



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103223160 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201210510430. 9

(22) 申请日 2005. 07. 19

(30) 优先权数据

60/589, 058 2004. 07. 19 US

60/619, 153 2004. 10. 15 US

60/632, 578 2004. 12. 02 US

60/655, 803 2005. 02. 24 US

60/655, 838 2005. 02. 24 US

(62) 分案原申请数据

200580031521. 2 2005. 07. 19

(73) 专利权人 比奥孔有限公司

地址 印度班加罗尔

(72) 发明人 伯勒辛加姆·拉达克里希南

迪蒂·阿加尔瓦尔 米歇尔·费罗

肯尼斯·D·詹姆斯

纳瓦迪普·B·马尔卡

马克·A·米勒 利奥·帕夫利夫

卡伦·波洛维 卡伦·普什卡什

诺希里尔·N·埃克沃瑞博

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 47/12 (2006. 01)

A61P 5/48 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5506203 A, 1996. 04. 09,

CN 1606432 A, 2005. 04. 13,

US 2003216541 A1, 2003. 11. 20,

审查员 赵天

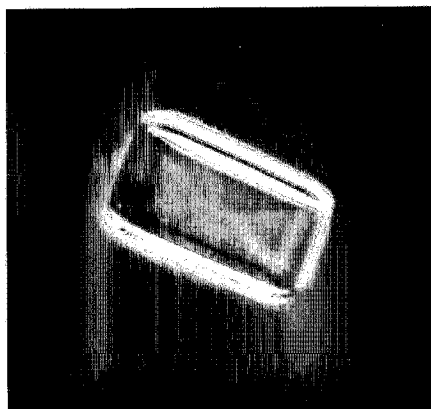
权利要求书1页 说明书92页 附图40页

(54) 发明名称

胰岛素-低聚物共轭物, 制剂及其用途

(57) 摘要

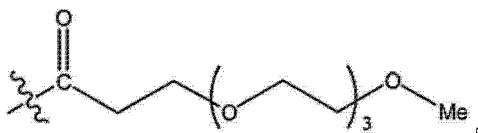
本发明涉及胰岛素-低聚物共轭物, 制剂及其用途。本发明提供包括阳离子和胰岛素化合物共轭物的配合物。所述胰岛素化合物共轭物包括结合于改性部分, 例如聚乙二醇部分的胰岛素化合物, 例如人胰岛素或其类似物。本发明还包括含有这些配合物的固体和药物组合物, 制备这些配合物的方法, 以及利用这些配合物治疗胰岛素化合物缺乏和其它疾病的方法。另外, 本发明还包括新型胰岛素化合物共轭物和用于制备新型胰岛素化合物共轭物的改性部分。本发明还包括用于给药本发明的药剂, 例如所述新型胰岛素化合物共轭物, 和/或阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的脂肪酸组合物。



1. 固体药物组合物,其被配制成用于通过摄食而口服给药的制剂,其包含:

(a) 40 至 60 重量%的脂肪酸组分,其中所述的脂肪酸组分包含饱和或不饱和的 C_{4-12} 的脂肪酸和 / 或这些脂肪酸的盐;

(b) 治疗剂,其中所述治疗剂是在 A1、B1 和 / 或 B29 处结合到如下结构的改性部分的人胰岛素,



2. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含至少一种选自以下的组分:崩解剂、稀释剂、润滑剂、流动性增强剂、压缩助剂、着色剂、防腐剂、悬浮剂、分散剂、成膜剂、调味剂、和溶出增强剂。

3. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含甜味剂。

4. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含助流剂。

5. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含粘合剂。

6. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含填充剂。

7. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含至少一种选自以下的组分:涂料、印刷墨水和糖类。

8. 权利要求 1 的药物组合物,其还包含至少一种选自以下的组分:纤维素、甘露醇和乳糖。

9. 权利要求 1 的药物组合物,其还包克劳斯卡马洛斯 (crosscarmaloses)。

10. 权利要求 1 的药物组合物,其被制成选自片剂、粉剂、硬胶胶囊或软胶胶囊的剂型。

11. 权利要求 1 的药物组合物,其被制成选自小片剂的剂型。

12. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述脂肪酸组分为癸酸和 / 或月桂酸,和 / 或癸酸和 / 或月桂酸的盐。

13. 权利要求 1 的药物组合物,其包含选自磷酸盐缓冲盐、磷酸钠、三羟甲氨基甲烷缓冲盐、柠檬酸缓冲盐和乙醇氨缓冲盐的缓冲盐。

14. 权利要求 13 的药物组合物,其包含的缓冲盐被选择以获得在吸收位点的缓冲能力保持局部 pH 为 4.8 至 9.5。

15. 权利要求 13 的药物组合物,其包含的缓冲盐被选择以获得在吸收位点的缓冲能力保持局部 pH 为 5 至 8。

16. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述的胰岛素共轭物在 B29 处结合。

17. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述脂肪酸组分为癸酸和 / 或月桂酸的盐。

18. 权利要求 1 的药物组合物,其包含选自磷酸盐缓冲盐、磷酸钠、三羟甲氨基甲烷缓冲盐、柠檬酸缓冲盐、乙醇氨缓冲盐和三乙胺缓冲盐的缓冲盐。

胰岛素 - 低聚物共轭物, 制剂及其用途

[0001] 本申请为国际申请 PCT/US2005/025644 于 2007 年 3 月 19 日进入中国国家阶段、申请号为 200580031521.2、发明名称为“胰岛素 - 低聚物共轭物, 制剂及其用途”的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求如下美国专利申请的优先权, 并将它们的全部公开内容并入本文中作为参考: 2004 年 7 月 19 日提交的 60/589,058、2004 年 10 月 15 日提交的 60/619,153、2004 年 12 月 2 日提交的 60/632,578、2005 年 2 月 24 日提交的 60/655,838 和 2005 年 2 月 24 日提交的 60/655,803。本申请还并入 Radhakrishnan 等人于 2005 年 7 月 19 日提交的如下申请作为参考: 名称为“Cation complexes of insulin compound conjugates, formulations and uses thereof”的美国专利申请 11/184,668; 名称为“Insulin-oligomer compound conjugates, formulations and uses thereof”的美国专利申请 11/184,594; 名称为“Fatty acid formulations for oral delivery of proteins and peptides, and uses thereof”的美国专利申请 11/184,528。

技术领域

[0004] 本发明涉及新型胰岛素化合物共轭物, 其中胰岛素或胰岛素类似物结合于改性部分。本发明还涉及这些胰岛素化合物共轭物的阳离子配合物, 并涉及包括这种胰岛素化合物共轭物和 / 或改性部分的药物制剂。

背景技术

[0005] 锌配合的胰岛素化合物是可商购的, 例如商品名为 HUMULIN® 和 HUMALOG®。锌配合的胰岛素通常以六聚体形式存在。

[0006] 对于锌在酰化胰岛素的结晶中的应用已有很多方法被描述。例如, 2001 年 11 月 15 日公开的 Mark L. Brader 等人的, 名称为“Stabilized acylated insulin formulations”的美国专利申请 20010041786 描述了用于非肠道递送的具有水溶液的制剂, 特别是作为可注射制剂, 其中 pH 为 7.1 至 7.6, 其包含脂肪酸酰化的胰岛素或脂肪酸酰化的胰岛素类似物, 并用锌和优选的酚类化合物稳定。在 2002 年 9 月 17 日公告的 Schaffer 等人的美国专利 6,451,970, 其已转让给 Novo Nordisk A/S, 名称为“Peptide derivatives”, 该专利描述了胰岛素化合物和胰岛素类似物的衍生物, 其中 B 链的 N 端氨基和 / 或在位置 B28、B29 或 B30 的 Lys 的 ε-氨基用具有 12 至 22 个碳原子的长链烃基团酰化, 及其锌配合物。

[0007] 鱼精蛋白和酚类化合物已经被描述用于酰化胰岛素的结晶。名称均为“Insoluble insulin compositions”的 Brader 的美国专利 6,268,335(2001 年 7 月 31 日)和 6,465,426(2002 年 10 月 10 日)描述了由酰化胰岛素鱼精蛋白配合物、六聚体稳定化的酚类化合物和二价金属阳离子组成的不溶组合物。

[0008] 已有的方法被特别改进用于天然胰岛素化合物或胰岛素化合物类似物的结晶, 或者用于使酰化的胰岛素化合物相对于未酰化的胰岛素化合物具有增加的亲脂性。在本领域

中需要包括衍生的胰岛素化合物,而不是酰化胰岛素,例如亲水和 / 或两亲胰岛素化合物衍生物的药学可接受的配合物,以及需要稳定化的非酰化亲脂性胰岛素化合物类似物。本领域还需要相对于已有共轭物而言具有增加生物利用度的或具有其它改进的药物品质的新型蛋白质共轭物。本领域需要使蛋白质和蛋白质共轭物方便口服递送的新型制剂。最后,需要改进蛋白质如胰岛素化合物的口服生物利用度的组合方法,该方法将作为固体提供的改进的口服蛋白质共轭物并入到改进的制剂中以使蛋白质的口服递送的益处最大化。

发明内容

[0009] 一般而言,本发明提供包含具有结合于改性部分的胰岛素化合物的胰岛素化合物共轭物和阳离子的配合物,其中所述胰岛素化合物共轭物与所述阳离子配位。所述的胰岛素化合物可以,例如为天然胰岛素或胰岛素类似物。胰岛素化合物的例子包括人胰岛素、赖脯胰岛素、des30 胰岛素、天然胰岛素原、人工胰岛素原等。所述的阳离子组分可以,例如为选自 Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 和 Mg^{++} 的二价金属阳离子。

