

~ 研究论文 ~

• 一致性评价专栏 •

重组人胰岛素注射液临床前生物相似性评价研究

王海荣, 范明源, 项宗尚, 宋紫辉, 胡晓丞, 张春云, 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 通过 Beagle 犬长期给药毒性试验及免疫原性试验, 评价重组人胰岛素注射液 (Insulin R) 与原研药 (Humulin R) 的生物相似性。方法 进行 Beagle 犬 scInsulin R 30 d 停药 14 d 长期给药毒性试验, Insulin R 剂量为 0.5、1.0、1.5 IU/kg, Humulin R 剂量为 1.5 IU/kg, 检测指标包括一般状况、进食量、体温、心电图、血液学、凝血、血清生化、电解质及尿液等, 于给药期结束及停药期结束分两次剖杀动物, 测定主要脏器的脏器系数并进行常规病理组织学检查; ELISA 法检测 Beagle 犬血清的免疫原性。结果 Beagle 犬重复 sc Insulin R 30 d 毒性试验中, 中、高剂量组部分动物出现食欲降低、食量减少, 高剂量 1 只雄性动物出现流涎、站立不稳、心率加速、抽搐等低血糖症状, 中、高剂量组动物心率增加; 原研药组与 Insulin R 高剂量组毒性反应相当; Beagle 犬给予 Insulin R 30 d 未检测到抗药抗体。结论 Beagle 犬 sc Insulin R 30 d 时的最大无毒反应剂量为 0.5 IU/kg, 相当于临床等效剂量的 0.5 倍, 且未产生抗药抗体, 与 Humulin R 具有较好的临床前生物相似性。

关键词: 胰岛素; 安全性评价; 免疫原性; Beagle 犬; 生物类似物

中图分类号: R977.15

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 6376 (2016) 01 - 0028 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.004

Pre-clinical bio-similarity evaluation of Recombinant Human Insulin R

WANG Hai-rong, FAN Ming-yuan, XIANG Zong-shang, SONG Zi-hui, HU Xiao-cheng, ZHANG Chun-yun, CAI Yong-ming, ZHANG Zong-peng

TJIPR Drug Assessment Co. Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To investigate the bio-similarity of Insulin R via repeated-dose toxicity study and immunogenicity study. **Methods** In this 30-day sc injection toxicity study in Beagle's dogs, the bio-similarity of Insulin R was evaluated in doses of 0.5, 1.0, and 1.5 IU/kg via clinical observation, food consumption, clinical pathology, histopathology, and immunogenicity test, with vehicle and Humulin R (1.5 IU/kg) groups as controls. **Results** Symptoms of food consumption reduction, and vomits were observed in high- and mid-dose groups; and one male animal in high-dose group had salivation, tachycardia, and convulsion on the first 8 d. Similar toxic reactions were found in Humulin R group. No anti-Insulin R or anti-Humulin R antibody was detected. **Conclusion** The NOAEL of Insulin R in this Beagle's dog repeated-dose toxicological study was considered to be 0.5 IU/kg, and with no anti-Insulin R antibody detected, showing a great biosimilarity with Humulin R.

Keywords: insulin; toxicology; immunogenicity; Beagle's dogs; bio-similarity

胰岛素由加拿大的 Banting 和 Best 于 1921 年发现^[1], 1922 年用于临床, 为胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 患者带来福音^[2,3]。近年来, 不同来源、剂型和药效时程的胰岛素已经研制成功并广泛使

用^[4-9], 可单独使用或与西格列汀、格列美脲、亚莫利等联合使用治疗 IDDM; 也有研究将其用于慢性难愈合性溃疡及胆源性脓毒症等的治疗^[10-11]。对于急性及重症糖尿病患者, 常规胰岛素为首选, 然

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 天津创新药物安全评价技术平台 (2013ZX09302301)

作者简介: 王海荣, 药理学硕士, 主要从事生物制品安全性评价及药理工作。Tel: (022)84845247 E-mail:wanghr@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

