计算出各管计数与零标准管计数的百分比值 B/B_0 。

2.5.2 标准曲线与样品浓度计算 标准曲线是用分析缓冲液将测定试剂盒所带的犬 C 肽标准溶液 (20 ng/mL) 倍比稀释成浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 ng/mL 的系列标准工作液, 按

上述方法测定 CPM 值, 每个浓度平行做 2 管, 取平均值。结果经 Origin 7.0 软件处理, 在 0.312 5~20 ng/mL 时, 药物浓度与 B/B_0 符合四参数方程 $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^P]$, 每次试验均制备 1 条标准曲线。

X 为待测样品浓度, Y 为测得的 B/B_0 值, X_0 为 $B/B_0 = 50\%$ 对应的样品浓度, P 为标准曲线斜率, A_1 、 A_2 分别是反 S 型曲线上渐进线和下渐进线的估计值 (根据标准品测量值计算机能自动算出)。最低定量限为 0.312 5 ng/mL, 即为标准曲线的最低浓度点。

2.5.3 精密度与准确度试验 将 0、1.0、3.0、10 ng/mL 犬 C 肽加入犬血浆中, 测得的批内 RSD 值为 2.30%~6.30%, 批间 RSD 值为 2.90%~8.50%。

2.5.4 稳定性试验 加入不同浓度的犬 C 肽得到 0.980、3.98、11.1 ng/mL 血样, -80°C 保存 60 d 后测定 RE 为 -1.13%~8.87%, 说明在该保存条件下待测品可以保持稳定。

2.5.5 回收率试验 空白犬血浆中加入 0、1.0、3.0、10 ng/mL 犬 C 肽, 测定后扣除本底的相对回收率为 98%~100%。

2.6 胰岛素血药浓度测定及主要药动学参数

4 只健康 Beagle 犬 sc 重组人胰岛素注射剂以及 po 和内窥镜给予胰岛素胶囊后, 测定的各时间点血浆样品的总胰岛素浓度扣除本底后得到各时间点外源胰岛素浓度值。采用 DAS 2.0 药动力学计算程序软件计算药动学参数, 比较动物交叉给药后 $C_{\min}$ 和 $t_{\min}$, 绘出平均外源胰岛素浓度-时间曲线。外源胰岛素平均药时曲线见图 1, 主要药动学参数见表 1。

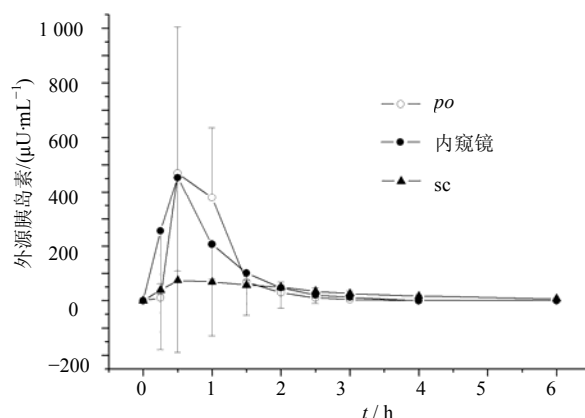


图1 Beagle 犬给药后外源胰岛素的平均药时曲线 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 1 Mean plasma concentration - time curves in Beagle dogs ($\bar{x} \pm s$)

表1 Beagle 犬3种给药方式的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Main pharmacokinetic parameters after three administration of Beagle dogs ($\bar{x} \pm s$)

参数	单位	sc	po	内窥镜给药
$t_{1/2}$	h	0.986 ± 0.185	0.649 ± 0.508	0.518 ± 0.187
$C_{\max}$	$\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	102.0 ± 45.7	625.0 ± 360.0	453.0 ± 436.0
$t_{\max}$	h	0.375 ± 0.224	0.750 ± 0.289	0.500 ± 0.601
AUC_{0-t}	$\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	181.0 ± 42.6	414.0 ± 246.0	423.0 ± 526.0
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	184.0 ± 41.5	426.0 ± 242.0	433.0 ± 530.0
F	%		5.41 ± 2.26	8.31 ± 9.94

可以看出 *po* 和内窥镜这两种途径的胰岛素胶囊随着时间的变化大致一样, 在 0.5~1 h 能达到峰值, 随后胰岛素浓度在血液中逐渐降低, 半衰期 ($t_{1/2}$) 在 0.5 h 左右, 作用时间短; *sc* 胰岛素制剂在血液中的浓度波动变化不大, $t_{1/2}$ 为 1 h 左右, 作用时间较长, 与以上两种给药途径在 Beagle 犬体内的变化不一致。