[0010] 所述的改性部分可被选择以使得所述的胰岛素化合物共轭物的溶解度大于、小于或等于相应的未共轭的胰岛素化合物的溶解度。优先选择所述的改性部分以使得在 pH 为约 7.4 的水溶液中,所述胰岛素化合物共轭物的溶解度比相应的未共轭的胰岛素化合物的溶解度至少大 1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5 或 15 倍。优先选择所述的改性部分以使得胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 下的水溶解度超过约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、50g/L、75g/L、100g/L、125g/L 或 150g/L。另外,选择所述的改性部分以使得所述的胰岛素化合物共轭物的溶解度等于或大于相应的未共轭的胰岛素化合物的溶解度,并且所述的胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低。在另一方面,选择所述的改性部分以使得所述的胰岛素化合物共轭物的溶解度等于或大于相应的未共轭的胰岛素化合物的溶解度;所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低,并且所述配合物的水溶解度大于胰岛素化合物的水溶解度。在又一方面,与相应的母体胰岛素化合物相比,所述胰岛素化合物共轭物的相对亲脂性(k_{rel})为 1 或小于 1。

[0011] 本发明还提供具有结合于改性部分的胰岛素化合物的新型胰岛素化合物共轭物。例如,本发明提供结合于具有下式的改性部分的胰岛素化合物:

[0012] $-X-R^1-Y-PAG-Z-R^2$ (式 VI)

[0013] 其中,

[0014] X、Y 和 Z 为独立选择的连接基团,并且各自任选存在,并且 X,当存在时,通过共价键结合于胰岛素化合物,

[0015] R^1 或 R^2 至少一个是存在的,并且为低级烷基并可任选包括羰基,

[0016] R^2 为封端基团,例如 $-CH_3$ 、 $-H$ 、甲苯磺酸酯或活性基团,和

[0017] PAG 为合并一个或多个亚烷基二醇部分(即氧基亚烷基部分)的直链或支链的碳链,并任选合并一个或多个选自 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-N-$ 和 $-C(O)-$ 的另外的部分,和

[0018] 其中所述的改性部分具有最大数量的 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个重原子。

[0019] 在本发明的实施方案中,任何一个或多个 X、Y 和 Z 可以不存在。另外,当存在时,

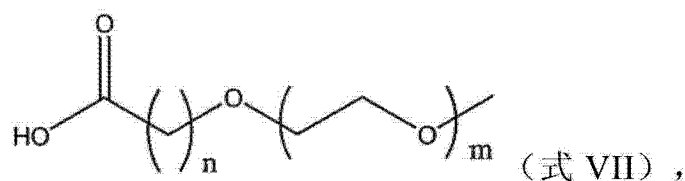
X、Y 和 / 或 Z 可独立地选自 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C-$ 和 $-N-$ 。在一个实施方案中, Z 为 $-C(O)-$ 。在另一个实施方案中, Z 不存在。

[0020] 在一些实施方案中, R^1 为低级烷基, 并且 R^2 不存在。在另一些实施方案中, R^2 为低级烷基, 并且 R^1 不存在。

[0021] 在另一个实施方案中, 所述的改性部分可包括直链或支链的、取代的碳链部分, 该碳链部分具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19、19、20、21、22、23、24 或 25 个选自 $-C-$ 、 $-C-$ 、 $-O-$ 、 $=O$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 、 $-Si-$ 原子的主链。所述的重原子将典型地包括一个或多个碳原子和一个或多个选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N-$ 和 $=O$ 的非碳重原子。所述的碳原子和非碳重原子典型地以每个非碳重原子至少 1 个碳原子, 优选每个非碳重原子至少 2 个碳原子, 更优选每个非碳重原子至少 3 个碳原子的比例存在。所述的碳原子和氧原子典型地以每个氧原子至少 1 个碳原子, 优选每个氧原子至少 2 个碳原子, 更优选每个氧原子至少 3 个碳原子的比例存在。所述的改性部分可包括一个或多个封端基团, 例如支链或直链的 C_{1-6} , 支链或直链的, 或羰基。所述的改性部分将典型地包括氢, 并且一个或多个氢可用氟(其是重原子但在上述式子中不认为它是重原子)替代。在一些情况下所述的改性部分可以明确不包括未取代的烷基部分。所述的改性部分可以例如通过连接基团, 例如氨基甲酸酯、碳酸酯、醚、酯、酰胺或二级氨基或通过二硫键, 被结合于例如在多肽的氨基酸上的可利用的基团, 例如氨基、羟基或游离羧酸基团。在所述连接基团中的分子被认为是所述改性部分的一部分。在优选的实施方案中, 所述改性部分的分子量小于 HIM2 改性部分的分子量。

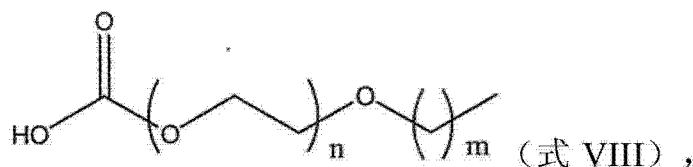
[0022] 本发明包括具有如下式的改性部分的胰岛素化合物共轭物:

[0023]



[0024] 其中 n 为 1、2、3 或 4, 和 m 为 1、2、3、4 或 5; 和 / 或

[0025]



[0026] 其中 n 为 1、2、3、4 或 5, 和 m 为 1、2、3 或 4。

[0027] 将理解的是, 所述的新型改性部分, 以及该部分在改性胰岛素和其它多肽中的应用, 它们自身就是本发明的方面。

[0028] 本发明还提供包括本发明的胰岛素化合物共轭物和 / 或阳离子-胰岛素化合物共轭物的制剂。本发明的发明人惊奇地发现一些脂肪酸组合物是特别有用的, 尤其对于多肽和多肽共轭物, 例如胰岛素和胰岛素化合物共轭物的口服递送, 和 / 或本发明的阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的口服递送。在一方面, 本发明提供脂肪酸组合物, 其具有一种或多种饱和或不饱和 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 或 C_{10} 的脂肪酸和 / 或这些脂肪酸的盐。优选的脂肪酸为辛酸、癸酸、肉豆蔻酸和月桂酸。优选的脂肪酸盐为辛酸、癸酸、肉豆蔻酸和月桂酸的钠

盐。所述组合物的脂肪酸含量范围典型地为低限约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0 重量%，和高限约 3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9 或 12.0 重量%。在又一个实施方案中，所述组合物的脂肪酸含量范围为低限约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0 重量%，和高限约 3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9 或 12.0 重量%，并且所述组合物的脂肪酸含量典型地为大于约 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8 或 99.9 重量% 的单独羧酸，优选辛酸、癸酸、肉豆蔻酸或月桂酸，或其盐。

[0029] 本发明还提供在对象中用本发明的胰岛素化合物共轭物、阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物和/或制剂治疗胰岛素缺乏或另外补充胰岛素的方法。该方法通常包括将治疗有效量的一种或多种本发明的胰岛素化合物共轭物、阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物和/或制剂对需要其的对象给药。

附图说明

[0030] 图 1-15B 为本发明的多种结晶固体的光学显微照片。图 1 和 2 为利用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄的光学显微照片，其显示晶体生长 24 小时，30g/L 浓度的 HIM2 的 T 型 Zn 配合物。图 3 为利用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄的光学显微照片，其显示晶体生长 5 天，30g/L 浓度的 HIM2 的 T 型 Zn 配合物。图 4 为利用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄的光学显微照片，其显示晶体生长 4 天，30g/L 浓度的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物。图 5 显示包含 30% 有机溶剂的 R 型结晶的 IN105 的 Zn 配合物。图 6A-10B 显示用有机溶剂制备的多种 R 型 HIM2 的 Zn 配合物。图 11A-14B 显示多种 R 型共结晶的 HIM2 和 IN105 的 Zn 配合物的晶体光学显微照片。图 15A-15B 显示多种 R 型共结晶的 HIM2 和人胰岛素的 Zn 配合物的晶体光学显微照片。本发明包括具有示于任何图 1-15B 中的形态的晶体。

[0031] 图 16-20 显示对于 HIM2 和多种 Zn-HIM2 配合物的小鼠血糖测定结果。图 16 显示对于 HIM2 的 MBGA 生物效能曲线图。图 17 显示对于 R 型 Zn HIM2 胰岛素化合物产物的 MBGA 生物效能曲线图。图 18 显示对于 T 型 Zn HIM2 胰岛素化合物产物的 MBGA 生物效能曲线图。图 19 显示对于具有鱼精蛋白的 Zn HIM2 胰岛素化合物产物的 MBGA 生物效能曲线图。图 20 显示 R 型鱼精蛋白配合物在给药后 30 和 90 分钟的葡萄糖降低效应。

[0032] 图 21-24 显示对于 IN-186、IN-192、IN-190、IN-191、IN-189、IN-178、IN-193、

IN-194、IN-185、IN-196 和 IN-197 的 MBGA 生物效能曲线图。

[0033] 图 25 和 26 显示对于本发明的 Zn-HIM2 配合物的狗夹(clamp)研究结果。图 27 和 28 显示对于本发明的 Zn-IN105 配合物的狗夹研究结果。

[0034] 图 29 和 30 显示对狗给药 IN105 的狗夹研究结果,所述 IN105 在没有另外赋形剂的 3w/v% 癸酸钠盐的磷酸盐缓冲液中。

[0035] 图 31-33 显示对狗给药包含如下成分的片剂的狗夹研究结果,所述的片剂包含 6mg IN105 和 150mg 甘露醇,30mg Exlotab,含有 143mg 月桂酸盐,含有或没有 143mg 癸酸盐。

[0036] 图 34-37 显示对于给药原型片剂 150mg 和 280mg 癸酸盐片剂和给药 140mg/140mg 癸酸盐 / 月桂酸盐片剂的狗的狗夹研究结果。

[0037] 图 38-42 显示对于给药原型片剂 150mg 和 280mg 癸酸盐片剂和给药 140mg/140mg 癸酸盐 / 月桂酸盐片剂的另外的狗的狗夹研究结果。

[0038] 定义

[0039] 下文中为整个本说明书和权利要求中所用的术语的定义。这些被提供的定义应用于整个本说明书中,除非另外指明。本文中没有定义的术语具有所述术语所属领域中通常理解的含义。

