

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/62

A61K 38/28



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95106567.X

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1145641C

[22] 申请日 1995. 6. 14 [21] 申请号 95106567. X

[30] 优先权

[32] 1994. 6. 16 [33] US [31] 260633

[71] 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·迪菲利皮斯

审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

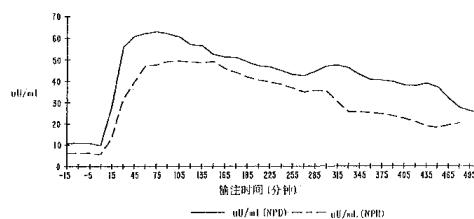
代理人 谭明胜 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称 单体胰岛素类似物制剂

[57] 摘要

本发明公开了各种非肠道用药物制剂，其含有：单体胰岛素类似物、锌、鱼精蛋白和苯酚衍生物。所述类似物制剂可以使作用时间延长。本发明还公开了胰岛素类似物鱼精蛋白制剂的制备方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种单体胰岛素类似物-鱼精蛋白复合物，其基本上由下列成分组成：其中 B28 位上的 Pro 被 Asp、Lys、Leu、Val 或 Ala 取代并且 B29 位上的 Lys 是 Lys 或 Pro 的人胰岛素、脱 (B28-B30) -人胰岛素或  
5 脱 (B27) -人胰岛素；鱼精蛋白；锌；和苯酚衍生物；条件是当胰岛素为 Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素时，鱼精蛋白的浓度低于 10%重量比。

2. 权利要求 1 的复合物，其为 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素，约 0.27-0.32mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物，约 0.35-0.9%重量比的锌，和苯酚衍生物。

10 3. 权利要求 1 的复合物，其为 Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素，约 0.27-0.35mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物，约 0.35-0.9%重量比的锌，和苯酚衍生物。

4. 权利要求 1、2 或 3 中任一权利要求的复合物，其中所述复合物为结晶。

15 5. 一种非肠道用单体胰岛素类似物-鱼精蛋白药物制剂，其含有权利要求 1 的复合物。

6. 权利要求 5 的药物制剂，其还含有约 0.2-1.5mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物，约 0.35-0.9%重量比的锌，和苯酚衍生物。

20 7. 权利要求 6 的药物制剂，其含有：Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素，约 0.27-0.32mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物和约 0.35-0.9%重量比的锌。

8. 权利要求 6 的药物制剂，其含有：Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素，约 0.27-0.35mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物和约 0.35-0.9%重量比的锌。

25 9. 权利要求 5 的药物制剂，其还含有可溶性单体胰岛素类似物。

10. 一种非肠道用药物制剂，其含有 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素，约 0.3mg 鱼精蛋白/100IU 胰岛素类似物，约 0.7%重量比的锌，约 1.7mg/mL 间甲苯酚，约 0.7mg/mL 苯酚，约 16mg/mL 甘油和约 3.78mg/mL 磷酸氢二钠。

30 11. 权利要求 10 的非肠道用药物制剂，其还含有可溶性单体胰岛素类似物。

12. 非肠道用药物制剂，含有可溶性单体胰岛素类似物和单体胰岛

素类似物-鱼精蛋白结晶的混合物；其中单体胰岛素类似物与单体胰岛素类似物-鱼精蛋白结晶的重量比约为 1:99-99:1；

所述单体胰岛素类似物是其中 B28 位上的 Pro 被 Asp、Lys、Leu、Val 或 Ala 取代并且 B29 位上的 Lys 是 Lys 或 Pro 的人胰岛素、脱  
5 (B28-B30)-人胰岛素或脱(B27)-人胰岛素；条件是当胰岛素为 Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素时，鱼精蛋白的浓度低于 10%重量比。

13. 权利要求 12 的非肠道用药物制剂，其中两种组分的重量比约为 75:25-25:75。

14. 权利要求 13 的非肠道用药物制剂，其含有：Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰  
10 岛素和 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素-鱼精蛋白结晶。

15. 权利要求 14 的非肠道用药物制剂，其中两种组分的重量比约为 50:50、75:25、或 25:75。

16. 权利要求 1 的复合物在制备治疗糖尿病的药物中的应用。

17. 权利要求 1 的复合物的制备方法，其包括：于含水溶剂中混合  
15 单体胰岛素类似物、鱼精蛋白、锌和苯酚衍生物，并形成所述复合物。

18. 一种 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素-鱼精蛋白结晶的制备方法，其包括：

于约 8-22℃的温度下，将六聚物缔合形式的 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素  
水溶液与鱼精蛋白溶液混合；

20 所述水溶液含有重量比为约 0.35-0.9%锌、Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素和苯酚衍生物，pH 约为 7.1-7.6；

所述鱼精蛋白溶液含有鱼精蛋白，pH 约为 7.1-7.6，以使得鱼精蛋白的最终浓度为约 0.27-0.32mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物。

19. 权利要求 18 的方法，其中温度为 15℃；锌的浓度为 0.7-0.9%  
25 并且鱼精蛋白的浓度为 0.3mg/100IU 单体胰岛素类似物。

20. 一种 Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素鱼精蛋白结晶的制备方法，其包括：

于约 13-17℃的温度下，将六聚物缔合形式的 Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素水溶  
液与鱼精蛋白溶液混合；

30 所述水溶液含有重量比为约 0.35-0.9%锌、Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素和苯酚衍生物，pH 约为 7.1-7.6；

