



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103930096 B

(45)授权公告日 2017.05.31

---

(21)申请号 201280053399.9	(51)Int.Cl.
(22)申请日 2012.10.31	A61K 9/19(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号	A61K 9/08(2006.01)
申请公布号 CN 103930096 A	A61K 38/22(2006.01)
(43)申请公布日 2014.07.16	A61K 38/26(2006.01)
(30)优先权数据	A61K 38/28(2006.01)
61/553,388 2011.10.31 US	A61K 9/00(2006.01)
61/609,123 2012.03.09 US	A61K 47/02(2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 47/10(2006.01)
2014.04.29	A61K 47/12(2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据	A61K 47/14(2006.01)
PCT/US2012/062816 2012.10.31	A61K 47/18(2006.01)
(87)PCT国际申请的公布数据	A61K 47/20(2006.01)
W02013/067022 EN 2013.05.10	A61K 47/22(2006.01)
(73)专利权人 XERIS药物公司	(56)对比文件
地址 美国德克萨斯州	CN 103442695 A,2013.12.11,
(72)发明人 史蒂文·普莱斯特斯基	CN 103442695 A,2013.12.11,
南希·斯科特	EP 2060268 A1,2009.05.20,
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事	US 2008/0248999 A1,2008.10.09,
务所(普通合伙) 11413	GB 2119248 A,1983.11.16,
代理人 王春伟 刘继富	审查员 段洁
	权利要求书4页 说明书18页 附图4页

---

(54)发明名称

用于治疗糖尿病的制剂

(57)摘要

公开了一种含有胰岛素的用于肠胃外施用的制剂,所述制剂包含在1至4之间或在6至8之间的pH记忆和非质子极性溶剂,其中所述胰岛素溶解于非质子极性溶剂中,其中溶解的胰岛素包括稳定的胰岛素单体或二聚体形式或其混合物,其中所述制剂的水含量等于或小于15%w/v。

1. 一种用于肠胃外施用的制剂,其包含:

(a) 包含在1至4之间或在6至8之间的pH记忆并且已经由非挥发性缓冲剂预干燥的浓度为3mg/ml至100mg/ml的胰岛素,所述非挥发性缓冲剂选自甘氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、或磷酸盐缓冲剂、或其混合物;和

(b) 非质子极性溶剂,所述非质子极性溶剂选自二甲基亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、或碳酸亚丙酯、或其混合物,

其中所述胰岛素溶解于所述非质子极性溶剂中,其中溶解的胰岛素包括稳定的胰岛素单体或二聚体形式或其混合物,

其中所述制剂的水含量等于或小于15%w/v,和

其中,

(i) 所述制剂还包含能够减少胰岛素的单体或二聚体形式的聚集的成分;或

(ii) 所述胰岛素为未改性的人类胰岛素;或

(iii) 所述制剂包含至少75%w/v的所述非质子极性溶剂。

2. 权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含至少80%w/v的所述非质子极性溶剂。

3. 权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含至少85%w/v的所述非质子极性溶剂。

4. 权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含至少90%w/v的所述非质子极性溶剂。

5. 权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含至少95%w/v的所述非质子极性溶剂。

6. 权利要求1所述的制剂,其中所述胰岛素的所述pH记忆在1至4之间。

7. 权利要求1所述的制剂,其中所述胰岛素的所述pH记忆在1至3之间。

8. 权利要求1所述的制剂,其中所述胰岛素的所述pH记忆为2。

9. 权利要求1所述的制剂,其中所述胰岛素的pH记忆在6至8之间。

10. 权利要求1所述的制剂,其中所述胰岛素的pH记忆为7。

11. 权利要求1所述的制剂,其中所述非质子极性溶剂为二甲基亚砜(DMSO)。

12. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含3mg/ml至50mg/ml的胰岛素。

13. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含3mg/ml至10mg/ml的胰岛素。

14. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含10mg/ml至50mg/ml的胰岛素。

15. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述溶解的胰岛素的大部分为单体形式。

16. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述溶解的胰岛素的大部分为二聚体形式。

17. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述能够减少胰岛素的单体或二聚体形式的聚集的成分为脲、盐酸胍、氨基酸、糖、多元醇、聚合物、酸、或表面活性剂、或其混合物。

18. 权利要求17所述的制剂,其中所述酸为乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、或己二酸、或其混合物。

19. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其还包含共溶剂。

20. 权利要求19所述的制剂,其中所述共溶剂为水。

21. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂不包含锌,或者其中在所述制剂中存在的锌与螯合剂结合。

22. 权利要求21所述的制剂,其中所述非挥发性缓冲剂为柠檬酸盐缓冲剂、或磷酸盐缓冲剂。

23. 权利要求1所述的制剂,所述制剂还包含螯合剂。

24. 权利要求22所述的制剂,所述制剂还包含螯合剂。

25. 权利要求21所述的制剂,其中所述螯合剂为乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、酒石酸、甘油或柠檬酸。

26. 权利要求23所述的制剂,其中所述螯合剂为乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、酒石酸、甘油或柠檬酸。

27. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其还包含能够使所述非质子极性溶剂的凝固点下降到0°C的成分。

28. 权利要求27所述的制剂,其中所述能够使所述非质子极性溶剂的凝固点下降到0°C的成分为水、糖、糖醇或其混合物。

29. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其还包含溶解于所述制剂中的糊精类似物。

30. 权利要求29所述的制剂,其中所述糊精类似物为普兰林肽。

31. 权利要求30所述的制剂,其中所述普兰林肽具有2的pH记忆。

32. 权利要求30所述的制剂,其中所述普兰林肽具有2的pH记忆,并且所述胰岛素具有2的pH记忆。

33. 权利要求31所述的制剂,其中所述普兰林肽已经在非挥发性缓冲剂中预干燥,所述缓冲剂具有2的pH。

34. 权利要求30所述的制剂,其中所述制剂的水含量在5%至15%w/v之间。

35. 权利要求30所述的制剂,其中所述制剂的水含量在7%至12%w/v之间。

36. 权利要求30所述的制剂,其中所述制剂的水含量在8%至10%w/v之间。

37. 权利要求30所述的制剂,其中所述制剂的水含量为9%w/v。

38. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂为液体形式。

39. 权利要求38所述的制剂,其中所述制剂为溶液。

40. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中当所述制剂在室温下储存一个月时,所述制剂内至少90%的胰岛素保持化学和物理稳定。

41. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述非质子极性溶剂为所述制剂的连续相。

42. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述溶解的胰岛素为亚稳的。

43. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含在注射器、笔式注射装置、自动注射器装置、泵或灌注袋内。

44. 权利要求1至43所述的制剂中的任一种在制造用于降低血糖水平的药物中的用途,其中向有此需要的对象施用所述药物以降低对象的血糖水平。

45. 权利要求44所述的用途,其中所述对象的血糖水平在施用后90分钟内降低。

46. 权利要求44所述的用途,其中所述对象的血糖水平在施用后60分钟内降低。

47. 权利要求44所述的用途,其中所述对象的血糖水平在施用后30分钟内降低。

48. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中在所述对象中的早期 $1/2T_{\max}$ 血液胰岛素水平在施用后30至60分钟内出现。

49. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述对象已经诊断为患有I型或II型糖尿病。

50. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食前10分钟内施用。

51. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食前5分钟内施用。

52. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食前1分钟内施用。

53. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食后10分钟内施用。

54. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食后5分钟内施用。

55. 权利要求44至47中任一项所述的用途,其中所述药物在所述对象进食后1分钟内施用。

56. 一种制备权利要求1至43中任一项所述的制剂的方法,其包括:

(a) 干燥含有胰岛素和非挥发性缓冲剂的混合物以获得经干燥的胰岛素,所述非挥发性缓冲剂选自甘氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、或磷酸盐缓冲剂、或其混合物,其中所述经干燥的胰岛素具有在1至4或6至8之间的pH记忆;和

(b) 使所述经干燥的胰岛素在非质子极性溶剂中重构,所述非质子极性溶剂选自二甲基亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、或碳酸亚丙酯、或其混合物,

其中所述胰岛素溶解于所述非质子极性溶剂中,其中所溶解的胰岛素包括稳定的胰岛素单体或二聚体形式或其混合物,

其中所述制剂的水含量等于或小于15%w/v,所述制剂包含浓度为3mg/ml至100mg/ml的胰岛素,和

其中,

(i) 所述制剂还包含能够减少胰岛素的单体或二聚体形式的聚集的成分;或

(ii) 所述胰岛素为未改性的人类胰岛素;或

(iii) 所述制剂包含至少75%w/v的所述非质子极性溶剂。

57. 权利要求56所述的方法,其中所述制剂包含50mg/ml至100mg/ml的胰岛素。

58. 权利要求56所述的方法,其中所述溶解的胰岛素的大部分为单体形式或二聚体形式。

59. 权利要求56所述的方法,其还包括:

(c) 干燥含有糊精类似物和与步骤(a)中相同的非挥发性缓冲剂或第二非挥发性缓冲剂的混合物以获得经干燥的糊精类似物;和

(b) 使所述经干燥的糊精类似物与所述经干燥的胰岛素一起在所述非质子极性溶剂中重构,其中所述经干燥的糊精类似物溶解于所述非质子极性溶剂中。

60. 权利要求59所述的方法,其中非挥发性缓冲剂具有2的pH。

61. 权利要求58所述的方法,其还包括添加制剂的5%至15%w/v之间的水作为共溶剂。

## 用于治疗糖尿病的制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年3月9日提交的美国临时申请61/609123号和2011年10月31日提交的美国临时申请61/553388号的权益。以上参考申请的内容通过引用并入本申请中。

### 背景技术

[0003] A. 技术领域

[0004] 本发明涉及用于肠胃外施用的胰岛素制剂。这些制剂可以包含稳定的胰岛素单体和二聚体形式,从而加快胰岛素进入对象血流中的吸收速率。

[0005] B. 相关技术说明

[0006] I型糖尿病的患者几乎不或者不产生胰岛素,因而对于I型糖尿病的主要治疗为外源性胰岛素疗法。另外,由于非胰岛素治疗的局限性,许多II型糖尿病的患者最终需要胰岛素疗法。历史上,胰岛素用于治疗糖尿病已经超过了90年。一种典型的方案涉及每天多次注射胰岛素:每天用一或两次的长效基础胰岛素和进餐时的速效胰岛素。尽管该治疗方案是公认有效的,但它具有局限性。首先,患者通常由于不方便和针扎的疼痛而不喜欢对自身注射胰岛素。结果,患者往往不充分依从于规定的治疗方案。更重要地,即使适当用药,也没有进餐时注射用胰岛素产品能充分地复制人类胰岛素的天然生理作用。具体地说,非糖尿病患者的第一阶段反应是:随着来自进食的葡萄糖进入血液的几分钟内,血液中胰岛素水平的上升而产生胰岛素高峰。然后,血液中的胰岛素水平会在起效后30到60分钟之间达到峰值。与此相反,注射的胰岛素进入血液缓慢,观察到的最大浓度(C<sub>max</sub>)出现在注射普通人类胰岛素90分钟或更久之后。

