

【 安全性评价 】

精蛋白重组人胰岛素注射液生物类似药非临床安全性评价

项宗尚, 宋紫辉, 张慧霞, 李春雨, 王海荣, 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 通过小鼠单次给药毒性试验、Beagle 犬重复毒性及免疫原性试验和豚鼠全身主动过敏试验, 考察精蛋白重组人胰岛素注射液 (Insulin NPH) 的毒副作用、毒性靶器官或靶组织, 为开展临床试验提供依据。方法 ①小鼠单次给药毒性试验: 采用最大给药量法分别 sc 生理盐水、溶媒和 Insulin NPH (2092~2488 IU/kg), 监测给药后小鼠一般状态、体质量、脏器异常。②Beagle 犬重复毒性试验: sc 溶媒、原研对照药 (Humulin NPH, 1.5 IU/kg), 低、中和高剂量 (0.5、1.0 和 1.5 IU/kg) 的 Insulin NPH, 每天 1 次, 连续 30 d, 停药恢复 14 d; 在给药期和恢复期内观察动物的一般体征和注射部位的局部刺激性, 进行体质量、肛温、血糖及心电图检查, 测定血液学、血清生化、尿液常规等指标, 并进行脏器质量及组织病理学检查; 免疫原性试验采用间接 ELISA 法检测不同给药期 Beagle 犬血清中抗药结合抗体。③豚鼠主动全身过敏试验: 分别 sc 低和高剂量 (4 和 12 IU/kg) 的 Insulin NPH、生理盐水和溶媒, 另设卵清蛋白为阳性对照, 使用以上剂量进行 5 次致敏试验后, iv 3 倍致敏剂量进行激发试验, 观察豚鼠过敏症状。结果 小鼠 sc 165 倍临床常用剂量的 Insulin NPH 后, 未见明显毒性反应; Beagle 犬重复毒性试验中 1.0 IU/kg 是 Insulin NPH 的无毒反应剂量 (NOAEL), 该剂量相当于临床拟用剂量的 2 倍, 免疫原性试验各剂量组均未发现抗药结合抗体; 豚鼠主动全身过敏试验中未见明显过敏症状。结论 在本试验条件下未观察到 Insulin NPH 明显毒性反应。

关键词: 精蛋白重组人胰岛素注射液; 单次给药毒性; Beagle 犬重复毒性; 免疫原性; 主动全身过敏试验

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)05-0652-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.013

Nonclinical safety evaluation of Insulin NPH, a biosimilar of Humulin NPH

XIANG Zong-shang, SONG Zi-hui, Zhang Hui-xia, Li Chun-yu, Wang Hai-rong, CAI Yong-ming,
ZHANG Zong-peng

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

Abstract: Objective To investigate the toxic reaction, toxic organs or target tissues of protamine recombinant human insulin (Insulin NPH), and provide basis for clinical trials by single dose toxicity test in mice, repeated toxicity and immunogenicity of Beagle's dogs, and systemic active allergy in guinea pig. **Methods** ① Using maximum dose method, mice in single dose toxicity test were sc injected with normal saline (NS), vehicle, and Insulin NPH (2092—2488 IU/kg), the toxic reactions after injection were monitored. ② In repeated toxicity study, Beagle's dogs were sc administrated with vehicle, the original (Humulin NPH, 1.5 IU/kg) and different doses of Insulin NPH (0.5, 1.0 and 1.5 IU/kg) for 30 d continuously, followed by a 14-d recovery. During the administration and recovery period, general observation, local irritation, body weight, anus temperature, blood glucose, and electrocardiogram (ECG) were checked, moreover, hematology, serum biochemistry and urine were detected. Also, organic weights and histopathological examination were conducted. Binding antibodies in dog serum were measured by indirect ELISA method in immunogenicity test. ③ In systemic active allergy study, cavies were sc injected with low- and high-dose (4 and 12 IU/kg) Insulin NPH, normal saline and vehicle. Besides, ova as positive control was also included. After five times of sensitization test with above doses, the excitation reactions of iv injection with tripled sensitizing doses were observed. **Results** No obvious toxicity was

