

短效重组人胰岛素在人体内的药动学及药效学研究

谭惠文^{1,2}, 王 椿¹, 刘瑶霞¹, 喻红玲², 张祥迅², 冯 萍³, 余叶蓉^{1*}

(1. 四川大学华西医院内分泌科, 四川 成都 610041; 2. 华西医院内分泌代谢研究室, 四川 成都 610041; 3. 华西医院国家临床药物试验 GCP 中心, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 采用正常血糖-高胰岛素钳夹技术评估短效重组人胰岛素在健康人体内的药动学及药效学。方法 采用单中心、随机、双盲、平行交叉研究 22 名健康志愿者在正常血糖-高胰岛素钳夹平台基础上, 分别前后接受皮下注射短效重组人胰岛素和优泌林 R 两次 10 h 钳夹试验, 于给药前 120、90、60、30 min 及给药后 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、180、210、240、270、300、330、360、390、420、450、480 min 取血测定血清胰岛素水平, 同时计算给药后的前 2 h 每 10 min 的葡萄糖输注速率和后 6 h 的每 15 min 的葡萄糖输注速率 (GIR), 计算药动学和药效学参数。结果 20 名志愿者纳入分析, 平均 25.8 ± 1.76 岁, 体重指数 $21.52 \pm 1.21 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。受试制剂和参比制剂在钳夹基线稳态期组间的葡萄糖 GIR 和 C 肽抑制率接近, 差异无统计学意义。短效重组人胰岛素和优泌林 R 皮下给药后有关药动学参数如下: 胰岛素的 $C_{\max}$ 分别为 108.64 ± 18.98 、 $111.92 \pm 118.02 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$; $T_{\max}$ 分别为 78.00 ± 31.56 、 $86.00 \pm 38.44 \text{ min}$; AUC_{0-480} 分别为 20.6801 ± 5.5153 、 $21.3471 \pm 5.4641 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $GIR_{\max}$ 分别为 5.55 ± 1.73 、 $6.16 \pm 1.69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果表明: 短效重组人胰岛素和优泌林 R 之间的药动学参数差异无统计学意义。结论 正常血糖-高胰岛素钳夹技术可准确评估胰岛素制剂的药动学和药效学。两种制剂的药动学参数无显著差异, 具生物等效性。

关键词: 正常血糖-高胰岛素钳夹技术; 短效重组人胰岛素; 优泌林 R; 药物动力学; 正常血糖-高胰岛素钳夹降血糖

中图分类号: R96

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2011)05-0407-04

Investigation on pharmacokinetics and pharmacodynamics of rh-insulin in healthy volunteers

TAN Hui-wen^{1,2}, WANG Chun¹, LIU Yao-xia¹, YU Hong-ling², ZHANG Xiang-xun², FENG Ping³, YU Ye-rong^{1*}

(1. Department of Internal Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China; 2. Laboratory of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China; 3. Institute of Drug Clinical Trial-GCP Center, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To evaluate the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics of subcutaneous injection of rh-insulin by euglycemic clamp technique in healthy volunteers. **METHODS** This was a mono-centre, randomized, double blinded two periods, cross-over open-label comparative study in 22 healthy volunteers, who were randomly received the rh-insulin or regular insulin subcutaneous administration. All subjects underwent an oral glucose tolerance test, an evaluation of their metabolic profiles and a 10 h euglycaemic hyperinsulinaemic clamp test. The blood samples of the clamp study at -120, -90, -60, -30, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480 min were taken for insulin detection, meanwhile glucose infusion rate (GIR) were determined per 10 min over the first 2 h and per 15 min over the next period of 6 h. **RESULTS** During the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp, whole-body glucose use and C-peptide suppression were similar in the two treatment groups at baseline, and the $C_{\max}$ of insulin were of tested and reference preparation were 108.64 ± 18.98 , $111.92 \pm 118.02 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{\max}$ were 78.00 ± 31.56 , $86.00 \pm 38.44 \text{ min}$, AUC_{0-480} were 20.6801 ± 5.5153 , $21.3471 \pm 5.4641 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, $GIR_{\max}$ were 5.55 ± 1.73 , $6.16 \pm 1.69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** Euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique is use for the research of insulin pharmacokinetics and pharmacodynamics. The study shows that there were no significant differences of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties between the rh-insulin and regular insulin, the tested rh-insulin and reference preparation are bio-equivalent.

