

聚乙二醇化重组人胰岛素注射液 Beagle 犬毒动学研究

宋紫辉, 项宗尚, 李春雨, 申文晋, 吴雅丽, 蔡永明, 张宗鹏*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 研究毒性剂量暴露下聚乙二醇化重组人胰岛素注射液 (PEG-Det) 的毒动学 (TK), 以评价系统暴露与剂量、时间及毒性结果之间的关系, 通过重复给药分析药物在体内是否存在蓄积及代谢方式是否改变等特性。方法 32 只健康 Beagle 犬随机分为 4 组, 每组 8 只, 雌雄各半, 分别 sc 低、中、高剂量 (37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) PEG-Det 及溶媒, 每周给药 2 次, 重复给药 9 个月。分别于首次 (d1)、中期 (d89) 和末期 (d260) 给药后采用放射免疫分析 (RIA) 法检测不同时间血药浓度, 采用罗氏血糖仪同步测定动物血糖水平。试验数据采用 DAS 3.0 药动程序拟合分析并计算 TK 参数。结果 各剂量组动物 sc 给药后, 随血药浓度升高伴血糖降低, 且与给药剂量呈正相关; 随给药频率增加, 血糖降低幅度减小; 单次和多次给药后, PEG-Det 的 C_{max} 和 AUC 与剂量均呈正相关; 随给药频率增加, 各剂量组的 C_{max} 和 AUC_{ss} 降低, 且给药末期 (9 个月) 的蓄积指数 ($R_{C_{\text{max}}}$ 和 R_{AUC}) 均小于 1; 各剂量组在给药不同阶段的消除半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 为 20~30 h; 达峰时间 T_{max} 和清除率 CL_z/F 均在一定范围内波动, 不与剂量相关。结论 Beagle 犬重复 sc 给予 PEG-Det 37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 随给药剂量增加, 药物暴露量增大; 经多次给药后, 血浆中胰岛素浓度趋于平稳, 体内无药物蓄积; 且血糖降低幅度减少, 在维持有效浓度和药效的基础上, 降低了由低血糖带来的安全性风险。

关键词: 聚乙二醇化重组人胰岛素注射液; 毒动学; Beagle 犬; 药物蓄积

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)06-0983-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.012

Toxicokinetics study of pegylated recombinant human insulin injection in Beagle's dogs

SONG Zi-hui, XIANG Zong-shang, LI Chun-yu, SHEN Wen-jin, WU Ya-li, CAI Yong-ming, ZHANG Zong-peng

Tianjin Institute Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co.Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To study toxicokinetics of pegylated recombinant human insulin injection (PEG-Det) at the toxic dose, and to evaluate the relationship between systemic exposure and dose, time or toxicity outcomes. The existence of drug accumulation and the change of drug metabolism characteristics *in vivo* are explored by multiple administration of the drug. **Methods** Totally 32 healthy Beagle's dogs were randomly divided into four groups, including low, medium and high dose (37.5, 75.0 and 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) groups of PEG-Det, and vehicle control group. Each group included 8 Beagle's dogs, with male and female animals each half. All animals were sc administered twice a week with continuous dosing for 9 months. The plasma concentration of PEG-Det in period of first day (d1), mid-term (d89) and late-term (d260) dosing was determined using a radioimmunoassay (RIA) method. Meanwhile, the blood glucose level was monitored using a Roche blood glucose meter. The toxicokinetic parameters were calculated by DAS 3.0 software. **Results** After drug administration, the blood glucose which was positively correlated with the dose decreased along with elevated plasma concentration of PEG-Det. But with increasing of dosing times, the reduction amplitude of blood glucose diminished. The C_{max} and AUC of PEG-Det were both positively correlated with the dose after single or multiple drug administration. And the C_{max} and AUC_{ss} of different dose groups reduced with increasing of dosing times. The accumulation indexes ($R_{C_{\text{max}}}$ and R_{AUC}) were both less than one after nine months dosing, indicating that there was no drug accumulation *in vivo* of Beagle's dog. The mean elimination half-life $t_{1/2\alpha}$ ranged from 20 to 30 h, which displayed its characteristics of long-lasting effect. The peak concentration arrival time T_{max} and

收稿日期: 2016-07-18

基金项目: 天津创新药物安全评价技术平台 (2013ZX09302301)

作者简介: 宋紫辉 (1984-), 硕士, 主要从事药物临床前评价研究。E-mail: songzh@tjipr.com

*通信作者 张宗鹏, 研究员, 硕士生导师。Tel: 022-84845259, E-mail: zhangzp@tjipr.com

clearance CL_z/F fluctuated within a certain range, and were independent of dose. **Conclusion** Beagle's dogs are sc treated with PEG-Det at different doses of 37.5, 75.0, and 150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 9 months. With the increase of dose, drug exposure could increase. After multiple dosing, the plasma concentration of insulin trends to be stable. There is no drug accumulation *in vivo*. The reduction amplitude of blood glucose reduces, which lowers the safety risks of hypoglycemia on the basis of maintaining the effective concentration and efficacy.