而对于重组人常规胰岛素的临床前生物相似性研究鲜有报道。本研究通过重组人胰岛素注射液对 Beagle 犬的长期毒性试验及伴随的免疫原性试验,考察了其与原研药的临床前生物相似性。

1 材料

1.1 药品与试剂

重组人胰岛素注射液 (Insulin R), 无色澄明液体, 300 IU/3 mL/支, 批号为 20111202, 2~8℃ 保存备用; Humulin R, 批号为 A850900C, 美国礼来, 2~8℃ 保存备用。

犬免疫球蛋白 (犬 IgG, 北京成文免疫化学研究室), 辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG (IgG-HRP, 北京成文免疫化学研究室); 全血细胞检测试剂, 白细胞分类试剂, 网织红细胞检测试剂及质控全血均为 SIMENS 公司产品; 凝血功能测定专用试剂和质控 (美国实验室仪器公司产品); 自动生化分析仪试剂 (北京中生北控生物科技股份有限公司产品), 电解质分析仪专用试剂 MEDICA 产品; 尿液测定试纸 (桂林优利特医疗电子有限公司产品)。

1.2 实验动物

普通级 Beagle 犬, 7~9 kg, 雌雄各半, 由安徽阜阳市维光实验动物中心提供, 生产许可证 SCXK (皖) 2011-001。动物均饲养于公司全封闭饲养观察室, 光照昼夜明暗 12 h/12 h 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。动物使用方案经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 审查并批准。实验操作遵从国家食品药品监督管理局 (CFDA) 药物非临床研究质量管理规范 (GLP)。

1.3 仪器

ACCU-Check 血糖仪 (罗氏); Vaioskan Flash 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 7080 全自动生化分析仪 (日立公司); 电解质分析仪 (MEDICA); ADVIA 2120 血液分析仪 (SIMENS); ACL9000 血凝分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); 电子吊秤 (杭州天辰称重设备有限公司); URITEST-300 尿液分析仪 (桂林优利特电子集团有限公司); CONTEC8000 心电工作站 (秦皇岛市康泰医学系统有限公司); MT1622 电子体温计 (Microlife 公司); 脱水机、包埋机、切片机、染色机及封片机 (日本樱花检验仪器株式会社)。

2 方法

2.1 长期毒性试验

30 只 Beagle 犬按体质量随机分为 5 组, 对照组, Insulin R 低、中、高剂量组和原研药组, 每组 6 只, 雌雄各半。Insulin R 低、中、高剂量分别为 0.5、1.0、1.5 IU/kg, 相当于临床等效剂量的 0.5、1.0、1.5 倍, 给药浓度分别为 2.5、5.0、7.5 IU/mL。原研药组剂量为 1.5 IU/kg。对照组给予等体积溶媒。每天 sc 给药 1 次, 给药体积 0.2 mL/kg, 连续给药 30 d, 停药恢复 14 d。原研药组和 Insulin R 高剂量组在给药 1~8 d 剂量为 2.0 IU/kg。

试验期间每日观察动物一般状态及耗食量; 每周测定体质量及给药前血糖值; 适应期和给药第 7、15、29 天及停药第 13 天收集尿液进行分析, 次日经动物前肢头静脉空腹采血进行血液学、血清生化、凝血因子、免疫原性及电解质检测, 检测指标如下: 凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT)、血浆凝血酶时间 (TT)、纤维蛋白原定量 (FIB-C)、网织红细胞计数 (RET); 适应期、给药第 29 天、停药第 13 天进行肛温、心电图及眼科监测; 于给药期结束安乐死 2/3 动物、停药期结束安乐死剩余动物 (雌雄各半), 进行病理学及骨髓细胞形态学检查。