Key words: Euglycemic-clamp technique; rh-insulin; Humulin R pharmacokinetics; Euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique

CLC number: R96

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2011)05-0407-04

作者简介: 谭惠文 (1982—), 正攻读内分泌专业的博士学位。Email: tanhuiwen2005@163.com

* 通信作者 (Correspondent author), Email: yerongyu@hotmail.com

近年来,各种新型胰岛素制剂及胰岛素促泌剂相继问世^[1]。高胰岛素-正常血糖钳夹技术(euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique, EHCT)^[2]是目前国际上公认的评估外周胰岛素敏感性的标准^[3]。因此,一些研究者开始使用 EHCT 来评估胰岛素制剂及胰岛素促泌剂的药动学和药效学特征^[4]。现采用 EHCT 评价印度生产的短效重组人胰岛素(rh-insulin)在正常人体内的药动学和降糖活性,并与优泌林 R 胰岛素进行对比,探讨短效人胰岛素在健康人体内的作用和代谢特点,并评价该技术用于胰岛素的药动学和生物等效性研究的优缺点。

1 实验部分

1.1 受试对象与试剂

健康受试者 22 名,血常规及肝肾功能正常,无糖尿病、高血压及血脂紊乱家族史,无急慢性呼吸道疾病及缺血性心、脑血管疾病或急慢性心功能不全,乙肝表面抗原阴性,排除药物过敏史或对胰岛素过敏者;经口服葡萄糖耐量试验证实无糖耐量异常,志愿者了解试验的全过程,自愿参加并签署知情同意书。短效重组人胰岛素(印度 MJ Biopharm Pvt Ltd, $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每支 400 IU);参比制剂优泌林 R(美国 Lilly 公司, $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每支 400 IU)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 采用单中心、双盲、随机、交叉研究 22 例健康志愿者随机平分 2 组。在每个研究日,志愿者按单双序号分为两组,单号组在第一次试验日接受 X 制剂,在第二个试验日接受 Y 制剂,双号组用药顺序相反,两次试验间隔 7 d(洗脱期),期间避免剧烈运动或饮用刺激性饮料(如酒精、浓茶、咖啡等),女性受试者避开月经期。

1.2.2 正常血糖高胰岛素钳夹试验的建立^[3,6]

受试者在试验前一天 8:00 pm 后禁食过夜,可饮水,清晨空腹,安静休息 1 h 后开始试验。卧位,逆心方向行一侧手背静脉穿刺,置入留置导管以生理盐水维持通道。通过电热垫加热以维持手的温度为 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 。从另一侧肘正中静脉置入静脉插管以备输注胰岛素和葡萄糖。试验开始后,从肘正中静脉通道用注射泵按 $40 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 输入短效人胰岛素(人正规胰岛素 $40 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$),并同时用输液泵输入 20% 葡萄糖液。每 10 min 从手背静脉通道取血测定血糖值,根据血糖水平调整葡萄糖液的输注速率,将血糖维持在 $5.0 \pm 0.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。正常血糖钳夹试验维持 10 h。正常血糖高胰岛素钳夹试验开始后 2 h 时于皮下注射对照药物或试验药物(短效人

重组胰岛素 $0.2 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)。胰岛素注射使用 BD 胰岛素注射器,经医生核对剂量后,由同一名护士在受试者的同一部位以 45° 斜角于腹部皮下注射。

1.2.3 药动学取样 分别于给药前 120、90、60、30 min 及给药后 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150、180、210、240、270、300、330、360、390、420、450、480 min 取血 3 mL(共 29 个取样点)。将血清胰岛素和 C 肽测定的血样置未经抗凝处理的试管中,室温下凝集 60 min,离心后吸取血清置密封的试管中,于 -20°C 冰箱中保存。

在 10 h 正常血糖钳夹试验期间,根据每 10 ~ 15 min 的血糖值调整 20% 右旋葡萄糖的输注速度,以维持血糖 $5.0 \pm 0.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,并计算校正的葡萄糖输注率(GIR)。在皮下注射后前 2 h 内,每 10 min 计算其平均校正的 GIR,在剩余的 6 h 内每 15 min 计算 1 次。