[0007] 已经开发了各种治疗胰岛素和胰岛素类似物,以获得不同的药代动力学(PK)性质,例如权衡起效至达到血浆胰岛素峰值的时间与药效持续时间。胰岛素治疗的一个重要改进为引入速效胰岛素类似物,包括Humalog®、Novolog®和Apidra®。然而,即使使用这些类似物,胰岛素水平峰值通常在注射后约60分钟出现。目前销售的胰岛素产品未能充分地模拟第一阶段胰岛素的释放导致在进餐开始时胰岛素水平不足而在进餐之间胰岛素水平过高,这会有进餐开始后早期的高血糖症和在进餐后期的低血糖症的生理影响。由于需要复杂算法来控制这两种延迟,这两种情况都对闭环人造胰腺技术的前景造成重要挑战。

[0008] 对于用胰岛素治疗的糖尿病患者,外源性胰岛素的主要施用途径为皮下施用,PK分布曲线的主要参数取决于皮下吸收。许多可变因素会影响皮下注射胰岛素的吸收(例如血流量、扩散速率和缔合状态)。当血液流速充足时,可溶性胰岛素吸收速率的限制因素为(i)通过扩散到毛细血管的间质输送和(ii)毛细血管膜的输送限制,这两个因素都受分子的大小(如胰岛素的缔合状态)控制。

[0009] 一般地,胰岛素制剂为水性制剂。对于此的一个原因是人体的大部分由水组成,包括血浆,所述血浆为水性环境。因此,存在给予与一种与药物意图到达的环境相容的药物制剂的天然所趋。尽管与胰岛素的六聚体形式相比,胰岛素单体和二聚体形式由于其较小而

更容易被吸收到血液中,但是胰岛素通常以稳定的、键合锌的六聚体形式存在于药物组合物中。胰岛素单体在水溶液中不稳定,会形成淀粉样纤维并通过水介导途径降解。尽管六聚体结构促进了在溶液(pH5至8)中的稳定性,但是这也阻碍了扩散和随后的吸收。另外,注射积存的体积也会对扩散有影响,使得体积越大,扩散速率越慢。这些因素的组合正是造成药效开始和峰值血浆胰岛素水平延迟的主要原因。

[0010] 为了防止胰岛素在水溶液中的纤维化和降解的同时促进其皮下吸收,已经开发了胰岛素类似物,其中氨基酸序列已被改变以降低自身缔合的倾向性同时保留受体结合的亲和力。这些类型的胰岛素通常被称为“单体”胰岛素,但是它们实际上以弱缔合的六聚体存在。这类剂型的吸收仍会延迟,因为吸收依赖于扩散和之后皮下浓度的降低,而这需要六聚体解离为二聚体/单体。其平衡有利于单体状态的胰岛素类似物(例如胰岛素类似物Lispro)已经显示出更快速的吸收和更短的药效持续时间。然而,与六聚体胰岛素相比,这些类似物分子更不稳定,且在热和机械应力下更易于不可逆地聚集。此外,这些聚集体不仅降低了可用的胰岛素剂量,还可能引起患者的刺激或免疫反应。在实验和流行病学研究中,也已经开始关注关于受体机械信号转导的延长和由一些较新的胰岛素类似物引起的肿瘤增殖。除了这些缺点之外,胰岛素类似物比常规人类胰岛素大约贵一倍。

## 发明内容

[0011] 本发明为胰岛素制剂面临的当前问题提供提供了一种解决方案。本发明在于在缓冲剂中干燥胰岛素以制备干燥形式的胰岛素,所述干燥形式的胰岛素在非质子极性溶剂中重构和溶解后保持期望的pH。获得的制剂包括溶解且稳定的胰岛素单体和二聚体形式。特别地,该制剂可以具有相对低量的水(20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少)或者可以无水,这进一步允许制剂中存在更多量的胰岛素,从而降低给予对象的含胰岛素制剂的体积。另外,本发明允许使用未改性或天然的胰岛素形式和改性的或类似的胰岛素形式。换言之,胰岛素类似物可以用于本发明,同时未改性/天然的胰岛素也可以使用,并且以其单体和二聚体的形式保持稳定。

[0012] 在本发明的一个方面,公开了一种包含胰岛素和非质子极性溶剂的制剂,所述胰岛素具有在1至4之间(或1至3或约2),或者6至8之间(或6.5至7.5或约7)的pH记忆,其中所述胰岛素可以溶解于非质子极性溶剂中,其中溶解的胰岛素可以包含稳定的胰岛素单体或胰岛素二聚体形式或其混合物,并且其中制剂的水含量可以等于或小于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%w/v或w/w或更少(例如无水)。该制剂可以用于肠胃外施用。在特定方面,非质子极性溶剂可以是二甲基亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、或碳酸亚丙酯、或其混合物。在特定方面,非质子极性溶剂可以是二甲基亚砜(DMSO)。在一些方面,制剂包含3mg/ml至50mg/ml、3mg/ml至10mg/ml或10mg/ml至50mg/ml的胰岛素。在其它方面,其可以包含0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、15mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、55mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL,或更多,或根据需要,或其间的任意范围。在一些方面,制剂内的胰岛素的大部分为单体形式或二聚体形式,或单体和二聚体形式的组合。该制剂还可以进一步包含能够减少胰岛素的单体形式或二聚体形式的聚集的成分。这类成分的非限

制性实例包括脲、盐酸胍、氨基酸、糖、多元醇、聚合物、酸、或表面活性剂、或其混合物。在特定方面，酸可以是乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、或己二酸、或其混合物。该制剂可以包含共溶剂。共溶剂的一个非限制性实例为水。在一些方面，该制剂不含锌，包含少量锌，和/或包含与螯合剂结合的锌，以降低六聚体形成的可能性。在特定方面，胰岛素可以在非挥发性缓冲剂中预干燥，所述缓冲剂可以具有在1至4之间或在1至3之间或为约2的pH范围，或者在6至8或6.5至7.5之间或为约7的pH范围。非挥发性缓冲剂的实例可以是甘氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、或磷酸盐缓冲剂、或其混合物。在一些方面，缓冲剂可以包含螯合剂。螯合剂的非限制性实例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、酒石酸、甘油、或柠檬酸、或其任意组合。该制剂还可以包含能够使所述非质子极性溶剂的凝固点下降到约0°C的成分，且这样的成分的非限制性实例包括水、糖、糖醇或其混合物。在一些实例中，胰岛素可以是未改性的或天然的人类胰岛素。在其它方面，组合物还可以包含胰岛素佐剂，例如糊精类似物。该糊精类似物可以溶解于所述制剂中。糊精类似物的一个非限制性实例为普兰林肽(pramlintide)。普兰林肽可以处理为使得其具有在1至5之间，或2、3或4，或约2的pH记忆。在共制剂的一些具体实例中，胰岛素pH记忆可以为约2，普兰林肽pH记忆可以为约2。在一些方面，普兰林肽的处理可以包括在非挥发性缓冲剂中干燥所述普兰林肽，所述缓冲剂具有在1至5之间，或2、3或4，或约2的pH范围。在包含胰岛素和普兰林肽的制剂中，水含量可以在5%至20%w/v或w/w、或5%至15%w/v或w/w、或7%至12%w/v或w/w、或8%至10%w/v或w/w之间、或为约9%w/v或w/w。制剂可以为液体形式。制剂可以是溶液。在特定方面，当制剂在室温下储存一个月时，制剂内至少50%、60%、70%、80%或90%或更多的胰岛素可以保持化学和物理稳定。在一些方面，制剂可以包含在容器内。容器可以是注射器、笔式注射装置、自动注射器装置、泵或灌注袋。在特定方面，非质子极性溶剂可以是制剂的连续相。制剂可以包含至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%w/v或w/w的非质子极性溶剂。制剂内的胰岛素可以是亚稳的。

[0013] 还公开了一种用于降低血糖水平的方法，其包括以有效降低对象中的血糖水平的量给予需要它的对象本发明的制剂中的任一种。对象可以是人(成人或儿童)、动物(例如黑猩猩、马、牛、猪、兔、大鼠、小鼠等)。在特定方面，对象中的血糖水平在用药后10分钟、20分钟、30分钟、60分钟或90分钟内降低。在一些实例中，对象中的早期Tmax血液胰岛素水平在用药后10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟或60分钟内或者在施用后30至60分钟内出现。对象可以是已经诊断为患有I型或II型糖尿病，或者是易进展为I型或II型糖尿病。在一些实例中，在对象进食前30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟或1分钟内用药，或在对象进食后1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或30分钟内用药。

[0014] 还公开了一种制备本发明的制剂的方法。该方法可以包括干燥包含胰岛素和非挥发性缓冲剂的混合物以获得干燥的胰岛素，其中经干燥的胰岛素可以具有在1至4(或2至3或约2)、或者6至8之间(或6.5至7.5或约7)的pH记忆；和随后在非质子极性溶剂中使所述经干燥的胰岛素重构，其中所述胰岛素可以溶解于非质子极性溶剂中，其中溶解的胰岛素可以包含稳定的胰岛素单体和二聚体形式或其混合物，且其中制剂的水含量可以等于或小于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%w/v或w/w或更少(例如无水)。本方法还可以包括干燥包含糊精类似物和第二非挥发性缓冲剂的混合物以获得干燥的糊精类似物和使经干燥的糊精类似物在非质子极性溶剂中与经干燥的胰岛素一起重构，其中经干燥的糊精类似物



可以溶解于非质子极性溶剂。如上所述,糊精类似物可以是普兰林肽,并且可以处理为具有在1至5之间,或2、3或4,或在具体实例中约2的pH记忆。在共制剂的一些具体实例中,胰岛素pH记忆可以为约2,普兰林肽pH记忆可以为约2。第二非挥发性缓冲剂可以具有在1至5之间,或约2、3或4,或更特别地为约2的pH范围。该方法还进一步包括以5%至20%w/v或w/w、或5%至15%w/v或w/w、或7%至12%w/v或w/w、或8%至10%w/v或w/w、或约9%w/v或w/w的量将共溶剂例如水添加到制剂。

[0015] 本制剂的另一独特方面为其可以包含在容器中,可以储存,可以在需要时立即用于肠胃外施用,而不必重构或稀释制剂。因此,可以储存制剂的容器可以是注射器、笔式注射装置、自动注射器装置、泵或灌注袋。还考虑在制剂中使用额外的添加剂/药物赋形剂,其非限制性实例包括:抗氧化剂(实例包括抗坏血酸、半胱氨酸、蛋氨酸、硫代甘油、硫代硫酸钠、亚硫酸盐、BHT、BHA、抗坏血酸棕榈酸酯、没食子酸丙酯或维生素E);螯合剂(实例包括EDTA、EGTA、酒石酸、甘油或柠檬酸);或防腐剂(实例包括烷基醇、苯醇、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或其混合物)。制剂可以是液体形式、半固体形式或凝胶形式。如下文所讨论的,该制剂可以具有期望的粘度范围(在一个非限制性实例中,这样的范围可以在0.5cps至1.5cps之间)。

[0016] 可以预计,本说明书中所讨论的任意实施方案均可针对本发明的任意方法或组合物来实施,并且反之亦然。此外,本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0017] “胰岛素”是指人类、非人类、重组的、纯化的、和/或合成(例如改性的胰岛素或胰岛素类似物)的胰岛素。“人类胰岛素”是指由胰腺分泌的人类肽激素胰岛素——其可以从天然源中分离,由基因改变的有机体制备,通过合成化学制造,购买等。“非人类胰岛素”为来源于动物(例如猪、牛等)的胰岛素。