2.2 免疫原性试验

采用酶联免疫法测定 Beagle 犬血清中抗 Insulin R 或抗 Humulin R 结合抗体。将 Insulin R 或 Humulin R 用 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液 (pH9.6) 稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 包被于 96 孔酶标板上, 每孔 100 μL , 4℃ 过夜。洗涤后用 2% BSA 封闭液 37℃ 封闭 2 h。待检血清用样品稀释液稀释, 每孔加入 100 μL , 设置阳性和阴性对照孔, 37℃ 孵育 1 h。洗涤后每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG, 37℃ 孵育 1 h。洗涤后每孔加入 50 μL 酶反应底物 TMB A 液和 TMB B 液, 37℃ 反应 15 min。50 μL 终止液终止反应, 酶标仪读取各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值。以同期阴性对照组动物血清测得 A 值的 2.1 倍作为产生抗体的阈值, 血清标本测得值大于或等于该阈值者, 判定为抗体阳性^[12]。

2.3 统计方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。计量资料采用单因素方差分析或非参数检验, 计数资料采用 NPar Tests Mann-Whitney Test、 χ^2 或等级指数检验。

3 结果

3.1 一般状态、体质量和进食量观察

在给药第 3、7 天, Insulin R 1.5 IU/kg 剂量组 1 只雄性动物出现站立不稳、流涎、抽搐等严重低血糖症状; 1.5 IU/kg Humulin R 也出现了程度相当的毒性反应, 1 只雌性动物在第 8 天给药后死亡, 1 只雄性动物在给药第 16 天出现呕吐。各组具体异常症状、出现时间及采取措施见表 1。

Insulin R 中剂量组 1 只动物在给药 9~12 d 及 16~18 d 食欲减退, 食量减半; 20~22 d 食量升至 2/3, 之后恢复正常; Insulin R 高剂量组、原研药组半数动物分别在给药 5~7、6~8 d 出现食欲降低、食量减少, 之后原研药组 1 只动物偶尔出现以上症状。表明较高剂量 Insulin R 会降低个别动物的食欲

和食量, 发生率和严重程度与原研药组相当。

在给药 8~15 d, 各组动物体质量快速增长, 尤其是原研药组和 Insulin R 高剂量组, 之后增长缓慢或略有下降。Insulin R 组与对照组比较差异不显著, 表明 Insulin R 对体质量增长基本无影响 (图 1)。

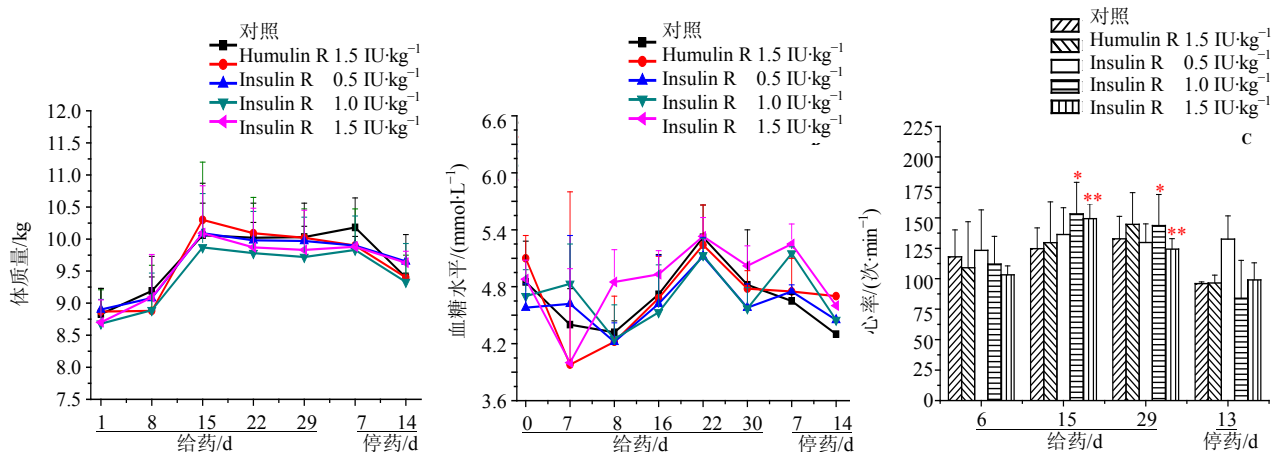
3.2 药前随机血糖变化

除了动物出现毒副反应时, 预定时间点药前随机血糖未降低, 仅高剂量组在给药第 8 天血糖升高, 中、高剂量组在停药第 7 天血糖升高, 但与对照组比较差异不显著。表明在 Beagle 犬每天 sc 1 次 Insulin R 的毒性试验中, 中、高剂量的 Insulin R 可以导致动物药前血糖轻微升高, 与其对血糖的短期调控有关。结果见图 1。