所述鱼精蛋白溶液含有鱼精蛋白，pH 约为 7.1-7.6，以使得鱼精蛋白的最终浓度为约 0.27-0.32mg 鱼精蛋白/100IU 单体胰岛素类似物。

---

21. 一种权利要求 5 的非肠道用药物制剂的制备方法，其包括：将单体胰岛素类似物-鱼精蛋白结晶悬浮于可药用的稀释剂中。

## 单体胰岛素类似物制剂

## 技术领域

5 本发明涉及人胰岛素单体类似物。更具体地讲，本发明涉及各种非肠道用制剂，其含有单体胰岛素类似物，锌，鱼精蛋白和苯酚衍生物。所述制剂可以使作用时间延长。本发明还公开了胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂的制备方法。

## 背景技术

10 自从二十世纪二十年代采用胰岛素以来，对于糖尿病的治疗不断取得突飞猛进的进展。主要的进展表现在胰岛素的纯度和随着重组 DNA 技术的发展的实用性上。而且还开发出了各种具有不同时间-作用关系的制剂。现在，通常有七种市售的胰岛素制剂：普通胰岛素、中效胰岛素、珠蛋白胰岛素、中性精蛋白锌胰岛素、胰岛素锌悬液、精蛋白锌胰岛素  
15 和长效胰岛素。

尽管有一批制剂可供使用，但是，皮下注射疗法仍然不能为患者方便的调节和正常化的血糖控制。如果患者一生中血糖水平经常偏离正常的血糖水平，将会导致高血糖症或低血糖症，以及长期的并发症，所述并发症包括视网膜病、神经病、肾病以及微血管病变和大血管病变。

20 为了避免血糖浓度过高，对糖尿病患者经常要实施多次注射疗法，借此达到每一餐都摄入胰岛素的目的。但是，此种疗法并不完美。因为，市售的以最快速度作用的胰岛素在注射后达到峰值的时间过于迟缓并且达到最佳控制血糖水平的时间过长。因此，为了开发可以改变皮下吸收过程动力学的胰岛素制剂和胰岛素类似物制剂付出了巨大努力。

25 由于所有市售的胰岛素药物制剂均含有自缔合形式和主要是锌-六聚物形式的胰岛素，因此据信胰岛素在由皮下注射部位向血流中吸收时的限速步骤，是自缔合胰岛素六聚物的离解过程。最近，开发出了单体胰岛素类似物，它与人胰岛素相比不容易缔合成较高分子量的形式。自缔合作用的降低原因在于修饰了人胰岛素的氨基酸序列，主要是通过破坏二聚物的形成来降低缔合作用。参见，例如 Brems 等人，Protein  
30 Engineering, 5:6, 527-533 (1992) 和 Brange 等人，Nature, 333:679-682 (1988)。因此，单体胰岛素类似物在保持了天然

人胰岛素生物活性的同时，起效还相对更快。这些胰岛素类似物在注射后能够很快被吸收，使得注射时间和胰岛素峰值作用更接近于与饮食相对应的饭后葡萄糖水平波动。

#### 发明内容

5 单体类似物的物理特性和特点不同于胰岛素。例如，如 Brems 等人所描述的，各种单体类似物几乎不会发生或者不发生 Zn-诱导的缔合反应。而所观测到的任何缔合反应都会产生大量高分子量物质。这一点与胰岛素明显不同，其在锌存在下几乎全部是有序的六聚物构象。Brange 等人，Diabetes Care 13:923-(1990)。缔合作用的降低，将会加速类似物的作用。由于类似物具有较低的缔合倾向，因此，令人惊奇的是，  
10 单体胰岛素类似物可以配制成可提供中等作用时效的制剂。

本发明提供了一种单体胰岛素类似物制剂，当使用时，该制剂能提供中等的作用持续时间。本发明进一步还提供了一种称为胰岛素类似物-NPD 的新的鱼精蛋白结晶。本发明还提供了一种胰岛素类似物-NPD 和  
15 可溶性单体胰岛素类似物的混合物。此混合物起效快并且可以达到适中的作用延续时间。因此，所述混合物与胰岛素和单体类似物相比具有优越性。本发明进一步还提供一种胰岛素类似物-NPD 均匀结晶的制备方法。

20 本发明提供了一种胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂，其含有：单体胰岛素类似物，鱼精蛋白，锌和苯酚衍生物。

本发明进一步提供了一种结晶状胰岛素类似物-鱼精蛋白复合物。此复合物已定义为胰岛素类似物-NPD。Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素-NPD含有：Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素，约0.27-0.32mg鱼精蛋白/100U胰岛素类似物，约0.35-0.9%锌(重量比)，和苯酚衍生物。

本发明还提供了一种制备Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素-NPD的方法，其包括：

于约8-22℃的温度下，将六聚物缔合形式的Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素水溶液与鱼精蛋白溶液混合；

所述水溶液含有约0.35-0.9%锌(重量比)，Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素和苯酚衍生物，pH约为7.1-7.6；