[0040] “附加”,当用于涉及氨基酸序列时,其包括一个或多个氨基酸在所述序列的每端或两端的扩展以及插入到所述序列之中。

[0041] “配合物”指分子缔合,其中一个或多个胰岛素化合物或胰岛素化合物共轭物与一个或多个金属原子或离子形成配位键。配合物可存在于溶液中或作为固体,例如晶体、微晶或无定形固体。“配合物混合物”指具有两种或更多种不同配合物的混合物,无论以溶液或以固体形式。配合物混合物可以,例如,包括具有不同胰岛素化合物、不同胰岛素化合物共轭物、不同杂化配合物、不同阳离子、上述物质的组合等的配合物。“杂化配合物”指具有两种或更多种不同胰岛素化合物和 / 或胰岛素化合物共轭物的阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物。

[0042] “配位剂”指具有多重电荷并键接于或配位于胰岛素化合物共轭物的分子。适于本发明使用的配位剂的例子包括鱼精蛋白、surfen、珠蛋白、精胺、亚精胺清蛋白、氨基酸、羧酸、聚阳离子聚合物、阳离子多肽、阴离子多肽、核苷酸和反义。参见 Brange, J., Galenics of Insulin compound, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987), 其全部内容被并入本文中作为参考。

[0043] 用于涉及氨基酸的附加、缺失或置换的“保守的”,指在氨基酸链上的附加、缺失或置换没有完全减少该胰岛素化合物的治疗效果,即该效果相对于科学上可接受的对照,例如相应的天然胰岛素化合物而言,可以降低、不变或增强。

[0044] “亲水的”指显示出的水溶性的特性,并且术语“亲水部分”指亲水的部分和 / 或当结合于另一个化学个体时,增加这种化学个体的亲水性的部分。例子包括但不限于,糖类和聚亚烷基部分,例如聚乙二醇。“亲脂的”指显示出的脂溶性的特性,例如在脂肪和脂肪组织中积聚,溶解于脂质的能力和 / 或渗透、相互作用于和 / 或穿过生物膜的能力,并且术语“亲脂部分”指亲脂的部分和 / 或当接于另一个化学个体时,增加这种化学个体的亲脂性的部分。“两亲的”指显示出的亲水和亲脂的特性,并且术语“两亲部分”指两亲的部分和 / 或当结合于多肽或非多肽药物时,增加所形成的共轭物,例如某些 PEG- 脂肪酸改性部分和

糖-脂肪酸改性部分的两亲性(即既增加亲水性还增加两亲性)的部分。

[0045] “低级烷基”指具有一个至六个碳原子,即 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 或 C_6 的取代或未取代的、直链或支链的烷基部分。“高级烷基”指具有六个或更多个碳原子,即 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 等的取代或未取代的、直链或支链的烷基部分。

[0046] “单分散的”指这样的化合物的混合物,其中在所述混合物中化合物的约 100% 具有相同的分子量。“基本上单分散的”指这样的化合物的混合物,其中在所述混合物中化合物的至少约 95% 具有相同的分子量。“纯粹单分散的”指这样的化合物的混合物,其中在所述混合物中化合物的约 100% 具有相同的分子量并具有相同的分子结构。因此,纯粹单分散混合物是单分散混合物,但单分散混合物不一定是纯粹单分散混合物。“基本上纯粹单分散的”指这样的化合物的混合物,其中在所述混合物中化合物的至少约 95% 具有相同的分子量和相同的分子结构。因此,基本上纯粹单分散的混合物是基本上单分散的混合物,但基本上单分散的混合物不一定是基本上纯粹单分散的混合物。所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的胰岛素化合物共轭物组分优选为单分散的、基本上单分散的、纯粹单分散的或基本上纯粹单分散的,但也可以是多分散的。“多分散的”指具有的分散性不是单分散的、基本上单分散的、纯粹单分散的或基本上纯粹单分散的。

[0047] 本文中所特定使用的“天然胰岛素化合物”指以由天然、合成或基因工程来源提供的哺乳动物的胰岛素化合物(例如人胰岛素、牛胰岛素、猪胰岛素或鲸胰岛素的化合物)。人胰岛素由通过二硫键交联的 21 个氨基酸的 A 链和 30 个氨基酸的 B 链组成。适当交联的人胰岛素包括三个二硫桥键:一个在 A7 和 B7 之间,第二个在 A20 和 B19 之间,和第三个在 A6 和 A11 之间。人胰岛素具有三个游离氨基:B1-苯丙氨酸、A1-甘氨酸和 B29-赖氨酸。在位置 A1 和 B1 的游离氨基是 α -氨基。在位置 B29 的游离氨基是 ϵ -氨基。“胰岛素类似物”指这样的多肽,其相对于相应的天然胰岛素显示出一些、全部或增强的活性,或者在体内或体外转化为相对于相应的天然胰岛素显示出一些、全部或增强活性的多肽,例如具有含有一个或多个保守氨基酸附加、缺失和/或置换的人氨基酸结构的多肽。胰岛素类似物利用已知的技术,例如描述于 Dahiyat 等人于 2002 年 3 月 18 日提交的美国专利公开 20030049654,“Protein design automation for protein libraries”中的那些技术确定。人和非人的动物的胰岛素原、前胰岛素原、胰岛素前体、单链胰岛素前体和上述任何物质的类似物也在本文中被指作胰岛素类似物,如非哺乳动物胰岛素那样。许多胰岛素类似物在本领域中是已知的(参见下文的讨论)。除非上下文中明确另外指出(例如如果涉及特定的胰岛素,例如“人胰岛素”等),术语“胰岛素化合物”被广义地使用,包括天然胰岛素和胰岛素类似物。

[0048] “聚亚烷基二醇”或 PAG 指取代或未取代的、线性或支化的聚亚烷基二醇聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)和聚丁二醇(PBG),及其组合(例如包括两种或多种不同 PAG 子单元,例如两种或更多种不同的选自 PEG、PPG、PPG 和 PBG 子单元的 PAG 单元的组组合的线性或支化聚合物),以及包括所述聚亚烷基二醇的单烷基醚。术语“PAG 子单元”指单个 PAG 单元,例如“PEG 子单元”指单个聚乙二醇单元,例如, $-(CH_2CH_2O)-$,“PPG 子单元”指单个聚丙二醇单元,例如, $-(CH_2CH_2CH_2O)-$,和“PBG 子单元”指单个聚丁二醇单元,例如, $-(CH_2CH_2CH_2CH_2O)-$ 。PAG 和/或 PAG 子单元还包括取代的 PAG 或 PAG 子单元,例如 PAG 包括烷基侧链,例如甲基、乙基或丙基侧链或羰基侧链,以及 PAG 包括一个或多个支化的 PAG 子单元,例如异-PPG 或异-PBG。

[0049] “胰岛素原化合物”指这样的胰岛素化合物,其中 B-链的 C-端通过天然或人工的具有 5 个或更多个氨基酸的 C-肽结合于 A-链的 N-端。“前胰岛素原化合物”指胰岛素原化合物,其进一步包括结合于所述 B-链的 N-端的前导序列,例如被选择以促进作为溶解蛋白的分泌的序列,或者被选择以防止 N-端共轭的序列,或者被选择以增加纯度的序列(例如对纯化柱具有成键亲和力的序列)。“单链胰岛素化合物前体”或“微小胰岛素原化合物”指这样的胰岛素化合物,其中将 B-链(或具有从所述 C-端除去的 1、2、3 或 4 个氨基酸的平头的 B 链)的 C-端结合于 A-链的 N-端或在 N 端缩短了 1、2、3 或 4 个氨基酸的平头的 A 链的 N-端,其中没有插进 C-肽,或通过具有 1、2、3 或 4 个氨基酸的缩短的 C-肽。

[0050] “鱼精蛋白”指得自天然(例如鱼精)或重组来源的强碱性蛋白质的混合物。参见 Hoffmann, J. A. 等人 Protein Expression and Purification, 1:127-133(1990)。所述的鱼精蛋白组合物可以相对不含所述蛋白质的盐的制剂的形式提供,经常叫做“鱼精蛋白碱”,或者以包括所述蛋白质的盐的制剂的形式提供。

[0051] “蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可互换使用,指具有至少两个和最多至任意长度的氨基酸序列的化合物。

[0052] “R-型”指形成于胰岛素化合物共轭物、阳离子和例如苯酚的稳定化合物中的配合物构象。“T-型”指形成于胰岛素化合物共轭物、阳离子中,而没有例如苯酚的稳定化合物的配合物构象。T-型或 R 型配合物可以包括或不包括鱼精蛋白。

[0053] “科学上可接受的对照”指对于实验主题的领域的技术人员可接受的实验对照。

[0054] “固体”指物体的状态,其中具有结构的三维规整性;该术语在本文中广义地用于指结晶固体、无定形固体,以及结晶固体和无定形固体的组合。“阳离子-胰岛素化合物共轭物固体”指包括优选与单价或多价阳离子配位的阳离子-胰岛素化合物共轭物的固体。“晶体”指具有规则多面体形状的固体。“结晶的”指固体具有晶体的特征。“微晶”指主要由以微观尺寸,典型的最大尺寸为 1 微米至 100 微米的结晶状态的物质组成的固体。在一些情况下,微晶组合物的单个晶体主要为单一结晶组合物。在一些实施方案中,本发明的晶体不是微晶。术语“微晶的”指状态是微晶。“无定形”指在形式上不是结晶的固体物质。本领域技术人员用标准技术,例如采用 x-射线结晶学技术、扫描电子显微镜或光学显微镜可区分晶体和无定形物质。“固体混合物”指两种不同固体的混合物。“晶体混合物”指两种不同的晶体的混合物。“共晶”指具有两种或更多种不同胰岛素化合物和/或胰岛素化合物共轭物的晶体。本发明的阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物可以以任何上述任何形式或者两种或更多种这些形式的混合物的形式提供。