表 1 一般观察异常情况总结表

Table 1 Summary of abnormal symptoms in clinical observation

组别	动物号/性别	时间	症状
Insulin R	19♂	给药 3 d	站立不稳, 流涎, 二倍量食物后恢复
	19♂	给药 7 d	抽搐、站立不稳, 静注葡萄糖后恢复
Humulin R	26♂	给药 3 d	站立不稳, 流涎, 静注葡萄糖后恢复
	2♀	给药 7 d	血糖值 0.8 mmol/L, 站立不稳, 静注葡萄糖后恢复
	13♀	给药 7 d	呕吐
	23♂	给药 7 d	呕吐
	2♀	给药 8 d	站立不稳, 流涎、抽搐, 静注葡萄糖后改善; 给药后约 4.5 h 发现死亡
	23♂	给药 16 d	呕吐



与同组第 6 天比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; Humulin R 组在给药 8~30 d $n = 5$, 停药期 $n = 2$; 其余组在给药期 $n = 6$, 停药期 $n = 2$, 下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs same group in d-6; For the Humulin R group, $n = 5$, 8~30 d during administration phase; $n = 2$, recovery phase; For other group, $n = 6$, administration phase; $n = 2$, recovery phasesame as below

图 1 Insulin R 给药 30 d 停药 14 d 对 Beagle 犬体质量、血糖及心率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effect of Insulin R on body weight, blood glucose and heart rate of dogs after 30-d administration and 14-d drug withdrawal ($\bar{x} \pm s$)

3.3 心电图变化

结果显示, Insulin R 中、高剂量组动物在给药第 15、29 天心率较适应期(第 6 天)明显增加($P < 0.05$ 、 0.01)。提示中、高剂量的 Insulin R 可导致部分动物心率加快,可能与其降血糖作用有关;高剂量组与市售对照组心率无显著差异。停药期未发现上述异常现象。结果见图 1。

3.4 血液学、血清生化、电解质及凝血功能检查

原研药组和 Insulin R 高剂量组 RET 在给药 16 d 较同期对照组轻微升高,但在骨髓细胞形态学检查中红系细胞比例及形态未见异常;与对照组比较, Insulin R 中、高剂量组 APTT 在给药 8、16 d 呈升高趋势,且有量效关系,但都处于历史数据范围内,与药物作用无明显相关性,结果见表 2;其他相关