[0018] “改性的胰岛素”或“胰岛素类似物”是胰岛素的变化形式,与天然的胰岛素不同(例如化学改性、不同结构、不同氨基酸序列),但是仍可用于对象(例如人类)以执行与天然/未改性的胰岛素相同的功能。例如,通过DNA编码的基因工程,胰岛素的氨基酸序列可以被改变以改变其ADME(吸收、分布、代谢和/或排泄)特征。改性胰岛素或胰岛素类似物的实例包括 Lispro®、Aspart®、Glulisine®、Detemir®、Degludec®等。未改性或天然的胰岛素包括天然的或自然存在的氨基酸序列。

[0019] “稳定的胰岛素”是指制剂内的胰岛素在制剂内不会不可逆地聚集或者在制剂施用之后失去其活性。胰岛素在被吸收到血液中之后保持其活性。不希望被理论束缚,据认为本发明的制剂内的胰岛素为“亚稳的”(meta-stable),因为尽管溶解的胰岛素的构象会变化,但是在施用并被吸收到血液中后胰岛素就变回其天然构象。另外,据认为制剂内的胰岛素的构象变化降低了与制剂内存在的其它胰岛素单体和二聚体或佐剂如糊精类似物聚集的可能性。单体胰岛素形式是指处于其单体形式的胰岛素。二聚体胰岛素形式是指处于其二聚体形式(例如缔合或偶联到一起的两个单体)的胰岛素。六聚体胰岛素形式是指处于其六聚体形式(例如缔合或偶联到一起的三个二聚体)的胰岛素。

[0020] “不含锌”或“低锌”是指制剂包含相对于胰岛素含量约0.6%或更少(例如0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0%)的锌,或每6个胰岛素单体3个或更少(例如2、1、0)的锌离子。

[0021] “非质子极性溶剂”是指不含酸性氢且不作为氢键供体的极性溶剂。如上所述,非

限制性实例包括二甲基亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)、乙酸乙酯、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)、二甲基乙酰胺 (DMA) 和碳酸亚丙酯。

[0022] “肠胃外施用”是指在动物例如人类的一层或多层皮肤或粘膜下方或者穿过它们来施用制剂。标准的肠胃外施用被提供到动物例如人类患者的皮下或肌肉内部位。以这些深的部位为靶点,这是因为相对于浅的真皮部位而言其组织更容易扩展以容纳注射体积来输送胰岛素制剂。可以利用针头、泵、注射装置、导管等来施用。

[0023] “药学上可接受的载体”表示用于将胰岛素递送到哺乳动物例如动物或人类的媒介物、悬浮剂或药学上可接受的溶剂。

[0024] “药学上可接受的”成分、赋形剂或组分是与合理的收益/风险比相称的适合用于人类和/或动物而没有过度不利的副作用(例如毒性、刺激性和过敏反应)的成分、赋形剂或组分。

[0025] “生物相容的”是指其与合理的收益/风险比相称的适合用于人类和/或动物而没有过度不利的副作用(例如毒性、刺激性和过敏反应)。

[0026] “生物利用度”是指对象从制剂吸收胰岛素达到的程度。

[0027] “系统的”是指,就胰岛素到对象的递送或施用而言,治疗剂在对象的血浆中在生物学显著水平上可检测。

[0028] “患者”、“对象”或“个体”是指哺乳动物(例如人类、灵长动物、狗、猫、牛、绵羊、猪、马、小鼠、大鼠、仓鼠、兔或豚鼠)。

[0029] 当在权利要求和/或说明书中使用“抑制”或“减少”或这些术语的任何变体包括达到预期结果的任何可测量的减少或完全抑制。

[0030] 当在权利要求和/或说明书中使用“有效的”、“治疗”或“防止”或这些术语的任何变体是指足以达到期望的、预期的或计划的结果。

[0031] 如本领域的普通技术人员所理解的,术语“约”或“大致”定义为接近于,并且在一个非限制性实施方案中该术语定义为在10%以内,优选在5%以内,更优选在1%以内,最优选在0.5%以内。另外,“基本上无水”是指以水的重量或体积计小于5%、4%、3%、2%、1%或更小。

[0032] 当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含/包括”一起使用时,单数形式可以表示“一个”,但是其也与“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0033] 术语“包含”(和其任意其它形式)、“具有”(和其任意其它形式)、“包括”(和其任意其它形式)或“含有”(和其任意其它形式)是包括性的或开放式的,并且不排除额外的、未列举的要素或方法步骤。

[0034] 对于其用途,组合物和方法可以“包含”说明书全文所公开的成分或步骤、“基本上由说明书全文所公开的成分或步骤构成”或“由说明书全文所公开的成分或步骤构成”。对于过渡形式“基本上由……构成”,在一个非限制性方面,本说明书所公开的制剂和方法的基本且新颖的特征包括所述制剂内的胰岛素的单体和/或二聚体形式的稳定性和溶解度。因此,可能影响制剂内的胰岛素的单体和/或二聚体形式的稳定性或溶解度的成分在其中权利要求使用过渡形式“主要包含”的实例中被排除在所述制剂之外。

[0035] 本发明的其它目的、特征和优点通过以下详细描述会变得明显。然而,应理解,在表明本发明的具体实施方案时,详细的描述和实施例仅以举例说明给出。另外,期望本发明

的精神和范围内的变化和修改通过该详细描述对于本领域技术人员会变得明显。

### 附图说明

[0036] 以下附图形成本说明书的一部分,并被包含以进一步示范本发明的特定方面。通过参照一个或更多个这些附图结合下文所提供的具体实施方案的详细说明,可以更好地理解本发明。

[0037] 图1:DMSO/胰岛素和水性的/胰岛素制剂的FTIR光谱。

[0038] 图2:DMSO/胰岛素和水性的/胰岛素制剂的表观分子量。

[0039] 图3:DMSO中50mg/mL的Ins-E的流体力学半径分布。水平轴为流体力学半径值的对数间隔的格子(相邻的点相差约1.3的因数)。分析涵盖从约0.01nm至约20 $\mu$ m的半径范围。在0.01nm至0.1nm处的峰已被抑制,所述峰是由光电检测器的寄生脉冲引起的假象。

[0040] 图4:DMSO中30mg/mL的Ins-E的流体力学半径分布(图形解释参见以上图3)。

[0041] 图5:DMSO中10mg/mL的Ins-E的流体力学半径分布(图形解释参见以上图3)。

[0042] 图6:DMSO中3mg/mL的Ins-E的流体力学半径分布(图形解释参见以上图3)。

[0043] 图7:缓冲剂E中10mg/mL的Ins-H<sub>2</sub>O的流体力学半径分布(图形解释参见以上图3)。

[0044] 图8:缓冲剂F中10mg/mL的Ins-H<sub>2</sub>O的流体力学半径分布(图形解释参见以上图3)。

### 具体实施方式

[0045] 如以上所讨论的,与以单体或二聚体形式配制胰岛素以用于肠胃外施用相关的难题得到充分的证明。对于这样的难题的当前解决方案也得到充分证明,并且已被接受作为制剂领域的标准惯例。例如,已经制备胰岛素类似物/改性的胰岛素以降低其与其自身的结合亲和力,希望能避免类似物的六聚体形成。这些类似物通常在水性环境中施用,这降低了其稳定性并使它们更易于在聚集发生后不可逆地聚集。另外,这种类似物昂贵,并且可能引起患者的刺激性或免疫反应。

[0046] 通过比较,本发明人已经发现一种针对上述问题的解决方案。该解决方案在于制备具有特定pH记忆的胰岛素和使所述胰岛素重构和溶解在非质子极性溶剂中。得到的可具有少量水至无水的制剂包含溶解且稳定的胰岛素单体和二聚体形式。另外,胰岛素在非质子极性溶剂中增加的溶解度导致含有大量胰岛素单体和二聚体形式的小体积制剂。特别地,该制剂既可以用于改性的胰岛素也可以用于未改性的胰岛素。在未改性胰岛素的情形中,可以避免与使用改性的/类似物胰岛素分子有关的问题,例如刺激性、免疫原性反应和成本。

[0047] 以下讨论本发明的这些和其它非限制性方面。

[0048] A. 胰岛素

[0049] 胰岛素帮助身体使用或储存其从食物中得到的血糖。在患有I型糖尿病人中,胰腺不再制造胰岛素。尽管II型糖尿病人制造胰岛素,但是他们的身体对胰岛素的反应无效或不充分,这通常被称为胰岛素抗性。

[0050] 胰岛素本身为众所周知并且被表征的肽激素。人类胰岛素的单体形式由51个氨基酸构成,其进一步表征为由二硫键连接的被称为A链和B链的两个肽链。在大多数物种中,A链由21个氨基酸构成,B链由30个氨基酸构成。虽然不同的物种之间胰岛素的氨基酸序列不

同,但是分子的某些片段是高度保持的。这些胰岛素氨基酸序列的相似性导致在物种间非常相似的胰岛素的三维构象,来自一种动物的胰岛素可以在其它物种中具有生物活性。例如,猪胰岛素已经广泛用于治疗人类患者。胰岛素的单体形式可以缔合到一起而形成二聚体。二聚体可以缔合到一起形成六聚体,这通常在锌的存在下发生。

[0051] 胰岛素的单体和二聚体形式均容易扩散到血液中。通过比较,六聚体部分由于其明显较大的尺寸而扩散较差。如上所述,这已经导致生产改性的胰岛素或胰岛素类似物(例如 Lispro®、Aspart®、Glulisine®、Detemir®、Degludec® 等),其可市够得到并且可用于本发明的情形中。另外,常规未改性的胰岛素也可以容易地在市场上买到(例如 Humulin® R、Humulin® N、Humulin® 70/30、Novolin® 等),并且也可用于本发明的情况。在特定方面,胰岛素的常规/未改性形式可以代替改性的形式使用,以降低过敏性或免疫原性成本,或降低制剂的成本。胰岛素目前由多个制造商(包括制药公司和合约制药商)生产。制药公司包括礼来(Eli Lilly and Co.)、诺和诺德(Novo Nordisk)以及赛诺菲(Sanofi)。

[0052] 合约制药商包括西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)、龙沙(Lonza)和百康(Biocon)。本说明书的实施例中所使用的胰岛素为从Sigma-Aldrich(圣路易斯,MO)购买的重组未改性人类胰岛素。

[0053] B. pH记忆

[0054] 本发明人还发现了可以用于进一步稳定制剂内溶解的胰岛素的处理步骤。该步骤包括在水溶液中使胰岛素与非挥发性缓冲剂混合,然后干燥混合物以获得干燥的胰岛素。在干燥之前,水溶液具有在1至4之间或在6至8之间的pH范围,其为在水性环境中对胰岛素稳定性最佳的pH范围。因此,在干燥了混合物之后,其产生具有在1至4之间或在6至8之间的“pH记忆”的经干燥的胰岛素,使得经干燥的胰岛素在非质子极性溶剂内溶解后仍保留该pH记忆。在进一步包含普兰林肽的一些具体实例中,胰岛素pH记忆可以为约2,普兰林肽pH记忆可以为约2。