Key words: pegylated recombinant human insulin injection; toxicokinetics; Beagle's dogs; drug accumulation

目前, 糖尿病已成为威胁人类健康的第三大重大疾病, 仅次于心脑血管疾病和肿瘤^[1-2]。随着近年来其发展趋势的年轻化 and 大众化, 新型胰岛素类似物的开发逐渐成为众多研究者关注的焦点^[3-6]。聚乙二醇化重组人胰岛素注射液 (PEG-Det) 属生物工程一类新药, 是通过地对特胰岛素 (Det) 聚乙二醇 (PEG) 修饰后得到, 其应用前景非常广阔。本试验通过研究 PEG-Det 在毒性剂量暴露下的毒代动力学与毒效动力学的动态变化, 探究其系统暴露程度和持续时间以及在体内的蓄积情况, 为该药的进一步临床试验提供参考。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

聚乙二醇化重组人胰岛素注射液 (PEG-Det, 规格 9.5 mg/3mL, 批号 20110401)、PEG-Det 溶媒 (规格 10 mL/支, 批号 20110401), 均由重庆富进生物医药有限公司提供。抑肽酶 (规格 5 mg/瓶, 批号 6247884), 比活 $>5\ 500\ \text{IU}/\text{mg}$, 为美国罗氏公司产品 (进口分装)。

胰岛素放射免疫分析试剂盒, 北京北方生物技术研究所, 批号为 20111120、20120120, 主要用于定量检测犬血浆样品中胰岛素水平; 犬 C 肽放射免疫分析试剂盒, 美国 Millipore 公司, 批号为 1963996A, 主要用于定量检测犬血浆样品中 C 肽水平。

1.2 主要仪器

Thermo Scientific Sorvall ST 16R 低温离心机 (美国 Thermo 公司); Accu-Chek Performa 卓越型血糖仪 (罗氏公司); GAMMA-C12 计数器 (德国 DPC 公司); 2470 WIZARD2 全自动伽玛计数器 (美国 Perkin Elmer 公司); LXJ-IIB 低速大容量多管离心机 (上海安亭科学仪器厂); GL-802A 型微型台式真空泵 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 实验动物

健康成年 Beagle 犬 32 只, 体质量 6~8 kg, 雌雄各半, 由安徽阜阳市维光实验动物中心提供, 实

验动物生产许可证号: SCXK (皖) 2011-001。所有动物均有检疫证书和个体档案, 研究方案经实验动物管理与使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 认证批准。动物实验操作均在 GLP 实验室进行。动物饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼, 温度设定范围 20~26 $^{\circ}\text{C}$, 湿度设定范围 40%~70%, 换气次数不少于 8 次全新风/h, 光照时间为 12 h/12 h 明暗交替。犬粮由北京科澳协力饲料有限公司提供, 自由饮用城市生活自来水。

2 方法

2.1 动物分组及给药

32 只 Beagle 犬按体质量随机分为 4 组: 溶媒对照组和 PEG-Det 低、中、高剂量组, 每组 8 只, 雌雄各半; 根据预试验结果及相关技术指导原则, PEG-Det 低、中、高剂量组的剂量分别设定为 37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 分别相当于临床拟用剂量的 1.97、3.95、7.89 倍; 所有动物每周于颈背部 sc 给药 2 次, 给药体积为 0.2 mL/kg, 连续重复给药 9 个月, 动物给药后 6 h 统一饲喂。实验中期即给药 3 个月时各组统一剖杀 2 只动物, 高剂量组 1 只雄性动物于给药 d125 死亡。

2.2 血样采集及血糖测定

血药浓度采血时间: 分别于 d1 (首次给药)、M3 (d89, 给药 3 个月)、M9 (d260, 给药 9 个月) 的 0 (药前)、0.5、2.0、4.0、6.0、12.0、24.0、48.0、72.0 (药后) h 于前肢隐静脉采血; 多次给药稳态波峰、谷采血时间: d78、d82、d85、d246、d250、d253、d257 的 0 h (药前)、6 h (药后), 于前肢隐静脉采血。用肝素抗凝采血管从前肢隐静脉采血约 2 mL, 加入含肝素钠抗凝的真空采血管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 20 min, 制备血浆, 分装 2 管, 其中一份加入抑肽酶 (500 kU/mL) 以防血液中所含 C 肽发生蛋白酶水解, 样品于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 直至测定。与血药浓度采血时间点同步进行血糖测定, 于前肢隐静脉采血, 即刻采用血糖仪检测全血血糖。