所述鱼精蛋白溶液含有鱼精蛋白，pH约为7.1-7.6，以使得鱼精蛋白的最终浓度为约0.27-0.32mg鱼精蛋白/100U胰岛素类似物。

本发明还提供了具有作用迅速和中效作用两大特性的制剂。此制剂是单体胰岛素类似物和结晶胰岛素类似物-NPD的混合物，所述两个组分的重量比约为1-99:99-1。

最后，本发明提供了一种对患有糖尿病的患者进行治疗的方法，其包括给所述患者施用含有胰岛素类似物-鱼精蛋白结晶的药物组合物。

图1用图解说明了Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI-NPD和人胰岛素-NPH的作用情况。曲线是 $\mu\text{U/ml}$ 对输注时间的关系图。此图说明了本发明的优越性。

图2显示了本发明Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素-鱼精蛋白结晶的图谱。此图谱是在相位反差比较下放大1000倍摄取的。

图3显示了本发明Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI-鱼精蛋白结晶的图谱。此图谱是在相位反差比较下放大1000倍摄取的。

综上所述，本发明提供了各种单体胰岛素类似物的制剂。本文所用术语“单体胰岛素类似物”或“胰岛素类似物”是指作用快速的不易发生二聚合作用或自缔合作用的胰岛素类似物。单体胰岛素类似物是指人胰岛素，其中B28位上的Pro被Asp、Lys、Leu、Val或Ala取代并且B29位上的Lys是赖氨酸或脯氨酸；脱(B28-B30)；或脱(B27)。单体胰岛素类似物公开于Chance等人的欧洲专利公开383 472和Brange等人的欧洲专利公开214 826中，而上述专利并入本文中作为参考文献。

本领域的技术人员会发现可以对单体胰岛素进行其它一些改变，这些改变在本领域是完全可以接受的，这些改变包括B10位上的组氨酸残基被天冬氨酸替代；B1位上的苯丙氨酸残基被天冬氨酸替代；B30位上的苏氨酸残基被丙氨酸替代；B9位上的丝氨酸被天冬氨酸替代；B1位上氨基酸缺失；或者B1位和B2位上的氨基酸一起缺失；以及B30位上苏氨酸缺失。

本文中所有氨基酸的缩写均是在37 C. F. R. § 1.822 (b) (2)中确立的美国专利和商标局接受的氨基酸缩写。特别优选的单体胰岛素类似物是Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素(B28是Lys；B29是Pro)和Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素(B28是Asp)。

术语“单体胰岛素类似物-NPD”或“胰岛素类似物-NPD”是指制剂中结晶胰岛素类似物和鱼精蛋白的悬浮液。NPD是根据DeFelippis配制的中性鱼精蛋白制剂。此组合物可以根据本文权利要求中所述方法制备。有关的术语“胰岛素类似物NPD结晶”、“结晶胰岛素类似物-NPD”或“Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素-鱼精蛋白结晶”是指NPD制剂中胰岛素类似物-鱼精蛋白结晶。

本文所用术语“治疗”是指为了防治疾病和症状或异常而对患者进行的处置和护理，包括施用本发明化合物以预防病症或并发症出现，或者减轻病症或并发症，或者消除疾病和症状或异常。

术语“等渗剂”是指生理上耐受的并且能使制剂获得适宜的等渗压以阻止水通过细胞膜净流的试剂。为此目的，通常是以公知的浓度使用例如甘油等化合物。等渗剂的浓度是在胰岛素制剂领域中公知的浓度范围内。

术语“苯酚衍生物”是指间甲苯酚、苯酚或者优选间甲苯酚和苯酚的混合物。

术语“无碱基质”指示制剂中鱼精蛋白的量。无碱基质校正了市售的并且通常用于非肠道制剂中的鱼精蛋白盐中的水和盐的含量。优选的鱼精蛋白、硫酸鱼精蛋白是约80%的鱼精蛋白。

术语“IU”或“U”是国际单位。

术语“鱼精蛋白比率”是用如Krayenbuhl和Rosenberg, STENO MEMORIAL HOSPITAL REPORT (COPENHAGEN), 1: 60 (1946)所述的类似物复合时所需鱼精蛋白的平衡量。鱼精蛋白的比率是用本领域公知的方法和Krayenbuhl等人所述方法通过滴定法测定的。

本发明提供了一种胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂，其包括：单体胰岛素类似物，鱼精蛋白，锌和苯酚衍生物。以无碱基质为基准，鱼精蛋白的浓度优选是约0.2-1.5mg鱼精蛋白/100U胰岛素类似物。最优选，鱼精蛋白的范围是约0.27mg/100U至约0.35mg/100U。锌的浓度为约0.35-0.9%(重量)，优选，锌的浓度为约0.7%。

苯酚衍生物是间甲苯酚、苯酚或间甲苯酚和苯酚的混合物。苯酚衍生物优选是间甲苯酚和苯酚。苯酚衍生物的浓度是本领域技术人员公知

的，其浓度必须能够满足维持防腐作用，即防止微生物生长。通常，苯酚衍生物的浓度例如在1.0mg/mL-6.0mg/mL的范围内，优选的是大于2.5mg/mL，最优选的浓度是约3mg/mL。有苯酚衍生物存在这才是关键，因为，除了用作防腐剂外，它还能使所述类似物、鱼精蛋白和锌发生复合。但是，可以确信的是，对于每分子胰岛素类似物来讲只有一分子苯酚键合到结晶结构上。

