

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808122.9

[51] Int. Cl.

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/16 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1293916C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 3/10 (2006.01)

[22] 申请日 1998.6.11 [21] 申请号 98808122.9

[30] 优先权

[32] 1997. 6. 13 [33] US [31] 60/053,089

[86] 国际申请 PCT/US1998/012218 1998.6.11

[87] 国际公布 WO1998/056406 英 1998.12.17

[85] 进入国家阶段日期 2000.2.12

[73] 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 M·R·德费利普斯

M·A·多滨斯 B·H·弗兰克

S·李 D·M·雷贝亨

[56] 参考文献

CN1122248A 1996.5.15 A61K38/28

US4839341A 1989.6.13 A61K37/26

CN1116629A 1996.2.14 C07K14/62

审查员 汪波莉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳

权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

稳定的胰岛素制剂

[57] 摘要

本发明提供了抗聚集作用的稳定的单体胰岛素类似物制剂，其中所述缓冲剂为 TRIS 或精氨酸。本发明的稳定制剂可用于治疗糖尿病，并且在需要长的化学和物理稳定性的治疗方案如持续输注系统中是特别有利的。

1. 用于非肠道给药的单体胰岛素类似物溶液制剂，它包括选自 TRIS 和 L-精氨酸的生理上可耐受的缓冲剂、单体胰岛素类似物、锌和酚防腐剂，其中所述单体胰岛素类似物选自 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -人胰岛素类似物和 Asp^{B28} -人胰岛素类似物，其中当在约 22℃ 下测定时该溶液的 pH 在 7 和 8 之间，并且单体胰岛素类似物在制剂中的浓度在 1.2 mg/mL 和 50 mg/mL 之间。

2. 权利要求 1 的制剂，其中所述单体胰岛素类似物为 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -人胰岛素类似物，所述缓冲剂为 TRIS。

3. 权利要求 1 的制剂，其中所述单体胰岛素类似物为 Asp^{B28} -人胰岛素类似物，所述缓冲剂为 TRIS。

4. 权利要求 2 的制剂，进一步包括等渗剂。

5. 权利要求 4 的制剂，其中所述 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -人胰岛素类似物的浓度在 1.2 mg/mL 和 50 mg/mL 之间。

6. 权利要求 5 的制剂，其中所述 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -人胰岛素类似物的浓度在 3.0 mg/mL 和 35 mg/mL 之间。

7. 权利要求 3 的制剂，进一步包括等渗剂。

8. 权利要求 7 的制剂，其中 Asp^{B28} -人胰岛素类似物的浓度在 1.2 mg/mL 和 50 mg/mL 之间。

9. 权利要求 8 的制剂，其中 Asp^{B28} -人胰岛素类似物的浓度在 3.0 mg/mL 和 35 mg/mL 之间。

10. 权利要求 6 的制剂，其中 TRIS 以大约 2 mg/mL 的浓度存在；甘油为等渗剂且以大约 16 mg/mL 的浓度存在；并且间甲酚以大约 1.76 mg/mL 的浓度存在，苯酚以大约 0.715 mg/mL 的浓度存在。

11. 权利要求 9 的制剂，其中 TRIS 以大约 2 mg/mL 的浓度存在；甘油为等渗剂且以大约 16 mg/mL 的浓度存在；并且间甲酚以大约 1.76 mg/mL 的浓度存在，苯酚以大约 0.715 mg/mL 的浓度存在。

12. 用于持续输注系统的单体胰岛素类似物的稳定的溶液制剂，主要包括等渗剂、选自 TRIS 和 L-精氨酸的缓冲剂、单体胰岛素类似物、锌和酚防腐剂，其中所述单体胰岛素类似物选自 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 Asp^{B28}-人胰岛素类似物，其中当在约 22℃ 下测定时该溶液的 pH 在 7 和 8 之间，并且单体胰岛素类似物在制剂中的浓度在 1.2 mg/mL 和 50 mg/mL 之间。

13. 权利要求 12 的制剂，其中所述胰岛素类似物为 Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素类似物。

14. 权利要求 12 的制剂，其中所述胰岛素类似物为 Asp^{B28} 人胰岛素类似物。

15. 权利要求 12 至 14 的任何一项的制剂，其中所述缓冲剂为 L-精氨酸。

16. 权利要求 1 至 11 的任何一项的制剂，其中所述制剂用于持续输注系统。

17. 如在权利要求 1 至 15 的任何一项所描述的单体胰岛素类似物溶液制剂用于制备治疗糖尿病药物的用途。

18. 如在权利要求 1 至 15 的任何一项所描述的单体胰岛素类似物溶液制剂用于制备治疗血糖过多药物的用途。

19. 制备权利要求 1 的单体胰岛素类似物溶液制剂的方法，它包括使选自 TRIS 和精氨酸的生理学上耐受的缓冲剂与单体胰岛素类似物、锌和酚防腐剂混合的步骤，其中所述单体胰岛素类似物选自 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 Asp^{B28}-人胰岛素类似物。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述单体胰岛素类似物为 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物，所述缓冲剂为 TRIS。

