

РАЗРАБОТКА САМОЭМУЛЬГИРУЮЩИХСЯ СИСТЕМ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ИНСУЛИНА

В.А.Мальцева, Д.И.Ефимова, Е.А.Рудько, А.К.Назаров, Е.А.Афонькина, А.Н.Семенов

ФГУП «Научный центр «Сигнал», Москва, 107014, ул. Большая Оленья, д. 8

тел. (495) 964-97-01, e-mail: info@ncsignal.ru

Резюме: Получены самоэмульгирующиеся системы, представлены их физические характеристики и рассмотрена возможность их использования для пероральной доставки инсулина. Исследована устойчивость самоэмульгирующихся систем с инсулином к разложению желудочным соком *in vitro* и изучена биодоступность инсулина в составе этих систем *in vivo*.

Ключевые слова: наноэмульсии, самоэмульгирующиеся системы доставки лекарств, пероральная доставка, биодоступность, инсулин.

DEVELOPMENT OF SELF-EMULSIFYING SYSTEMS FOR ORAL DELIVERY OF INSULIN

V.A.Maltseva, D.I.Efimova, E.A.Rud'ko, A.K.Nazarov, E.A.Afon'kina, A.N.Semenov

FGUP «Scientific Center «Signal», Moscow, ul. Bol'shaya Olen'ya, 8

tel. (495) 964-97-01, e-mail: info@ncsignal.ru

Summary: Self-emulsifying systems were obtained, data of its physicochemical properties were presented and potential of its application for oral delivery of insulin were considered. Resistance of insulin self-emulsifying systems for gastric fluid degradation *in vitro* was studied and bioavailability of insulin in its systems *in vivo* was researched.

Keywords: nanoemulsion, self-emulsifying drug delivery systems, oral delivery, bioavailability, insulin.

Введение

Сахарный диабет — хроническое эндокринно-обменное заболевание, обусловленное абсолютной или относительной инсулиновой недостаточностью. Для максимально

возможной компенсации углеводного обмена и снижения суточных колебаний глюкозы крови у больных сахарным диабетом I типа используют инсулинотерапию. Больные вынуждены регулярно прибегать к инъекциям инсулина для поддержания жизнедеятельности и сохранения привычного образа жизни. Этот способ введения доставляет дискомфорт, болезненные ощущения, пациентам необходимо строгое соблюдение режима питания, отдыха и двигательной активности. Кроме того, при инъекции инсулин вводится в системный кровоток, и лишь незначительная его доля достигает печени, где преимущественно локализуется функция инсулина согласно нормальной физиологии. Избыток инсулина в периферической части системы кровообращения может спровоцировать гипогликемию, иммунный ответ или инсулинорезистентность у пациентов [1].

Во всем мире активно предпринимаются попытки создания неинвазивных систем доставки лекарственных веществ, в особенности для перорального приема. Пероральный способ доставки инсулина является наиболее естественным и наиболее удобным для пациентов, так как распределение гормона соответствует нормальному физиологическому механизму, т.е. с током крови инсулин сначала поступает в печень через систему воротной вены, а затем в периферические ткани. Уровень гормона в системном кровотоке остается ограниченным, благодаря чему риск возникновения гипогликемии сводится к минимуму [1]. Однако, биодоступность инсулина при таком способе введения очень низкая (0,5 %) [2]. Это обусловлено деградацией инсулина под действием желудочно-кишечной среды и его слабой абсорбцией эпителием кишечника [3].

Различными исследовательскими группами были предприняты попытки защитить инсулин от негативного воздействия среды желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Так, было предложено химически модифицировать инсулин, покрывать его различными оболочками, внедрять в полимерные матрицы, использовать совместно с ингибиторами протеаз. Чтобы улучшить абсорбцию инсулина кишечником использовались вспомогательные вещества, а также коллоидные системы доставки [4–8]. В литературе описаны двойные [9] и тройные эмульсии с инсулином [10–12], устойчивые к действию протеолитических ферментов *in vitro* и снижающие уровень глюкозы в крови у животных. Чо и Флинн [13] отмечали снижение уровня глюкозы в крови у больных диабетом при приеме капсул, содержащих эмульсию «вода-в-масле» с инсулином и аprotинином.