优选的是，向制剂中加入等渗剂。优选的等渗剂是甘油。等渗剂的浓度例如是14mg/mL-18mg/mL，优选约16mg/mL。

制剂的pH值可以用生理上耐受的缓冲剂，优选磷酸盐缓冲剂，如磷酸二氢钠调节。其它生理上耐受的缓冲剂包括TRIS，乙酸钠或柠檬酸钠。缓冲剂的选择和浓度是本领域公知的，通常，其浓度例如是约1.5mg/mL-5.0mg/mL；优选3.8mg/mL。

本发明还提供了能使胰岛素类似物-鱼精蛋白以稳定的结晶形式存在的特定条件。这些结晶的制剂被定义为胰岛素类似物-NPD。胰岛素类似物-NPD是胰岛素类似物-NPD结晶配制成制剂的悬浮液，当使用时，能产生中等的作用持续时间。在降低单体类似物自缔合方面胰岛素类似物-NPD的活性十分令人惊奇。

图 I 说明了用单体类似物能够形成中效制剂。图 I 叙述了 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI-NPD 和人胰岛素-NPH 的作用情况。NPD 的情况与胰岛素-NPH 相似，NPD 制剂和胰岛素-NPH 制剂的作用时间几乎相同。但是，特别重要的是，与胰岛素-NPH 相比，本发明制剂起效更快并且能在较长时间内保持稳定。在单体类似物作用快速方面，这一区别更是不可预见的。

特别优选的胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂，Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素-NPD，含有：Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素，约0.27-0.32mg鱼精蛋白/100U胰

胰岛素类似物，约0.35-0.9%锌(重量比)，和苯酚衍生物，以无碱基质为标准，鱼精蛋白的浓度优选是0.3mg/100U。

本发明还提供了Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素-鱼精蛋白结晶的制备方法，其包括：

于约8-22℃的温度下，将六聚物缔合形式的Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素水溶液与鱼精蛋白溶液混合；

所述水溶液含有约0.35-0.9%锌(重量比)，Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-人胰岛素和苯酚衍生物，pH约为7.1-7.6；

所述鱼精蛋白溶液含有鱼精蛋白，pH约为7.1-7.6，以使得鱼精蛋白的最终浓度为约0.27-0.32mg鱼精蛋白/100U胰岛素类似物。

在本发明研究之初，单体胰岛素类似物缔合和形成六聚物的趋势较弱，这是公知的，但是以前在本领域中并不知道用鱼精蛋白使单体胰岛素类似物缔合以形成结晶所必需的条件。早先的研究只涉及胰岛素，Krayenbuhl 和 Rosenberg，STENO MEMORIAL HOSPITAL REPORT (COPENHAGEN)，1: 60 (1946)所讲述的胰岛素-NPH(根据Hagedorn的中性鱼精蛋白制剂)或鱼精蛋白锌胰岛素制剂的制备方法与单体胰岛素类似物的特性无关。事实上，生产人胰岛素-N<sup>TM</sup>(胰岛素-NPH)的商业方法，酸性-中性法，并不能生产出结晶的胰岛素类似物-NPD。

更重要的是，现已发现了本发明方法的参数——即结晶的温度以及胰岛素类似物、锌和苯酚衍生物的六聚物复合物的形成严格限制了稳定的Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI-NPD结晶的形成。

形成结晶的温度必须是从约8℃至约22℃，优选13℃-17℃。如果温度超出了此范围，结果会得到大部分是非晶形的胰岛素类似物-鱼精蛋白制剂。

还有一点重要的是，在形成结晶之前，胰岛素类似物被转变成六聚物形式。

当用单体缔合形式进行本方法时，结晶过程会得到非晶形产物，结晶是在5-36小时内无需搅拌的情况下形成的，通常在24小时内形成高质量的结晶。

通过将固体单体类似物悬浮于含有苯酚衍生物的稀释剂中并加入锌直至浓度达到基质重量的约0.35%至约0.9%，将可溶性单体胰岛素类似物复合形成六聚物形式。所加入的锌优选是盐的形式，锌盐的典型实例包括乙酸锌、溴化锌、氯化锌、氟化锌、碘化锌和硫酸锌。本领域的技术人员会发现有许多其它的锌盐也可以用于本发明的方法中，优选使用乙酸锌或氯化锌。

胰岛素类似物在稀释剂中的溶解可以借助公知的酸溶解的方法进行，在酸溶解中，可以用生理上耐受的酸优选HCl将pH降至约3.0-3.5以提高类似物的溶解度。其它生理上耐受的酸包括乙酸、柠檬酸和磷酸。然后再用生理上耐受的碱优选NaOH将pH调至约7.1-7.6，用于结晶化过程。其它生理上耐受的碱包括KOH和氢氧化铵。

重要的是，Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI-NPD复合物的生产过程对NaCl的浓度敏感。如果浓度超过约4mg/mL，则胰岛素类似物-NPD结晶将会变成其与非晶形产物的混合物形式。因此，优选的是，在中性pH下使单体胰岛素溶解，以避免生成盐离子。另外，可以在加入缓冲剂之前，将类似物溶解在pH酸性的稀释剂中，这样，便降低了由于pH调节而产生的盐的浓度。但是，对于六聚物或非晶形制剂的形成而言各组分的加入顺序并不是关键的。