21. 权利要求 19 的方法，其中所述单体胰岛素类似物为 Asp^{B28}-人胰岛素类似物，所述缓冲剂为 TRIS。

稳定的胰岛素制剂

本发明处于人类医学的领域中，尤其是通过给予单体的胰岛素类似物治疗糖尿病和血糖过多。更详细地讲，本发明涉及当暴露于高机械能输入和高温下时具有优越的长期物理稳定性的单体胰岛素类似物制剂。

特别要求治疗药的稳定制剂以用于使这些药物暴露于高温度和/或机械压力下的传递装置中。例如，需要稳定的胰岛素制剂以用于持续输注系统和笔式(pen)传递装置中。在这些类型的传递装置中目前的制剂仅提供有限的稳定性。

在持续输注系统中，含有治疗药的流体通常从贮库中泵出到皮下、静脉或腹膜内贮存。将必须定期再补充的该贮库连接于患者的身体内或者植入到患者的体内。在任何一种情况中，该患者的体热和身体的运动加上管和泵中的湍流均赋予该制剂相对高的热力学能量。在减小用于再补充贮库的频率和减小贮库体积的重要性中，具有相对高浓度的治疗药的制剂是为高度有利的。

Massey 和 Sheliga, U.S. 专利第 4,839,341 号(Eli Lilly and Company,1989)讨论了涉及提供稳定的胰岛素制剂持续输注的问题，并且提出了一个贯穿 1984 年前后本领域全面的综述。因为现在需要稳定期为 1 至 3 个月的胰岛素制剂，所以目前该问题甚至更大了。

也已开发出笔型注射装置(injector pen)以帮助糖尿病患者测量并给予准确、控制剂量的胰岛素。通常，这些笔型注射装置被安置在其中密封有特定量的液体药物的药筒上。该药筒包括一个在该药筒中以这样的方式来分散该药物的柱塞和推动该柱塞的机构。笔型注射装置是可再使用的或一次性的。在再使用的笔型注射装置中，使用者可替换消耗完的药筒并且将该笔型注射装置后部的推动螺杆重

新调至到它的初始位置。在一次性的笔型注射装置中，在该药筒的内容物消耗完之后该药筒永久的截留于一次性的笔型注射装置中。在这些笔型注射装置中所使用的胰岛素制剂被暴露于物理应激并通常观察到有限的稳定性。

随着治疗糖尿病的新的单体胰岛素类似物的引入，仍然存在着在危及该制剂的内在稳定性的治疗方案中使用这些化合物的需要。称为单体胰岛素类似物的快速起效的胰岛素在本领域是熟知的，并且在1996年5月7日颁发的Chance等的U.S. 专利第5,514,646号、Brems等的 *Protein Engineering*, 6:527-533(1992)、Brange等的EPO公布第214,826号(1987年3月18日公布)和Brange等的 *Current Opinion in Structural Biology* 1: 934-940 (1991)中公开。单体胰岛素类似物比胰岛素吸收快得多，并且理想地适宜于在需要它的患者饭后控制血糖水平。由于它们从给药部位迅速吸收，它们也特别适宜于通过持续输注给药用于膳食和基础血糖水平的控制。

不幸的是，单体胰岛素类似物制剂具有聚集倾向，并且当暴露于热力学应激时变得不稳定[Bakaysa等的U.S. 专利第5,474,978号，1995年12月12日颁发]。聚集甚至可显示为高级(higher-order)胰岛素种类的沉淀。以这种方式，聚集能阻止有效治疗剂量的单体胰岛素类似物可重现性的传递，并且也可引起在给药部位的刺激或更系统性的免疫应答。抗聚集稳定的胰岛素类似物制剂是合乎需要的。

用于持续输注系统的单体胰岛素类似物的制剂必须保持可溶性和基本上不聚集的，甚至经受患者的体热和几天到几个月的运动。通过持续输注系统所需要的更高的蛋白浓度和通过持续输注系统中该制剂所暴露的热力学应激促进了不稳定性。因此，在浓的胰岛素类似物制剂的物理和化学稳定性方面的改进迫切需要使它们成功地使用在持续输注系统中。除了用于持续输注方面以外，单体胰岛素制剂稳定性的改进也是有益的。

快速起效的单体胰岛素类似物的稳定制剂是已知的。Bakaysa等

在 U.S. 专利第 5,474,978 号公开了和权利要求了包括六分子的人胰岛素类似物(六聚复合物)、两个锌原子和至少三个分子的酚防腐剂的人胰岛素类似物复合物、包括六聚复合物的制剂和通过给予该制剂来治疗糖尿病的方法。Bakaysa 等也权利要求了进一步包括等渗性药物和生理学耐受的缓冲剂的六聚复合物的制剂。

U.S. 专利第 5,474,978 号的说明书公开了单体胰岛素类似物的锌复合物可在“生理学耐受的缓冲剂”存在下配制。在制剂中使用的所提到的缓冲剂为磷酸钠、乙酸钠、枸橼酸钠和 TRIS。在 U.S. 专利第 5,474,978 号中的实施例仅描述了其中缓冲剂为磷酸钠的制剂,并且在权利要求(权利要求 5)中只要求磷酸钠缓冲剂。在 U.S. 专利第 5,474,978 号中没有一个实施例特别公开了 TRIS 缓冲剂在锌-单体胰岛素类似物复合物制剂中的用途。