2.3 Beagle 犬校正后血药浓度测定

由于正常动物体内含内源性胰岛素，它将干扰血药浓度测定。通常胰岛素和 C 肽在体内是等分子分泌，测定血浆中犬 C 肽水平可用于校正内源性胰岛素的水平。本研究采用定量检测特异性犬 C 肽试剂盒，与胰岛素同步检测血浆中犬 C 肽浓度以扣除犬内源性胰岛素对外源性胰岛素测定的影响。

$$I_{\text{ext}} = I_t - C_t I_0 / C_0$$

I_{ext} 是注射后 t 时间的校正胰岛素浓度， I_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_0 是初始内源性胰岛素浓度， C_0 是初始时 C 肽浓度^[7-8]。

采用放射免疫分析 (RIA) 法测定的各时间点总胰岛素浓度减去时间点利用 C 肽校正过的内源性胰岛素浓度，得到校正后的胰岛素浓度。

2.4 毒代动力学参数计算及蓄积评价

单次和多次给药的血药浓度-时间测定数据采用 DAS 3.0 (北京博之音科技有限公司) 药动程序，非房室模型拟合计算毒代动力学参数，包括：药时曲线下面积 (AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 AUC_{ss})、峰浓度 (C_{max})、消除相半衰期 ($t_{1/2z}$)、清除率 (CL_z) 和达峰时间 (t_{max})，其中 t_{max} 、 C_{max} 采用实测值，AUC 采用统计矩法计算。计算蓄积指数 (R)，即末次给药的 $C_{\text{max}}^{\text{ss}}$ 和 AUC_{0-t}^{ss} 分别与首次给药的 C_{max}^1 和

AUC_{0-t}^1 的比值 ($R_{C_{\text{max}}} = C_{\text{max}}^{\text{ss}} / C_{\text{max}}^1$ ， $R_{\text{AUC}} = AUC_{0-t}^{\text{ss}} / AUC_{0-t}^1$)，以评价是否存在蓄积效应。

3 结果

3.1 血糖测定结果

32 只健康 Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 (0、37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) PEG-Det 后平均血糖浓度-时间曲线见图 1。结果表明，Beagle 犬给药后随血药浓度升高的同时，伴随着血糖的降低，且与剂量呈一定相关性。给药后 2 h 血糖开始下降，4~6 h 内降至最低，且维持在一较低水平内，随着血药浓度的降低，血糖水平逐渐升高。具体血糖变化趋势为：首次给药，各剂量组于给药后的 12 h 基本恢复到给药前的血糖基础水平；给药中期 (d89)，低和中剂量组在给药后的 12 h 能恢复到给药前的血糖基础水平，而高剂量组在给药后的 72 h 才恢复到给药前水平；给药后期 (d260)，低、中剂量组动物血糖降低程度明显减弱，24 h 后血糖恢复到基础水平，而高剂量组的血糖在 72 h 恢复到药前基础水平。上述结果提示，随给药时间的延长，动物给药后血糖降低的程度呈下降趋势，持续时间呈上升趋势，并与给药剂量呈正相关；随给药频率增加，血糖降低幅度减小，降低了由药物所致低血糖以及由此而引起的风险。