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 天津创新药物安全评价技术平台 (2013ZX09302301)

作者简介: 项宗尚, 助理研究员, 主要从事药物临床前安全评价研究工作。E-mail: xiangzs@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

observed in mice after injected with 165 times of usual clinical dose of Insulin NPH. Repeated toxicity study of Beagle's dogs revealed that 1.0 IU/kg was the no-toxic-effect dose (NOAEL) for Insulin NPH, which was equivalent to 2 times of clinical dose. No binding antibodies were found in immunogenicity test. There was no obvious allergic symptom in the active systemic allergy study of guinea pig. **Conclusion** Under the experimental conditions, no serious toxicity of Insulin NPH is found.

Key Words: insulin NPH; single dose toxicity; repeated toxicity of Beagle's dogs; immunogenicity; active systemic anaphylaxis

糖尿病为临床常见代谢性疾病,可引起心血管和神经系统的严重损害^[1],糖尿病患者由于体内胰岛素缺乏,需长期使用胰岛素或胰岛素类似物控制血糖。精蛋白重组人胰岛素(protamine zinc recombinant human insulin)又叫中性鱼精蛋白锌胰岛素(human insulin neutral protamine hagedorn, Insulin NPH),是一种长效胰岛素,临床上作为基础胰岛素(basal insulin)与常规胰岛素(regular human insulin, Insulin R)联合应用,广泛应用于1型或2型糖尿病治疗^[2-3]。Insulin NPH降糖效果显著、持久,可将血糖稳定在正常范围内,减少血糖波动带来的夜间低血糖风险^[4],在使用过程中可能会引起过敏反应、免疫原性等安全问题,本试验旨在通过对Insulin NPH的一系列临床前评价研究,综合评价其药物和制剂的安全性,为该药物的临床应用提供参考依据。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

供试品: Insulin NPH,批号为20120101,300 IU/3 mL/支)、原研对照:精蛋白锌重组人胰岛素注射液(Humulin NPH,批号为A820614G,300 IU/3 mL/支),由合肥天麦生物科技发展有限公司提供;溶媒对照:精蛋白重组人胰岛素注射液溶媒(批号20111204,3 mL/支,由Lilly France S.A.S.生产)。

犬免疫球蛋白(IgG,批号为201206a)和辣根过氧化物酶标记的兔抗犬IgG(IgG-HRP,批号为201206a),均由北京成文免疫化学研究室提供;酶反应底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色剂(TMB,批号为TT326548)和终止液(Stopping Solution,批号为TT652486),均购自ADL公司;牛血清白蛋白(BSA,批号为738328),购自Roche公司;96孔酶标板,购自美国Costar公司。

1.2 实验动物

1.2.1 小鼠单次给药毒性试验 SPF级ICR小鼠60只,体质量为17.0~21.0 g,雌雄各半,实验动物质量合格证号为0276142和0276141,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可

证号SCXK(京)2012-0001。

1.2.2 比格犬重复毒性试验及免疫原性试验 普通级比格犬30只,6~7月龄,体质量为5.85~6.90 kg,雌雄各半,实验动物质量合格证号为0234170,动物由北京玛斯生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-001。

1.2.3 豚鼠主动全身过敏试验 SPF级Hartley白色豚鼠30只,体质量为291.5~385.0 g,雌雄各半,实验动物质量合格证号为0273879,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.3 主要仪器

日立7080全自动生化分析仪,日立公司;ADVIA2120血液分析仪,SIMENS公司;ACL9000血凝分析仪,美国贝克曼库尔特公司;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;OCS-W-100kg电子吊秤,杭州天辰称重设备有限公司;电子天平,梅特勒托利多仪器上海有限公司;Vaioskan Flash酶标仪,Thermo Scientific Sorvall ST16R低温离心机,美国Thermo公司产品;DKB-501A型恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司产品;显微镜,日本奥林巴斯光学工业株式会社;脱水机、包埋机、切片机及染色机,日本樱花检验仪器株式会社。