也已开发得到了在使用时具有中等作用持续时间含有鱼精蛋白的单体胰岛素类似物制剂。在 U.S. 专利第 5,461,031 号中描述了单体胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂。使单体胰岛素类似物与碱性肽鱼精蛋白结晶以得到中性的鱼精蛋白悬浮液的方法为本领域已知的。此外,能够制备含有单体胰岛素类似物溶液和单体胰岛素类似物-鱼精蛋白悬浮液的两相混合物。这些混合物具有该类似物的最佳的时间-作用性质和基本活性。在 U.S. 专利第 5,461,031 号中也描述了单体胰岛素类似物的混合物。

单体胰岛素类似物-鱼精蛋白悬浮液制剂和两相混合物适合用于药筒容器中。然而,因为这些装置需要患者频繁的操作,增加了对该制剂的应激。当暴露于热力学应激时鱼精蛋白盐制剂特别具有有限的稳定性。因此,存在开发稳定的中等作用的单体胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂以及两相混合物制剂的需要。

我们现在已经发现当除了磷酸盐以外的一定的生理耐受缓冲剂使用于锌-单体胰岛素类似物复合物制剂、鱼精蛋白盐制剂或单体胰岛素类似物的两相混合物中时,这些制剂的物理稳定性与使用磷酸

盐缓冲剂时相比较是意想不到的更大。最大的优势就是我们的发现有鉴于如在 U.S. 专利第 5,474,978 号中详细实例说明的锌-单体胰岛素类似物复合物与磷酸盐缓冲剂的可溶性制剂的物理稳定性不足以使用持续输注泵系统来长期给药，由本发明提供的可溶性制剂对于长期胰岛素输注的安全使用来说是足够稳定的。我们也已发现把精氨酸加到单体胰岛素类似物的鱼精蛋白盐制剂中导致该制剂在化学和物理稳定性两者都有意想不到的改善。

因此，本发明提供了包括选自 TRIS 和精氨酸的生理学上耐受性缓冲剂、单体胰岛素类似物、锌和酚防腐剂的溶液制剂。

本发明也包括含有单体胰岛素类似物、锌、酚防腐剂、鱼精蛋白和选自 TRIS 和精氨酸的缓冲剂的胰岛素类似物制剂。

本发明进一步提供了在需要它的患者中使用该胰岛素类似物制剂以治疗糖尿病和血糖过多的方法，该方法包括给予该患者本发明的稳定制剂。

对于本发明目的而言，如这里所公开和权利要求的，下列术语和缩写具有以下含义。

术语“给药”意指将本发明的制剂引入到需要它的患者体内以治疗疾病或紊乱。

动词“聚集”的多种形式指的是使单一分子或复合物结合形成集合物的过程。集合物为包括单体胰岛素类似物的分子或复合物的聚合集群。对于本发明目的而言，该单体胰岛素类似物六聚物并非集合物而是复合物。当暴露于热力学应激时单体胰岛素类似物和它的六聚复合物具有聚集倾向。聚集能够进行到形成可见沉淀的程度。

术语“精氨酸”指的是氨基酸并且包括 D-和 L-对映体以及它们的混合物。该术语也包括它的任何药理学上可接受的盐。精氨酸也在本领域作为 1-氨基-4-胍基戊酸为人们所知道。精氨酸易于形成盐如盐酸盐。

术语“复合物”意指其中过渡金属配位于至少一种配体的化合

物。在许多其它化合物中配体包括含氮分子如蛋白、肽、氨基酸和 TRIS。单体胰岛素类似物可以为二价锌离子的配体。

术语“连续输注系统”指的是在延长的时间区间内经非肠道持续将流体给予患者或在延长的时间区间内经非肠道间歇将流体给予患者而不必在每次给予该流体时建立一个新的给药部位的装置。该流体含有一种或多种治疗药物。该装置包括在其输注前贮存流体的贮库、泵、导管或其它的借助泵使该贮库连接到给药部位并且控制该部件来调节该泵的管。可将该装置构造成植入装置，通常为皮下装置。在这样的情况下，通常使该胰岛素贮库适合于经皮再补充。显然，当植入该装置后，该贮库的内容物将为体温温度并且经受患者的身体运动。

“等渗性药物”为生理学上耐受的并赋予制剂适宜的渗透性以阻止水净流穿过与该制剂接触的细胞膜的化合物。化合物如甘油在已知浓度下通常用于这样的目的。其它的可能的等渗剂包括盐如氯化钠、葡萄糖和乳糖。

术语“单体人胰岛素类似物”、“单体胰岛素类似物”和“人胰岛素类似物”为本领域所熟知，并且通常指的是迅速起效的人胰岛素的类似物，它包括：

人胰岛素，其中在 B28 位的 Pro 被 Asp、Lys、Leu、Val 或 Ala 替代，并且其中 B29 位为 Lys 或以 Pro 取代；

AlaB26-人胰岛素

des(B28-B30)人胰岛素；和

des(B27)人胰岛素。

这样的单体胰岛素类似物在 1996 年 5 月 7 日颁发的 Chance 等 U.S. 专利第 5,514,646 号、Chance 等 U.S. 专利申请系列第 08/255,297 号、Brems 等 Protein Engineering, 6:527-533 (1992)、Brange 等 EPO 公开第 214,826 号(1987 年 3 月 18 日公开)和 Brange 等 Current Opinion in Structural Biology 1:934-940 (1991)中公开。在本制剂中使用的该单体