[0055] 特别地,胰岛素的“pH记忆”是由缓冲水溶液(例如由非挥发性缓冲剂)干燥胰岛素之后所得到的电荷分布(质子化状态)。胰岛素在非质子极性溶剂中的质子化状态、以及其溶解度和稳定性受干燥之前含水的胰岛素混合物或溶液的pH影响。当胰岛素在其中酸性和碱性组分都是非挥发性的缓冲物质中进行干燥时,经干燥的胰岛素的pH记忆会约等于胰岛素混合物或溶液的pH。参见例如Enzymatic Reactions in Organic Media, Koskinen, A.M.P. 和Klibanov, A.M., eds., Springer (1996)。此外,其中胰岛素被干燥的缓冲水溶液(例如非挥发性缓冲剂)的pH可以被优化以使胰岛素产生pH记忆,该pH记忆使干燥的胰岛素随后在非质子极性溶剂中重构时有最佳稳定性、最大溶解度和最小降解的胰岛素。因此,当经干燥的胰岛素被重构到这种溶剂中时,在重构制剂中的胰岛素会保持最佳pH记忆的溶解度和稳定性特征。

[0056] 胰岛素的pH记忆可以用若干方式进行测量。在一个方法中,pH记忆通过将经干燥的胰岛素重构到非缓冲的水中,然后用pH指示剂如pH试纸或校准的pH电极来测量重构的胰岛素混合物或溶液的pH。或者,可以通过向胰岛素/非质子极性溶剂制剂加入至少20%的水,并利用pH指示剂测量该制剂的pH来检测PH记忆。参见例如Baughman和Kreevoy,

“Determination of Acidity in 80% Dimethyl Sulfoxide-20% Water,” *Journal of Physical Chemistry*, 78 (4): 421-23 (1974)。非质子极性溶剂-水溶液中的pH的测量可能需要小的校正(即根据上述的Baughman和Kreevoy不超过0.2pH单位)。

[0057] 鉴于上文所述,在本文所述的制剂中有用的非挥发性缓冲剂是指那些有助于确立最大稳定性/最小降解的pH的缓冲剂,以及那些有助于从胰岛素中除去残留水分或水含量的缓冲剂。非挥发性缓冲剂包括不会以与水在干燥/冻干时相似的方式挥发掉的那些缓冲剂。合适的非挥发性缓冲剂包括例如甘氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂等。在具体实例中,非挥发性缓冲剂为甘氨酸缓冲剂或柠檬酸盐缓冲剂。

[0058] 胰岛素与非挥发性缓冲剂的干燥可以使用喷雾干燥技术、冷冻干燥技术、冻干技术、真空离心技术等来实施。喷雾干燥技术是本领域技术人员熟知的。喷雾干燥包括步骤:经由喷嘴转盘或其它装置雾化含有一种或多种固体(例如治疗剂)的溶液,随后蒸发液滴中的溶剂。得到的粉末的性质是包括起始溶质浓度、所产生的液滴的尺寸分布和溶质移除率在内的若干变量的函数。所产生的颗粒可能包含初始粒子的聚合体,该初始粒子由晶体和/或非晶固体组成,取决于溶剂移除的速率和条件。一种用于制备药物的超细粉末的喷雾干燥方法例如在美国专利6051256号中进行描述。冷冻干燥程序在本领域中是众所周知的,并且例如在美国专利4608764号和美国专利4848094号中进行描述。喷雾-冷冻-干燥方法例如在美国专利5208998号中进行描述。其它喷雾干燥技术在美国专利6253463、6001336、5260306号和PCT国际申请W091/16882和W096/09814号中进行描述。

[0059] 冻干技术是本领域技术人员熟知的。冻干是产品在冷冻状态并真空下(真空下的冰升华)通过微热干燥进行的脱水技术。这些条件使产品稳定,使氧化和其它降解过程最小化。冷冻干燥的条件允许在低温下实施方法,因此可以保护热不稳定的产品。冷冻干燥的步骤包括预处理、冷冻、一次干燥和二次干燥。预处理包括在冷冻之前处理产品的任何方法。这可以包括浓缩产品、剂型修正(即加入组分以增加稳定性和/或改善处理)、减少高蒸气压溶剂或增加表面积。预处理的方法包括:冷冻浓缩、溶液相浓缩和特别地配制以保持产品外观或为反应性产品提供冻干保护,并且例如在美国专利6,199,297号中所描述。“标准的”冻干条件例如美国专利5,031,336号和“Freeze Drying of Pharmaceuticals”(DeLuca, Patrick P., *J. Vac. Sci. Technol.*, 14卷,第1期,1977年一月/二月)和“The Lyophilization of Pharmaceuticals: A Literature Review”(Williams, N.A. and G.P. Polli, *Journal of Parenteral Science and Technology*, 38卷,第2期,1984年三月/四月)中所描述。

[0060] 在特定方面,冻干循环可以部分地在胰岛素的玻璃化转变温度( $T_g$ )之上进行,以引起质量的塌缩从而形成含有残留水分的致密结块。在其它实施方案中,冻干循环在胰岛素的玻璃化转变温度之下实施,以避免塌缩从而获得胰岛素颗粒的完全干燥。

[0061] C. 非质子极性溶剂

[0062] 在获得具有其选定的pH记忆的经干燥的胰岛素之后,经干燥的胰岛素然后可以被重构并溶解到非质子极性溶剂中。非质子极性溶剂包括缺乏酸性氢的那些溶剂。该特征有助于保持经干燥的胰岛素的pH记忆。非质子极性溶剂的非限制性实例包括二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙酸乙酯、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基乙酰胺(DMA)、碳酸亚丙酯及其混合物。这些溶剂中的每一种都是众所周知的,并且可从各种来源商购得到。

[0063] 如实例中所示的,溶解的胰岛素导致稳定的胰岛素单体和二聚体形式,这可以导致超快或快速作用的胰岛素产品。另外,如上所述,不希望受理论束缚,据认为溶解的胰岛素在非质子极性溶剂中是“亚稳的”。据认为该亚稳定性来源于胰岛素的pH记忆和胰岛素在非质子极性溶剂内的溶解度的结合。

#### [0064] D. 减少胰岛素聚集的成分

[0065] 可以在制剂中加入附加成分以进一步降低胰岛素的单体和/或二聚体形式聚集的可能性。在用药之前(例如在储存过程中)或用药之后(例如在用药之后并且在吸收到对象的血流中之前),可以用这些成分减少制剂内的聚集。这类可以使用的成分包括脲、盐酸胍、氨基酸、糖、多元醇、聚合物、酸、表面活性剂或其混合物。这样的成分可以从各种来源商购获得。

#### [0066] E. 制剂的水含量

[0067] 由于使用相对大量的非质子极性溶剂,本发明的制剂可以具有低水分或水含量。这可以通过降低制剂内胰岛素的单体和二聚体聚集的可能性来提供所述单体和二聚体形式的额外稳定性。例如,本发明的制剂可以具有以制剂的重量或体积计20%、19%、18%、17%、16%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05%、0.025%、0.01%至0%的水分或水含量。然而,在一些实例中,水还可以用作共溶剂,例如当本发明的制剂包含胰岛素和普兰林肽时。

#### [0068] F. 胰岛素/普兰林肽共制剂

[0069] 糊精,一种通常响应于葡萄糖摄入而与胰岛素一起分泌的 $\beta$ -细胞激素,在1型糖尿病患者中也完全不足。糊精表现出多个葡萄糖调节作用,这些作用是对胰岛素餐后葡萄糖调节作用的补充。天然的人类糊精由于其多个理化性质而不适合用于临床或药用,这些性质包括溶解度差、自聚集性以及形成淀粉样纤维和淀粉样斑块。

[0070] 普兰林肽为通过选择性地用脯氨酸取代Ala-25、Ser-28和Ser-29研制出的一种人类糊精的类似物。其解决了人类糊精的不理想的物理化学性质,而保留了其重要的代谢作用。普兰林肽普遍地可从各种商业来源(例如来自Amylin Pharmaceuticals的Symlin®)获得。

[0071] 普兰林肽通常经由除了胰岛素之外的单独皮下注射来施用。这种用法已被一些患者的亚群体所接受,但是采取额外的注射对已经每天多次注射胰岛素的患者造成了明显的负担。另外,一些患者可能无意地或有意地在注射前将普兰林肽和胰岛素混合到相同的注射器中,从而引发有害或不期望的事件。

[0072] 普兰林肽和胰岛素分开施用的原因之一是这些药物在它们的缓冲体系中有冲突,使混合的制剂难以相容。例如,几种胰岛素和胰岛素类似物具有在5至6范围内的等电点,而在大约7的pH进行配制。普兰林肽具有 $>10.5$ 的等电点,在低pH下是最佳稳定的,并且一般在大约4的pH进行配制。普兰林肽和胰岛素制剂在不同的pH和不同缓冲能力条件下的相互作用通常导致可溶的胰岛素组分沉淀或结晶的胰岛素组分溶解。普兰林肽和短效及长效胰岛素制剂的体外研究发现,当不同量的胰岛素与固定量的普兰林肽混合时胰岛素溶解度有很大变化。

[0073] 本发明解决由共制剂造成的这些问题。例如,普兰林肽可以在缓冲体系中干燥,使得其具有在1至5之间,或2、3或4,或更特别地约2的pH记忆。胰岛素可以在相同或单独的缓

冲体系中干燥,使得其具有约1至4、1至3或大约2,或者6至8或约7的pH记忆。然后,干燥的普兰林肽和胰岛素可以在相同的非质子极性溶剂内重构和溶解,并在相同制剂内维持其各自的溶解度和稳定性特征。因此,仅需要单个制剂来向对象施用普兰林肽和胰岛素两者。这种共制剂会降低对象对更接近地模拟餐后血糖水平升高的自然生理反应的治疗的抵触。在共制剂的一些具体实例中,胰岛素pH记忆可以为约2,普兰林肽pH记忆可以为约2。

[0074] 除了普兰林肽之外,也可以在本发明的情况下使用其它糊精激动剂。这样的激动剂可以是重组的或从天然源中纯化的。糊精激动剂可以是人类或非人类的。糊精激动剂还可以是糊精类似物,其可以基于人类糊精的氨基酸序列,但是具有一个或更多个氨基酸差异,或是化学改性的糊精或糊精类似物。糊精激动剂的剂量取决于其生物利用度和待治疗的患者。“人类糊精”包括由胰腺分泌的人类肽激素,无论是从天然源分离的,通过合成肽化学制备的,还是通过基因改变的微生物制备的。“糊精类似物”为变异的糊精,其不同于由胰腺分泌的糊精,但是仍可用于人体以用于发挥与天然糊精相同的作用。

#### [0075] G. 剂量

[0076] 任何合适剂量的胰岛素、普兰林肽或两者的组合可以利用本发明的制剂来使用。当然,用药剂量会根据已知因素改变,例如:特定的药物、盐或其组合的药效动力学特性;对象的年龄、健康状况或体重;症状的性质和程度;治疗剂和患者的代谢特性,同期治疗的种类;治疗的频率;或预期效果。通常,制剂中可含有约0.5mg/mL至约100mg/mL的胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素中胰岛素含量为约3mg/mL至约100mg/mL、3mg/mL至约10mg/mL、10mg/mL至约50mg/mL、或约50mg/mL至约100mg/mL。在特定方面,制剂内胰岛素的量在约3mg/mL至约10mg/mL的范围,这可导致大部分胰岛素以单体形式存在(参见实施例中的数据)。在其它实例中,制剂内胰岛素的量在约10mg/mL至约50mg/mL的范围,这导致大部分的胰岛素以二聚体形式存在(参见实施例中的数据)。在一些实施方案中,普兰林肽以0.1mg/mL至10mg/mL或0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL或9mg/mL或根据需要的量存在于制剂中。另外,对本领域的技术人员而言明显的是,用药剂量依据所使用的药物和治疗的疾病、失调或病情的不同而变化,制剂中药物的浓度会根据药物溶解度、剂量和施用方法而变化。