如上所述，本发明制剂中可以加入等渗剂。等渗剂可以加入到类似物溶液、鱼精蛋白溶液或最终的胰岛素类似物-NPD制剂中。同样，生理上耐受的缓冲剂也可以加入到类似物溶液、鱼精蛋白溶液或最终的胰岛素类似物-NPD制剂中。但优选的是，在将水溶液和鱼精蛋白溶液合并之前，类似物溶液和鱼精蛋白溶液中均含有等渗剂和缓冲剂。由于NaCl会影响结晶胰岛素类似物-NPD的生成过程，因此优选用甘油作等渗剂。

本发明还提供了胰岛素类似物制剂，所述制剂包含有结晶固体状胰岛素类似物-NPD和可溶性胰岛素类似物的混合物。制备所述混合物，其中悬浮的胰岛素类似物-NPD相对于可溶性胰岛素类似物的体积比为约1:99-99:1。可溶性胰岛素类似物是溶于稀释剂水溶液中的单体胰岛素类似物，所述稀释剂水溶液包括：锌，苯酚衍生物，等渗剂和缓冲剂。所述成分在稀释剂中的浓度与上文所述相同。胰岛素类似物-NPD与可溶性胰岛素类似物的比率优选是25:75-75:25；更优选50:50。通过将各个组分混合可以容易地制得此混合物。

由于起效快并且作用时间长，本发明混合制剂特别适于治疗糖尿病。根据患者的需要、饮食和身体状况通过改变各个组分的量可以使所述混合物达到“最佳控制”。悬浮的胰岛素-类似物-NPD和可溶性胰岛素类似物的混合物也是有益的，因为它们是均相的，亦即在悬浮的结晶和可溶性胰岛素类似物之间存在着平衡交换，这是一目了然的。

本发明胰岛素类似物可以通过各种不同的已知的合成肽的方法制备，包括经典法(溶液法)、固相法、半合成法以及现代的重组DNA法。例如Chance等人在欧洲专利公开383 472和Brange等人在欧洲专利公开214 826中所描述的各种单体类似物的制备方法。

下列实施例仅用于进一步说明本发明以及胰岛素类似物的制备方法。本发明的范围不能解释为仅由下列实施例构成。

### 实施例1

#### Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI-NPD的制备

通过将含有锌的Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI结晶溶于防腐剂/缓冲剂系统中制备浓度为200IU/mL的Lys<sup>B28ProB29</sup>-人胰岛素(Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI)溶液,所述防腐剂/缓冲剂含有: 1.6mg/mL间甲苯酚、0.73mg/mL苯酚(以89%计算相当于0.65mg/mL苯酚)、16mg/mL甘油和3.78mg/mL磷酸二氢钠缓冲液。结晶中内生的锌含量可以通过加入适宜体积的酸性ZnO溶液(10mg/mL)补足,以使最终浓度达到0.025mg/100IU(0.7%)。Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI的溶解可以通过在室温下用几 $\mu$ L的5M HCl将pH降低到约3来实现。当溶液澄清后,再用几 $\mu$ L的5M NaOH将pH调到7.5。

通过将足够的固体硫酸鱼精蛋白溶于防腐剂/缓冲剂溶液中,以无碱基质计算,使最终浓度达到0.6mg/100IU来制备鱼精蛋白溶液。将此溶液的pH调至7.5并于15 $^{\circ}$ C下平衡。

将所述两种溶液用注射用水稀释至最终浓度并过滤,将Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI亚组分的5mL等分试样装到各个干净的玻璃瓶中,并将样品于15 $^{\circ}$ C水浴中培养。经过平衡适宜时间(15分钟)后,通过向Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI样品中迅速加入5mL鱼精蛋白溶液诱发沉淀。在15 $^{\circ}$ C下令结晶进行约24小时。

### 实施例2

#### Lys<sup>B28ProB29</sup>-hI-NPD的制备

除了Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI的溶解是在中性pH下进行之外，用与实施例1相同的方法进行，所进行的此方法中最终pH值应为7.4。

### 实施例3

#### Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI-NPD的制备

按实施例1相似的方法制备胰岛素类似物-NPD，只是Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI的酸溶解过程是在除磷酸二氢钠缓冲液之外的所有赋形剂存在下进行。在胰岛素类似物溶液pH值恢复到7.4后，加入固体磷酸二氢钠，磷酸二氢钠的加入使溶液变得澄清。

### 实施例4

#### 胰岛素类似物-NPD混合物制剂的制备

如下所述制备中效和快速作用的Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI的混合物制剂。如实施例3所述方法制备中效作用的悬浮液制剂并将其作为混合物中中效作用的组成部分。如实施例1所述，通过在室温下将含有锌的Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI结晶溶于稀释剂中制备另外的Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI溶液(100IU)。此溶液中Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI内生的锌含量可通过加入酸性ZnO溶液补足，以达到悬浮液部分锌的浓度(即0.025mg/100 IU(0.7%))。用10%HCl和/或NaOH溶液将pH调至7.4后，用注射用水将溶液稀释到最终浓度。该溶液是混合物的快速作用的组成部分。通过将适宜体积的中效作用和快速作用的亚组分混合达到所需的比率来制备最终混合物。按体积比计，将1份中效作用组分与1份快速作用的组分相混合制得50/50混合物。

### 实施例5

#### 离子强度对Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI鱼精蛋白结晶作用的影响

通过与鱼精蛋白混合之前向Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI部分加入NaCl来评估离子强度对结晶作用的影响。加入NaCl使得总浓度为20、30和40mM(1.2、1.8和2.3 mg/mL)。随着NaCl浓度的提高,体积粒度显示出多重性(另一个峰值在较小粒度)。随着NaCl浓度的提高体积平均粒度降低说明了非晶形产物的增多。粒度与NaCl浓度比结果如下:

[NaCl]	体积平均粒度 ( $\mu\text{m}$ )
13mM	3.9
20mM	3.5
30mM	3.3
40mM	3.2

显微镜分析表明所有样品均含有非晶形物和结晶的混合物。含有40mMNaCl的样品绝大部分是非晶形物而几乎没有结晶。

### 实施例6

#### Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>-hI-NPD和人胰岛素-NPH的动力学比较

本试验在清醒的狗模型上进行。在开始试验之前,服用三个基础样品。开始输注生长激素释放抑制因子(0.3  $\mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{min.}$ ),间隔10分钟后,皮下注射NPD或者NPH。频繁测定血浆中葡萄糖并且输注变化量的葡萄糖(20%)输注液,以维持近于正常的血糖。对所有样品进行试验并对免疫反应性胰岛素(Linco抗体)和葡萄糖进行分析。结果如图1所示。

### 实施例7

#### Asp (B28)类似物·鱼精蛋白结晶的制备

通过将冷冻干燥的Asp (B28)-hI的块状物(纯度为95%)溶于防腐剂/缓冲剂系统中制备浓度为200IU/mL (U200)的Asp (B28)亚组分,所述防腐剂/缓冲剂系统含有: 1.6mg/mL间甲苯酚、0.73mg/mL苯酚(以89%计算相当于0.65mg/mL苯酚)、16mg/mL甘油和3.78mg/mL磷酸氢二钠。用适宜体积的酸性ZnO溶液(10mg/mL)向系统中加入锌,得到的最终浓度为0.025mg/100IU。在室温中性pH下将Asp (B28)溶解,这一部分产物的最终pH值为7.4。

如实施例2所述进行结晶,测得鱼精蛋白的最终浓度为0.3mg/100U、0.35 mg/100U和0.4mg/100U。以重量/重量比为基准,这些鱼精蛋白相应的浓度分别为2.9%、9.3%和10.5%。培养温度包括5℃(只有0.3mg/100U)、15℃和22℃,在这些温度下24小时后,分析样品的结晶形成。显微镜测定的结果表明,是少量结晶和非晶形产物的混合物。

### 实施例8

#### Asp (B28)类似物·鱼精蛋白结晶的制备

除了蛋白质首先溶于无缓冲剂的稀释剂中以外,如实施例7所述进行Asp (B28)鱼精蛋白结晶。加入酸性ZnO贮液足以使样品酸化至pH2.0-2.5。溶液澄清后,用几 $\mu$ L的5N NaOH再将pH调至约7。以浓度为47.25mg/mL的浓溶液加入磷酸氢二钠,使最终浓度达到3.78mg/mL。用几 $\mu$ L的HCl将亚组分调至pH7.4。

如上述实施例所述，通过将 Asp (B28) 和鱼精蛋白组分混合诱发结晶。测得鱼精蛋白的最终浓度为 0.3mg/100U、0.35mg/100U 和 0.4mg/100U。培养温度包括 15℃ 和 22℃。在这些温度下 24 小时后，分析样品的结晶形成。显微镜测定的结果表明，是结晶和非晶形物的混合物。

### 实施例9

#### Leu (B28) Pro (B29) 类似物·鱼精蛋白结晶的制备

如实施例8所述，将物料进行酸溶解，随后用 5N NaOH 将 pH 调至 pH7.4，制备浓度为 200IU/mL (U200) 的 Leu (B28) Pro (B29) 亚组分 (纯度为 93%)。如上所述进行结晶。测得鱼精蛋白的最终浓度为 0.3mg/100U、0.35mg/100U 和 0.4mg/100U。培养温度包括 5℃、15℃ 和 22℃。在这些温度下 24 小时后，通过显微镜测定，所有样品均含有一些结晶，但主要是非晶形物。

### 实施例10

#### 脱Des (B27) hI-鱼精蛋白结晶

如实施例8所述，将物料进行酸溶解，随后用 5N NaOH 将 pH 调至 pH7.4，制备浓度为 200IU/mL (U200) 的脱 Thr (B27) 亚组分 (纯度为 97.37%)。如实施例8所述进行结晶。测得鱼精蛋白的最终浓度为 0.3mg/100U、0.35mg/100U 和 0.4mg/100U。培养温度包括 15℃ 和 22℃。在这些温度下 24 小时后，通过显微镜测定，所有样品主要是非晶形物。定性分析，观测到结晶。

### 实施例11

### 脱 (B28-B30) hI-鱼精蛋白

如实施例8所述, 将物料进行酸溶解, 随后用5N NaOH将pH调至pH7.4 制备浓度为200IU/mL (U200) 的脱 (28-30) 亚组分 (纯度为96.3%)。如上所述, 用蛋白质和鱼精蛋白组分中性/中性合并的方法进行结晶。测得鱼精蛋白的最终浓度为0.3mg/100U、0.35mg/100U和0.4mg/100U。培养温度包括15℃和22℃。在这些温度下24小时后, 通过显微镜测定, 所有样品主要是非晶形物。定性分析, 观测到结晶。结晶完好。