[0055] “置换”指在所述胰岛素化合物序列中的一个或多个氨基酸残基用另一个氨基酸替代。在一些情况下,被置换的氨基酸起到功能等同物(functional equivalent)的作用,导致无征改变(silent alteration)。置换可以是保守的;例如保守的置换可选自所被置换的氨基酸属于的类的其它成员。非极性(疏水)氨基酸的例子包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸。极性中性氨基酸的例子包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。正电荷的(碱性)氨基酸的例子包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。负电荷的(酸性)氨基酸的例子包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0056] “水溶解度”或“水溶解性”除非另外指明,在 pH 为 7.4 的缓冲水溶液中测定。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明提供阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物和包括这些配合物的多种组合物,以及制备和使用这些配合物和组合物的方法。所述的配合物用于给药胰岛素化合物用于治疗各种内科疾病,例如特征为胰岛素化合物缺乏的疾病。这些配合物通常包括阳离子组分和胰岛素化合物共轭物组分。所述的胰岛素化合物共轭物组分通常包括结合于改性部分的胰岛素化合物。所述配合物和/或组合物的其它适当的组分的例子包括本领域中已知的用于制备阳离子-蛋白质配合物的稳定剂,配位剂,以及其它组分。本发明还提供包括这些胰岛素化合物共轭物和/或阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的新型胰岛素化合物共轭物和脂肪酸的制剂。

[0059] 1. 胰岛素化合物

[0060] 所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物包括胰岛素化合物组分。该胰岛素化合物可以,例如,是哺乳动物的胰岛素化合物,例如人胰岛素,或者是胰岛素化合物类似物。

[0061] 本领域已知很多胰岛素化合物类似物。优选的胰岛素化合物类似物为包括赖氨酸的那些,优选赖氨酸在 B-链的 C 端的 5 个氨基酸中,例如在位置 B26、B27、B28、B29 和/或 B30。一组合适的类似物描述于 EP-A 1227000107 中(其全部公开内容被并入本文中用作参考),其具有胰岛素化合物的序列,除了在位置 B28 的氨基酸残基为 Asp、Lys、Leu、Val 或 Ala;在位置 B29 的氨基酸残基为 Lys 或 Pro;在位置 B10 的氨基酸残基为 His 或 Asp;在位置 B1 的氨基酸残基为 Phe、Asp,或仅被消除位置 B2 的残基或与在位置 B2 的残基的消除组合;在位置 B30 的氨基酸残基为 Thr、Ala,或被消除;和在位置 B9 的氨基酸残基为 Ser 或 Asp;只要位置 B28 或 B29 为 Lys。

[0062] 其它合适的胰岛素化合物类似物的例子包括 Asp^{B28} 人胰岛素、Lys^{B28} 人胰岛素、Leu^{B28} 人胰岛素、Val^{B28} 人胰岛素、Ala^{B28} 人胰岛素、Asp^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Leu^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Val^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Ala^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素,以及利用如上所述的置换原则提供的类似物。胰岛素化合物片段包括但不限于:B22-B30 人胰岛素、B23-B30 人胰岛素、B25-B30 人胰岛素、B26-B30 人胰岛素、B27-B30 人胰岛素、B29-B30 人胰岛素、B1-B2 人胰岛素、B1-B3 人胰岛素、B1-B4 人胰岛素、B1-B5 人胰岛素、人胰岛素的 A 链和人胰岛素的 B 链。

[0063] 合适的胰岛素化合物类似物的其它的例子可见于 2003 年 7 月 31 日的,名称为“Insoluble compositions for controlling blood glucose”的美国专利公开 20030144181A1;2003 年 6 月 5 日的,名称为“Stable insulin formulations”的美国专利公开 20030104983A1;2003 年 2 月 27 日的,名称为“Method for making insulin precursors and insulin analog precursors”的美国专利公开 20030040601A1;2003 年 1 月 2 日的,名称为“Zinc-free and low-zinc insulin preparations having improved stability”的美国专利公开 20030004096A1;2003 年 4 月 22 日的,名称为“Stable insulin formulations”的美国专利 6,551,992B1;2003 年 3 月 18 日的,名称为“C peptide for improved preparation of insulin and insulin analogs”的美国专利 6,534,288B1;2003 年 3 月 11 日的,名称为“Insoluble compositions for controlling blood glucose”的美国专利 6,531,448B1;2003 年 1 月 28 日的,名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利 RE37,971E;2002 年 12 月 26 日的,名称为“Pulmonary insulin crystals”的美国专利公开 20020198140A1;2002 年 10 月 15

日的, 名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利 6, 465, 426B2 ;2002 年 9 月 3 日的, 名称为“Fatty acid-acylated insulin analogs”的美国专利 6, 444, 641B1 ;2002 年 9 月 26 日的, 名称为“Method for making insulin precursors and insulin precursor analogues having improved fermentation yield in yeast”的美国专利公开 20020137144A1 ;2002 年 9 月 19 日的, 名称为“Stabilized insulin formulations”的美国专利公开 20020132760A1 ;2002 年 6 月 27 日的, 名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利公开 20020082199A1 ;2002 年 1 月 1 日的, 名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利 6, 335, 316B1 ;2001 年 7 月 31 日的, 名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利 6, 268, 335B1 ;2001 年 11 月 15 日的, 名称为“Method for making insulin precursors and insulin precursor analogues having improved fermentation yield in yeast”的美国专利公开 20010041787A1 ;2001 年 11 月 15 日的, 名称为“Stabilized acylated insulin formulations”的美国专利公开 20010041786A1 ;2001 年 11 月 8 日的, 名称为“Pulmonary insulin crystals”的美国专利公开 20010039260A1 ;2001 年 11 月 1 日的, 名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利公开 20010036916A1 ;2001 年 7 月 12 日的, 名称为“Method for administering monomelic insulin analogs”的美国专利公开 20010007853A1 ;2000 年 4 月 18 日的, 名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利 6, 051, 551A ;2000 年 3 月 7 日的, 名称为“Stable insulin formulations”的美国专利 6, 034, 054A ;1999 年 10 月 26 日的, 名称为“Method of delivering insulin lispro”的美国专利 5, 970, 973A ;1999 年 9 月 14 日的, 名称为“Monomelic insulin analog formulations”的美国专利 5, 952, 297A ;1999 年 7 月 13 日的, 名称为“Acylated Insulin Analogs”的美国专利 5, 922, 675A ;1999 年 3 月 30 日的, 名称为“Use of monomelic insulin as a means for improving the bioavailability of inhaled insulin”的美国专利 5, 888, 477A ;1999 年 2 月 23 日的, 名称为“Method of maintaining a diabetic patient' s blood glucose level in a desired range”的美国专利 5, 873, 358A ;1998 年 5 月 5 日的, 名称为“Monomelic insulin analog formulations”的美国专利 5, 747, 642A ;1997 年 12 月 2 日的, 名称为“Acylated insulin compound analogs”的美国专利 5, 693, 609A ;1997 年 7 月 22 日的, 名称为“Monomeric insulin analog formulations”的美国专利 5, 650, 486A ;1997 年 7 月 8 日的, 名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利 5, 646, 242A ;1997 年 1 月 28 日的, 名称为“Preparation of stable insulin analog crystals”的美国专利 5, 597, 893A ;1996 年 8 月 20 日的, 名称为“Insulin analog formulations”的美国专利 5, 547, 929A ;1996 年 4 月 2 日的, 名称为“Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals”的美国专利 5, 504, 188A ;1995 年 12 月 12 日的, 名称为“Insulin analog formulations”的美国专利 5, 474, 978A ;1995 年 10 月 24 日的, 名称为“Monomeric insulin analog formulations”的美国专利 5, 461, 031A ;1983 年 12 月 20 日的, 名称为“Process for producing an insulin”的美国专利 4, 421, 685A ;2001 年 4 月 24 日的, 名称为“Insulin derivatives with increased zinc binding”的美国专利 6, 221, 837 ;1993 年 1 月 5 日的, 名称为“Pharmaceutical formulation for the treatment of diabetes mellitus”的美国专利 5, 177, 058 (描述了这样的药物制剂: 其包括用碱在 B31 改性的胰岛素化合物

衍生物,并具有 5.8 至 8.5 的等电点,和 / 或在药学可接受的赋形剂中至少一种其生理上可耐受的盐,以及相当高含量的为大于 $1\mu\text{g}$ 至约 $200\mu\text{g}$ 的锌 /IU 的锌离子,包括胰岛素化合物 -B31-Arg-OH 和人胰岛素 -B31-Arg-B32-Arg-OH)。每篇上述专利文献的全部公开内容被并入本文中作为参考,特别是用于教导关于各种胰岛素化合物类似物的制备、使用和组合物。

[0064] 用于制备所述阳离子 - 胰岛素化合物共轭物的胰岛素化合物可通过很多公认的肽合成技术,例如经典(溶液)法、固相法、半合成法和重组 DNA 法中的任何一种制备。例如,Chance 等人,美国专利申请 07/388,201, EP0383472, Brange 等人, EP0214826 和 Belagaje 等人,美国专利 5,304,473 公开了多种胰岛素原化合物和胰岛素化合物类似物的制备,并且被并入本文中作为参考。所述胰岛素化合物类似物的 A 和 B 链也可通过胰岛素原化合物状前体分子或单链胰岛素化合物前体分子,利用重组 DNA 技术而制备。参见 Frank 等人,“Peptides:Synthesis-Structure-Function”Proc. Seventh Am. Pept. Symp., 编者 D. Rich 和 E. Gross(1981);Bernd Gutte, Peptides:Synthesis, Structures, and Applications, Academic Press(1995 年 10 月 19 日);Chan, Weng 和 White, Peter (编者), Finoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press (2000 年 3 月),其全部公开的内容被并入本文中作为参考,用于教导关于肽的合成、重组体的生产和制备。

[0065] 2. 改性部分

[0066] 所述阳离子 - 胰岛素化合物共轭物配合物包括改性部分,其结合于(例如共价地或离子地)所述胰岛素化合物以提供所述胰岛素化合物共轭物。改性部分为结合于所述胰岛素化合物的部分,其提供给所述的胰岛素化合物如本文中所述的希望的性质。例如,所述的改性部分可降低所述胰岛素化合物在各种环境(例如肠胃道和 / 或血流)中的降解速率,使得在这些环境中在改性形式中的胰岛素化合物的降解的量比不存在所述改性部分的形式中的胰岛素化合物应当降解的量更少。优选的改性部分为允许所述胰岛素化合物共轭物保持母体胰岛素化合物的生物活性的治疗学意义的百分比。另外,优选的改性部分为两亲或亲水的,和 / 或使得所述胰岛素化合物共轭物两亲或亲水,或比科学上可接受的对照,例如相应的胰岛素化合物或相应的未共轭的胰岛素化合物亲脂性更少的那些部分。