#### [0077] H. 额外成分/药物赋形剂

[0078] 本发明的制剂可以包含附加成分/药物赋形剂,以进一步开发具有期望的触觉性能、粘度范围的配方,或者进一步保护胰岛素或普兰林肽。例如,制剂可以进一步包含抗氧化剂(其非限制性实例包括抗坏血酸、半胱氨酸、蛋氨酸、硫代甘油、硫代硫酸钠、亚硫酸盐、BHT、BHA、抗坏血酸棕榈酸酯、没食子酸丙酯或维生素E或其任意组合)、螯合剂(其非限制性实例包括EDTA、EGTA、酒石酸及其盐、甘油和柠檬酸及其盐);和/或防腐剂(其非限制性实例包括烷基醇、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯及其混合物)中的任何一种、任意组合或全部。另外,本发明的制剂还可以包含非水质子溶剂(其非限制性实例包括聚乙二醇(PEG)、丙二醇(PG)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、甲氧基丙二醇(MPEG)、甘油、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)及其混合物)。

#### [0079] I. 试剂盒/容器

[0080] 由于在本发明的特定方面使用,本发明还涉及试剂盒。例如,本发明的制剂可以容

纳在试剂盒内。试剂盒可以包括容器。在一个方面,例如,制剂可以包含在已准备好用于对象的肠胃外施用而无需重构或稀释制剂的容器内。也就是说,待使用的制剂可以储存在容器中并在需要时立即使用。储存容器可以是注射器、笔式注射装置、自动注射器装置或泵。合适的笔式/自动注射器装置包括但不限于由Becton-Dickenson、Swedish Healthcare Limited (SHL Group)、YpsoMed Ag等制造的那些笔式/自动注射装置。合适的泵装置包括但不限于由Tandem Diabetes Care, Inc.、Delsys Pharmaceuticals等制造的那些泵装置。

[0081] 或者,本发明的试剂盒可以包括多个容器或容器内的多个隔室。每一容器或多个隔室可以用于单独储存例如生物相容的非水溶剂和小分子药物。于是,当需要时,溶剂和药物可以混合到一起,并立即使用或根据需求储存一段时间。

[0082] J. 制备制剂的方法

[0083] 本发明的制剂可以通过使用以下步骤来制备。这些步骤用于制备本说明书的实施例中的制剂。

[0084] 1. 通过将胰岛素粉末(例如重组的人类胰岛素, Sigma-Aldrich, 圣路易斯, MO)以10mg/mL的胰岛素浓度溶解到期望的水性缓冲剂(包括特定的缓冲物质、浓度和pH;例如柠檬酸盐, pH2.0)中来制备胰岛素水溶液。

[0085] 2. 普兰林肽(例如AmbioPharm, Inc., Beech Island, SC和C S Bio, Inc., Menlo Park, CA, 其用于本说明书的实施例)可以用相似方法制备,不同的是普兰林肽可以以2mg/mL的浓度溶解于水性缓冲剂中。

[0086] 3a. 根据下表1中或与其相似的冻干循环,将胰岛素或普兰林肽溶液分装到干净的HPLC小瓶或冻干瓶中进行冻干。

[0087] 表1

[0088]

步骤	温度条件	速率/持续时间	真空(毫托)
加样	5°C	1 小时	N/A
冷冻降温	-50°C	1°C/分钟	N/A
持续冷冻	-50°C	2 小时	N/A
逐渐升温	-15°C	1°C/分钟	N/A
加热	-15°C	1 小时	N/A
一期干燥	-15°C	24 小时	100
升温至二期干燥	25°C	1°C/分钟	100
二期干燥	25°C	8 小时	100
冻干结束	25°C		100

[0089] 3b. 或者,将胰岛素或普兰林肽水溶液分装到微量离心管并在真空和微热(25至30°C)条件下离心干燥。

[0090] 4. 将选定pH记忆的干燥胰岛素或普兰林肽粉末通过缓慢地移取至所需浓度或特定缓冲体系和pH允许的浓度来溶解于DMSO。

[0091] 5. 所得溶液可通过目测评估其澄清度,和/或使用630nm处的可见光谱分析其光散



射,所得溶液在各种后续应用中使用。

#### [0092] 实施例

[0093] 本发明会通过具体的实施例更加详细地描述。以下实施例是为了举例说明的目的提供的,而无意于以任何方式限制本发明。本领域技术人员会容易地识别出可以变化或改变以产生基本上相同的结果的各种非关键性参数。

#### [0094] 实施例1

[0095] 该实施例提供关于如何制备胰岛素/DMSO制剂的信息,其中胰岛素具有约2的pH记忆。还提供作为比较的胰岛素/H<sub>2</sub>O制剂,并将其用于傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和动态光散射 (DLS) 分析 (以下在实施例2和3中分别讨论)。应注意,本说明书实施例中所使用的胰岛素为从Sigma-Aldrich (圣路易斯,MO) 购买的重组未改性人类胰岛素。

[0096] 胰岛素/缓冲剂A/DMSO:重组的人类胰岛素 (Sigma-Aldrich, 圣路易斯,MO) 以10mg/mL的浓度溶解于缓冲剂A (即10mM柠檬酸盐+1mM EDTA, pH2.0), 以0.25mL等份分装至HPLC小瓶中,并根据以上在“制备制剂的方法”部分中步骤1至5所列出的程序进行冻干。每个瓶中经冻干的胰岛素都具有2.0的pH记忆,并用100 $\mu$ L的DMSO重构至25mg/mL的浓度 (根据目视检查胰岛素溶解于DMSO中)。然后,该母液的等份试液用缓冲剂A进一步稀释以产生期望的柠檬酸盐缓冲的胰岛素/DMSO/H<sub>2</sub>O溶液 (例如在DMSO和缓冲剂A中12.5mg/mL和5mg/mL的胰岛素)。这些制剂被称为“Ins-A/DMSO”或是指其稀释液。

[0097] 胰岛素/缓冲剂A/H<sub>2</sub>O:将胰岛素以10mg/mL的浓度溶解于蒸馏的去离子水中,并以0.25mL等份进行冻干。胰岛素来源和冻干程序与上述相同。小瓶用250 $\mu$ L的缓冲剂A (即H<sub>2</sub>O+10mM柠檬酸盐+1mM EDTA, pH2.0) 进行重构,得到缓冲溶液A中10mg/mL的胰岛素。然后,该母液的小份用缓冲剂A进一步稀释,以产生期望的胰岛素/缓冲剂A溶液 (例如在缓冲剂A中5mg/mL的胰岛素)。通过目测检查胰岛素溶解于缓冲剂A。这些制剂被称为“Ins-A/H<sub>2</sub>O”。

[0098] 胰岛素/缓冲剂E/DMSO:胰岛素以10mg/mL的浓度溶解于缓冲剂E (即H<sub>2</sub>O+10mM柠檬酸盐+1mM EDTA+10mM NaCl, pH2.0), 并以0.5mL等份进行冻干。胰岛素的来源和冻干程序与上述相同。每个瓶中经冻干的胰岛素具有2.0的pH记忆,并用100 $\mu$ L的DMSO重构到50mg/mL的浓度。通过目测检查胰岛素溶解于DMSO。然后,该母液的等份试液用DMSO进一步稀释,以产生期望的胰岛素/DMSO溶液 (例如在DMSO中30mg/mL、25mg/mL、10mg/mL、5mg/mL和3mg/mL的胰岛素)。这些制剂被称为“Ins-E/DMSO”。

[0099] 胰岛素/缓冲剂E和F/H<sub>2</sub>O:将胰岛素以10mg/mL的浓度溶解于蒸馏的去离子水中,并以0.5mL等份进行冻干。胰岛素的来源和冻干程序与上述相同。一个小瓶用500 $\mu$ L的缓冲剂E进行重构,由此产生缓冲剂E溶液中10mg/mL的胰岛素。另一小瓶用500 $\mu$ L的缓冲剂F (即H<sub>2</sub>O+10mM磷酸盐-柠檬酸盐+1mM EDTA+10mM NaCl, pH7.0) 进行重构,从而产生缓冲剂F溶液中10mg/mL的胰岛素。通过目测检查胰岛素均溶解在缓冲剂E和F溶液中。这些样品分别被称为“Ins-E/H<sub>2</sub>O”和“Ins-F/H<sub>2</sub>O”。

#### [0100] 实施例2

[0101] 该实施例提供显示DMSO对胰岛素构象的影响的FTIR数据。BioTools Inc. (Jupiter, 美国佛罗里达) 进行FTIR分析,并提供相应的数据 (参见下文)。

[0102] 用于FTIR分析的材料和方法:制备以下制剂用于FTIR分析:

[0103] 制剂1 (F1):以1份缓冲剂A稀释到12.5mg/mL的Ins-A/DMSO

[0104] 制剂2 (F2) :以缓冲剂A稀释到5mg/mL的Ins-A/H<sub>2</sub>O

[0105] 制剂3 (F3) :以缓冲剂A重构至10mg/mL的Ins-A/H<sub>2</sub>O

[0106] 制剂4 (F4) :25mg/mL的Ins-A/DMSO

[0107] 制剂5 (F5) :以4份缓冲剂A稀释到5mg/mL的Ins-A/DMSO

[0108] 在配有DTGS检测器的PROTA FTIR光谱仪 (BioTools, Inc) 上以4cm<sup>-1</sup>的分辨率和20分钟的收集时间来收集关于每一样品和缓冲剂的FTIR数据。样品按所述方法溶解,并且对于基于水的样品放置在具有CaF<sub>2</sub>窗的6um的BioCell中,基于DMSO的样品放置在75微米的具CaF<sub>2</sub>窗的BioCell中。用PROTA软件套装进行所有的光谱分析 (缓冲剂扣除和结构解析)。

[0109] 结果:图1示出了构象敏感的酰胺I区的FTIR光谱。这些数据证实胰岛素未在DMSO中不可逆地展开,这是因为胰岛素分布在所测试的制剂1至5中保持相对稳定。特别地,制剂3显示出指示混合 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠蛋白质的典型胰岛素光谱。制剂4显示出向高频区移动的同时保持其分布。这可能是DMSO溶剂的较强氢键特性或构象变化的结果。制剂5基本上与胰岛素的水性光谱相同。图1中的这些数据证实胰岛素未在DMSO中不可逆地展开。

[0110] 实施例3

[0111] 该实施例提供DLS分析以证实与对照样品相比胰岛素在DMSO中的缔合状态 (即单体形式、二聚体形式、六聚体形式)。Alliance Protein Laboratories (Thousand Oaks, 美国加利福尼亚) 执行DLS分析,并提供相应的数据 (参见下文)。应注意,由于进行DLS分析需要用到NaCl,因而使用缓冲剂E和缓冲剂F体系。

[0112] 用于DLS分析的材料和方法:制备以下制剂用于DLS分析:

[0113] 制剂6 (F6) :50mg/mL的Ins-E/DMSO

[0114] 制剂7 (F7) :30mg/mL的Ins-E/DMSO

[0115] 制剂8 (F8) :10mg/mL的Ins-E/DMSO

[0116] 制剂9 (F9) :3mg/mL的Ins-E/DMSO

[0117] 制剂10 (F10) :10mg/mL的Ins-E/H<sub>2</sub>O

[0118] 制剂11 (F11) :10mg/mL的Ins-F/H<sub>2</sub>O

[0119] 在DLS (也称为准弹性光散射或光子相关光谱) 中,测量散射光随时间的波动。这些波动与分子的布朗运动有关,因而可以用于测量扩散系数。扩散系数通常通过Stokes-Einstein关系式转化为流体力学 (Stokes) 半径R<sub>h</sub>:

$$[0120] \quad R_h = k_B T / 6\pi\eta D$$

[0121] 其中k<sub>B</sub>为玻耳兹曼常数,T为绝对温度, $\eta$ 为溶剂粘度,D为扩散系数。

[0122] 在常温25°C下,用Protein Solutions (现在Wyatt Technology) DynaPro MS/X仪器,使用12 $\mu$ L的石英散射池收集数据。在装入样品池之前,将样品在微量离心机 (Fisher model235A) 中离心10分钟以除去灰尘和大颗粒。一般地,记录25个十秒数据积累,并将其平均以改善信噪比。得到的数据利用由制造商提供的Dynamics版本6.12.0.3软件进行分析。平均 (z-平均) 尺寸的计算基于累积矩法。尺寸分布使用Dynals分析方法来计算。重量分数用Raleigh球体模型来估算。仪器校准是绝对必要的,基于时间和距离 (其中距离通过光源的波长来测量) 的单位。然而,该仪器每年使用标定过的胶乳球粒径标准物 (直径21 $\pm$ 1.5nm,来自Thermo Scientific的产品3020A批次35266) 来校准。DMSO的粘度指数确定为1.991cp和1.4768。

[0123] 总体结果:用动态光散射(DLS)来检测DMSO中胰岛素的聚集状态。单体胰岛素具有大约6kDa的真实分子量。因此,二聚体胰岛素会具有12kDa的真实分子量,六聚体胰岛素具有36kDa的真实分子量。图2总结了在制备的DMSO和水溶液(即制剂6至10)中测量的胰岛素的表观分子量(MW)。pH7.0且浓度为10mg/ml的水性制剂(制剂10)中胰岛素的表观分子量为53kDa。在这种高浓度下,溶液可能是不理想的,由于分子间作用导致表观分子大于真实分子量。无论如何,测量的表观分子量表明胰岛素处于六聚体状态。

[0124] 关于胰岛素/DMSO制剂,在10mg/ml(制剂7),表观分子量为16kDa,大约为10mg/ml的水性胰岛素(制剂10)分子量的三分之一,表明DMSO中的胰岛素在该浓度下缔合为二聚体。对于高达50mg/ml(制剂8至9)的浓度的情况同样如此,这是因为观测到的表观分子量的变化与递增的浓度之间近似线性的关系可能是该技术中常见的已占体积效应的假象。然而,3mg/ml(制剂6)的表观分子量减小到13kDa偏离了该趋势,表明该浓度下出现了可逆地解离为单体。

[0125] 这些DLS研究表明,在相关使用浓度的范围中,DMSO中INS-2E的最大多聚体状态为二聚体,而在该浓度范围的低值端,存在单体-二聚体平衡状态。这些发现与在水性胰岛素制剂中相反,在所述水性胰岛素制剂中六聚体占主导——甚至在不存在锌的情况下——单体不稳定并快速纤维化。基于目前胰岛素缔合和吸收的动力学模型,预计一种不含六聚体胰岛素的胰岛素制剂会使其吸收动力学比目前仍含有大量六聚体胰岛素的速效胰岛素(例如Lispro®、Aspart®等)更快。总之,这些物理化学研究说明使用非水溶剂来开发超速效胰岛素制剂的方法比水性方法更有可能成功。在包含速效制剂的水溶液中,单体胰岛素不稳定而六聚体形式占主导,但在DMSO中,更快速吸收的胰岛素单体/二聚体是热力学优选的,即使在相对高的浓度下也是如此。另外,这些数据(包括DLS和FTIR数据)说明看起来由DMSO引起的任何构象变化在重构到水介质中之后都是可逆的。

[0126] 制剂6(50mg/mL的Ins-E/DMSO)的具体结果:关于DMSO中50mg/mL的INS-E的尺寸分布(散射强度相对于流体力学半径的柱状图)示于图3中。主峰(按重量计)为第一峰,其具有2.12nm的平均半径,占总散射强度的34.7%。基于水性球状蛋白质标准物,该半径相当于约20kDa的分子量。除了主峰之外,还检测到较大半径的三个峰,平均半径为110nm、2.29 $\mu$ m和9.85 $\mu$ m。虽然这三个其它峰构成总散射强度的约2/3,但是它们实际上占非常小的重量分数,如下表2中所估计的。不幸地,对于大于1 $\mu$ m的物质不能做出有意义的重量分数估计,这是因为(1)来自这类大颗粒的散射非常依赖于颗粒的具体形状(由于内部反射),和(2)几乎所有的散射光都被向前发射,此处仅观察到呈90°角的微少部分。所有或部分这些其它物质可能是由于污染物或除胰岛素聚集体之外的不完全溶解的缓冲剂组分引起的。

[0127] 表2\*

[0128] (DMSO中50MG/ML的INS-E的汇总)

[0129]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	2.12	20 kDa	34.7	99.970
2	110	200 MDa	54.5	0.030
3	2290	250 GDa	5.6	**
4	9850	7.4 TDa	5.2	**

[0130] \*z-平均半径24.5nm;平均强度182kcant/s。

[0131] \*\*因为这样大的物质的重量分数不能可靠地估计,所以该峰不包括在该计算中。

[0132] 制剂7 (30mg/mL的Ins-E/DMSO) 的具体结果:关于DMSO中30mg/mL的INS-E所获得的尺寸分布示于图4中。在该浓度下,主峰已经移动到2.02nm的稍小半径(估计质量17kDa)。特别地,在2.29 $\mu$ m和9.85 $\mu$ m处没再检测到物质,强烈表明那些是现已溶解的缓冲剂组分。100nm附近的物质的相对强度也已大幅下降。在该浓度下,在17.7nm处检测到新的物质。因为该物质仅占总散射光的1.9%,所以该物质在50mg/mL下的样品中可能以相同水平存在,但是由于其在强光(来自100nm和更大物质的强散射)中丢失而未检测到。来自DLS的原始数据(自相关函数)具有有限的动态范围,这表示占总散射光小于约1%的物质通常低于检测限。表3中提供关于制剂7的这些数据的汇总。

[0133] 表3\*

[0134] (DMSO中30MG/ML的INS-E的汇总)

[0135]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	2.02	17 kDa	76.7	99.9932
2	17.7	2.8 MDa	1.9	0.0037
3	102	170 MDa	21.4	0.0031

[0136] \*z-平均半径2.12nm;平均强度77.9kcant/s。

[0137] 制剂8 (10mg/mL的Ins-E/DMSO) 的具体结果:DMSO中10mg/mL的尺寸分布示于图5中。稀释已经将主峰进一步向下移动到1.94nm(估计质量16kDa)。在该浓度下,未检测到17.7nm处的峰,100nm附近的物质的相对强度进一步下降。5.45 $\mu$ m处还存在少量大颗粒(但是通过离心移除这类物质有时是不完全的)。表4提供了关于制剂8的数据的汇总:

[0138] 表4\*

[0139] (DMSO中10MG/ML的INS-E的汇总)

[0140]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	1.94	16 kDa	87.1	99.9975
2	115	220 kDa	12.2	0.0025
3	5450	1.9 TDa	0.7	**

[0141] \*z-平均半径1.07nm;平均强度43.1kcnt/s。

[0142] \*\*因为这样大的物质的重量分数不能可靠地估计,所以该峰不包括在该计算中。

[0143] 制剂9 (3mg/mL的Ins-E/DMSO) 的具体结果:DMSO中3mg/mL的尺寸分布示于图6中。在该浓度下,主峰降至1.79nm处(估计质量13kDa)。在该浓度下,检测到6.34nm处的新峰,其可能是少量的胰岛素聚集体(可能由冻干产生)。在该样品中看到的60.8nm处的峰可能是与在较高浓度下于100至110nm处测量的相同的物质——这种明显迁移可能由于在该浓度下较低的信噪比引起的,或者可能为分辨6.34nm处的新峰的结果。表5提供了关于制剂9的数据的汇总。

[0144] 表5\*

[0145] (DMSO中3MG/ML的INS-E的汇总)

[0146]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	1.79	13 kDa	84.7	99.9393
2	6.34	250 kDa	2.2	0.060
3	60.8	50 MDa	13.1	0.0009

[0147] \*z-平均半径0.24nm;平均强度31.4kcnt/s。

[0148] 制剂10 (Ins-E/H<sub>2</sub>O) 的具体结果:关于缓冲剂E (pH2.0) 中Ins-H<sub>2</sub>O的尺寸分布示于图7中。主峰出现在3.08nm的半径处。该半径对应于47kDa的估计质量,表明样品在该低pH下仍主要为六聚体(或更大)。应注意,在10mg/mL的浓度下,溶液非理想(“分子拥挤”)效应可能导致一些尺寸偏差,但偏差是增高还是降低取决于是静电效应还是已占体积效应占主导地位。还检测到27nm和165nm处的痕量较大物质,但是这些是胰岛素聚集体还是颗粒污染物尚不清楚。表6提供了关于制剂10的数据的汇总。

[0149] 表6\*

[0150] (缓冲剂E中10MG/ML的INS-H<sub>2</sub>O的汇总)

[0151]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	3.08	47 kDa	67.5	99.894
2	27.0	7.5 MDa	20.5	0.053
3	165	520 MDa	12.0	0.053

[0152] \*z-平均半径4.06nm;平均强度375kcnt/s。

[0153] 制剂10 (Ins-F/H<sub>2</sub>O) 的具体结果:关于缓冲剂F (pH7.0) 中Ins-H<sub>2</sub>O的尺寸分布示于图8中。主峰出现在3.26nm的半径处。该半径对应于53kDa的估计质量。此处10mg/mL处溶液非理想效应可能再次导致一些尺寸偏差,但是在中性pH的较低电荷可能表示已占体积占主导,因而表观尺寸会稍微大于真实尺寸。还检测到35nm和238nm处的痕量较大物质。表7提供了关于制剂11的数据的汇总。

[0154] 表7\*

[0155] (缓冲剂F中10MG/ML的INS-H<sub>2</sub>O的汇总)

[0156]

峰编号	平均半径 (nm)	估计分子量	强度分数	重量分数(%)
1	3.26	53 kDa	77.2	99.9688
2	35.0	14 MDa	18.2	0.023
3	238	1.2 GDa	4.6	0.0078