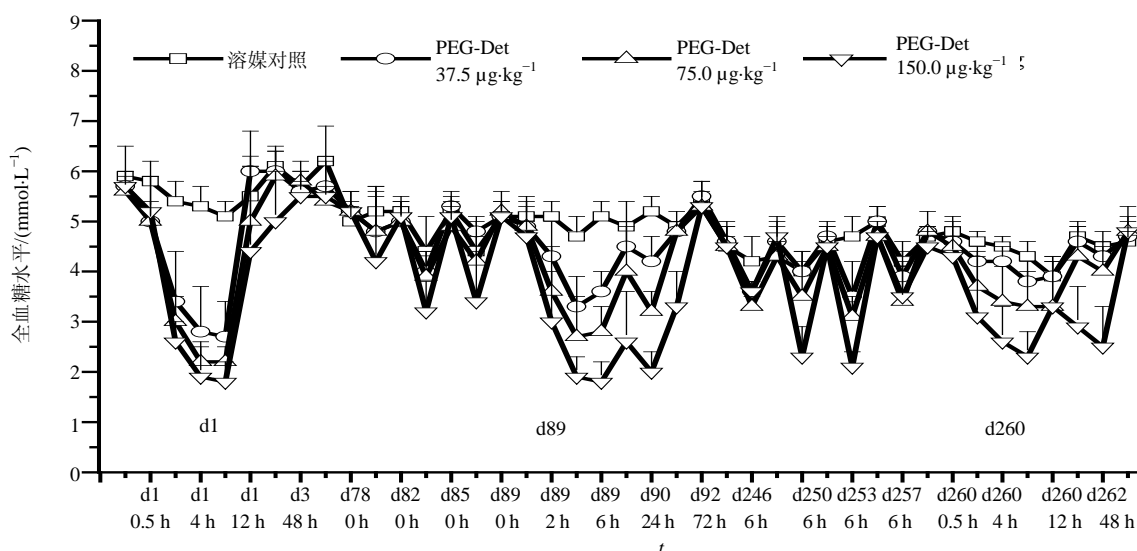


图 1 Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 PEG-Det 后的血糖-时间变化曲线图

Fig. 1 Mean blood glucose level-time curves after single or multiple sc administration of PEG-Det in Beagle's dogs

3.2 RIA 法测定犬血浆胰岛素浓度的方法学确证

标准曲线：配制不同浓度的 PEG-Det 溶液，使其终浓度分别为：5、15、45、135、405 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (按 1 mg 相当于 10.5 U 换算后配制而成，U 表示为胰岛

素效价)；在此浓度范围内，药物浓度对数与 B/B_0 (各管计数与零标准管计数的比值) 呈 Logistic 线性相关。PEG-Det 注射液的平均标准曲线方程为： $Y = 0.759 + 104.406 / [1 + (X/40.343)^{0.856}]$ ($n=24$)，分

析方法的线性范围为 5~405 $\mu\text{U/mL}$ (X 为待测样品浓度, Y 为样品测定的 cpm 值)。在标准曲线范围内, 将 PEG-Det 配制成低、中、高 (30、60、150 $\mu\text{U/mL}$) 3 个浓度的质控 (QC) 样品, 测定的批间、批内精密度和准确度均在 $-15\% \sim 15\%$ 范围内。QC 样品在 25 $^{\circ}\text{C}$ 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存 1 d、 -20°C 储存 1 d 或 60 d、 -20°C 经历 3 次冻融循环等 5 种不同条件下均可稳定保存, 准确度在 $-15.1\% \sim 2.8\%$ 。当稀释度不大于 1:16 时, 用犬空白血浆稀释样品对测定结果的影响不大。该方法特异性良好, 胰高血糖素、促黄体生成素、卵泡刺激素、胰岛素原、生长抑素等 5 种肽类或蛋白类激素对测定的交叉反应率均 $\leq 0.27\%$ 。以上方法学验证结果表明, 本研究所建立的 RIA 方法能满足 PEG-Det 非临床毒代动力学研究的基本要求。

3.3 RIA 法测定犬血浆 C 肽浓度的方法学确证

标准曲线: 采用试剂盒提供的犬 C 肽标准品, 制备其终质量浓度为 0.172、0.344、0.688、1.375、2.750、5.500、11.000、22.000 ng/mL 的溶液; 在此浓度范围内, 药物浓度对数与 B/B_0 呈 Logistic 线性相关。PEG-Det 注射液的平均标准曲线方程

为: $Y=0.424+101.308/[1+(X/2.040)^{1.025}]$ ($n=7$)。分析方法的线性范围为 0.172~22.000 ng/mL 。在标准曲线范围内, 将犬 C 肽配制成低、中、高 (0.7、1.8、7.0 ng/mL) 3 个浓度的质控 (QC) 样品, 测定的批间、批内精密度和准确度均在 $-15\% \sim 15\%$ 。

3.4 校正后的犬血浆中胰岛素浓度测定

健康 Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 PEG-Det 后的平均药时曲线变化比较见图 2。结果显示, Beagle 犬 sc 给药后的血药浓度随时间呈动态变化, 并与剂量呈正相关。给药后血浆药物缓慢释放呈逐渐升高趋势, 在药后 2~24 h 内血药浓度一直维持在相对高的水平范围内, 其后逐渐降低, 72 h 时仍能检测到血浆中药物浓度 (平均约降至峰浓度的 1/10~1/3)。但随给药次数的增加, 血药浓度逐渐趋于平稳。Beagle 犬单次与多次 sc PEG-Det 在相同时间不同剂量下的血药浓度随时间的动态变化趋势较为一致; 但在相同剂量下, 随给药频率的增加平均药时曲线分布更加趋于平缓。另外, 经多次给药后的波峰-谷稳态浓度测定结果显示, 其血浆药物浓度变化已基本趋于稳态。