[0067] 合适的用于所述阳离子 - 胰岛素化合物共轭物组合物的改性部分和胰岛素化合物共轭物的例子可在下述专利中找到,其全部内容被并入本文中作为参考:2001 年 10 月 16 日的,名称为“Trialkyl-lock-facilitated polymeric prodrugs of amino-containing bioactive agents”的美国专利 6,303,569;2001 年 4 月 10 日的,名称为“Coumarin and related aromatic-based polymeric prodrugs”的美国专利 6,214,330;2000 年 9 月 5 日的,名称为“Water-soluble non-antigenic polymer linkable to biologically active material”的美国专利 6,113,906;1999 年 11 月 16 日的,名称为“Substantially pure histidine-linked protein polymer conjugates”的美国专利 5,985,263;1999 年 5 月 4 日的,名称为“Method of reducing side effects associated with administration of oxygen-carrying proteins”的美国专利 5,900,402;1997 年 10 月 28 日的,名称为“Conjugation-stabilized therapeutic agent compositions, delivery and diagnostic formulations comprising same, and method of making and using the same”的美国专利

5,681,811;1997年6月10日的,名称为“Aryl imidate activated polyalkylene oxides”的美国专利5,637,749;1997年3月18日的,名称为“Active carbonates of polyalkylene oxides for modification of polypeptides”的美国专利5,612,460;1996年10月22日的,名称为“Azlactone activated polyalkylene oxides conjugated to biologically active nucleophiles”的美国专利5,567,422;1995年4月11日的,名称为“Cyclic imide thione activated polyalkylene oxides”的美国专利5,405,877;和1994年10月25日的,名称为“Conjugation-stabilized polypeptide compositions,therapeutic delivery and diagnostic formulations comprising same,and method of making and using the same”的美国专利5,359,030。用于本发明制剂中的共轭的多肽的另外的例子可在如下美国专利申请中找到,其全部内容被并入本文中作为参考:1998年8月14日提交的美国专利申请09/134,803;2001年12月19日提交的美国专利申请10/018,879;2002年9月5日提交的美国专利申请10/235,381;2002年9月5日提交的美国专利申请10/235,284;和2001年6月4日提交的美国专利申请09/873,797。上述每篇专利和专利申请的全部公开内容被并入本文中作为参考,用于教导关于用于改性多肽的部分。

[0068] 所述的改性部分在它们的主链中可包括弱的或可降解的键。例如,所述的PAG可包括水解不稳定的键,例如易于水解的丙交酯、乙交酯、碳酸酯、酯、氨基甲酸酯等。这个手段使得所述聚合物可被切断成较低分子量的片段。这些聚合物的例子描述于例如Hubbell等人的美国专利6,153,211,其全部内容被并入本文中作为参考。还参见Ekwuribe等人的美国专利6,309,633,其全部内容被并入本文中作为参考。

[0069] 所述的改性部分可包括任何亲水部分、亲脂部分、两亲部分、成盐部分及其组合。典型的亲水、两亲和亲脂聚合物和改性部分将在下文中更详细地描述。

[0070] 2.1 亲水性部分

[0071] 适合的亲水部分的例子包括PAG部分、其它亲水聚合物、糖部分、聚山梨醇酯部分,及其组合。

[0072] 2.2 聚亚烷基二醇部分

[0073] PAG为具有重复亚烷基二醇单元的化合物。在一些实施方案中,所述的单元全都是一样的(即PEG或PPG)。在另一些实施方案中,所述的亚烷基单元是不同的(例如聚乙二醇丙二醇共聚物,或**PLURONICS®**)。所述的聚合物可以是无规共聚物(例如,其中氧化亚乙基和氧化亚丙基是共聚合的)或支化共聚物或接枝共聚物。

[0074] PEG是优选的PAG,并用于生物应用,因为它具有高度希望的性质并通常被食品和药品监督管理局认为是安全的(GRAS)。PEG通常具有分子式 $\text{H}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$,其中n可以为约2至约4000或更高,尽管封端部分可以不同,例如单-甲氧基或二羟基。PEG通常为无色的、无味的、水可溶或水可混溶的(取决于分子量)、热稳定的、化学惰性的、水解稳定的和通常是无毒的。PEG还是生物适合的,并典型地不会在身体内产生免疫反应。优选的PEG部分包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更多个PEG子单元。

[0075] 所述的PEG可以是单分散的、基本上单分散的、纯粹单分散的或基本上纯粹单分散的(例如,如由均于2001年6月4日提交的美国专利09/873,731和美国专利09/873,797

的申请人以前所描述的,这些文献的公开内容被并入本文中作为参考)或多分散的。采用相对低分子量的单分散的聚合物的一个优点是:它们易于形成已定义的共轭物分子,这可便于重现合成和 FDA 批准。

[0076] 所述的 PEG 可以是在每端都具有羟基的直链(在结合于所述胰岛素化合物剩余部分之前)。所述的 PEG 还可以是烷氧基 PEG,例如甲氧基-PEG(或 mPEG),其中一个端基是相对惰性的烷氧基(例如直链或支链的 OC_{1-6}),而另一个端基为羟基(其结合于所述的胰岛素化合物)。

[0077] 所述的 PEG 也可以是支化的,其在一个实施方案中可表示为 $\text{R}(-\text{PEG}_n\text{OH})_m$,其中 R 表示中心(典型为多羟基的)核心试剂,例如季戊四醇、糖、赖氨酸或甘油,n 表示 PEG 子单元的数量,并且每个臂都可以不同并典型为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50,并且 m 表示臂的数量并且是 2 至在所述核心试剂上结合位点(sites)的最大数量。每个分支可以相同或不同并可用例如醚和/或酯进行封端。臂的数目 m 可以是 3 至 100 或更多,并且可以将一个或多个末端羟基结合于所述胰岛素化合物的剩余部分,或者另外进行化学改性。

[0078] 另一些支化的 PEG 包括由式 $(\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-)_p\text{R}-\text{Z}$ 表示的那些,其中 p 等于 2 或 3,R 表示中心核,例如赖氨酸或甘油,并且 Z 表示经历准备好的化学活化的例如羧基的基团。另一种支化的形式,悬挂的 PEG,具有反应性基团,例如羧基,这些基团沿着所述 PEG 主链,而不是所述 PEG 链的末端或除所述 PEG 链的末端以外。叉状的 PEG 可由式 $\text{PEG}(-\text{LCH}_2)_m$ 表示,其中 L 为连接基团并且 X 为活化的端基。

[0079] 2.3 糖部分

[0080] 本文中所述的改性部分可包括糖部分。通常所述的糖部分为至少一个蔗糖基团的碳水化合物产物。典型的糖部分包括但不限于,甘油部分,单、二、三和寡糖,以及多糖例如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。特定的单糖包括 C_6 和以上(优选 C_6 至 C_8)的糖,例如葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、核糖和景天庚酮糖;二和三糖包括具有两个或三个单糖单元(优选 C_5 至 C_8)的部分,例如蔗糖、纤维二糖、麦芽糖、乳糖和棉子糖。利用糖部分的共轭描述于美国专利 5,681,811、5,438,040 和 5,359,030 中,其全部内容并入本文中作为参考。

[0081] 2.4 聚山梨醇酯部分

[0082] 所述的改性部分可包括一个或多个聚山梨醇酯部分。例子包括山梨聚糖的酯,以及用聚氧乙烯衍生的聚山梨醇酯。利用聚山梨醇酯的共轭描述于美国专利 5,681,811、5,438,040 和 5,359,030 中,其全部内容并入本文中作为参考。

[0083] 2.5 生物适合的水溶性聚阳离子部分

[0084] 在一些实施方案中,可使用生物适合的水溶性聚阳离子聚合物。生物适合的水溶性聚阳离子聚合物包括,例如任何具有作为侧基结合的质子化的杂环的改性部分。在本文中的“水溶性”指在温度为 20 至 37℃ 下,整个改性部分可溶于水溶液中,例如缓冲盐水溶液或具有少量加入的作为共溶剂的有机溶剂的缓冲盐水溶液中。在一些实施方案中,所述的改性部分自身并不充分可溶于水溶液自身,但通过与水溶性聚合物例如 PEG 链接枝而带入溶液中。例子包括在改性部分的主链或改性部分的侧链上具有胺基团的多胺,例如聚-L-Lys,以及天然或合成氨基酸或氨基酸的混合物的其它带正电荷的聚氨基酸,包括聚

(D-Lys)、聚(鸟氨酸)、聚(Arg)和聚(组氨酸),和非肽的多胺,例如聚(氨基苯乙烯)、聚(氨基丙烯酸酯)、聚(N-甲基氨基丙烯酸酯)、聚(N-乙基氨基丙烯酸酯)、聚(N,N-二甲基氨基丙烯酸酯)、聚(N,N-二乙基氨基丙烯酸酯)、聚(氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N-甲基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N-乙基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N,N-二甲基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(N,N-二乙基氨基甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯亚胺)、季铵的聚合物,例如聚(N,N,N-三甲氨基丙烯酸酯氯化物)、聚(甲基丙烯酰胺丙基三甲基氯化铵)和天然或合成的多糖,例如壳聚糖。

[0085] 2.6 其它亲水性部分

[0086] 所述的改性部分还可包括其它亲水聚合物。例子包括聚(氧乙烯化的多羟基化合物),例如聚(氧乙烯化的甘油)、聚(氧乙烯化的山梨糖醇)和聚(氧乙烯化的葡萄糖);聚(乙烯醇) (“PVA”);葡聚糖;碳水化合物基聚合物等。所述的聚合物可以是基于上述聚合物单体的均聚物或者无规或嵌段共聚物以及三元聚合物,可以是直链的或支链的。

[0087] 合适的另外的聚合物的特定例子包括,但不限于,聚(噁唑啉),双官能聚(丙烯酸酰吗啉) (“PACM”)和聚(乙烯吡咯烷酮) (“PVP”)。PVP和聚(噁唑啉)是本领域公知的聚合物并且它们的制备对于技术人员而言将是显而易见的。PACM及其合成和使用描述于美国专利 5,629,384 和美国专利 5,631,322 中,其公开内容全部被并入本文中作为参考。