### 实施例12

#### Asp (B28) 类似物-鱼精蛋白

通过将16.6mg蛋白质溶于1mL含有3.2mg/mL间甲苯酚、1.3mg/mL苯酚和32mg/ml甘油的溶液中制备胰岛素Asp (B28)-人胰岛素类似物溶液。加入酸性锌贮液 (10mg/mL  $Zn^{2+}$ , 通过将0.311g氧化锌溶于5mL10%HCl中并用水稀释至25mL制备) 的14.4  $\mu$ L等分试样。溶液pH值为2.3, 该pH可使蛋白质完全溶解。加入10  $\mu$ L 10%NaOH等分试样, 调节pH至7.06。向溶液中加入100  $\mu$ L 0.28M磷酸 $\alpha$ -二钠, 溶液的pH由7.0升至pH7.27。向溶液中加入870  $\mu$ L等分试样的注射用水, 加入另外的10%HCl (1  $\mu$ L) 和NaOH (0.7  $\mu$ L), 用注射用水将溶液的最终体积调至2mL, 使最终的pH值达到7.26。使用之前将溶液经0.2  $\mu$ m (Supor Acrodisc<sup>®</sup> 13, Gelman Sciences) 过滤器过滤。

通过将硫酸鱼精蛋白溶于含有1.6mg/mL间甲苯酚、0.65mg/mL苯酚、16mg/mL甘油和14mM磷酸 $\alpha$ -二钠的溶液中制备鱼精蛋白贮液。将溶液的最终pH值调至7.3。以无碱基质为基准, 鱼精蛋白的最终浓度为

0.60mg/100U。使用前两种溶液均经过0.22 μm(Millipore Sterivex™-GV)过滤器过滤。

如表1所示，在控制温度下以1:1的比率通过与Asp(B28)-人胰岛素溶液混合实现析晶。混合物的最终条件为3.94mg/mL Asp(B28)-人胰岛素、0.0359 mg/mL (0.9%) 锌离子、1.6mg/mL间甲苯酚、0.65mg/mL苯酚、16mg/mL甘油、14mM磷酸氢二钠和0.30mg/100U鱼精蛋白，pH为7.3。具体地讲，将每份50-200 μL的Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素溶液装入玻璃瓶中，并将样品于4、8、15或23(室温)℃下平衡。在这些温度下也将两种鱼精蛋白溶液样品进行平衡。15-20分钟后，将等体积的每种鱼精蛋白溶液用吸量管加入到Asp(B28)-人胰岛素样品中。轻轻搅拌混合物，加盖并在析晶期间令其在控制温度下静置。24小时后，用显微镜检测所有样品，发现绝大部分是非晶形物。48小时后，样品含有0.30mg/100U鱼精蛋白，将其于15℃下培养，发现有大量的针状结晶和一些非晶形物。

### 实施例13

通过将10.62mg蛋白质溶于0.71mL含有3.2mg/mL间甲苯酚、1.3mg/mL苯酚和32mg/mL甘油的溶液中制备胰岛素Asp(B28)-人胰岛素类似物溶液。加入酸性锌贮液(10mg/mL Zn<sup>2+</sup>，通过将0.311g氧化锌溶于5mL 10% HCl中并用水稀释至25mL制备)的10.2 μL等分试样，溶液pH值为2.3。该pH可使蛋白质完全溶解。加入6.5 μL 10% NaOH等分试样，调节pH至7.00。向溶液中加入71 μL 0.28M磷酸氢二钠，溶液的pH由7.0升至pH7.26。向溶液中加入620 μL等分试样的注射用水，加入另外的10% HCl(0.2 μL)和NaOH(0.6 μL)，用注射用水将溶液的最终体积调至

1.42mL, 使最终的pH值达到7.42。使用之前将溶液经0.2 μm(Supor<sup>®</sup> Acrodisc<sup>®</sup> 13, Gelman Sciences)过滤器过滤。

通过将硫酸鱼精蛋白溶于含有1.6mg/mL间甲苯酚、0.65mg/mL苯酚、16mg/mL甘油和14mM磷酸氢二钠的溶液中制备鱼精蛋白溶液。将溶液的最终pH值调至7.4。以无碱基质为基准, 鱼精蛋白的最终浓度为0.60mg/100U。使用前溶液经过0.22 μm(Millipore Sterivex<sup>TM</sup>-GV)过滤器过滤。

如实施例12所述, 在控制温度为13℃、15℃、17℃和23℃下以1:1的比率通过将Asp(B28)-人胰岛素溶液与鱼精蛋白溶液混合实现析晶。结果如表1所示。混合物的最终条件为3.74mg/mL Asp(B28)-人胰岛素、0.0359mg/mL(0.9%) 锌离子、1.6mg/mL间甲苯酚、0.65mg/mL苯酚、16mg/mL甘油、14mM磷酸氢二钠和0.30mg/100U鱼精蛋白, pH为7.4。对4种不同的结晶温度进行评估。将于15℃平衡的1mL Asp<sup>B28</sup>-人胰岛素等分试样与1mL调至相同温度的鱼精蛋白溶液混合, 轻轻搅拌后, 令制剂于15℃下静置。通过将100 μL Asp(B28)-人胰岛素溶液平衡至13℃, 然后将其与100 μL调至相同温度的鱼精蛋白溶液混合制备另一个样品。最终的混合物于13℃下培养。以相似的方法制备第三个样品, 但将两个100 μL的等分试样在17℃下进行平衡、混合并然后培养。通过于室温下平衡的80 μL Asp(B28)-人胰岛素和鱼精蛋白溶液的等分试样混合制得最终溶液, 并将其于室温(23℃)下培养。24小时后, 用显微镜对所有样品进行评估, 而此后以其它时间间隔测得的结果如表1所示。