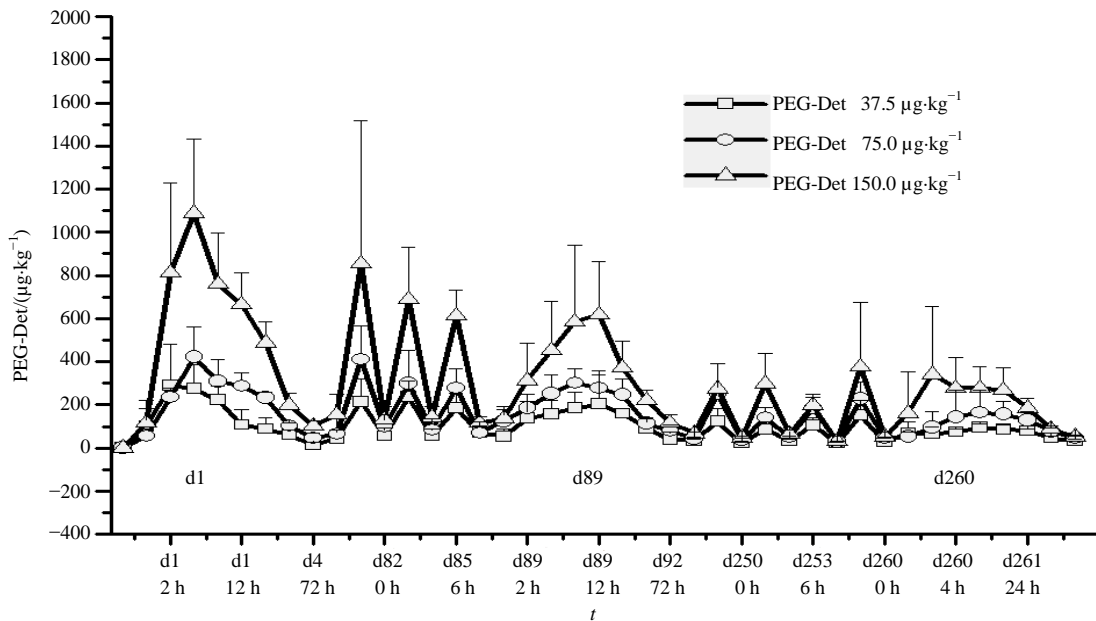


图 2 Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 PEG-Det 后的药时曲线图

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves after single or multiple sc administration of PEG-Det in Beagle's dogs

3.5 毒代动力学 (TK) 参数计算和分析

将校正后的胰岛素浓度数据用 DAS 3.0 药动学计算程序进行数据处理, Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 PEG-Det 在不同时间的平均 TK 参数比较列于表 1, 平均 $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ 和 C_{max} 变化曲线比较见图

3。结果显示, Beagle 犬单次 (d1) sc PEG-Det 3 个不同剂量 (37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g/kg}$) 后, AUC 和 C_{max} 与剂量呈正相关, 其平均 $\text{AUC}_{(0-72\text{h})}$ 分别为 (6 187 \pm 2 256)、(12 157 \pm 1 466) 和 (27 542 \pm 5 066) $\mu\text{U/mL}\cdot\text{h}$; 平均 C_{max} 为 (318.2 \pm 167.9)、(427.4 \pm

表1 Beagle 犬 sc 不同剂量 PEG-Det 后的平均 TK 参数比较

Table 1 Comparison of mean TK profiles after single or multiple sc administration of PEG-Det in Beagle's dogs