[0088] 2.7 生物粘附聚阴离子部分

[0089] 某些亲水聚合物明显具有潜在应用的生物粘附性质。这些聚合物的例子可在例如 Mathiowitz 等人的美国专利 6,197,346 中找到。这些包含羧基的聚合物(例如,聚(丙烯酸))显示出生物粘附性质,并且还易于与本文中所描述的胰岛素化合物共轭。在降解时暴露羧基的可快速生物腐蚀的聚合物,例如聚(丙交酯乙交酯共聚物)、聚酸酐和聚原酸酯,也是生物粘附性聚合物。这些聚合物可用于将所述的胰岛素化合物递送到胃肠道。随着所述聚合物的降解,它们可暴露羧基基团以使得它们能够牢固地粘附于胃肠道,并能帮助所述胰岛素化合物共轭物的递送。

[0090] 2.8 亲脂性部分

[0091] 在一些实施方案中,所述的改性部分包括一个或多个亲脂性部分,所述的亲脂性部分可以是如本领域技术人员知道的多种亲脂性部分,包括但不限于,烷基部分、烯基部分、炔基部分、芳基部分、芳烷基部分、烷芳基部分、脂肪酸部分、金刚烷基(adamantantyl)和胆甾烯基,以及亲脂性聚合物和/或低聚物。

[0092] 所述的烷基可以是饱和的或不饱和的,直链的,支链的或环状烃链。在一些实施方案中,所述的烷基部分具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 或更多个碳原子。例子包括饱和的直链烷基部分。例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十八烷基、十九烷基和二十烷基;饱和的支链烷基部分,例如异丙基、仲丁基、叔丁基、2-甲基丁基、叔戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2-乙基己基、2-丙基戊基;和衍生于上述饱和烷基部分的不饱和烷基部分,包括但不限于,乙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基、乙炔基、1-丙炔基和 2-丙炔基。在另一些实施方案中,所述的烷基部分为低级烷基部分。在另一些实施方案中,所述的改性部分明确不包含烷基部分,或明确不包含低级烷基部

分,或明确不包含烷烃部分,或明确不包含低级烷烃部分。

[0093] 所述的烷基可以是未取代的或用一个或多个取代基取代的,并且这些取代基优选不干扰所述共轭物的合成方法或消除所述共轭物的生物活性。潜在地干扰性功能基可用保护基适当地阻断,使得所述的功能基不具有干扰性。每个取代基可任选取代以另外的非干扰性取代基。术语“非干扰性”的特征在于所述取代基不会消除根据本发明方法而进行的任何反应的可行性。

[0094] 所述的亲脂性部分可以是脂肪酸部分,例如天然的或合成的,饱和的或不饱和的,直链的或支链的脂肪酸部分。在一些实施方案中,所述的脂肪酸部分具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多个碳原子。在一些实施方案中,所述的改性部分明确不包含脂肪酸部分;或明确不包含具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多个碳原子的脂肪酸部分。

[0095] 当所述的改性部分包括芳环时,该环可用亲核官能团(例如 OH 或 SH)官能化,其中所述的亲核官能团被定位以使得它可以以分子内方式与氨基甲酸酯部分反应并参加其水解。在一些实施方案中,所述的亲核基团用能够在体内被水解或其它方式降解的保护基团保护,结果当将该保护基团脱保护时,这促进了所述共轭物的水解并导致所述的母体胰岛素化合物的释放。

[0096] 合适的改性部分的其它的例子包括 $-C(CH_2OH)_3$; $-CH(CH_2OH)_2$; $-C(CH_3)_3$; $-CH(CH_3)_2$ 。

[0097] 2.9 两亲性部分

[0098] 在一些实施方案中,所述的改性部分包括两亲性部分。许多聚合物和低聚物都是两亲的。这些经常是包括亲水和亲脂性部分的嵌段共聚物、支化共聚物或接枝共聚物,其可以是低聚物和/或聚合物的形式,例如直链、支化或嵌段聚合物或共聚物。

[0099] 所述的两亲改性部分可包括本文中所述的任何亲脂和亲水性部分的组合。这些改性部分典型地包括至少一个经常在所述改性部分的末端的反应性基团,例如卤素、羟基、胺、硫醇、磺酸、羧酸、异氰酸酯、环氧化物、酯等。这些反应性官能团可用于连接亲脂性直链或支链的烷基、烯基、炔基、芳烷基或烷芳基,或亲脂性聚合物或低聚物,因此增加所述改性部分的亲脂性(并因此使得它们通常是两亲的)。

[0100] 所述的亲脂基团可例如,衍生于单或二羧酸,或如果适合,羧酸的反应等同物,例如酸酐或酰氯。对于所述的亲脂基团的适合的前体的例子为乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异丁酸、三甲基乙酸、己酸、辛酸、庚酸、癸酸、壬酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、山萘酸、二十四烷酸、ceratic acid、montanoic acid、异硬脂酸、异壬酸、2-乙基己酸、油酸、蓖麻油酸、亚油酸、亚麻酸、芥酸、大豆脂肪酸、亚麻仁脂肪酸、脱水蓖麻脂肪酸、松浆油脂肪酸、桐油脂肪酸、向日葵脂肪酸、红花脂肪酸、丙烯酸、甲基丙烯酸、马来酸酐、邻苯二甲酸酐、对苯二酸、间苯二酸、己二酸、壬二酸、癸二酸、四氢化邻苯二甲酸酐、六氢化邻苯二甲酸酐、琥珀酸和聚烯炔羧酸。

[0101] 所述的末端亲脂性基团不必是等同物,即所形成的共聚物可包括相同或不同的末端亲脂基团。所述的亲脂性基团可衍生自一种以上如上所定义的单或双官能的烷基、烯基、炔基、环烷基、芳烷基或烷芳基。

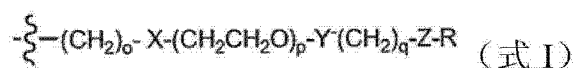
[0102] 2.10 PAG- 烷基改性部分

[0103] 所述的改性部分可以是具有一个或多个线性或支化 PAG 部分和 / 或一个或多个直链或支链的、取代或未取代的烷基部分的线性或支化的聚合物部分。在一些情况下, 这些部分被认为是两亲的; 然而, 所述的 PAG 和烷基部分可以不同以使得这些部分更亲脂或更亲水。在一些实施方案中, 所述的改性部分明确不包含烷基部分, 和在另一些实施方案中, 所述的改性部分明确不包含烷烃部分。

[0104] 在一些实施方案中的 PAG 部分包括以线性或支化形式排列的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个 PAG 子单元。在一些实施方案中的 PAG 部分包括 PEG、PPG 和 / 或 PBG 子单元。在一些实施方案中的烷基部分优选具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子。所述的烷基部分优选为烷烃部分。所述的改性部分可包括封端部分, 例如 $-\text{OCH}_3$ 。另外, 所述的改性部分可包括疏水基团, 例如新戊酰基。

[0105] 在一个实施方案中, 所述的改性部分具有下式:

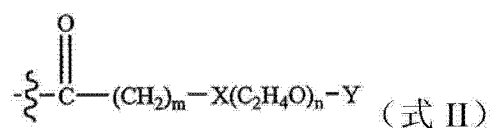
[0106]



[0107] 其中 o、p 和 q 独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50, 并且 o、p 和 q 中至少一个至少为 2。X、Y 和 Z 独立地选自 $-\text{C}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 和 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, 并且 R 为 H 或烷基, 优选低级烷基, 更优选甲基。对变量 o、p 和 q 优先选择以产生亲水或两亲改性部分, 并关于胰岛素化合物进行优先选择以产生亲水或两亲的胰岛素化合物共轭物, 优选单共轭物、二共轭物或三共轭物。在一个优选的实施方案中, 对于待用于基础胰岛素化合物维持的胰岛素化合物共轭物而言, 选择 o、p 和 q 以产生所述胰岛素化合物近端为 PAG 和所述胰岛素化合物远端为烷基部分。或者, 可以选择 o、p 和 q 以产生所述胰岛素化合物远端为 PAG 和所述胰岛素化合物近端为烷基部分。在另一个可选的实施方案中, R 为新戊酰基或烷基-新戊酰基。

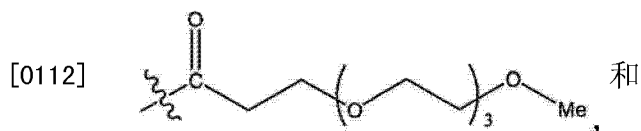
[0108] 在相关的实施方案中, 所述的改性部分具有下式:

[0109]



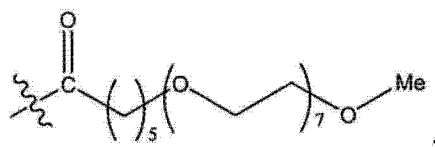
[0110] 其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25, 和 n 为 2 至 100, 优选 2 至 50, 更优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25, X 为 $-\text{C}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, 和 Y 为低级烷基或 $-\text{H}$ 。X 优选为 O 和 Y 优选为 $-\text{CH}_3$ 。在一些情况下, 所述的羰基 ($-\text{C}(\text{O})-$) 可以不存在, 并且所述的 $-(\text{CH}_2)-$ 部分可以结合于在氨基酸上可利用的基团, 例如羟基或游离羧酸基团。

[0111] 在优选的实施方案中, 所述的改性部分具有选自如下结构式的结构:



[0113] (当将就在上面的改性部分在 B29 结合于人胰岛素, 所形成的单共轭物被称为 IN105)。

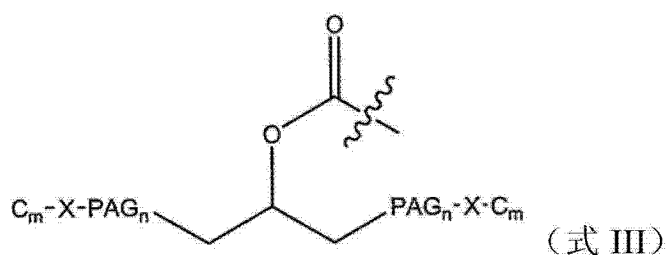
[0114]