胰岛素类似物是适宜的交联的。适宜交联的胰岛素类似物含有三个二硫桥：一个桥在 A 链的 7 位和 B 链的 7 位之间，第二个在 A 链的第 20 位和 B 链的 19 位之间，第三个在 A 链的 6 位和 11 位之间。

这里所使用的术语“酚防腐剂”指的是氯甲酚、间-甲酚、苯酚或它们的混合物。

这里所使用的名词“稳定性”指的是单体胰岛素类似物的制剂的物理稳定性。蛋白制剂的物理不稳定性可由蛋白分子的聚集引起以形成高级聚合物或甚至形成沉淀。“稳定”的制剂为其中蛋白的聚集程度是可接受控制的、并且随时间不会不可接受地增加的制剂。当暴露于热力学应激时单体胰岛素类似物制剂具有聚集的倾向。物理稳定性可通过本领域熟知的方法来评价，包括测量样品的光表观衰减(吸收或光密度)。这样的光衰减的测量与制剂的浊度有关。该制剂中的蛋白或复合物的聚集或沉淀可产生浊度。评价物理稳定性的其它方法为本领域熟知的。

术语“治疗”指的是治疗和护理患有糖尿病或血糖过多的患者，或者其它的需要给予胰岛素以用于抵抗或减轻那些紊乱的症状和并发症的紊乱。治疗包括给予本发明制剂来预防症状或并发症的发作、减轻症状或并发症、或消除疾病、紊乱或失调。

术语“TRIS”指的是 2-氨基-2-羟基甲基-1,3-丙二醇和它的任何药理学上可接受的盐。该游离碱和盐酸盐形式为 TRIS 的两个普通形式。Tris 在本领域也已知为三羟甲基氨基甲烷、tromethamine 和三(羟甲基)氨基甲烷也为本领域所已知的。

本发明提供了相对于那些在本领域已知的技术而言具有极大增加了物理稳定性的单体胰岛素类似物的制剂，这可通过以下的数据易于为人们所意识到。

把基本上按如在这里实施例 3 所描述来制备的包括单体胰岛素类似物、Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 TRIS 的制剂进行了以下所描述的加速稳定性试验。把所制备制剂的样品放入预先清洁的 2 ml 容

量的玻璃 HPLC 自动进样管中。每一个管含有三个直径大约为 3/16 英寸的 Teflon[®]球。用该制剂样品从管中完全置换空气。密封之后，在 40 Hz 下于 12 mm 峰-峰的振幅下持续振摇(20 × g, 平均线性加速度)该小管，并且在 37°C 下提供到处于利于聚集和物理不稳定性的温度下的该制剂中的相对高水平的机械能量输入。将该管固定在摇床上以使它们的长度(即从顶部至底部)定向成为与线性加速度的方向相平行—即它们平放在摇床表面上。对于胰岛素制剂来说已经显示出在以上描述的加速条件下增加的稳定性与实用稳定性极大地相关。

使用 Shimadzu 1201 分光光度计分阶段测量样品制剂和对照制剂在 450 nm 下的光密度。以与样品制剂相同的方法制备对照制剂，但是在 4°C 下不搅拌贮存。通过从样品的光密度减去对照组的光密度来计算该样品的净光密度。在表 1 的值为平均净光密度和所给出的样品数目(n)的标准差。含有磷酸盐作为缓冲剂的样品和对照制剂(pH 7.4 ± 0.1)基本上如在实施例 4 中所描述的那样来制备。

表 1. 在 37°C 下暴露于高机械能量输入的缓冲剂和时间对于 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物的浊度(在 450 nm 下的光密度)的作用

	在 450 nm 的光密度			
	16 小时	70 小时	100 小时	500 小时
实施例 3 (TRIS)	0.02 ± 0.01 n = 5	0.03 ± 0.02 n = 5	0.01 ± 0.01 n = 5	0.04 ± 0.01 n = 4
实施例 4 (磷酸盐)	0.81 ± 0.71 n = 5	N.D.	N.D.	N.D.

N.D = 未测定

在以上描述的条件，与含有磷酸盐的在 4°C 下不搅拌贮存的对照制剂相比较在具有磷酸盐缓冲剂的制剂的浊度在 16 小时达到很高的不可接受的水平(表 1, 实施例 4)。另一方面，含有 TRIS 作为缓冲剂的制剂的光密度实际上与含有 TRIS(实施例 3)的制剂对照组 500 小时的光密度保持相同。表 1 的数据清楚地证实在 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰

小时的光密度保持相同。表 1 的数据清楚地证实在 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物制剂中以 TRIS 缓冲剂替代磷酸盐缓冲剂显著增加该制剂的稳定性。因为在加速试验中能量输入比所期待的用途期间能量输入大，因此在对于其它胰岛素制剂观察的基础上，人们相信在加速试验中在 TRIS 缓冲剂中的单体胰岛素类似物制剂的令人惊奇的和显著的稳定性将转化为比 500 小时大的多的实用稳定性。