2 方法

2.1 小鼠单次给药毒性试验

2.1.1 剂量设计 Insulin NPH临床使用方法为sc,日用剂量为0.5~1.0 IU/kg,按体表面积折算为小鼠的最大剂量为12.72 IU/kg(人以65 kg计算);按照相关指导原则要求,采用最大给药量法进行试验,并结合预试验结果,供试品给药剂量设定为50 IU/只(给药日动物体质量范围为20.1~23.9 g,折算给药剂量为2 092~2 488 IU/kg)。

2.1.2 分组及给药 将ICR小鼠随机分为3组,每组20只,雌雄各半,分别设为对照组(生理盐水)、溶媒对照组和供试品组。给药组动物采用供试品最

高浓度 (100 IU/mL) 和最大给药体积 (每只小鼠 0.5 mL), 对照组和溶媒对照组动物分别给予相同体积生理盐水和溶媒对照, 单次 sc 给药。

2.1.3 检测指标 给药后立即仔细观察动物反应情况直至给药后 4 h, 随后每日观察 1 次, 至给药后第 14 天 (d14); 于给药前 (d0) 和给药后第 1、3、7、12、14 天 (d1、d3、d7、d12 和 d14) 称质量。试验期间观察并记录毒性反应。观察期结束后进行动物大体解剖, 记录脏器的异常改变。

2.2 比格犬重复毒性试验和免疫原性试验

2.2.1 剂量设计 Insulin NPH 日用剂量为 0.5 IU/kg, 按体表面积折算比格犬的常用剂量为 0.99 IU/kg (人以 65 kg 计算), 按照药物特点、“ICH S6 (生物技术药物临床前安全性评价)^[5]”及《治疗用生物制品非临床安全性技术审评一般原则》^[6], 本试验设供试品高、中和低 3 个剂量组, 即 1.5、1.0 和 0.5 IU/kg, 分别相当于临床剂量的 3、2 和 1 倍, 并同时设原研对照组 (1.5 IU/kg) 和溶媒对照组。

2.2.2 分组及给药 30 只比格犬, 在适应期间, 检查体质量、肛温、血糖、血液学、血清生化、尿液、心电图、眼科 (分别使用无线吊钩秤、电子体温计、血糖仪、血液分析仪、日立 7180 型全自动生化仪和电解质分析仪、尿液分析仪、心电工作站、检眼镜进行测定); 适应期结束后, 按体质量随机分为 5 组, 每组 6 只, 雌雄各半。分别 sc 低、中和高剂量 (0.5、1.0 和 1.5 IU/kg) 的供试品, 原研对照及溶媒对照, 0.2 mL/kg, 每天 1 次, 连续给药 30 d (d1~d30), 停药恢复 14 d (rd1~rd14)。

2.2.3 重复给药毒性试验检测指标 给药后每天观察动物体征及进食量, 于给药前 d0, 给药期 d8、d16、d23 和 d30, 恢复期 rd6 和 rd14 检测禁食 16 h 后的全血血糖; 给药前 d0 和给药 d15、d29 及恢复期 rd13 分别进行体质量、肛温、眼科、尿液及心电图检查 (分别使用无线吊钩秤、电子体温计、检眼镜、尿液分析仪、心电工作站进行测定), 给药前 4 天 (d-4) 和给药 d16、d30 及恢复期第 14 天 (rd14) 进行血液学、血清生化及免疫原性检测; 给药期结束次日麻醉各组 2/3 动物 (4 只, 雌雄各半), 恢复期结束次日麻醉剩余动物 (2 只, 雌雄各半), 进行骨髓细胞形态学及组织病理学检查。

采用尿液分析仪检测比格犬尿液的 pH、亚硝酸盐 (NIT)、葡萄糖 (GLU)、维生素 C (ASC)、尿比重 (SG)、尿隐血 (BLD)、蛋白质 (PRO)、胆

红素 (BIL)、尿胆原 (UBG)、酮体 (KET) 及白细胞 (LEU) 等项目; 测量心率、P 波电压、R 波电压、T 波电压、P-R 间期、QRS 时限、Q-T 间期、ST 段电压。