表 2 Insulin R 给药 30 d 停药 14 d 各组动物凝血功能及电解质变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Coagulation and RET in Beagle's dogs after 30-d administration with Insulin R and 14-d drug withdrawal ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB-C/(g·L ⁻¹)	RET/%
对照	给药 8 d	7.12±0.20	11.82±0.80	10.68±0.35	3.73±0.31	2.31±0.70
	给药 16 d	7.18±0.24	11.78±0.82	12.48±0.97	3.25±0.61	2.77±0.41
	给药 30 d	7.25±0.32	12.08±1.07	10.70±0.71	3.07±0.81	2.89±0.91
	停药 14 d	7.35±0.50	14.50±0.42	11.00±0.28	2.94±0.68	1.47±0.72
Humulin R 1.5 IU·kg ⁻¹	给药 8 d	7.03±0.08	12.35±2.67	10.00±0.91	4.26±0.58	2.27±0.34
	给药 16 d	7.04±0.09	12.76±0.78	12.46±0.36	3.31±0.25	3.82±0.13**
	给药 30 d	7.26±0.40	13.74±1.79	10.28±0.27	3.70±0.66	3.16±0.34
	停药 14 d	7.00±0.00	14.40±0.14	10.95±0.50	3.53±0.42	2.22±0.44
Insulin R 0.5 IU·kg ⁻¹	给药 8 d	7.00±0.00	11.57±1.36	10.98±1.08	4.37±1.60	2.76±0.84
	给药 16 d	7.03±0.05	11.88±0.82	11.40±0.55*	4.57±1.50	2.40±0.66
	给药 30 d	7.15±0.15	12.67±0.88	10.75±0.90	3.08±0.93	2.57±0.86
	停药 14 d	7.00±0.00	12.65±2.33	10.45±0.50	3.56±1.51	1.90±0.00
Insulin R 1.0 IU·kg ⁻¹	给药 8 d	7.15±0.27	12.97±0.43*	10.18±1.11	4.41±0.95	2.61±0.38
	给药 16 d	7.75±1.42	14.05±4.49	11.67±1.17	3.59±0.76	2.95±0.57
	给药 30 d	7.38±0.38	13.42±0.52	10.07±0.49	3.40±0.61	2.48±0.57
	停药 14 d	9.25±2.05	20.05±9.12	10.35±0.07	3.14±0.18	1.57±0.56
Insulin R 1.5 IU·kg ⁻¹	给药 8 d	7.42±0.48	14.35±1.76**	9.57±0.48**	5.47±1.44*	2.87±0.92
	给药 16 d	7.47±0.39	13.45±0.75**	10.65±0.67**	4.53±1.45	3.83±0.23**
	给药 30 d	8.53±2.14	16.75±7.77	9.83±0.27*	3.46±1.15	2.47±0.40
	停药 14 d	7.70±0.99	15.65±2.62	10.15±1.20	3.03±0.62	1.98±0.19

参数在其余时间点正常波动。

3.5 尿常规、肛温、眼科检查

Beagle 犬给予不同剂量 Insulin R 后,给药期及停药期不同阶段的尿液检查未发现尿胆红素(BIL)、尿胆原(UBG)、酮体(KET)、维生素 C(ASC)、尿糖(GLU)、尿蛋白(PRO)、尿潜血(BLD)、尿亚硝酸盐(NIT)、尿白细胞(LEU)、尿比重(SG)和 pH 值等与药物相关的明显变化;Beagle 犬肛温均在正常值范围内波动,可认为 Insulin R 对动物体温无影响;在适应期、给药 29 d、停药 13 d 用检眼镜检查动物双眼,未发现药物对眼睑、结膜、角膜、巩膜、瞳孔、玻璃体、眼底(视神经乳头、中央动脉、视网膜)产生明显影响。

3.6 大体解剖、脏器系数及骨髓细胞形态学

给药及停药期结束次日,对相应动物进行安乐死后解剖,动物毛顺,有光泽,营养状况良好;胸、

腹膜光滑,胸、腹腔内未见积液、粘连,被检脏器形态、颜色、位置等未见肉眼可见的病理改变。各组动物脏器质量及脏器系数与同期对照组相比无差异。各组骨髓细胞形态学正常,粒系百分比、各阶段粒细胞数目比无差异,均呈基本正常骨髓像。

3.7 组织病理学检查

仅见部分动物脏器的自发性病变,包括肺、颌下腺、胰腺和前列腺等间质炎细胞浸润,肝脏微小肉芽肿、气管局部黏膜鳞状上皮化生、肾小管钙化斑等,经统计学检验各给药组与同期对照组的上述变化无明显差异,根据病变性质及发病情况分析,上述改变是动物自发性病变或胚胎发育异常(甲状旁腺囊肿),而非药物的毒性反应。