如在实施例 3、4 和 5 中分别描述的制备含有单体胰岛素类似物、Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和作为缓冲剂的 TRIS、磷酸盐或 L-精氨酸的制剂。三个批号的 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物用于制备该制剂。对于每一个类似物批号和缓冲剂的混合物来说，六个样品经受以上所描述的稳定性试验。用四个不同的摇床给小瓶赋予机械能量。每一个摇床至少具有每一个批号的样品和缓冲剂混合物。这些制剂的稳定性通过如上所述测量样品和对照组的光密度来阶段性评价。结果示于表 2。表 2 的值为对于每一个批号和缓冲剂的六个样品的平均净光密度和标准差。

表 2. 在 37°C 下暴露于高机械能量输入的缓冲剂、类似物批号和时间对于 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物制剂的浊度(在 450 nm 下的光密度)的作用

缓冲剂	类似物 批号	在 450 nm 的光密度			
		23 小时	47 小时	87 小时	139 小时
TRIS	批号 1	0.02 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.02
	批号 2	0.00 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.02
	批号 3	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.02
精氨酸	批号 1	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	2.12 ± 1.03
	批号 2	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.08	1.80 ± 0.60
	批号 3	0.00 ± 0.02	0.03 ± 0.02	1.84 ± 0.66	N.D.
磷酸盐	批号 1	0.13 ± 0.06	2.68 ± 0.17	2.61 ± 0.11	N.D.
	批号 2	0.21 ± 0.24	2.14 ± 0.75	2.75 ± 0.14	N.D.
	批号 3	0.29 ± 0.23	2.75 ± 0.14	2.79 ± 0.11	N.D.

在以上描述的条件下，忽略不计所使用的胰岛素类似物的批号，含有磷酸盐缓冲剂的制剂的浊度在 23 小时达到很高的不可接受的水平 (表 2)。相反，忽略不计所使用的胰岛素的批号，含有 TRIS 作为缓冲剂的制剂的浊度基本上保持 139 小时不变。与含有磷酸盐的制剂相比较，含有 L-精氨酸缓冲剂的制剂证实具有更好的物理稳定性，并且它们的稳定性的持续时间有点依所使用的胰岛素类似物的批号而定。表 2 中的数据清晰地证实，与含有磷酸盐缓冲剂的制剂相比较，在 pH 7.4 含有 TRIS 缓冲剂或 L-精氨酸缓冲剂的 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物的制剂能够将稳定的抗聚集作用保持显著更长的时间。再者，因为在加速试验中能量输入比所期望的用途大，人们相信在 TRIS 和 L-精氨酸缓冲剂中的单体胰岛素类似物的制剂令人惊奇的和显著的稳定性将转化为比在加速试验观察到的更大的实用稳定性。

通过物理稳定性应激实验(PSST)评价 Lys^{B28}Pro^{B29} 悬浮制剂在形态学和外观方面对于变化的敏感性。在这个热力学方法中，把制剂封闭到无顶空的带有玻璃珠的固定体积的容器中。将该容器置于在高温 (大约 37 摄氏度)下的室中，以固定的速度(大约 30 rpm)使之旋转一定时间(大约 4 小时)，然后保持静置 24 小时。当确定到聚集(结块)已经发生时评价该容器的变化并且从试验中移去。在试验中于更长的时间内无失败以及在试验中更大数量的容器保留下来即表示为增加了物理稳定性。

试验了含有 Lys^{B28}Pro^{B29} 和 Lys^{B28}Pro^{B29}-鱼精蛋白结晶的两个不同的混合物。对于低(low)混合物而言 Lys^{B28}Pro^{B29} 与 Lys^{B28}Pro^{B29}-鱼精蛋白的比率为 25:75，而对于高(high)混合物来说两者的比率则为 75:25。如实施例 6 和 7 所描述那样来制备这些混合物。当使用 PSST 方法试验低混合物时，在 18 天后只有含有精氨酸的制剂具有剩余的容器。在 44 天后两个实验样品具有剩余的容器。在高混合物的 PSST 试验中显示出与含有精氨酸的制剂具有相似的结果，即在试验 36 天

后具有大约 50%的容器保留下来，而含有磷酸盐缓冲剂的对照制剂在 36 天后有 0 至 5%的容器保留下来。

对于用于本发明制剂的优选的单体胰岛素类似物为 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素、Asp^{B28}-人胰岛素和 Ala^{B26}-人胰岛素。

在本制剂中单体胰岛素类似物的浓度范围为 1.2 mg/mL 至 50 mg/mL。类似物浓度的优选范围为大约 3.0 mg/mL 至大约 35 mg/mL。更优选的浓度为大约 3.5 mg/mL、大约 7 mg/mL、大约 14 mg/mL、大约 17.5 mg/mL 和大约 35 mg/mL，它们分别相当于每 mL 具有大约 100 单位、大约 200 单位、大约 400 单位、大约 500 单位和大约 1000 单位的胰岛素活性的制剂。