| 组别 | 参数 | 单位 | d1 | d89 | d260 |
|--|--------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| PEG-Det 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | n | / | 8 | 8 | 6 |
| | AUC_{ss} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | / | $8\,322\pm 3\,010$ | $4\,429\pm 508$ |
| | $AUC_{(0-72h)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $6\,187\pm 2\,256$ | $8\,322\pm 3\,010$ | $4\,429\pm 508$ |
| | $AUC_{(0-\infty)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $8\,737\pm 4\,092$ | $11\,443\pm 3\,765$ | $5\,913\pm 720$ |
| | $t_{1/2z}$ | h | 30.37 ± 24.88 | 31.52 ± 16.12 | 34.95 ± 2.37 |
| | T_{max} | h | 3.0 ± 1.1 | 11.3 ± 5.9 | 7.1 ± 4.4 |
| | CL_z/F | $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 0.054 ± 0.022 | 0.040 ± 0.020 | 0.068 ± 0.008 |
| | C_{max} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 318.2 ± 167.9 | 238.8 ± 117.3 | 110.7 ± 30.3 |
| PEG-Det 75.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | n | / | 8 | 8 | 6 |
| | AUC_{ss} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | / | $12\,223\pm 2\,575$ | $7\,316\pm 2\,209$ |
| | $AUC_{(0-72h)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $12\,157\pm 1\,466$ | $12\,223\pm 2\,575$ | $7\,316\pm 2\,209$ |
| | $AUC_{(0-\infty)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $14\,136\pm 2\,179$ | $15\,965\pm 4\,060$ | $9\,350\pm 2\,421$ |
| | $t_{1/2z}$ | h | 24.05 ± 6.29 | 30.99 ± 12.74 | 32.18 ± 5.03 |
| | T_{max} | h | 6.5 ± 7.1 | 6.5 ± 2.3 | 9.7 ± 3.7 |
| | CL_z/F | $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 0.057 ± 0.010 | 0.052 ± 0.013 | 0.089 ± 0.020 |
| | C_{max} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 427.4 ± 132.6 | 320.4 ± 71.8 | 178.2 ± 108.2 |
| PEG-Det 150.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | n | / | 8 | 8 | 5 |
| | AUC_{ss} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | / | $21\,772\pm 6\,512$ | $10\,897\pm 2\,929$ |
| | $AUC_{(0-72h)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $27\,542\pm 5\,066$ | $21\,772\pm 6\,512$ | $10\,897\pm 2\,929$ |
| | $AUC_{(0-\infty)}$ | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ | $30\,563\pm 5\,893$ | $28\,553\pm 7\,897$ | $12\,744\pm 2\,938$ |
| | $t_{1/2z}$ | h | 21.18 ± 3.11 | 30.44 ± 9.89 | 26.08 ± 5.44 |
| | T_{max} | h | 3.8 ± 0.7 | 10.5 ± 2.8 | 5.2 ± 4.1 |
| | CL_z/F | $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 0.054 ± 0.012 | 0.059 ± 0.017 | 0.128 ± 0.024 |
| | C_{max} | $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | $1\,133.2\pm 396.7$ | 681.4 ± 347.7 | 394.6 ± 274.7 |

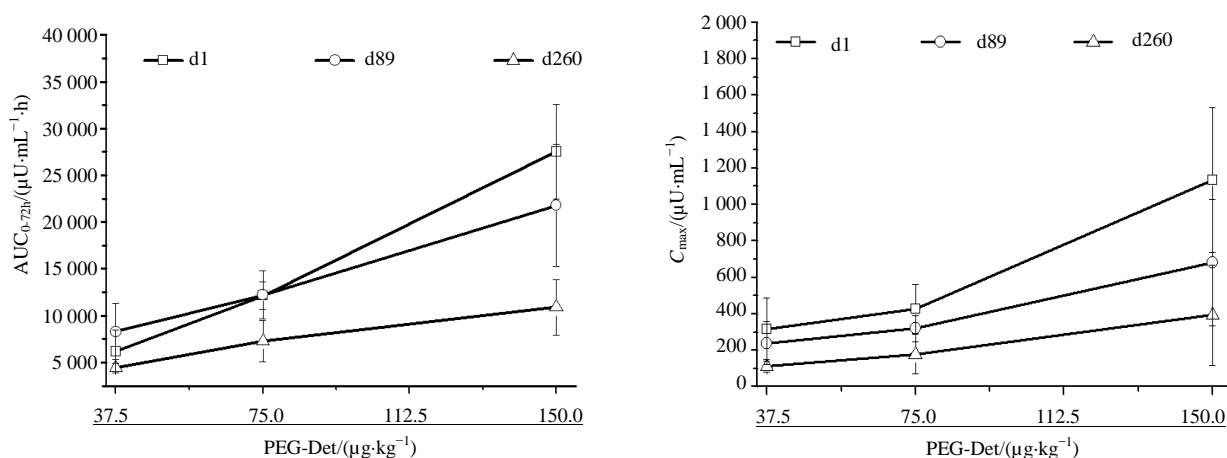


图3 Beagle 犬单次或多次 sc PEG-Det 后的平均 AUC_{0-72h} 和 C_{max} 与剂量的变化曲线图

Fig. 3 Comparison on mean AUC_{0-72h} and C_{max} -dose curves after sc administration of PEG-Det in Beagle's dogs