3.8 免疫原性检测

采用间接 ELISA 方法测定 10 倍稀释及原液血清中抗 Insulin R 或 Humulin R 的结合抗体。结果显

示,所测的 A 值均低于同期对照组抗体均值的阈值,表明受检血清中未检测到抗 Insulin R 或 Humulin R 的结合抗体。结果见图 2。

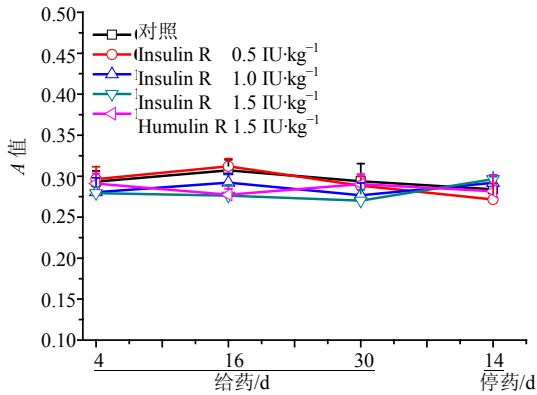


图2 Beagle 犬 sc Insulin R 后检测抗体的 A 值 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.2 A value of antibody after sc 30-day in Insulin R repeated-dose toxicity study in Beagle's dogs ($\bar{x} \pm s$)

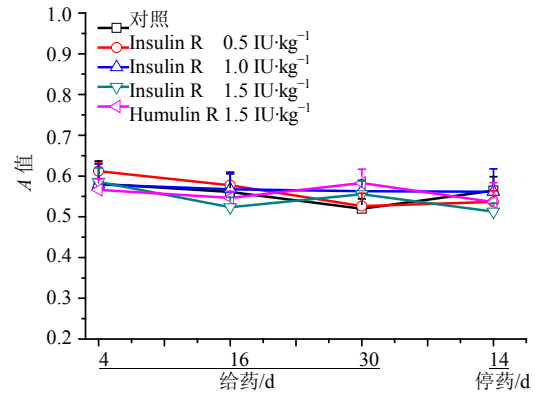
为 6.7%, 已高过世界平均水平 6.4%, 而且每天新增 16 000 糖尿病患者, 截肢、失明、瘫痪等糖尿病并发症让患者饱受精神肉体双重折磨, 每天约有 3 000 人死于糖尿病的并发症, 成为危害国人的最大杀手。胰岛素是机体内唯一降血糖的激素, 也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素, 是糖尿病治疗中的常用药物之一。

本文通过 Beagle 犬 30 d 重复 sc 给药毒性试验和免疫原性试验对 Insulin R 进行了临床前生物相似性研究, 结果显示 Beagle 犬重复 sc 较高剂量的 Insulin R 后, 动物出现的食欲降低、食量减少、呕吐、流涎、站立不稳、及心率加速、抽搐等症状, 可能均源于降低血糖效果的延伸^[7,14-15], 最大无毒反应剂量为 0.5 IU/kg, 相当于临床等效剂量的 0.5 倍; 原研药组与 Insulin R 高剂量组毒性反应相当; Beagle 犬 sc Insulin R 及 Humulin R 30 d 均未产生抗药抗体; 以上结果表明, 在该试验条件下 Insulin R 与 Humulin R 具有较好的生物相似性。另外在家兔 iv 和 sc 刺激性试验、豚鼠全身主动过敏试验、大鼠皮肤被动过敏试验及溶血性试验中, Insulin R 均显示阴性结果, 与 Humulin R 结果一致。Insulin R 的过敏试验结果与本实验室其他胰岛素品种过敏试验结果不太一致, 可能与剂型中不含鱼精蛋白及药物结构有关^[16]。

在考察 Insulin R 重复给药的毒性试验时, 采用了非糖尿病模型的健康 Beagle 犬, 受正常动物血糖和胰岛素降低血糖药效作用特点限制, 本试验没有

4 讨论

目前糖尿病已成为继心血管和肿瘤之后的第三大疾病^[13], 是一种终生性疾病。我国糖尿病发病率



采用常规长期毒性试验设计原则, 将高剂量设定为临床拟用剂量的十余倍或更大, 仅设定为临床拟用剂量的 3 倍, 这体现了生物制品临床前评价中“Case by case”的原则。也有研究者在进行胰岛素及其类似物疗效评价时, 通过静脉点滴不同速度的葡萄糖以维持受试者血糖相对恒定, 而葡萄糖的点滴速度反映了胰岛素及其类似物的疗效^[17-20]; 在进行过敏性及刺激性试验研究时, 依据预实验或 PK/PD 结果, 给予受试动物过量的饲料或葡萄糖水, 以维持动物血糖并保证试验结果。期望以上结果可以对胰岛素类药物研究者提供借鉴。