Среди коллоидных систем доставки особый интерес для исследований представляют самоэмульгирующиеся системы (СЭС). Они способны спонтанно самоэмульгироваться в

среде желудка и кишечника. При легком взбалтывании, имеющем место на фоне моторики ЖКТ, они легко формируют эмульсию «масло-в-воде» с размером капель 1–100 нм. Улучшение биодоступности лекарств в составе СЭС достигается как за счет малого размера капель, так и за счет более равномерного их распределения в отделах ЖКТ. Кроме того, липиды, входящие в состав эмульсий, защищают лекарства от воздействия среды ЖКТ и способствуют их всасыванию в кишечнике, в частности за счет образования смешанных мицелл из продуктов липолиза триглицеридов и компонентов желчи [14]. СЭС термодинамически стабильны и удобны в применении. Их можно использовать в виде раствора или же преобразовать в гранулы или порошки для наполнения твердых желатиновых капсул и формирования таблеток [15, 16].

Цель исследования

Изучение возможности использования СЭС для пероральной доставки инсулина.

Материалы и методы

В работе были использованы Мейзин 35-1, Лабрафил М 2125 CS, Транскутол Р, Каприол 90 и Лабразол (Gattefosse, Франция); Твин-80, Коллифор EL, Кремофор А25, ПЭГ-400, этанол (96 %) и инсулин человеческий рекомбинантный (Sigma-Aldrich, Германия); олеиновая кислота (Fluka, Бельгия).

Получение наноэмульсий. Предконцентраты СЭС, содержащие липидную фазу, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и растворители в различных соотношениях, получены при перемешивании компонентов в термомиксере «Эппендорф» (Германия) при 25 °С в течение 20 мин при 2000 об·мин⁻¹. Кремофор А25 при комнатной температуре находится в твердом состоянии, поэтому его перед смешением с другими компонентами нагревали до температуры 37 °С. При разбавлении предконцентратов водой легко образуются эмульсии, размеры капель которых измеряли методом динамического рассеяния света («Zetasizer Nano-ZS», Malvern Instruments Ltd, Malvern, Англия). Предконцентрат смешивали с водой в соотношении 1:100 с образованием прозрачного однородного раствора. Измерения проводили сразу после растворения при 25 °С при фиксированном угле рассеяния 173°. Для дальнейших исследований были выбраны эмульсии с размером капель до 50 нм, устойчивые при комнатной температуре в течение 72 ч (табл. 1).

Табл. 1. Состав предконцентратов и размер капель СЭС, полученных из них.

№ п/п	Состав предконцентратов	Соотношение компонентов по массе	Средний диаметр капле эмульсии, нм
1	Мейзин:Коллифор EL:ПЭГ-400:Этанол	1:4:1:2	22
2	Мейзин ^а :Коллифор EL:ПЭГ-400:Этанол	1:4:1:2	24
3	Лабрафил:Твин-80:ПЭГ-400	2:4:1	23
4	Лабрафил:Коллифор EL:Транскутол	2:5:2	21
5	Лабразол:Коллифор EL:ПЭГ-400	1:3:2	11
6	Каприол:Коллифор EL:Этанол	2:6:1	16
7	Каприол:Кремофор А25:Лабразол	1:2:3	42

^аМейзин с добавкой 5 мас.% олеиновой кислоты.

В полученные предконцентраты эмульсий был введен инсулин. Для этого в фиксированный объем предконцентрата, равный 400 мкл, вносили навеску инсулина — 2 мг. Инсулин растирали шпателем, добавляли 60 мкл 0,1 Н НСl, перемешивали, затем прикапывали 40 мкл 2 Н NaOH и снова перемешивали. Предконцентрат № 7 имел кремообразную консистенцию, поэтому перед добавлением инсулина он был нагрет до жидкого состояния (37°C).