比格犬静脉血经 EDTA-K2 抗凝进行血细胞分析, 用 ADVIA 2120 多物种血液分析仪测定红细胞数量、血红蛋白浓度、红细胞压积、平均红细胞体积、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、网织红细胞百分比、白细胞及分类和血小板等血液学参数; 取新鲜枸橼酸钠抗凝血, 采用 ACL9000 型全自动血凝仪测定凝血酶原时间、部分活化凝血酶原时间、凝血酶时间、纤维蛋白原 4 项指标; 取血清, 采用日立 7180 型全自动生化仪测定天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、 γ -谷氨酰转移酶、碱性磷酸酶、血清尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆红素、三酰甘油、甘油三酯和肌酸磷酸激酶等血清生化参数; 同时测定血清中钾、钠、氯离子浓度。

动物剖杀后, 摘取心、主动脉、肝、脾、肺、气管、肾、脑、垂体、脊髓、胸腺、淋巴结、唾液腺、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、胰腺、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胆囊、睾丸、附睾、前列腺、子宫、卵巢、乳腺、胸骨、坐骨神经、膀胱、给药部位皮肤、肌肉等, 进行病理检查; 并称量部分脏器质量, 计算脏器系数 (g 湿组织/kg 体质量)。

2.2.4 免疫原性试验测定方法 分别将给药前 (适应期, d-4)、给药期 (d16、d30) 及恢复期 (rd14) 的受检动物血清, 用样品稀释液稀释 10 倍, 采用间接 ELISA 方法测定不同时期血清中抗 Insulin NPH 或 Humulin NPH 的结合抗体。具体方法为: 供试品经包被液 (pH 9.6 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液) 稀释后, 包被于 96 孔酶标板上, 1 μg /孔, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; 洗涤后用 2% BSA 封闭液 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2 h, 之后各孔加入用样品稀释液稀释的待检血清样品, 同时设阳性和阴性对照孔, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG, 37 $^\circ\text{C}$ 再孵育 1 h; 洗涤后各孔分别加入 50 μL 酶反应底物 TMB Solution A 和 Solution B, 37 $^\circ\text{C}$ 避光反应 15 min; 用 50 μL 终止液终止反应, 在酶标微板读数仪上读取各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

以同期溶媒对照组动物血清标本所测得吸光度 (A) 值的 2.1 倍作为产生抗体的阈值, 凡给药

后血清标本测得的 A 值大于或等于阈值者, 判定为阳性^[7]。

2.3 豚鼠全身主动过敏试验

2.3.1 剂量设计 Insulin NPH 临床应用剂量按体表面积折算为豚鼠剂量为 3.18~6.36 IU/kg, 按照相关指导原则要求, 致敏和激发剂量设定为:

致敏剂量: 供试品低剂量设定为临床拟用剂量 4 IU/kg, 高剂量 (12 IU/kg) 约为临床拟用剂量的 3 倍。

激发剂量: 为致敏剂量的 3 倍, 药物浓度同致敏用浓度。

2.3.2 分组及给药 30 只豚鼠, 适应期结束后称量体质量, 随机分为 5 组, 每组 6 只, 雌雄各半。分别给予低和高剂量 (4 和 12 IU/kg) 的供试品、卵清白蛋白 (10 mg/kg, 阳性对照)、生理盐水和溶媒对照。阳性对照组连续隔日 ip 5 次进行致敏, 其他组连续隔日 sc 5 次进行致敏; 在末次致敏后 d12, 一次快速 iv 3 倍致敏剂量进行激发。

2.3.3 检测指标 致敏期间, 每日对豚鼠进行一般观察。激发后观察豚鼠在 30 min 内出现的症状, 记录每只豚鼠症状出现及消失时间 (最长观察 3 h)。

根据《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[8]中全身主动过敏试验评价标准判断反应级数, 确定受试物的过敏反应强弱。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。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 SPSS 11.5 NPar Tests Mann-Whitney Test、 χ^2 或等级指数检验。