1.2.4 测定方法 采用葡萄糖氧化酶法测定血糖浓度。放免法测定血清胰岛素,与人胰岛素原(HPI)交叉反应 $<0.2\%$,批内 RSD $<3.8\%$ 。放射免疫法测定血清 C 肽,与人胰岛素原交叉反应 $<4.0\%$,批内 RSD $<6.4\%$,批间 RSD $<9.3\%$ 。肝肾功能及血尿常规样品送华西医院检验中心采用全自动生化仪检测。将皮下注射胰岛素后所测血清胰岛素值减去皮下注射前进行的正常血糖钳夹稳态期血清胰岛素水平,获得给药后各时点的血药浓度。

1.2.5 安全性评估和统计学处理 皮下注射试验制剂或参比制剂后,观察生命体征的变化(呼吸、心率和血压等)及受试者有无皮肤过敏及低血糖等不良事件的发生。

采用中国药理学学会数学药理分专业委员会编制的 DAS 2.0 程序的实测值计算生物等效性,处理血清胰岛素(INS)和 GIR 经时变化数据,分别求出 AUC_{0-t} (统计矩计算)、 $C_{\max}$ (实测值)、 $T_{\max}$ (实测值)和 $T_{1/2}$ 等药动学参数,将 AUC_{0-t} 、 $C_{\max}$ 经对数转换后进行交叉试验的方差分析、双向单侧 t 检验处理与群体等效性分析; $T_{\max}$ 用实测值进行非参数法检验分析,计算常规人重组胰岛素注射液的相对生物利用度。安全性指标的统计分析采用 SAS9.1 统计软件进行分析。

1.3 结果

1.3.1 人口学资料和胰岛素钳夹试验技术的指标

1 名受试者因故中断试验而退出,21 名志愿者(男 17 名、女 4 名)完成自身前后试验。第 3 例志愿者因生理状况(月经提前 3 d 来潮)影响,故不纳入药效及药动学统计。受试者平均 25.8 ± 1.76 岁,体重指数为 $21.52 \pm 1.21 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。胰岛素钳夹试验

平台技术指标: 钳夹试验的血糖目标水平为 $5.0 \pm 0.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此过程中受试制剂组的实测血糖值为 $4.99 \pm 0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 参比制剂组的为 $4.99 \pm 0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 两组的血糖值基本一致, 均在目标水平 $\pm 5\%$ 以内。胰岛素钳夹试验在约 90 min 时达到稳态期, 两组制剂的志愿者稳态期胰岛素水平分别为 82.29 ± 11.25 、 $78.96 \pm 12.37 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$; 钳夹试验中受试制剂组的基础血清 C 肽水平为 $0.90 \pm 0.36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、稳态期水平为 $0.60 \pm 0.26 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稳态期血清 C 肽水平为基础值的 66.78%, 提示志愿者的内源性胰岛素分泌被抑制; 参比制剂组的基础血清 C 肽水平为 $0.81 \pm 0.33 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稳态期的为 $0.56 \pm 0.29 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稳态期血清 C 肽水平为基础值的 69.18%, 两组间的差别无统计学意义。两组稳态期的 GIR 分别为 10.08 ± 2.58 、 $10.51 \pm 2.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 两组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.3.2 重组人胰岛素的药动学参数 在健康人体皮下注射受试制剂或参比制剂后约 80 min 时血药浓度达峰值 (108.64 ± 18.98 、 $111.92 \pm 118.02 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$, $P > 0.05$), 此后血中胰岛素水平逐渐下降, 在给药后 8 h 左右基本回复至基线水平 (图 1)。两组 AUC_{0-480} 分别为 20.6801 ± 5.5153 、 $21.3471 \pm 5.4641 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P > 0.05$)。 $T_{\max}$ 分别为 78.00 ± 31.56 、 $86.00 \pm 38.44 \text{ min}$ ($P > 0.05$)。

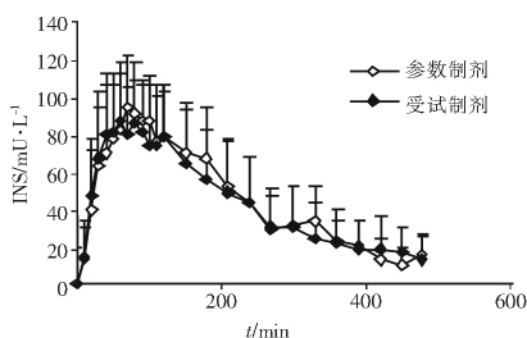


图1 受试制剂组和参比制剂组的血清胰岛素浓度-时间曲线

Fig 1 Serum insulin profiles after a single subcutaneous injection dose of rh-insulin and Humulin R