Изучение устойчивости СЭС с инсулином к разложению желудочным соком in vitro. СЭС с инсулином (СЭС_{инс}) получены из соответствующих предконцентратов с инсулином при разбавлении водой в соотношении 1:4. В 2 мл среды, моделирующей желудочный сок (Фармакопея США, USP30-NF25, 2007 г.), термостатируемой при температуре 37 °С, вводили 500 мкл СЭС_{инс}. Смесь инкубировали при умеренном перемешивании в течение 30 мин. Отбор проб проводили сразу после введения СЭС_{инс} и через 30 мин. Пробы исследовали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка Poroshell 300 SB, C18; 7,1×2,1; D=5 мкм, ПФА=0,1 % TFA в воде, ПФВ=0,1 % TFA в смеси ацетонитрил:изопропанол=6:4). По результатам анализа для дальнейших исследований были выбраны СЭС_{инс} №№ 1, 2, 5–7, для которых концентрация инсулина при инкубации в течение 30 мин уменьшилась не более чем в три раза.

Определение относительной биодоступности инсулина в составе наноземульсий. Эксперимент проводили на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 230±10 г. Животные содержались в виварии в стандартных условиях при температуре 22±2 °С, 12-

часовом световом цикле и свободном доступе к корму и воде. Содержание и обращение с экспериментальными животными соответствовали приказу МЗ ССР от 23.08.2010 № 70811 «Об утверждении правил лабораторной практики» и директиве ЕП и СЕС от 22.09.2010 «По охране животных, используемых в научных целях».

В процессе эксперимента животные имели свободный доступ к питьевой воде. За 12 ч до начала и в процессе эксперимента животные лишались корма. Фармакокинетику раствора инсулина в воде при внутрибрюшинном введении и инсулина в СЭС_{Инс} №№ 1, 2, 5–7 при пероральном введении изучали на протяжении 6 ч.

Крыс делили на 12 групп. Группе 1 однократно внутрибрюшинно вводили раствор инсулина в воде в объеме $1,8 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ в дозе $0,145 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Контрольной группе 2 вводили внутрибрюшинно дистиллированную воду в том же объеме. Группам 3–7 однократно внутривенно с помощью зонда вводили СЭС_{Инс} №№ 1, 2, 5–7 в объеме $8,7 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ (в дозах $7,27 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ для СЭС_{Инс} №№ 1, 2 и $2,96 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ для СЭС_{Инс} №№ 5–7). Контрольным группам животных 8–12 аналогичным образом вводили эмульсии №№ 1, 2, 5–7 без инсулина в том же объеме.

Кровь отбирали из хвостовой вены через 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 ч после внутрибрюшинного введения и через 1, 2, 3, 4, 5, 6 ч после перорального введения препарата в сухие пробирки «Eppendorf». Кровь центрифугировалась 15 мин при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ для получения сыворотки. Содержание человеческого рекомбинантного инсулина в сыворотке крови крыс определяли с помощью иммуноферментного набора Insulin ELISA Monobind, США.

На каждую временную точку было взято по 8 животных. Анализ фармакокинетических данных проводили с использованием программы Origin Pro 9.1. При этом модельно-независимым методом рассчитывали следующие основные фармакокинетические параметры:

$AUC_{0 \rightarrow 6}$ — площадь под фармакокинетической кривой (0–6 ч), $\text{нг} \cdot \text{ч} \cdot \text{мл}^{-1}$;

C_{max} — максимальная концентрация инсулина в сыворотке крови, $\text{нг} \cdot \text{мл}^{-1}$;

t_{max} — время достижения C_{max} , ч;

БД — относительная биодоступность инсулина (в %), найденная по формуле:

$$\text{БД} = (AUC_{\text{п}} \times D_{\text{вн}}) / (AUC_{\text{вн}} \times D_{\text{п}}) \times 100 \%,$$

где $AUC_{\text{п}}$ и $AUC_{\text{вн}}$ — соответственно площади под фармакокинетическими кривыми при пероральном и внутривенном введении, $D_{\text{вн}}$ и $D_{\text{п}}$ — соответственно дозы инсулина, введенного внутривенно и перорально.