132.6) 和 $(1\ 133.2 \pm 396.7)$ $\mu\text{U}/\text{mL}$ 。多次给药中期 (d89), AUC_{ss} 和 C_{max} 均与剂量呈正相关, 达稳态 AUC_{ss} 和 $AUC_{0-72\text{h}}$ 均分别为 $(8\ 322 \pm 3\ 010)$ 、 $(12\ 223 \pm 2\ 575)$ 和 $(21\ 772 \pm 6\ 512)$ $\mu\text{U}/\text{mL}\cdot\text{h}$; C_{max} 为 (238.8 ± 117.3) 、 (320.4 ± 71.8) 和 (681.4 ± 347.7) $\mu\text{U}/\text{mL}$ 。多次给药末期 (d260), AUC_{ss} 和 C_{max} 均与剂量呈正相关, 达稳态 AUC_{ss} 和 $AUC_{(0-72\text{h})}$ 均分别为 $(4\ 429 \pm 508)$ 、 $(7\ 316 \pm 2\ 209)$ 和 $(10\ 897 \pm 2\ 929)$ $\mu\text{U}/\text{mL}\cdot\text{h}$; C_{max} 为 (110.7 ± 30.3) 、 (178.2 ± 108.2) 和 (394.6 ± 274.7) $\mu\text{U}/\text{mL}$ 。低、中和高 3 个剂量的 C_{max} 均随给药频率的增加而逐渐降低; 高剂量组的 AUC 随给药频率增加逐渐降低, 而低和中剂量在给药中期 (d89) 的 AUC 变化不明显, 但在给药末期 (d260) 呈现下降趋势。各剂量组在给药不同阶段的

消除半衰期 $t_{1/2z}$ 变化范围约为 20~30 h, 体现其长效的作用特点。达峰时间 T_{max} 和清除率 CL_z/F 均在一定范围内波动, 不与剂量相关。

3.6 多次给药后药物蓄积评价

Beagle 犬 sc 不同剂量 PEG-Det 后的蓄积指数计算结果见表 2。结果显示, 随给药次数增加, $R_{C_{max}}$ 逐渐降低, 给药末期 (d260) 与给药中期 (d89) 相比, 降低近 1 倍, 且 R 值均 <1 ; 在给药中期 (d89) 的高剂量组和给药末期 (d260) 的低、中和高 3 个剂量组的 $R_{AUC} < 1$, 且有随给药剂量和给药次数增加而降低的趋势。在重复给药近 9 个月 (d260) 后, 3 个剂量组的平均血浆峰浓度为首次给药的 40%~50% 间, 药物暴露量 (AUC) 也为首次给药的 45%~85%, 提示 Beagle 犬经多次 sc 给药后体内无药物蓄积。

表 2 Beagle 犬单次或多次 sc 不同剂量 PEG-Det 后的蓄积指数

Table 2 Accumulation index profiles after single or multiple sc administration of PEG-Det

| 剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | d1 | | d89 | | d89 蓄积指数 | |
|---|--|---|---|--|-----------------|-----------------|
| | $C_{max}^1/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0-t}^1/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h})$ | $C_{max}^{ss}/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0-t}^{ss}/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h})$ | $R_{C_{max}}$ | R_{AUC} |
| 37.5 | 318.2 ± 167.9 | $6\ 187 \pm 2\ 256$ | 238.8 ± 117.3 | $8\ 322 \pm 3\ 010$ | 0.89 ± 0.51 | 1.40 ± 0.43 |
| 75 | 427.4 ± 132.6 | $12\ 157 \pm 1\ 466$ | 320.4 ± 71.8 | $12\ 223 \pm 2\ 575$ | 0.80 ± 0.31 | 1.01 ± 0.17 |
| 150 | $1\ 133.2 \pm 396.7$ | $27\ 542 \pm 5\ 066$ | 681.4 ± 347.7 | $21\ 772 \pm 6\ 512$ | 0.62 ± 0.24 | 0.79 ± 0.18 |
| 剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | d1 | | d260 | | d260 蓄积指数 | |
| | $C_{max}^1/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0-t}^1/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h})$ | $C_{max}^{ss}/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0-t}^{ss}/(\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h})$ | $R_{C_{max}}$ | R_{AUC} |
| 37.5 | 318.2 ± 167.9 | $6\ 187 \pm 2\ 256$ | 110.7 ± 30.3 | $4\ 429 \pm 508$ | 0.40 ± 0.13 | 0.84 ± 0.25 |
| 75 | 427.4 ± 132.6 | $12\ 157 \pm 1\ 466$ | 178.2 ± 108.2 | $7\ 316 \pm 2209$ | 0.43 ± 0.28 | 0.60 ± 0.16 |
| 150 | $1\ 133.2 \pm 396.7$ | $27\ 542 \pm 5\ 066$ | 394.6 ± 274.7 | $10\ 897 \pm 2929$ | 0.52 ± 0.52 | 0.45 ± 0.22 |