1.3.3 短效重组人胰岛素的药效学参数 从图 2 及表 2 可见: 两组的葡萄糖输注率 (GIR) 在 0 ~ 480 min 时, 曲线下面积 ($GIR - AUC_{0-480}$) 为 1.3846 ± 0.4947 、 $1.3509 \pm 0.4939 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($P > 0.05$)。经自然对数转换后进行交叉试验的方差分析、双单侧 t 检验和群体等效性分析, 受试制剂与参比制剂 $GIR - AUC_{0-480}$ 比值的 90% 置信区间为 89.2%、118.6%, 落在 80% ~ 125% 的等效区间内。由于 $GIR - AUC$ 直接反映了研究制剂的有效性, 故以优

泌林 R 注射液为参比, 根据 GIR 的剂量校正后, 计算得人重组胰岛素注射液的相对生物有效性为 102.9%。受试制剂的 $GIR - C_{\max}$ 与参比制剂的基本一致, 分别为 5.55 ± 1.73 、 $6.16 \pm 1.69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 差别无统计学意义。受试制剂与参比制剂的 $GIR - T_{\max}$ 分别为 85.00 ± 24.82 、 $87.00 \pm 21.79 \text{ min}$ ($P > 0.05$)。对 $GIR - T_{\max}$ 用实测值进行非参数统计, 两种制剂间差异无统计学意义。

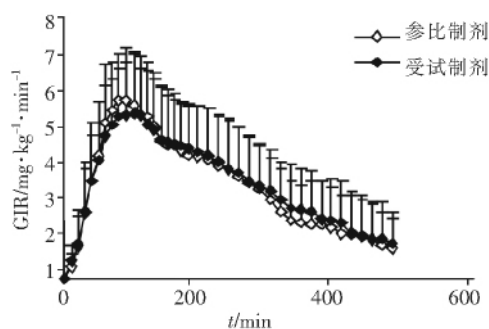


图2 受试制剂和参比制剂的平均 GIR-时间曲线

Fig 2 The glucose infusion rate (GIR) response in health subjects after subcutaneous injection of rh-insulin and Humulin R

1.3.4 安全性指标 在前后两次钳夹试验过程中, 除两例有一过性低血糖反应 (第一例由于试验结束后停止输液进餐延时所致, 另一例因突然发生地震紧急撤离过程中终止葡萄糖输注所致, 2 例受试者低血糖均迅速纠正) 外, 其余受试者均无低血糖事件及其他不适, 生命体征平稳。试验前及试验结束后所进行的体检未见异常。体重、血、尿常规及血生化检查, 包括血脂、肝功能 (谷丙转氨酶、谷草转氨酶)、肾功能 (血尿素氮、血清肌酐) 等在试验前后无明显变化, 心电图检查未见异常。

2 讨论

正常人体内的血糖水平受诸多因素的影响, 主要的调控机制是血浆葡萄糖水平与调节血糖的激素通过反馈调节维持血糖于稳定状态。高胰岛素-正常血糖钳夹技术 (EHCT) 通过同时静脉输注外源性胰岛素与葡萄糖, 可打破体内葡萄糖-胰岛素的负反馈调控, 升高血浆胰岛素水平, 同时通过葡萄糖的输注来对抗外源性胰岛素所诱导的血糖降低, 使血糖达到一个预先设定的水平 (靶血糖值) 并维持稳态水平, 从而避免了因血糖波动所致的神经激素等因素对血糖调节的影响。由于高浓度外源性胰岛素抑制了内源性葡萄糖产生 (肝糖分解和糖异生) 和内源性胰岛素分泌, 当钳夹试验达稳态时, 外源性葡萄糖输注速率就等于血浆清除率也即外周组织的葡萄糖利用率。EHCT 将内源性胰岛素分泌的干扰