在这些制剂中锌的浓度范围为从大约 4.5 mg/mL 至约 370 mg/mL，并且在每一个六聚物中的六个胰岛素分子的复合物中必须是至少有两个锌原子。总的锌(配合的锌加上未配合的锌)与胰岛素类似物六聚物的比率应在 2 和 4 之间。每一个胰岛素类似物六聚物复合物总的锌的比率优选为大约 3 至约 4 个原子。

对于形成本制剂中单体胰岛素类似物六聚物来说，需要最小浓度的酚防腐剂。对于某些目的来说，为了满足多次使用的制剂的 compendial 防腐有效性需要，本发明制剂中酚防腐剂的浓度可增加到需要形成本制剂中六聚物的浓度之上达到需要保持防腐有效性必要的量。对于有效的防腐作用来说，必要的防腐剂浓度依所使用的防腐剂、制剂的 pH 而定，并且无论是结合还是螯合防腐剂的物质也是存在的。一般地，必要的量能够在如 WALLHAUSER, K. DH., DEVELOP. BIOL. STANDARD. 24,第 9-28 页(Basel, S. Krager, 1974) 中找到。当配制时，用于本制剂的胰岛素类似物六聚物复合物可结合多至七个酚，尽管一般仅有六个酚结合到六聚物上。对于六聚物形成最少要求大约三个酚。当需要防腐剂的抗菌有效性时，优选的酚浓度为大约 23 mM 至 35 mM。间甲酚和苯酚或者单独或混合使用为优选的防腐剂。

该制剂可任选含有等渗剂。该制剂优选含有等渗剂并且甘油为最优的等渗剂。当使用它时，对于胰岛素制剂来说甘油的浓度在本领域已知的范围内，优选为大约 16 mg/mL。

该制剂的 pH 通过缓冲剂如 TRIS 或 L-精氨酸来控制。不应认为该缓冲剂的浓度在得到本发明的目标时起关键作用，并且应该如此以便在贮存期间提供足够的 pH 缓冲以保持 pH 值在 $\text{pH} \pm 0.1$ pH 单位之间。当在约 22°C 下测量时优选的 pH 在大约 7 至大约 8 之间。

其它添加剂如药学上可接受的助溶剂像吐温 20[®] (聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、吐温 40[®] (聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单棕榈酸酯)、吐温 80[®] (聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯)、Pluronic F68[®] (聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和 PEG(聚乙二醇)可任选加入到该制剂中。并不需要这些添加剂来得到本发明的大的优势；但是如果该制剂与塑料材料接触则可能是有用的。

本发明也包括含有可变化比例的可溶性成分的单体胰岛素类似物的鱼精蛋白盐的制剂。需要胰岛素分子的非特异性构象来使含有精氨酸的制剂稳定，尽管正常加入到胰岛素制剂中的(以上讨论的)像锌的赋形剂和防腐剂可与精氨酸一起增强稳定性。在含有鱼精蛋白的制剂中精氨酸的浓度在 1 至 100 mM 的范围内。最优选地为精氨酸的浓度在 5 至 25 mM 的范围内。能够将精氨酸作为补充剂加入到已经含有锌离子和酚防腐剂的溶液或沉淀的悬浮液中。

可借助一般技能的医师已知有效的任何途径给药。非肠道给药为优选的。非肠道给药通常理解为通过非胃肠道途径给药。给予本发明制剂的优选非肠道给药途径包括静脉、肌肉、皮下、腹膜内、动脉内、鼻、肺和颊途径。用于本发明的化合物的静脉、腹膜内、肌肉和皮下的给药途径为更优选的非肠道给药途径。本发明制剂的静脉、腹膜内和皮下给药途径为更更优选的途径。

通过一定的非肠道途径给药可包括将本发明制剂通过灭菌的注射器或其它的机械装置例如持续输注系统推动的针或者是导管引入

到患者体内。本发明提供的制剂可使用冲洗器、注射器、泵或任何其它的本领域已知的非肠道给药的装置来给药。本发明制剂也可作为在肺或鼻腔吸收的气雾剂给药。该制剂也可通过粘膜吸收给药例如在颊给药。

给药用来治疗糖尿病或血糖过多的本发明制剂的量依多种因素而定，这些因素包括(不局限于)患者的性别、体重和年龄、所治疗的紊乱或疾病的潜在原因、给药途径和生物利用度、体内给予单体胰岛素类似物的持久性、制剂和单体胰岛素类似物的效力。当间歇给药时，每次给药的量也应该考虑两个剂量之间的间隔和来自该制剂的单体胰岛素类似物的生物利用度。给予本发明制剂可以是连续的。为达到所需要的临床结果，本发明制剂的滴定剂量和输注速度或给药频率是在普通医师的技能范围之内。

用于本发明的单体胰岛素类似物能够通过多种已知的肽合成技术包括传统溶液方法、固相方法、半合成方法和重组DNA方法来制备。Chance等的1996年5月7日颁发的U.S.专利第5,514,646号公开了多种单体胰岛素类似物的制备，该专利足够详细以至于本领域技术人员能制备用于本发明的任何单体胰岛素类似物。