2.7 胰岛素的药效学参数比较

3种给药方式后 Beagle 犬血糖变化见图2, $t_{\min}$ 和 $C_{\min}$ 结果见表2。

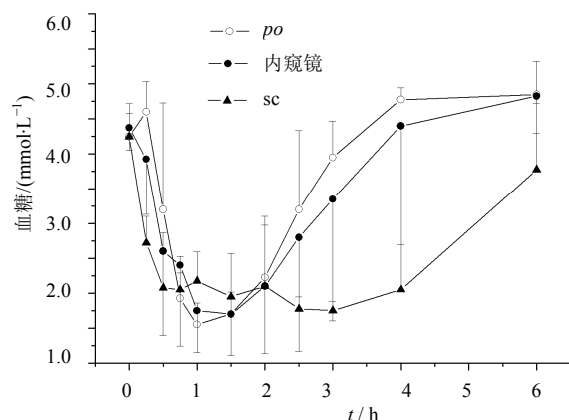


图2 Beagle 犬在3种方法给药后的平均血糖-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Mean blood glucose - time curve of Beagle dogs after three methods ($\bar{x} \pm s$)

表2 3种方式给药后 Beagle 犬血糖 $C_{\min}$ 和 $t_{\min}$ 值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 $C_{\min}$ and $t_{\min}$ of blood glucose in Beagle dogs by three ways ($\bar{x} \pm s$)

给药方式	$t_{\min}/\text{h}$	$C_{\min}/(\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$
sc	1.63 ± 0.85	1.4 ± 0.36
po	1.0 ± 0.41	1.4 ± 0.26
内窥镜	1.5 ± 0.71	1.58 ± 0.62

可以看出 *sc* 重组人胰岛素注射剂能在更长时间内控制 Beagle 犬的血糖值, 血糖值回升速度较慢, 波动范围较窄; 而经过 *po* 和内窥镜两种途径的胰岛素胶囊的血糖控制时间短, 血糖值回升速度快, 且血糖值的波动较大, 相比之下, 降低血糖值的维持时间较短。

3 讨论

胰岛素制剂是目前治疗糖尿病历史最长且疗效肯定的重要降糖药物, 而临床上使用的剂型是注射剂, 对于终身使用胰岛素患者来说长期的注射胰岛素易引起过敏反应或感染发生, 在生理上和心理上给众多糖尿病患者带来不便和痛苦^[8]。最容易让患者接受和最方便的一种给药方式是口服给药, 能够避免注射部位的疼痛和不适感; 更重要的是, 口服胰岛素通过肠道吸收可以经门静脉直接进入肝脏, 抑制肝糖原的分解, 减少发生高胰岛素血症, 符合正常的生理状态, 是最佳和首选的给药途径^[7,9]。

实验结果表明, *po* 和内窥镜这两种途径的胰岛素胶囊在 0.5~1 h 浓度达到最大, 然后在血液中的外源性胰岛素浓度逐渐降低, 直至检测不到, 波动范围较大; $t_{1/2}$ 基本为 0.5 h 左右, 作用时间较短; 血糖值降低的维持时间较短, 回升速度快, 且血糖值的波动较大。*sc* 短效胰岛素制剂在 Beagle 犬体内的浓度波动程度较小, $t_{1/2}$ 为 1 h 左右, 作用时间较长; 血糖值回升速度较慢。因此本研究的口服胰岛素制剂通过直接口服和内窥镜给予胰岛素胶囊内容物, 与 *sc* 短效胰岛素的结果相比, 尽管 *po* 胰岛素胶囊在 Beagle 犬体内吸收和消除均比较快, 动物的个体差异影响较明显; 但是仍然具有降糖的作用。同时, 可能由于制剂工艺或其他因素生物利用度较低, 需要进一步的提高完善。

现如今, 随着高分子生物学、材料化学、药学等各学科快速发展, 会更加全面和深入的研究制

药技术、药物新剂型和载体材料等技术^[10], 将有希望进一步的改善 *po* 胰岛素胶囊, 使其能安全有效的满足临床需求, 从而为广大糖尿病患者更方便和稳定的控制血糖。

参考文献

- [1] 李娟, 赵维纲. 口服胰岛素制剂研发进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(21): 2095-2099.
- [2] Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis J S, *et al.* Insulinitis and β -Cell Mass in the natural history of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2016, 65(3):719-731.
- [3] Segal A R, Vootla T, Beaser R S. Insulin: making sense of current options [J]. *Endocrin Metab Clin North Am*, 2016, 45(4):845-874.
- [4] Rekha M R, Sharma C P. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes--future perspectives [J]. *Int J Pharm*, 2013, 440(1): 48-62.
- [5] 刘岩, 杜郁茜, 孙进. 口服胰岛素制剂的研究进展 [J]. 中南药学, 2015, (10): 1062-1065.
- [6] 奚炜, 鲁憬莉, 向明. 口服胰岛素制剂的优势与研究进展 [J]. 医药导报, 2011, 30(11): 1446-1448.
- [7] Heinemann L, Jacques Y. Oral insulin and buccal insulin: a critical reappraisal [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2009, 3(3): 568-584.
- [8] Jin X, Zeng L, Zhang S, *et al.* Human insulin versus porcine insulin in rhesus monkeys with diabetes mellitus [J]. *J Med Primatol*, 2013, 42(1):1-9.
- [9] Rekha M R, Sharma C P. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes--Future perspectives [J]. *Int J Pharm*, 2013, 440(1): 48-62.
- [10] 张艺卓, 张俊伟, 尹东东, 等. 口服胰岛素制剂的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2015, (22): 2560-2566.