减至最小,降低了结果的变异性,保证了实验的可控性与准确性。同时避免了内源性胰岛素缺乏(如糖尿病患者)及低血糖(如胰岛素耐量试验中)对胰岛素敏感性测定的影响^[2-3,6]。该技术被认为是目前评价胰岛素药动学和药效学参数的最佳方法^[6-7],由于其操作复杂、费用高昂,仅在近 10 余年才较多用于一些新型胰岛素制剂的药效学与药动学的评估。钳夹试验中稳态血糖水平(SSPG)、胰岛素水平(SSPI)、稳态期葡萄糖输注速率(GIR)、胰岛素曲线下面积(AUC_{ins})、达峰时间(T_{max})及作用持续时间是评价胰岛素药动学和药效学参数的重要指标。另外,钳夹试验中的血糖变异系数(CVBG)也是反映钳夹技术稳定性与准确性的指标之一^[8]。文中采用 EHCT 评价短效重组人短效胰岛素在正常人体内的药动学和降糖活性。在注射胰岛素前的基础正常血糖钳夹试验中,稳态期血糖维持在 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,实测值在目标值 $\pm 8\%$ 以内。钳夹稳态期 C 肽水平为空腹基线水平的 60% 以下,提示内源性胰岛素分泌及葡萄糖异生被抑制,为准确评价受试胰岛素制剂的药动学和药效学提供了较好的平台。结果表明:受试制剂重组人胰岛素与参比试剂优泌林 R 相比,血药浓度达峰时间一致,均在皮下注射约 80 min 时达到高峰,GIR 达峰时间两者也相差无几,显示该制剂皮下注射后其作用的起效和持续时间与正规胰岛素皮下注射制剂优泌林 R 相当。经非参数检验,两种制剂的 T_{max} 具有等效性。常规人重组胰岛素注射液的迅速降糖作用模拟内源性胰岛素的正常生理反应,有助于控制进餐后血糖的迅速升高。短效重组胰岛素在机体内廓清速率较快,降糖作用的快速减退,有助于减少胰岛素使用后于下餐前低血糖发生的风险^[8]。由于 EHCT 技术程序复杂、时间性强,须精确的时间间隔采血,要求工作人员配合默契度高,因此,在试验前需要周密详细的安排才能保证高效有序的完成。试验过程中应注意受试者血管紧张度和小便及起卧引起的交感神经刺激反应等诸多因素对钳夹稳态建立的影响。同时,在整个 EHCT 试验结束后不要急于停止葡萄糖的输

注,因达到稳态循环中胰岛素浓度较高,而被抑制的葡萄糖异生尚不能开始,故易发生低血糖,宜在停止胰岛素泵后继续输注葡萄糖并监测血糖 30 ~ 60 min,试验结束,推荐受试者进食,以先进食碳水化合物为宜,尽量避免低血糖的发生。胰岛素制剂药动学和药效学研究还在不断改进,文中采用 EHCT 法对短效重组人胰岛素进行评价,结果显示:受试制剂与参比制剂的起效时间、达峰时间以及药效持续时间基本一致,具有生物等效性。

致谢:承北京春天医药科技发展有限公司(CRO 公司)和四川大学华西医院国家药品临床研究基地(GCP 中心)所做的临床监查。

参考文献:

- [1] Osterberg O, Erichsen L, Ingwersen SH, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of insulin aspart and human insulin[J]. *J Pharmac Pharmacodyn* 2003, 30(3): 221 - 235.
- [2] 邓尚平. 胰岛素抵抗的临床测定方法和评价[M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 101 - 109.
- [3] Elahi D. In praise of the hyperglycemic clamp, a method for assessment of β - cell sensitivity and insulin resistance[J]. *Diabetes Care*, 1996, 19: 278 - 286.
- [4] Scholtz HE, Pretorius SG, Wessels DH, *et al.* Pharmacokinetic and glucodynamic variability: assessment of insulin glargine, NPH - insulin and insulin ultralente in healthy volunteers using a euglycaemic clamp technique[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(10): 1988 - 1995.
- [5] 余叶蓉, 李洪亮, 喻红霖, 等. 单纯性肥胖患者胰岛素抵抗与内皮依赖性血管舒张功能的研究[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(17): 1467 - 1470.
- [6] Muniyappa R, Lee S, Chen H, *et al.* Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance *in vivo*: advantages, limitations, and appropriate usage[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(1): 15 - 26.
- [7] 董立厚, 宋海峰. 高胰岛素 - 正葡萄糖钳夹技术的研究进展[J]. *中国新药杂志* 2007, 16(19): 1561 - 1564.
- [8] Swinnen SG, Holleman F, Devries JH. The interpretation of glucose clamp studies of long - acting insulin analogues: from physiology to marketing and back[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(10): 1790 - 1795.

收稿日期:2010 - 11 - 10