3 结果

3.1 小鼠单次给药急性毒性试验

小鼠 sc 供试品后, 未观察到明显毒性反应症状。给药后, 雄性动物体质量持续增长; 雌性动物体质量呈现先快速增长而后缓慢下降再增长的趋势,

具体表现在: 给药组雌性和雄性动物 d1 的体质量较生理盐水及溶媒对照均显著增加 ($P < 0.01$), d7 雌性动物体质量显著低于生理盐水对照组 [$(23.2 \pm 1.3) \text{ g vs } (25.0 \pm 1.3) \text{ g}, P < 0.01$], 体质量增长率在以上时间点呈现相应变化。动物解剖结果未见异常改变。结果表明, 小鼠给予约临床剂量 165 倍的 Insulin NPH 后, 未发生明显的急性毒性反应。

3.2 比格犬重复毒性试验

3.2.1 一般症状、进食量、给药部位刺激性观察及眼科检查 给药期和恢复期各剂量组均未见动物死亡; 动物的外观体征、精神、行为、活动、步态、呼吸等也未见异常; 给药期和恢复期各试验组的所有受试动物进食量均未见明显异常, 饲喂后动物均能很快吃完定量的食物, 表明药物对动物进食量没有明显影响; 试验过程中未见供试品 sc 给药对给药部位皮肤及肌肉的刺激反应; 眼科检查也未见异常。

3.2.2 体质量、肛温和血糖检查 给药期和恢复期各试验组的所有受试动物的肛温、体质量和体质量增长与溶媒对照组比较, 均无显著性差异, 表明药物对动物体温和体质量无明显影响; 各剂量组血糖水平与同期溶媒对照组比较, 均无显著性差异, 前期药效学研究表明, 该药于给药后约 2 h 降糖作用最强, 药后 24 h 血糖基本恢复到正常基础水平; 本试验检测每次给药前 (即上次给药后 24 h) 血糖, 所测定时间点血糖为动物基础血糖值, 表明在给药 24 h 后动物血糖已基本恢复到正常基础水平, 结果见表 1。

3.2.3 心电图检查 各组动物心电图检查结果显示, 给药期 d15 高剂量组 ST 段电压高于同期溶媒对照组 ($P < 0.05$), 并有 5 只动物出现 T 波倒置 (5/6), 同期原研对照组也存在上述现象, 这些变化可能与高剂量胰岛素降低正常动物血糖后所产生的对心电图一过性可逆影响有关, 中、低剂量组无明

表 1 Insulin NPH 对 Beagle 犬血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Insulin NPH on blood glucose of Beagle's dogs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (IU·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)						
		d0	d8	d16	d23	d30	rd6 (n = 2)	rd14 (n = 2)
溶媒对照	—	4.0±0.1	4.3±0.4	4.5±0.4	4.5±0.5	4.2±0.4	4.1±0.3	4.2±0.3
原研对照	1.5	4.1±0.5	4.0±0.4	4.4±0.5	4.8±0.4	4.3±0.4	4.1±0.2	4.6±0.4
Insulin NPH	0.5	4.1±0.4	4.2±0.6	4.3±0.4	4.9±0.2	4.4±0.3	4.4±0.1	4.6±0.9
	1.0	4.0±0.3	4.1±0.2	4.5±0.4	4.8±0.6	4.2±0.6	3.8±0.5	4.2±0.0
	1.5	4.0±0.3	4.1±0.5	4.6±0.5	4.5±0.3	4.2±0.3	4.1±0.1	4.2±0.4