[0157] \*z-平均半径3.80nm;平均强度447kcant/s。

[0158] 实施例4

[0159] 该实施例提供关于在本发明的制剂中的普兰林肽和胰岛素/普兰林肽共制剂的数据。

[0160] DMSO和DMSO-水共溶剂中的普兰林肽溶解度:在pH2.0的10nM柠檬酸盐或pH4.0的10nM柠檬酸盐中以2mg/mL的浓度来制备普兰林肽溶液,每种都具有或没有2mg/mL海藻糖。溶液在25℃至30℃下真空离心干燥大约3.5小时,或如上所述冻干。

[0161] 具有2.0pH记忆的经干燥的柠檬酸盐缓冲的普兰林肽(含或不海藻糖)通过几分钟的间歇缓慢移取以20mg/mL的浓度(所测最高浓度)完全溶解于纯DMSO。得到的溶液为可流动的,并且通过目测检查为完全透明的。

[0162] 具有4.0pH记忆的经干燥的柠檬酸盐缓冲的普兰林肽对重构到纯DMSO中2mg/mL的起始浓度稍微有点抵抗,并且实际上不溶于水。如目测所观察到的,向普兰林肽的DMSO溶液中添加6%至10%的水会改善肽类的溶解度或使其几乎完全溶解,所述普兰林肽的DMSO溶液的标示普兰林肽浓度在2mg/mL和5mg/mL之间。

[0163] 胰岛素和普兰林肽的共制剂:胰岛素和普兰林肽的共制剂的制备如下:将重组的人类胰岛素以10mg/ml的浓度溶解于pH2的10mM柠檬酸盐/1.0mM EDTA缓冲剂。将普兰林肽以2mg/ml的浓度溶解于pH2.0的10mM柠檬酸盐,添加或不添加2mg/mL的海藻糖。如上所述,该溶液以0.5-mL的小份在真空下离心干燥。胰岛素用50μL DMSO重构到100mg/mL的浓度,普兰林肽用50μLDMSO重构到20mg/mL的浓度。将等体积的肽-DMSO溶液混合以产生50mg/ml胰岛素和10mg/mL普兰林肽的混合溶液,添加或不添加10mg/mL海藻糖。溶液为可流动的,并且通过目测为完全透明的。5:1的胰岛素:普兰林肽比(w/w)是可能的代表性治疗剂量比的比例,并且在目视观察的6小时内,肽在单独的高浓度溶液中保持稳定。对于现有的制剂技术,这些肽需要单独且不相容的缓冲体系,这反过来又需要经由在身体上不同部位单独注射来使用——这是实施该有益治疗的明显障碍。

[0164] 实施例5

[0165] 这是与现有的速效胰岛素产品(例如Aspart®、Glulisine®、Lispro®)相比检测本发明制剂的生物活性、药理学和药效动力学能力的预示实施例。

[0166] 生物活性:细胞水平的胰岛素作用涉及与胰岛素受体(IR)结合、受体自身磷酸化、以胰岛素受体为底物的IR介导的磷酸化和之后的PI3激酶-Akt级联的活化。受体结合某种程度上通过胰岛素分子的缔合状态来确定,因此不仅可以是胰岛素制剂的总体生物活性的量度,还可以是肽的多聚体(单体)状态的量度。本发明制剂的生物活性可以用R&D Systems

生产的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒, 通过其在小鼠胚胎成纤维细胞中诱发 IR 磷酸化的能力来测量和比较, 所述小鼠胚胎成纤维细胞过表达 IR-B 亚型 (在胰岛素敏感组织中发现的主要形式)。因为单独的 IR 结合预测的下游信号传递未必更接近于最终的生物反应, 例如葡萄糖的调节和脂肪酸的摄取和脂解, 所以对于磷酸化 Akt 可以相似地定量细胞裂解物 (参见 Marks, A.G., 等 (2011), "Plasma distribution and signaling activities of IGF-II precursors. *Endocrinology*," 152:922-930; Denley, A., 等 (2007), "Differential activation of insulin receptor substrates (IRS)-1 and 2 by IGF-activated insulin receptors," *Mol. Cell. Biol.* 27:3569-3577; 和 Denley, A., 等 (2006), "Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C domain," *Endocrinology*, 147:1029-1036, 其全部通过引用并入)。

[0167] 药理学: 药理学研究可以使用具有皮下留置的血管通路 (VAP) 的奥曲肽灌注的清醒猪模型来进行。不患糖尿病的 Yorkshire 清醒猪模型可以基于以下来使用: (a) 与人类相似的碳水化合物生理机能, (b) 适合置入 IV 导管的大静脉, (c) 清醒模型避免了长时间麻醉的并发症 (肺不张、肺炎、插管/拔管困难), 和 (d) 一头猪可以用于多个研究。研究可以设计为在时间点 0 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、45 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟、180 分钟和 240 分钟来测试具有可接受胰岛素剂量 (例如 0.2 mg/kg) 的本发明制剂。

[0168] 药效动力学: 可以用俄勒冈健康科学大学之前验证过的分析猪血清中天然胰岛素和胰岛素类似物的方法 (参见 Mercodia Iso-Insulin ELISA, 产品编号 10-1128-01, 由瑞典的 Mercodia AB Uppsala 制造) 来分析血液样品。人类胰岛素 (例如本发明的制剂和比较的水性制剂) 以及胰岛素类似物的血液水平可以在指示的时间过程中定量, 并和比较曲线下的面积、 $C_{max}$ 、 $T_{max}$ 、早期  $1/2T_{max}$  和晚期  $1/2T_{max}$ 。主要终点可以是早期和晚期  $1/2T_{max}$  值, 其实际上比  $T_{max}$  对 PK 变化更敏感。 $T_{max}$  通常在长的平稳期出现, 其难以测量并产生误导性的结果, 而早期和晚期的值快速地上升或下降, 从而更可靠。

[0169] \*\*\*\*\*

[0170] 本说明书中所公开和要求保护的所有成分、组合物或方法可以根据本公开不需要过度实验即制成和实现。尽管本发明的成分、组合物或方法已经按照具体的实施方案进行了描述, 但是对于本领域技术人员明显的是, 可以对所述成分、组合物或方法以及在本文所描述方法的步骤或步骤的顺序中实施变化, 而不脱离本发明的概念、精神和范围。