[0115] (当将就在上面的改性部分在 B29 结合于人胰岛素, 所形成的单共轭物被称为 HIM2)。任何上述的部分可以, 例如, 在亲核性残基处, 例如 A1、B1 或 B29 处结合于人胰岛素。在一些情况下, 所述的羰基可以不存在或用烷基部分, 优选低级烷基部分替代, 并且所述的 $-(CH_2)-$ 部分可以结合于在氨基酸上可利用的基团, 例如羟基或游离羧酸基团。

[0116] 在另一个实施方案中, 所述的改性部分具有下式:

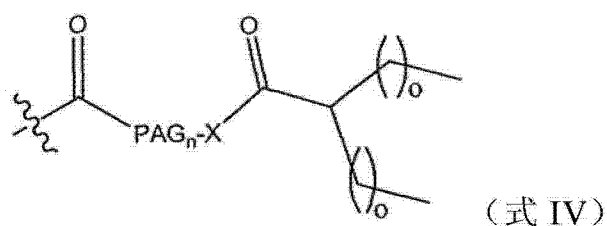
[0117]



[0118] 其中每个 C 被独立地选择并且是具有 m 个碳原子的烷基部分, 并且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20; 并且每个 PAG 被独立地选择并且是具有 n 个子单元的 PAG 部分, 并且 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25; 每个 X 被独立地选择并且是将 PAG 结合于 C 的连接部分, 并且优选为 $-C-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NH-$ 。在一些实施方案中, 所述的 C_m-X 部分不存在, 并且所述的 PAG_n 部分用 $-OH$ 部分或 $-OCH_3$ 部分封端。例如, 所述的 PAG 可以是甲氧基封端的或羟基封端的 PAG, 其具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个 PAG 子单元, 包括 PEG、PPG 和 / 或 PBG 子单元。在一些情况下, 所述的羰基 ($-C(O)-$) 可以用烷基部分, 优选低级烷基部分替代, 其可以结合于在氨基酸上可利用的基团, 例如羟基或游离羧酸基团。

[0119] 所述的改性部分可以, 例如具有下式:

[0120]

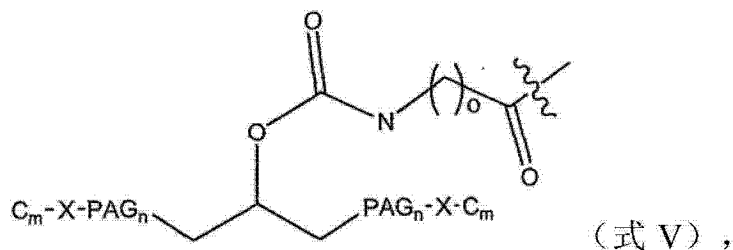


[0121] 其中每个 C 被独立地选择并且是具有 m 个碳原子的烷基部分, 并且 m 为 1、2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 ;并且每个 PAG 被独立地选择并且是具有 n 个子单元的 PAG 部分,并且 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 ; X 为 $-O-$ 、或 $-NH-$;每个 o 被独立地选择并且是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15。例如所述的 PAG 可以具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个 PAG 子单元,包括 PEG、PPG 和 / 或 PBG 子单元。在一些情况下,在附着点的近端的羰基($-C(O)-$)可以不存在或用烷基部分,优选低级烷基部分替代,并且所述的 $-(CH_2)-$ 部分可以结合于在氨基酸上可利用的基团,例如羟基或游离羧酸基团。

[0122] 所述的改性部分可以,例如具有下式:

[0123]



[0124] 其中每个 C 被独立地选择并且是具有 m 个碳原子的烷基部分,并且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 ;并且每个 PAG 被独立地选择并且是具有 n 个子单元的 PAG 部分,并且 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 ;每个 X 被独立地选择并且是将 PAG 结合于 C 的连接部分,并且优选为 $-C-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NH-$ 。每个 o 被独立地选择并且是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15。在一些实施方案中,所述的 C_m-X 部分不存在,并且所述的 PAG_n 部分用 $-OH$ 部分或 $-OCH_3$ 部分封端。例如所述的 PAG 可以是甲氧基封端的或羟基封端的 PAG,其具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个 PAG 子单元,包括 PEG、PPG 和 / 或 PBG 子单元。在一些情况下,在附着点的近端的羰基($-C(O)-$)可以不存在,并且所述的 $-(CH_2)-$ 部分可以结合于在氨基酸上可利用的基团,例如羟基或游离羧酸基团。

[0125] 在另一个实施方案中,所述的改性部分那可以具有下式:

[0126] $-X-R^1-Y-PAG-Z-R^2$ (式 VI)

[0127] 其中,

[0128] X 、 Y 和 Z 为独立选择的连接基团,并且各自任选存在,并且 X ,当存在时,通过共价键结合于所述的胰岛素化合物,

[0129] R^1 或 R^2 中至少一个是存在的,并且是低级烷基并任选包括羰基, R^2 为封端基团,例如 $-CH_3$ 、 $-H$ 、甲苯磺酸酯或活性基团,和

[0130] PAG 为合并一个或多个亚烷基二醇部分的直链或支链的碳链(即氧基亚烷基部分),并任选合并一个或多个另外的选自 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-N-$ 和 $-C(O)-$ 的部分,和

[0131] 其中所述的改性部分具有最大数量的 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个重原子。

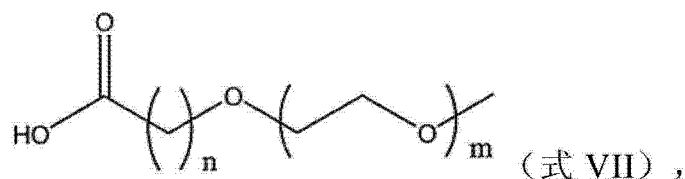
[0132] 在本发明的实施方案中,任何一个或多个 X 、 Y 和 Z 可以是不存在的。另外,当存在时, X 、 Y 和 / 或 Z 可独立地选自 $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、和 $-N-$ 。在一个实施方案中, Z 为 $-C(O)-$ 。在另一个实施方案中, Z 是不存在的。

[0133] 在一些实施方案中, R^1 为低级烷基, 和 R^2 是不存在的。在另一些实施方案中, R^2 为低级烷基, 和 R^1 是不存在的。

[0134] 在另一个实施方案中, 所述的改性部分可以包括直链或支链的, 取代的碳链部分, 其具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19、19、20、21、22、23、24 或 25 个选自 -C-、-C-、-O-、=O-、-S-、-N-、-Si- 原子的主链。所述的重原子典型地将包括一个或多个碳原子和一个或多个选自 -O-、-S-、-N- 和 =O 的非碳重原子。所述的碳原子和非碳重原子典型地以每个非碳重原子至少 1 个碳原子, 优选每个非碳重原子至少 2 个碳原子, 更优选每个非碳重原子至少 3 个碳原子的比例存在。所述的碳原子和氧原子典型地以每个氧原子至少 1 个碳原子, 优选每个氧原子至少 2 个碳原子, 更优选每个氧原子至少 3 个碳原子的比例存在。所述的改性部分可包括一个或多个封端基团, 例如支链或直链的 C_{1-6} , 支链或直链的, 或羰基。所述的改性部分将典型地包括氢, 并且一个或多个氢可用氟(其是重原子但在上述式子中不认为它是重原子)替代。在一些情况下所述的改性部分目前不包含未取代的烷基部分。所述的改性部分可以例如通过连接基团, 例如氨基甲酸酯、碳酸酯、醚、酯、酰胺或二级氨基或通过二硫键, 结合于例如在所述多肽的氨基酸上的可利用的基团, 例如氨基、羟基或游离羧酸基团。在所述连接基团中的分子被认为是所述改性部分的一部分。在优选的实施方案中, 所述改性部分的分子量小于 HIM2 改性部分的分子量。

[0135] 本发明包括具有下式的改性部分:

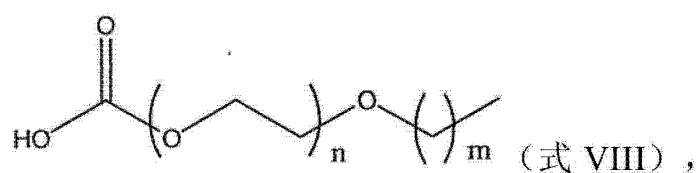
[0136]



[0137] 其中 n 为 1、2、3 或 4, 和 m 为 1、2、3、4 或 5。

[0138] 本发明包括具有下式的改性部分:

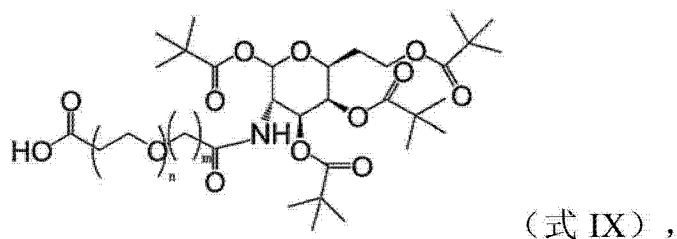
[0139]



[0140] 其中 n 为 1、2、3、4 或 5, 和 m 为 1、2、3 或 4。

[0141] 本发明包括具有下式的改性部分:

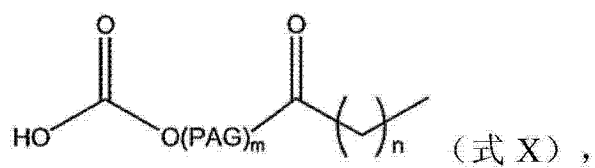
[0142]



[0143] 其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20, 和 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。