显异常；药前、给药期和恢复期的不同阶段各给药组的个别动物也出现 T 波倒置、心率不齐，心动过速等现象，但均属动物自发生理表现。另外个别动

物在给药期和恢复期间的 P 波电压、P-R 间期、Q-T 间期与溶媒对照组比较，虽有统计学意义，但无明显

表 2 比格犬 sc Insulin NPH 对 Beagle 犬 II 导联心电图的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of Insulin NPH injection on ECGs of Beagle's Dogs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	d0							
		HR/(B·min ⁻¹)	P/mV	R/mV	T/mV	P-R/ms	QRS/ms	Q-T/ms	ST 段/mV
溶媒对照	0	110.8±13.2	0.280±0.030	1.593±0.320	0.455±0.111	90.2±9.4	58.8±4.2	189.8±8.3	0.066±0.068
原研对照	1.5	111.7±18.0	0.354±0.086	1.721±0.288	0.546±0.150	88.8±12.1	59.8±3.5	193.8±1.8	0.073±0.055
Insulin	0.5	99.7±13.6	0.275±0.045	1.401±0.322	0.339±0.189	88.8±6.8	60.3±4.0	203.2±6.0**	-0.011±0.088
NPH	1.0	102.3±10.9	0.298±0.071	1.598±0.252	0.446±0.095	89.8±5.1	60.7±5.8	197.5±8.5	0.059±0.039
	1.5	108.5±12.4	0.324±0.079	1.562±0.409	0.453±0.108	90.2±3.1	61.3±3.4	196.0±7.4	0.046±0.081
组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	d15							
		HR/(B·min ⁻¹)	P/mV	R/mV	T/mV	P-R/ms	QRS/ms	Q-T/ms	ST 段/mV
溶媒对照	0	115.8±11.3	0.303±0.048	1.545±0.307	0.319±0.112	82.5±11.4	59.8±2.9	191.8±9.0	0.037±0.086
原研对照	1.5	119.3±14.3	0.411±0.085*	1.839±0.332	0.244±0.057	95.2±5.0*	59.8±2.9	194.5±15.6	0.138±0.047*
Insulin	0.5	116.3±18.6	0.334±0.050	1.531±0.376	0.259±0.141	85.3±4.8	61.5±4.6	198.8±10.0	0.052±0.076
NPH	1.0	121.5±17.1	0.383±0.057*	1.760±0.504	0.260±0.086	96.2±5.7*	60.2±3.9	190.5±15.6	0.127±0.069
	1.5	122.8±18.2*	0.369±0.069	1.591±0.343	0.230±0.047	96.5±5.8*	61.7±2.3	194.3±13.8	0.141±0.039*
组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	d29							
		HR/(B·min ⁻¹)	P/mV	R/mV	T/mV	P-R/ms	QRS/ms	Q-T/ms	ST 段/mV
溶媒对照	0	136.8±17.0	0.309±0.060	1.391±0.302	0.356±0.096	85.5±8.5	61.8±3.8	185.2±8.3	0.034±0.083
原研对照	1.5	120.0±18.0	0.411±0.077*	1.605±0.187	0.423±0.135	86.5±8.9	65.0±1.8	196.5±12.1	0.088±0.065
Insulin	0.5	103.8±8.9**	0.305±0.097	1.687±0.496	0.454±0.208	82.8±5.6	64.5±5.0	198.5±8.5*	0.022±0.079
NPH	1.0	116.0±18.9	0.359±0.044	1.629±0.441	0.402±0.081	88.7±4.8	63.7±2.6	193.8±8.0	0.076±0.037
	1.5	120.0±17.8	0.358±0.084	1.505±0.390	0.345±0.198	88.5±5.4	63.7±5.0	193.0±10.1	0.054±0.073
组别	剂量/ (IU·kg ⁻¹)	rd13							
		HR/(B·min ⁻¹)	P/mV	R/mV	T/mV	P-R/ms	QRS/ms	Q-T/ms	ST 段/mV
溶媒对照	0	122.5±23.3	0.233±0.037	1.269±0.383	0.186±0.016	76.0±25.5	65.5±2.1	208.5±4.9	-0.059±0.079
原研对照	1.5	118.0±0.0	0.370±0.055	1.412±0.493	0.238±0.093	94.0±12.7	62.5±2.1	208.5±2.1	0.042±0.006
Insulin	0.5	99.5±7.8	0.325±0.025	1.208±0.321	0.272±0.034	82.5±9.2	69.5±6.4	203.5±3.5	0.001±0.056
NPH	1.0	120.0±21.2	0.304±0.082	1.268±0.112	0.168±0.052	98.0±4.2	64.5±4.9	197.5±10.6	0.024±0.055
	1.5	135.5±40.3	0.422±0.074	1.487±0.120	0.352±0.136	88.0±2.8	60.5±2.1	189.5±21.9	0.091±0.056