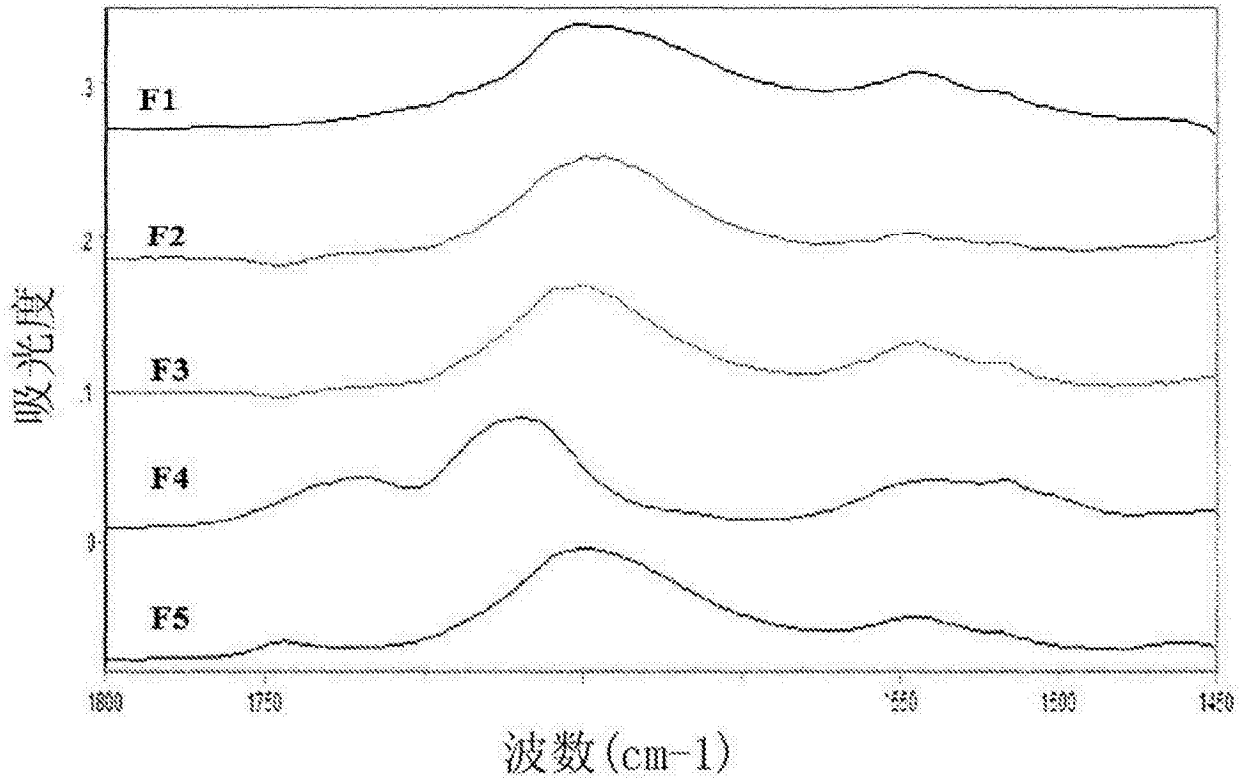


图1

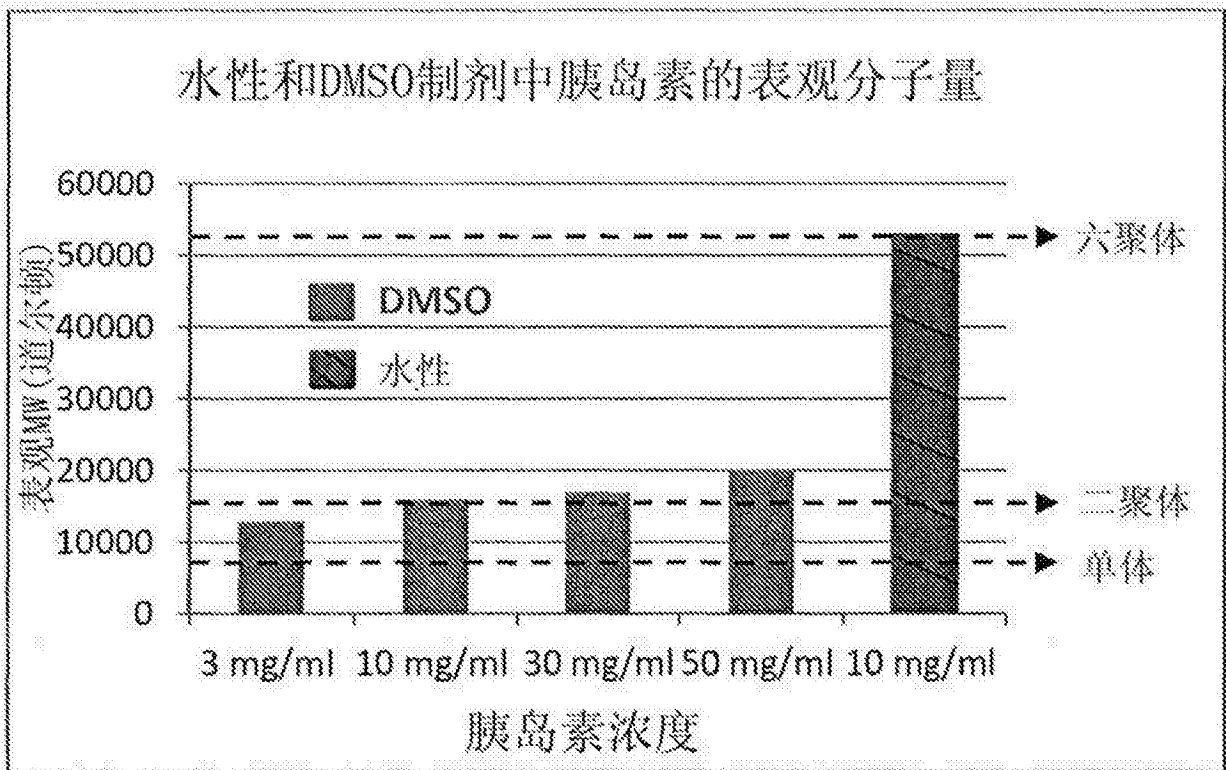


图2



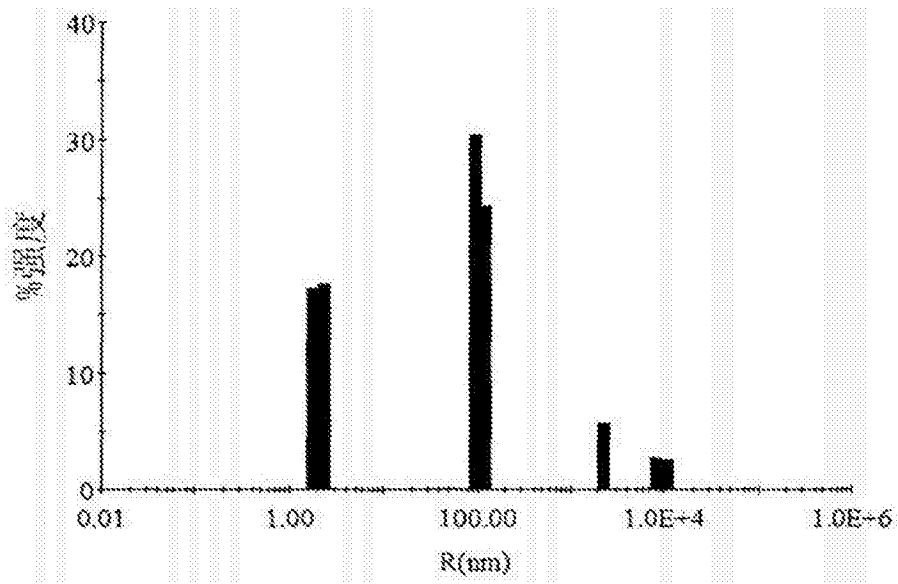


图3

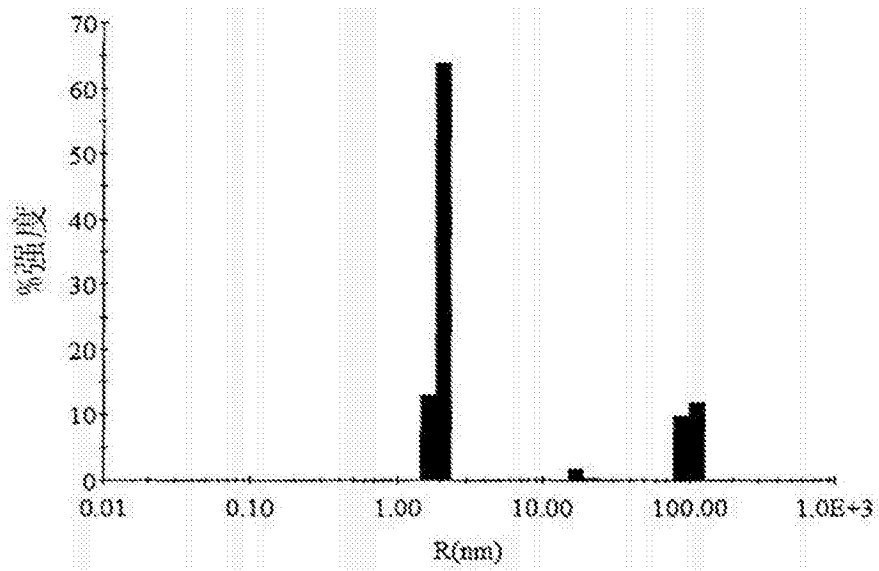


图4

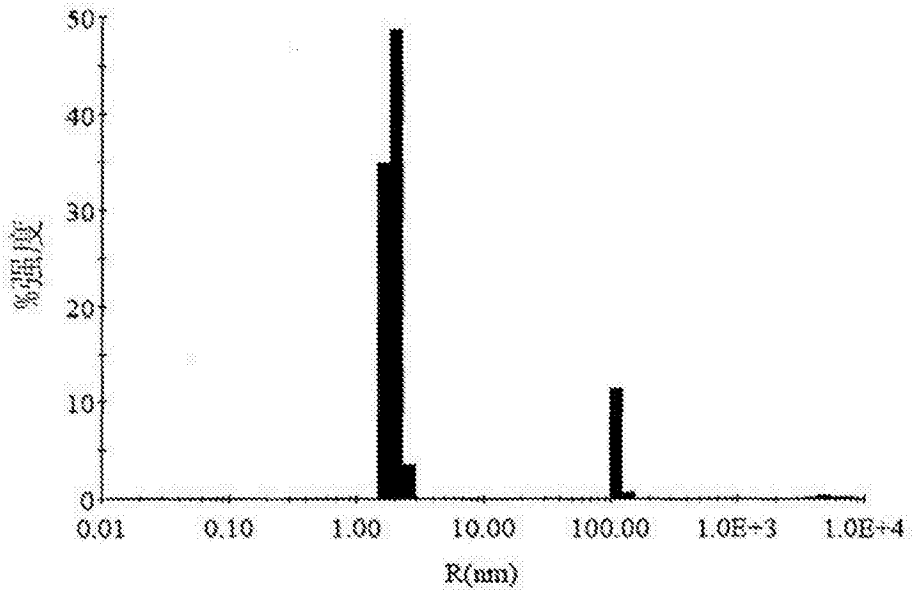


图5

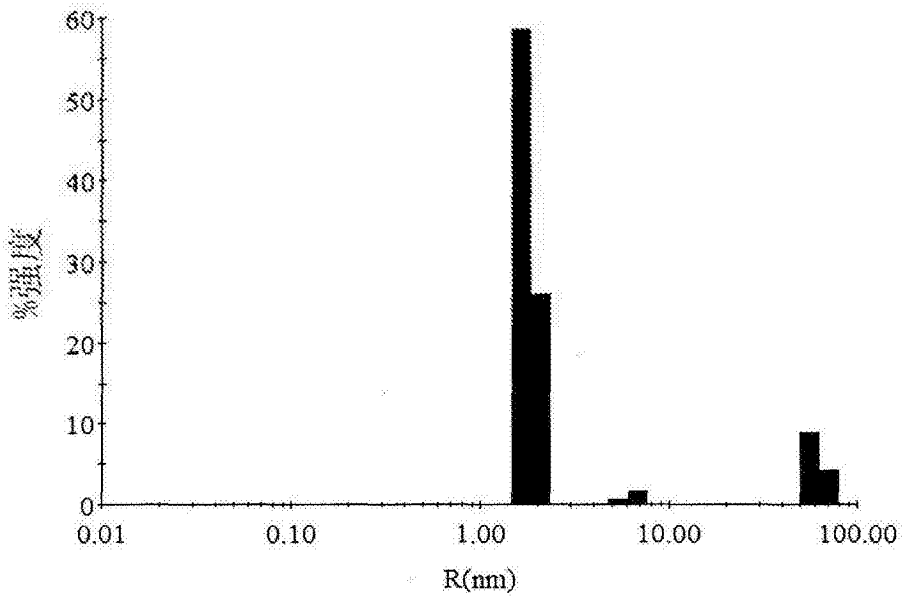


图6

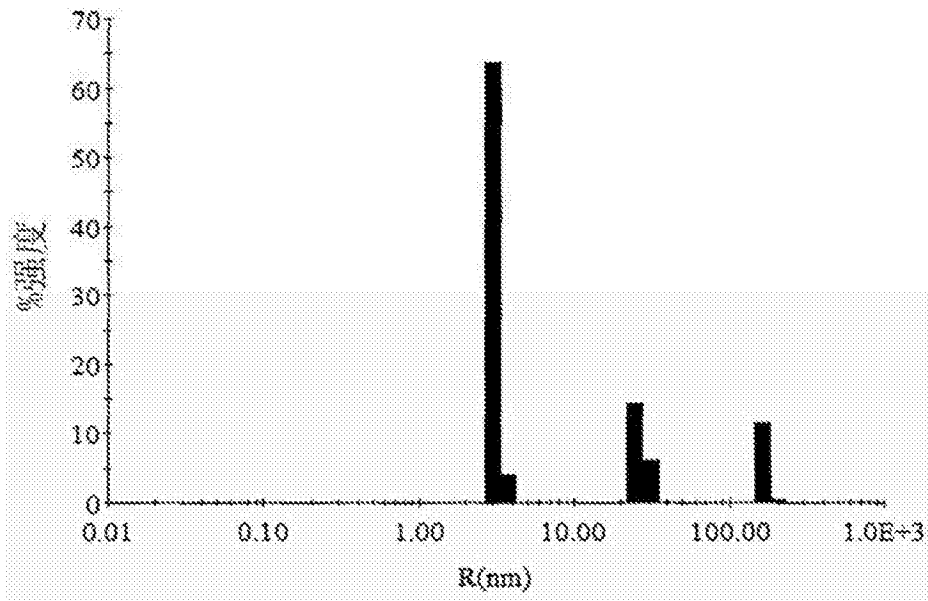


图7

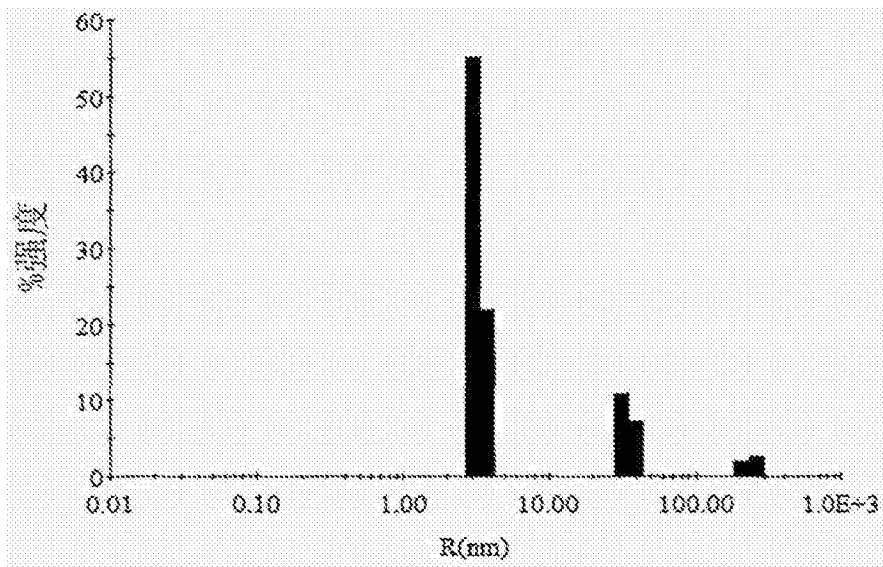


图8