Результаты исследования и их обсуждение

Получены предконцентраты СЭС, содержащие в различных соотношениях липидную фазу, ПАВ и растворители. При разбавлении предконцентратов водой происходило спонтанное образование наноземульсий, размеры частиц которых измерены методом динамического рассеяния света. Для исследований были выбраны системы с размером частиц <50 нм, в них был введен инсулин и исследована его устойчивость к разложению желудочным соком *in vitro*. По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ наноземульсии №№ 1, 2, 5–7 частично защищают белок от разложения желудочной средой. Эти системы с инсулином были исследованы *in vivo* на крысах, и проведен иммуноферментный анализ сыворотки крови крыс после однократного перорального введения СЭС_{Инс}. Он показал, что для СЭС_{Инс} №№ 2, 5, 6 содержание инсулина в сыворотке крови крыс достоверно отличалось ($p < 0.05$) от полученного для контрольных групп. Для СЭС_{Инс} №№ 1 и 7 такого отличия не наблюдалось. Результирующие фармакокинетические кривые для раствора инсулина и СЭС_{Инс} №№ 2, 5, 6 были построены по усредненным концентрациям инсулина в сыворотке крови крыс (рис. 1, 2).

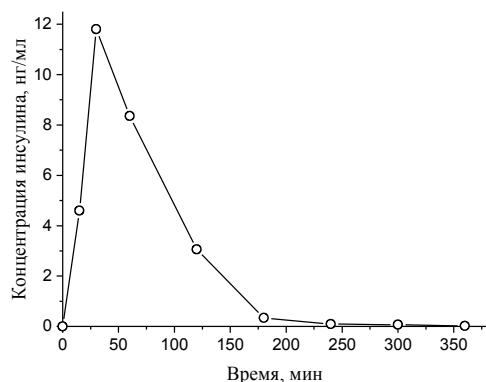


Рис. 1. Усредненный фармакокинетический профиль раствора инсулина в воде при внутривенном введении.

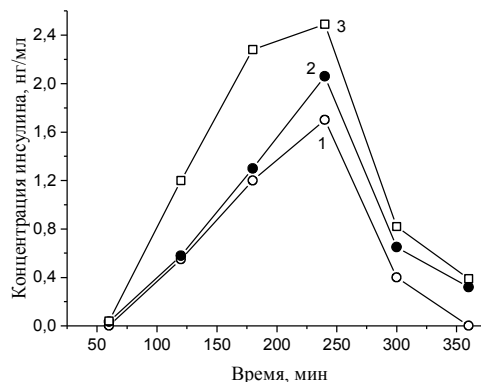


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические профили инсулина в СЭС_{Инс} № 2 (кривая 1), № 5 (кривая 2) и № 6 (кривая 3) при пероральном введении.

Установлено, что при внутрибрюшинном введении раствора инсулина в воде через ~4 ч белок в сыворотке крови крыс практически не определялся. При пероральном введении СЭС_{Инс} наибольшая концентрация инсулина от момента введения наблюдалась через ~4 ч, затем, в течении часа, она уменьшалась в 3–4 раза. По-видимому, смещение значения $t_{\max}$ связано с тем, что мицеллы наноэмульсий выполняют функцию депо, и высвобождение инсулина происходит достаточно медленно. Для СЭС_{Инс} №№ 2, 5 и 6 получены фармакокинетические параметры (табл. 2) и рассчитана относительная биодоступность. Наибольшие значения $C_{\max}$ и AUC демонстрировала СЭС_{Инс} № 6 на основе каприола, коллифора EL и этанола.

Табл. 2. Фармакокинетические параметры инсулина после однократного введения в свободной форме и в виде эмульсий.