锌和酚防腐剂是获得复合物所必需的，所述复合物是稳定的并能迅速溶解和起效。该六聚物复合物由每一个胰岛素类似物六聚物中有两个锌离子和至少三个分子的选自氯甲酚、间甲酚、苯酚和它们的混合物的酚防腐剂组成。

通过在pH大约7至大约8下使单体胰岛素类似物溶解在含有适宜量的酚防腐剂的稀释剂中、随后加入锌使可溶的单体胰岛素类似物转化成为六聚复合物。优选地以锌盐形式来加入锌如(不局限于)乙酸锌、溴化锌、氯化锌、氟化锌、碘化锌和硫酸锌。技术人员将认识到存在许多其它的锌盐，这些盐也可用来制备作为本发明部分的单体胰岛素类似物复合物。优选地，使用乙酸锌、氧化锌或氯化锌，因为这些化合物对于工业上可接受的过程来说不增加新的化学离

子。

溶解该单体胰岛素类似物可借助通常称作“酸溶解”的方法。对于酸溶解而言，以生理学上耐受的酸(优选地为 HCl)使该水溶性溶剂的 pH 降低到大约 3.0 至 3.5 以有助于该单体类似物的溶解。其它生理学上耐受的酸包括(不局限于)乙酸、枸橼酸和硫酸。在制备本发明制剂中优选地不使用磷酸来调节 pH。然后将 pH 用生理学上耐受的碱，优选地为氢氧化钠来调节到大约 pH 7.3 至 7.5。其它生理学上耐受的碱包括(不局限于)氢氧化钾和氢氧化铵。此后，加入酚防腐剂和锌。

本发明的非肠道制剂能够使用常规的溶解和混合方法来制备。为了制备适宜的制剂，例如使在水中测量的单体胰岛素类似物的量与所要求的防腐剂、锌化合物和缓冲剂在制备六聚复合物的足量的水中混合。该制剂一般在给药之前过滤除菌。该过程的变化本领域一般技术人员可以认识到。例如，对于所使用的浓度和给药方法而言，可对加入所述成分的次序、调节 pH 的顺序，(若有的话)在制备该制剂时的温度和离子强度进行优化。

提供以下实施例和制备只是进一步阐明本发明制剂的制备。本发明的范围并不局限于以下实施例。

实施例 1

含有 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 TRIS 的 U100 可溶制剂的制备

把经计算在最终制剂中每毫升得到 100 单位胰岛素活性的量的 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物-锌结晶悬浮在含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚、16 mg/mL 甘油和氧化锌的水溶液中。该胰岛素类似物-锌的结晶含有大约 0.36% (重量)的锌。补充在稀释剂水溶液中氧化锌的浓度以使制剂的最终锌离子浓度至大约每 100 单位胰岛素活性大约为 0.025 mg。加入 10%盐酸调节 pH 到 2.8 至 3.0。在搅拌溶解该结晶后，小心加入 10%氢氧化钠溶液以调节 pH 到 7.4 至 7.7。

把经过计算的 TRIS 储备液(50 mg/mL, pH 7.4, 在室温即大约 22°C 下测定)加入到胰岛素类似物溶液中, 所述 TRIS 储备液使得在最终制剂中 TRIS 的浓度为 2 mg/mL。加水稀释该制剂到最终体积。使用 0.2 微米的滤膜对该制剂进行过滤除菌。

实施例 2

含有 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 L-精氨酸的 U100 可溶制剂的制备

按照实施例 1 中所描述的方法进行至加入缓冲剂。然后以经过计算的 L-精氨酸储备液(200 mM, pH 7.4)替代一定量的 TRIS 储备液加入胰岛素类似物溶液中, 在最终制剂中 L-精氨酸的浓度为 20 mM。加水稀释该制剂到最终体积。使用 0.2 微米的滤膜对该制剂进行过滤除菌。

实施例 3

含有 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 TRIS 的 U400 可溶制剂的制备

把经过计算的 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物-锌结晶悬浮在含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚、16 mg/mL 甘油和氧化锌的水溶液中, 使得在最终制剂中每毫升 400 单位胰岛素活性。该胰岛素类似物-锌结晶含有大约 0.36% (重量)的锌。补充在稀释剂水溶液中氧化锌的浓度使制剂的最终锌离子浓度为每 100 单位胰岛素活性大约为 0.025 mg。加入 10%盐酸调节 pH 到 2.8 至 3.0。在搅拌溶解该结晶后, 小心加入 10%氢氧化钠溶液以调节 pH 到 7.4 至 7.7。把经过计算的 TRIS 储备液(50 mg/mL, pH 7.4, 在室温下测定, 即在大约 22°C 下)加入胰岛素类似物溶液中, 使得在最终制剂中 TRIS 的浓度为 2 mg/mL。加水稀释该制剂到最终体积。使用 0.2 微米的滤膜对该制剂进行除菌过滤。