表1  
结晶条件<sup>a</sup>和显微镜显示结果

[Asp <sup>B28</sup> ] (mg/mL)	[鱼精蛋白] (mg/100U)	温度 (°C)	时间 (小时)	显微镜结果 <sup>b</sup>
3.94	0.30	15	24	非晶形
			48	结晶
			72	结晶
			96	结晶
			120	结晶
3.94	0.30	23	24	非晶形
			48	非晶形
			72	非晶形
3.74	0.30	13	24	非晶形
			40	结晶/非晶形
			48	结晶/非晶形
			69	结晶/非晶形
3.74	0.30	15	24	非晶形/结晶
			40	结晶
			48	结晶
			69	结晶
3.74	0.30	17	24	非晶形/少量结晶
			40	结晶/非晶形
			48	结晶/非晶形
			69	结晶/非晶形
3.74	0.30	23	24	非晶形
			40	非晶形/少量结晶
			48	非晶形/少量结晶
			69	非晶形/少量结晶

<sup>a</sup>所有溶液还含有0.9%锌离子、1.6mg/mL间甲苯酚、0.65mg/mL苯酚、16mg/mL甘油和14mM磷酸氢二钠，pH为7.4。

<sup>b</sup>通过显微镜放大600倍 (Nikon Optiphot 66显微镜) 和1000倍 (具有界面差比较的Zeiss Axioplan显微镜) 下评估结晶结果, 这两种显微镜均安装了照相用附件。

根据上述实施例所制备的结晶如图2和图3所示。

图 1

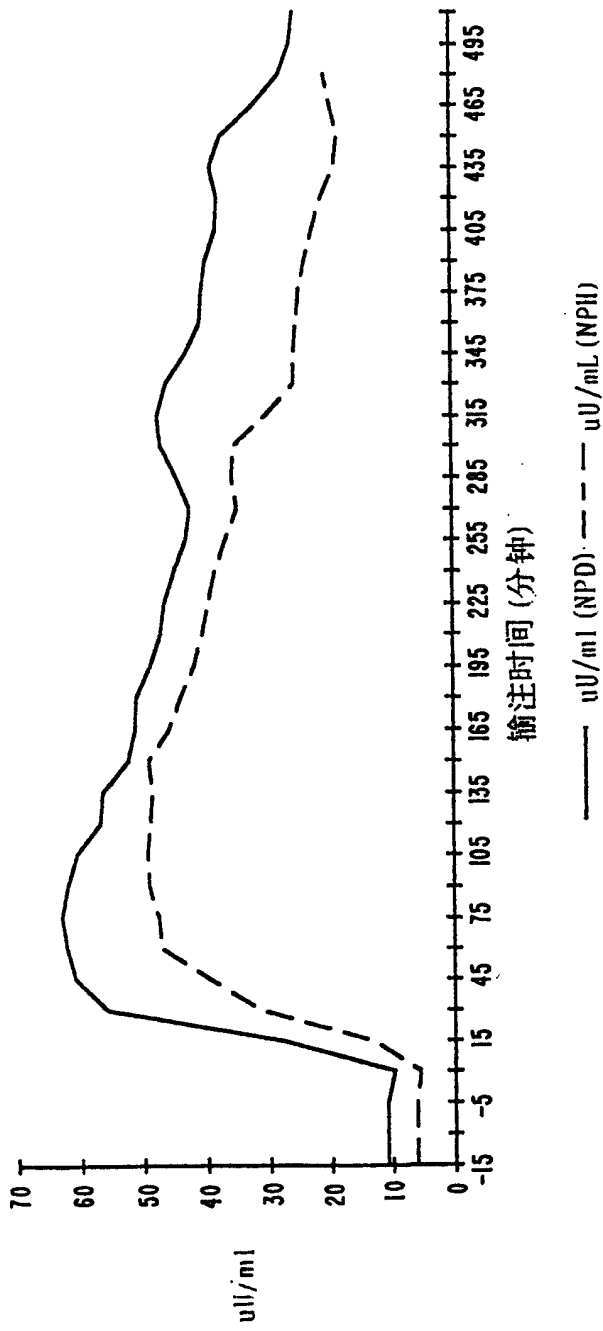


图 2

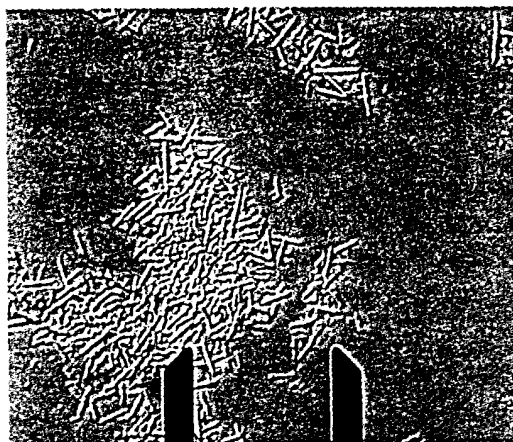


图 3