致谢: 天津药物研究院新药评价有限公司郭传敏和王晶晶等老师对本研究病理读片提供的帮助。

参考文献

- [1] Banting F G, Best C H, Collip J B, *et al.* Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus [J]. *Can Med Assoc J*, 1922, 12(3): 141-146.
- [2] Gilchrist J A, Best C H, Banting F G Observations with Insulin on Department of Soldiers' Civil Re-Establishment Diabetics [J]. *Can Med Assoc J*, 1923, 13(8): 565-72.
- [3] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2008 [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(Suppl1): S12-54.
- [4] Shaikh I M, Jadhav K R, Ganga S, *et al.* Advanced approaches in insulin delivery [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2005, 6(5): 387-395.
- [5] 易卫军, 朱旅云, 罗云章, 等. 胰岛素泵的研究和进展 [J]. *医疗卫生装备*, 2004, 25(7): 29-31.

- [6] 李 静. 胰岛素口服制剂的研究进展 [J]. 医药导报, 2008, 27(7): 812-814.
- [7] 张春云, 蔡永明, 张 骏, 等. 胰岛素及其类似物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 436-441.
- [8] 韩旭亮, 石俊峰, 龙丽辉, 等. 胰岛素及其类似物治疗糖尿病进展 [J]. 西北药学杂志, 2012, 27(3): 277-279.
- [9] 王战强. 胰岛素及其合成技术应用与发展 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(13): 11-12, 24.
- [10] 黄丽容, 方 梅, 曾郎平, 等. 胰岛素联合生长因子治疗慢性难愈性溃疡的效果观察与护理 [J]. 护理实践与研究, 2012, 17(9): 97-98.
- [11] Dylewski M L, Prdaek K, Weber J M, *et al.* Malnutrition among pediatric patients: A consequence of delayed admissions [J]. *Bums*, 2010, 36(8): 1185-1189.
- [12] XU Z K. Practicality of monoclonal antibody technique [M]. Xian: Shanxi Science and Technology press, the first edition, 1992.
- [13] Galli L, Salpietro S, Pellicciotta G, *etal.* Risk of type 2 diabetes among HIV-infected and healthy subjects in Italy [J]. *Eur J Epidemiol*, 2012, 27(8): 657-665.
- [14] 付 凯. 胰岛素的不良反应及处理 [J]. 黑龙江医学, 2002, 26(1): 80.
- [15] 马博青, 薛树正. 浅谈胰岛素的副作用及临床处理 [J]. 现代中西医结合杂志, 1997, 6(3): 496-498.
- [16] 李海燕, 姜德宝, 纪立伟. 多种人胰岛素致过敏反应 [J]. 中国药物应用与监测, 2011, 8(5): 318-319.
- [17] Paola L, Francesca P, Paolo R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of therapeutic doses of Basal Insulins NPH, Glargine, and Detemir after 1 week of daily administration at bedtime in type 2 diabetic subjects [J]. *Dia Care*, 2011, 34: 1312-1314.
- [18] Eda C, Karen L S, William V T. The alteration of aspart insulin pharmacodynamics when mixed with detemir insulin [J]. *Dia Care*, 2012, 35: 690-692.
- [19] Luzio S D, Dunseath G J, Atkinson M D, *et al.* A comparison of the pharmacodynamic profiles of insulin detemir and insulin glargine: a single dose clamp study in people with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2013, 39(6): 537-42.
- [20] Koehler G, Treiber G, Wutte A. Pharmacodynamics of the long-acting insulin analogues detemir and glargine following single-doses and under steady-state conditions in patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(1): 57-62.