与溶媒对照比较: *P<0.05

**P<0.05 vs dissolvent control group

3.2.4 血液学和血液生化 Beagle 犬 sc 不同剂量供试品和原研对照药后，各项检测指标结果均在正常范围内，某些指标（平均血红蛋白浓度、网织红细胞百分比、总胆红素和钾离子）的均值与同期溶媒对照组比较虽略有差异（P<0.05），但这些变化并无明显的时效-反应关系。

3.2.5 尿常规检查 Beagle 犬 sc 不同剂量受试药物后，给药期及恢复期不同阶段的尿液检查未发现尿液中 BIL、UBG、KET、ASC、GLU、PRO、BLD、

NIT、LEU、SG 和 pH 等指标与药物相关的明显异常变化。

3.2.6 脏器质量和组织病理学检查 给药结束及恢复期结束剖检可见胸、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。在给药期结束发现心脏和睾丸的脏器质量和脏器系数与同期溶媒对照组比较略有差异（P<0.05、0.01）。

镜下检查发现，本试验所出现的主要病理改变

是部分脏器的自发性病变或是动物自身发育异常,包括给药 30 d 和停药恢复 14 d 发生在溶媒对照组、原研对照组、供试品低、中、高剂量给药组少量或部分动物的肺、肝、肾、颌下腺间质轻度炎细胞浸润;较多动物气管局部黏膜鳞状上皮化生、肝组织中见微小肉芽肿形成、少量肾小管上皮空泡变性;少量动物肺组织局部出血、极少量肾小管内有蛋白

管型、甲状旁腺局部囊肿形成等。上述病变出现的比例和病变程度各给药组与同期溶媒对照组比较,无统计学差异。

3.3 免疫原性试验

表 3 中结果显示,所测的 *A* 值均低于同期溶媒对照组抗体均值的阈值,表明受检血清中未检测到抗 Insulin NPH 或 Humulin NPH 的结合抗体。

表 3 比格犬 sc Insulin NPH 后产生结合抗体的动物数统计(产生结合抗体动物数/总动物数)

Table 3 Statistics of dogs with binding antibody during different periods of Insulin NPH Injection (dogs with binding antibody/ total animals)

组别	剂量/(IU·kg ⁻¹)	药前(d-4, n = 6)	给药期		恢复期 (rd14, n = 2)
			d16 (n = 6)	d30 (n = 6)	
溶媒对照	0	0/6	0/6	0/6	0/2
	0.5	0/6	0/6	0/6	0/2
Insulin NPH	1.0	0/6	0/6	0/6	0/2
	1.5	0/6	0/6	0/6	0/2
Humulin NPH	1.5	0/6	0/6	0/6	0/2

3.4 豚鼠主动全身过敏试验

豚鼠主动全身过敏试验结果显示,供试品高剂量组有 1 只雄性豚鼠在给药后 2 min 出现轻微呼吸加快,8 min 后恢复正常;其它各给药组动物均未见明显过敏反应症状。表明未见明显豚鼠主动全身过敏症状,但建议临床应关注过敏反应症状的出现。

4 讨论

新药非临床评价是药物从药学研究进入临床试验的重要环节,可以预测对机体产生的毒性反应,提供毒性靶器官及其损害的可逆性,为临床的安全使用剂量及不良反应监测提供参考^[9-10]。生物类似药物多次重复给药后极易引起过敏反应和免疫原性^[11],可能会降低药物疗效,甚至导致严重的不良反应。虽然临床前研究由于种属不同并不能完全反映出药物在人体内的过敏反应和免疫原性情况,但能为开展临床研究提供一定的参考依据。

精蛋白重组人胰岛素是利用重组 DNA 技术获得的高纯度的生物合成人胰岛素,与天然胰岛素有相同的结构和功能,是一种长效胰岛素。通过在注射部位皮下形成鱼精蛋白盐和胰岛素晶体复合物延长其药效作用时间^[2],其降血糖作用于给药后 4~12 h 最强,可持续约 14 h^[12-14],药效持久且能显著抑制肝脏中血糖的生成。临床上常作为基础胰岛素与口服降糖药物合用治疗胰岛素缺乏的糖尿病^[15],在实现将血糖平稳维持在正常水平的同时尽可能避