实施例 4

含有 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和磷酸盐的 U400 可溶制剂的制备

把经过计算的 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物-锌结晶悬浮在含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚、16 mg/mL 甘油和氧化锌的水溶液中，使得在最终制剂中每毫升 400 单位胰岛素活性。该胰岛素类似物-锌结晶含有大约 0.36% (重量)的锌。补充在稀释剂水溶液中氧化锌的浓度以使该制剂的最终锌离子浓度为每 100 单位胰岛素活性大约为 0.025 mg。加入 10%盐酸以调节 pH 到 2.8 至 3.0。在搅拌溶解该结晶后，小心加入 10%氢氧化钠溶液调节 pH 到 7.4 至 7.7。把经过计算的磷酸氢二钠储备液加入胰岛素类似物溶液中，使得在最终制剂中磷酸氢二钠的浓度为 3.78 mg/mL (pH 7.4 ± 0.1)。加水稀释该制剂到最终体积。使用 0.2 微米的滤膜对该制剂进行过滤除菌。

实施例 5

含有 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物和 L-精氨酸的 U400 可溶制剂的制备

按照实施例 3 中所描述的方法进行至加入缓冲剂。然后以经过计算的 L-精氨酸储备液(200 mM, pH 7.4)替代 TRIS 储备液加入到胰岛素类似物溶液中，使得在最终制剂中 L-精氨酸的浓度为 20 mM。加水稀释该制剂到最终体积。使用 0.2 微米的滤膜对该制剂进行过滤除菌。

实施例 6

含有 L-精氨酸的 U100Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素类似物高混合物制剂(75% v/v 可溶性的, 25% v/v 中性鱼精蛋白 Lys^{B28}Pro^{B29})的制备

A. 中性鱼精蛋白 Lys^{B28}Pro^{B29} 的制备

把计算量的使含有 200 U/mL 的 Lys^{B28}Pro^{B29} 锌胰岛素结晶悬浮于含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚、16 mg/mL 甘油和以盐酸酸化以使补充最终锌离子浓度到 0.025 mg/100 U 的氧化锌的水

溶液中。加入 10%盐酸调节该溶液 pH 到 2.8 至 3.0。在搅拌溶解后，加入 10%氢氧化钠溶液调节该溶液 pH 到 7.4 至 7.7。加入 pH 为 7.2 的 75.6 mg/mL 的磷酸氢二钠盐溶液，它相当于使最终制剂浓度为 3.78 mg/mL。溶解沉淀的固体并且滴定保持 pH 为 7.4，随后加水稀释该制剂到最终体积，然后过滤该溶液。

将经过计算使含有 0.6 mg /100 U 鱼精蛋白碱的固体鱼精蛋白硫酸盐溶解于含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚和 16 mg/mL 甘油的水溶液中。加入固体磷酸氢二钠盐以使该制剂浓度为 3.78 mg/mL。以 10%盐酸调节该溶液 pH 至 7.4，加水稀释至最终体积并过滤。

在 15°C 下 200 单位的 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 溶液和鱼精蛋白溶液均达到平衡。将鱼精蛋白溶液加入到 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 溶液中，并且将生成的悬浮液在 15°C、未扰乱下孵育 24 小时。

B. $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 高混合物的制备

把在实施例 2 中制备的相应于 75%终体积的含有 L-精氨酸的 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 100 单位溶液加入到计算量的 100 U/mL 的中性鱼精蛋白 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 中。在室温下搅拌该悬浮液。

实施例 7

含有 L-精氨酸的 $\text{U100Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ -人胰岛素类似物低混合物制剂(25% v/v 可溶性的, 75% v/v 中性鱼精蛋白 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$)的制备

A. 中性鱼精蛋白 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 的制备

把计算量的使含有 200 U/mL 的 $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$ 锌胰岛素结晶悬浮于含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚、16 mg/mL 甘油和以盐酸酸化以使补充最终锌离子浓度到 0.025 mg/100 U 的氧化锌的水溶液中。加入 10%盐酸调节该溶液 pH 到 2.8 至 3.0。在搅拌溶解后，加入 10%氢氧化钠溶液调节该溶液 pH 到 7.4 至 7.7。加入 pH 为 7.2 的 75.6 mg/mL 的磷酸二氢钠盐的溶液，它相当于使最终制剂浓度为

3.78 mg/mL。溶解沉淀的固体并且以滴定法保持 pH 为 7.4，随后加水稀释该制剂到最终体积并过滤该溶液。

将经过计算使得含有 0.6 mg/100 U 鱼精蛋白碱的固体鱼精蛋白硫酸盐溶解于含有 0.715 mg/mL 苯酚、1.76 mg/mL 间甲酚和 16 mg/mL 甘油的水溶液中。加入固体磷酸二氢钠盐以使该制剂浓度为 3.78 mg/mL。以 10% 盐酸调节该溶液 pH 至 7.4，加水稀释至最终体积并过滤。

在 15°C 下 U200Lys^{B28}Pro^{B29} 溶液和鱼精蛋白溶液均达到平衡。将鱼精蛋白溶液加入到 Lys^{B28}Pro^{B29} 溶液中，并且将生成的悬浮液在 15°C、未扰乱下孵育 24 小时。

B. Lys^{B28}Pro^{B29} 低混合物的制备

把在实施例 2 中制备的相应于 25% 终体积的含有 L-精氨酸的 Lys^{B28}Pro^{B29} U100 溶液加入到计算量的 100 U/mL 的中性鱼精蛋白 Lys^{B28}Pro^{B29} 中。在室温下搅拌该悬浮液。