4 讨论

PEG-Det 属生物技术 I 类新药, TK 研究是毒性研究的一个重要组成部分。Det 作为已上市的新一代长效胰岛素类似物, 其降糖疗效平稳而持久, 个体变异小, 低血糖和体质量增加发生率均较低^[9-12]。据其用药说明提示, Det 的消除相半衰期约为 5~7 h, 最长作用持续时间达 24 h, 因此患者临床应用时只需每日注射 1 次或 2 次。本研究中 Beagle 犬重复 sc 不同剂量的 PEG-Det 后, 消除相半衰期 $t_{1/2z}$ 均在 20~30 h 波动。相比 Det, PEG-Det 药效作用时间显著延长, 且每周给药两次即可维持有效的药物浓度, 这大大降低了由低血糖带来的安全性风险。PEG-Det 的长效作用机制是由于对 Det 进行的 PEG 化修饰。PEG 可使蛋白质或多肽分子上形成保护层, 增大相对分子质量并增加药物的水

溶性。相对分子质量的增大会降低肾小球的清除速率, 增加药物在体内循环的半衰期, 从而获得长效缓释的作用^[13-15]。

基于生物技术药物的特点, 本研究采用了灵敏度极高的 RIA 法检测血浆中胰岛素和 C 肽浓度, 并同步检测血糖水平的动态变化, 以进行毒代动力学-毒效学 (TK-TD) 模型的相关性分析。结果显示, PEG-Det 经多次给药后, 犬血浆中胰岛素浓度趋于平稳, 波峰/波谷比例减小; 同步监测的血糖降低幅度也随给药时间和频率增加逐渐变小, 显示 TK-TD 两者研究结果具有一定的一致性, 提示该药在临床应用时, 如果设定合理的给药剂量和间隔, 不仅能很好地维持长效药效浓度的发挥, 还能降低由低血糖带来的安全性风险。此外, 末次给药期与首次相比, 蓄积指数 ($R_{C_{max}}$ 和 R_{AUC}) 均小于 1, 提示连续

给药9个月后体内无药物蓄积。但同时发现随着给药频率的增加,暴露量(AUC和 C_{max})却呈降低趋势,这是由于PEG-Det在长期给药后可刺激动物细胞膜产生胰岛素受体数量上调,从而受体与药物结合最终导致了血药浓度的降低。

由此可见,PEG化的Det确实能改善和提高TK-TD特性,延长半衰期,降低清除率,增加暴露量,减小血清峰-谷浓度比率,延缓药物体内作用时间,具有长效作用及良好的安全性。另外,对于药物进入体内的作用及消除机制尚待进一步的研究。

参考文献

- [1] Ginter E, Simko V. Global prevalence and future of diabetes mellitus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771: 35-41.
- [2] 张晓春. 糖尿病发展现状分析 [J]. *临床医学实践*, 2015, 24(10): 184-186.
- [3] 曹凤林, 郑少雄. 胰岛素类似物: 糖尿病治疗的新选择 [J]. *医学综述*, 2007, 13(1): 32-34.
- [4] Caparrotta T M, Evans M. PEGylated insulin Lispro, (LY2605541)-a new basal insulin analogue [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(5): 388-395.
- [5] Rendell M. Insulin degludec: a long-acting modern insulin analogue with a predictable pharmacokinetic/pharmacodynamic profile [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2013, 49(6): 387-397.
- [6] Szypowska A, Golicki D, Groele L, et al. Long-acting insulin analogue detemir compared with NPH insulin in type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2011, 121(7-8): 237-246.
- [7] Jacobsen L V, Sogaarb B, Riis A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a premixed formulation of soluble and protamine-retarded insulin aspart [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 56(5): 399-403.
- [8] 毛晓明, 梁秉文, 饶亚萍, 等. 胰岛素经皮给药的药代动力学研究 [J]. *中国药学杂志*, 2000, 35(11): 760-762.
- [9] Goldman-Levine J D, Lee K W. Insulin detemir-a new basal insulin analog [J]. *Ann Pharmacother*, 2005, 39(3): 502-507.
- [10] Pieber T R, Treichel H C, Hompesch B, et al. Comparison of insulin detemir and insulin glargine in subjects with Type 1 diabetes using intensive insulin therapy [J]. *Diabet Med*, 2007, 24(6): 635-642.
- [11] Orozco-Beltrán D, Artola-Menéndez S. Prospective observational study of insulin detemir in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus initiating insulin therapy for the first time (SOLVE Study) [J]. *Aten Primaria*, 2016, 48(2): 95-101.
- [12] Haak T, Tiengo A, Draeger E, et al. Lower within-subject variability of fasting blood glucose and reduced weight gain with insulin detemir compared to NPH insulin in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2005, 7(1): 56-64.
- [13] 董红霞, 童 玥, 钱晓暉, 等. 聚乙二醇化蛋白质多肽类药物定点修饰策略 [J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(4): 360-365.
- [14] Turecek P L, Bossard M J, Schoetens F, et al. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 460-475.
- [15] Kolate A, Baradia D, Patil S, et al. PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2014, 192: 67-81.