免低血糖风险。

本研究探讨了生物类似药物临床前安全性评价的主要研究内容,由于前期文献调研结果显示,人胰岛素可以控制餐后营养物质代谢,尤其是葡萄糖的暴露量,从而具有改善心脏舒张功能、减轻糖尿病人心脏衰竭症状的作用^[16],因此在 Beagle 犬重复毒性研究中,特别关注了 NPH 对犬心电图的影响。实验结果显示,Beagle 犬心电图检查中 Insulin NPH 高剂量给药组和原研对照组给药 d15 出现明显的 T 波倒置,而随着给药时间延长或停药后该现象显著减少,这可能与受试药和原研药降低正常动物血糖后对心电图所产生的一过性影响有关,该作用是可逆的;实验过程的不同阶段各给药组的个别动物也出现了心律不齐、心动过速等现象,与药物无特定的相关性,考虑应为动物的偶发生理现象。另外,小鼠急性毒性试验中,给药组动物体质量在 d1 的快速增长,可能与胰岛素类药物药理活性相关,其降血糖的特点导致了动物摄食量的代偿性增加。

参考文献

- [1] 许小红, 咎旺, 吴敏. 糖尿病治疗药物——胰岛素研究进展 [J]. 西南军医, 2007, 9(1): 83-86.
- [2] Frier B M, Russell-Jones D, Heise T. A comparison of insulin detemir and neutral protamine Hagedorn (isophane) insulin in the treatment of diabetes: a systematic review [J]. Diabetes Obes Metab, 2013,

- 15(11): 978-986.
- [3] 黄海亮, 赵东永, 盛家峰. 门冬胰岛素与精蛋白重组人胰岛素联合吡格列酮治疗 2 型糖尿病疗效比较研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13 (11): 1564-1566.
- [4] Niskanen L, Virkamaki A, Hansen J B, et al. Fasting plasma glucose variability as a marker of nocturnal hypoglycemia in diabetes: evidence from the PREDICTIVE study [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 86(2):e15-e18.
- [5] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for use. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals [S]. 2011.
- [6] 治疗用生物制品非临床安全性技术审评一般原则 [S]. 2010. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=100>
- [7] XU Z K. Practicality of monoclonal antibody technique [M]. Xian: Shanxi Science and Technology Press, the first edition, 1992: 43-47.
- [8] 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=188>
- [9] 吕秋军. 生物技术药物的免疫毒性和免疫原性研究 [J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(4): 281-282.
- [10] 吕秋军, 丁林巨. 生物技术药物临床前安全性评价研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2001, 10(4): 252-256.
- [11] Lu Q J, Gao Y, Tao L B, et al. Production of neutralizing antibodies to recombinant human basic fibroblast growth factor and its renal deposition in rhesus monkeys and rats [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1999, 23(3): 168-171.
- [12] Heise T, Pieber T R. Towards peakless, reproducible and long-acting insulins. An assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2007, 9(5): 648-659.
- [13] Lucidi P, Porcellati F, Rossetti P, et al. 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: a randomized cross-over study [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34: 1312-1314.
- [14] Klein O, Lyngé J, Endahl L, et al. Albumin-bound basal insulin analogues (insulin detemir and NN344): comparable time- action profiles but less variability than insulin glargine in type 2 diabetes [J]. *Diabetes ObesMetab*, 2007, 9(3): 290-299.
- [15] Yki-Järvinen H, Kauppinen-Mäkelin R, Tiikkainen M, et al. Insulin glargine or NPH combined with metformin in type 2 diabetes: the LANMET study [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(3): 442-451.
- [16] von Bibra H, Siegmund T, Kingreen I, et al. Effects of analogue insulin in multiple daily injection therapy of type 2 diabetes on postprandial glucose control and cardiac function compared to human insulin: a randomized controlled long-term study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15: 7.