Параметры	Инсулин, введенный внутрибрюшинно	Инсулин, введенный перорально в эмульсиях		
		№ 2	№ 5	№ 6
Доза инсулина, мг·кг ⁻¹	0,145	7,27	2,96	2,96
$t_{\max}$, ч	0,5±0,1	3,8±0,6	4,1±0,8	3,6±0,7
$C_{\max}$, нг·мл ⁻¹	16,54±3,51	1,74±0,39	2,08±0,44	2,67±0,78
$AUC_{0 \rightarrow 6}$, нг·ч·мл ⁻¹	925±197	234±68	287±59	420±101
БД, %	–	0,5	1,5	2,2

Выводы

Самоемульгирующие системы повышают биодоступность лекарственных препаратов, в том числе белковой природы, и являются перспективными для пероральной доставки инсулина. Проведенные исследования показали, что СЭС частично защищают инсулин от разложения под действием желудочной среды и способствуют прохождению через эпителий кишечника. Следует отметить, что наноэмульсии, содержащие одно и то же ПАВ, но с различным составом липидной фазы, по-разному увеличивают биодоступность инсулина. Так, биодоступность СЭС_{Инс} № 2 (0,5 %) на основе линолевой кислоты сравнима с биодоступностью нативного инсулина, хотя по данным ВЭЖХ эмульсия защищает белок от разложения в желудке. Лучшей биодоступностью обладают СЭС_{Инс} №№ 5 и 6 (1,5 и 2,2 % соответственно) на основе октановой кислоты. При этом биодоступность инсулина в СЭС_{Инс} № 5, в которой липидная фаза является смесью моно-, ди- и триглицеридов, меньше, чем в

СЭС_{инс} № 6, где липидная фаза — монокаприлат. По-видимому, размеры образующихся при самоэмульгировании мицелл влияют на их транспорт через эпителий кишечника.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей разработки улучшенных составов СЭС путем введения ингибиторов протеаз и мукоадгезивных компонентов.

Список литературы

1. Katteboina S., Chandrasekhar P., Balaji S. Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. // Asian J. Pharm. Sci. 2009. Vol. 4, № 4. P. 240–253.
2. Siekmeier R., Scheuch G. Inhaled insulin – does it become reality? // J. Physiol. Pharmacol. 2008. Vol. 59, Suppl. 6. P. 81–113.
3. Duckworth W.C. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. // Endocrine Rev. 1988. Vol. 9, № 3. P. 319–345.
4. Saffran M., Kumar G.S., Savariar C., Burnham J.C., Williams F., Neckers D.C. A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. // Science. 1986. New Series. Vol. 233, № 4768. P. 1081–1084.
5. Bhumkar D.R., Joshi H.M., Sastry M., Pokharkar V.B. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. // Pharm. Res. 2007. Vol. 24, № 8. P. 1415–1426.
6. Heinemann L. New ways of insulin delivery. // Int. J. Clin. Pract. 2012. Vol. 66, Suppl. 175. P. 35–39.
7. Verma A., Kumar N., Malviya R., Sharma P.K. Emerging trends in noninvasive insulin delivery. // J. Pharm. Vol. 2014. P. 1–9.
8. Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. // Pharm. Res. 1994. Vol. 11, №10. P. 1496–1500.
9. Çilek A., Çelebi N., Tirnaksiz F., Tay A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats. // Int. J. Pharm. 2005. Vol. 298. P. 176–185.
10. Silva-Cunha A., Chéron M., Grossiord J.L., Puisieux F., Seiller M. W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. // Int. J. Pharm. 1998. Vol. 169. P. 33–44.

11. Morishita M., Kajita M., Suzuki A., Takayama K., Chiba Y., Tokiwa S., Nagai T. The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions in incorporating highly purified EPA and DHA. // *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 201. P. 175–185.
12. Shichiri M., Shimizu Y., Yoshida Y., Kawamori R., Fukuchi M., Shigeta Y., Abe H. Enteral absorption of water-in-oil-in-water insulin emulsions in rabbits. // *Diabetologia.* 1974. Vol. 10. P. 317–321.
13. Cho Y.W., Flynn M. Oral delivery of insulin. // *Lancet.* 1989. P. 1518–1519.
14. MacGregor K.J., Embleton J.K., Lacy J.E., Perry E.A., Solomon L.J., Seager H., Pouton C.W. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997. Vol. 25. P. 33–46.
15. Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2000. Vol. 45. P. 89–121.
16. Алексеев К.В., Турчинская К.Г., Блынская Е.В., Тихонова Н.В. Технология самоэмульгирующихся систем доставки лекарственных веществ. // *Вестн. новых мед. технол.* 2014. Т. 21, №1. С.128–133.