[0144] 本发明还包括具有下式的改性部分：

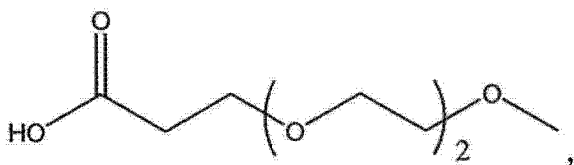
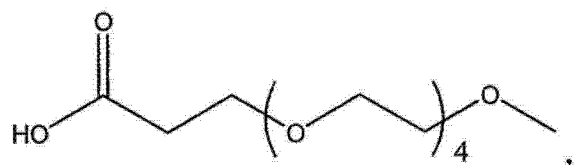
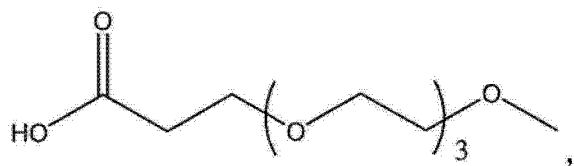
[0145]



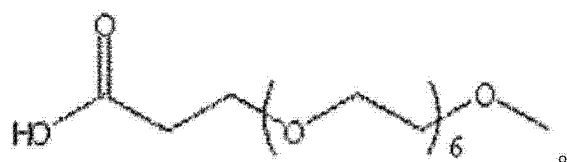
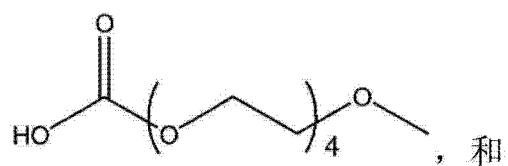
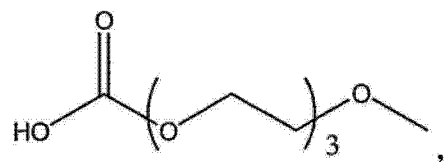
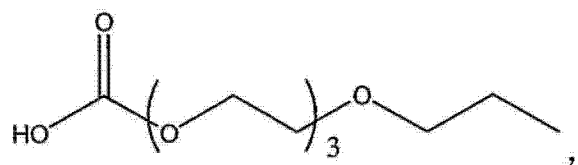
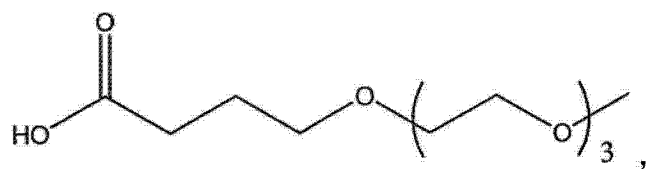
[0146] 其中 PAG 为具有 m 个子单元的 PAG 部分, 并且 m 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 和 n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。

[0147] 其它优选的改性部分包括：

[0148]

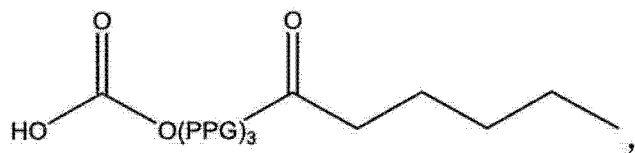
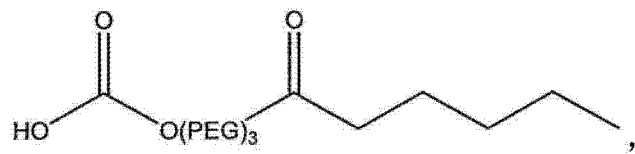
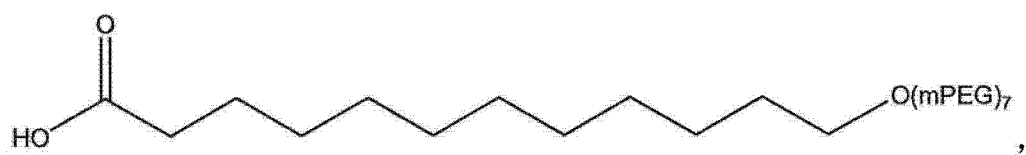
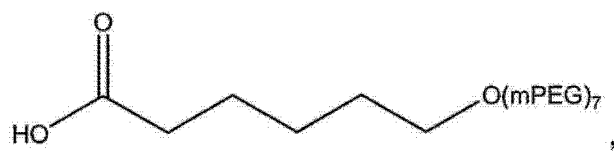


[0149]

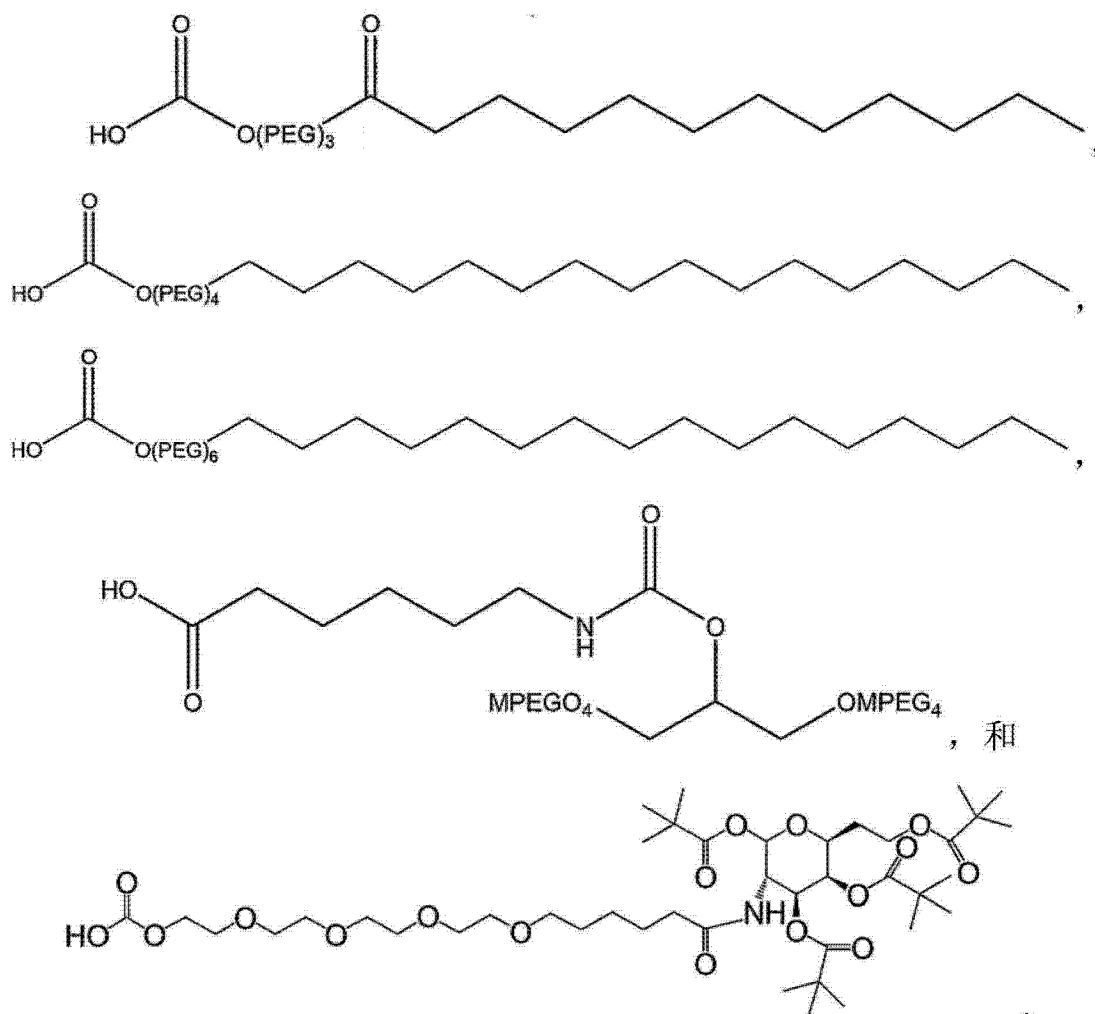


[0150] 下述的改性部分可特别优选用于基础胰岛素化合物替代方案。

[0151]



[0152]



[0153] 另一些改性部分包括如下部分：

- [0154] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0155] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0156] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0157] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0158] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0159] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0160] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0161] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0162] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0163] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0164] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0165] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0166] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0167] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0168] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0169] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,

- [0170] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0171] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0172] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0173] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0174] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0175] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0176] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0177] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0178] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0179] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0180] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0181] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0182] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0183] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0184] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0185] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0186] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0187] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0188] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0189] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0190] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0191] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0192] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0193] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0194] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0195] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0196] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0197] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0198] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0199] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0200] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0201] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0202] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0203] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0204] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0205] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0206] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0207] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0208] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,

- [illegible]

- [0248] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0249] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0250] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0251] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0252] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0253] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0254] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0255] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0256] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0257] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0258] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0259] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0260] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0261] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0262] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0263] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0264] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0265] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0266] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0267] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$,
- [0268] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0269] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0270] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0271] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0272] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0273] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0274] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0275] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0276] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0277] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0278] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0279] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0280] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0281] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0282] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0283] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0284] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0285] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0286] $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,

- [illegible]

- [0326] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0327] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0328] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0329] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0330] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0331] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0332] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0333] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0334] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0335] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0336] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0337] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0338] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0339] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0340] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0341] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0342] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0343] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0344] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0345] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0346] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0347] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0348] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0349] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0350] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0351] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0352] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0353] $R-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0354] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0355] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0356] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0357] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0358] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0359] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0360] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0361] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0362] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0363] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0364] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,

- [0365] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0366] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0367] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0368] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0369] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0370] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0371] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0372] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0373] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0374] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0375] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0376] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0377] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0378] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0379] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0380] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0381] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0382] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0383] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0384] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0385] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0386] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0387] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0388] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0389] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0390] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0391] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0392] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0393] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0394] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0395] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0396] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0397] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0398] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0399] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0400] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0401] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0402] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0403] $R-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,

- [0482] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0483] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0484] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0485] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0486] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0487] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0488] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0489] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0490] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0491] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0492] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0493] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0494] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0495] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0496] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0497] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0498] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0499] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0500] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_3$,
- [0501] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0502] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0503] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0504] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0505] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0506] $R-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_3$,
- [0507] $R-CH_2-O-CH_2-CH_3$,
- [0508] $R-CH_2-O-CH_3$,

[0509] 其中 R 为 -H、-OH、-CH₂OH、-CH(OH)₂、-C(O)OH、-CH₂C(O)OH 或活性部分,例如碳二亚胺、混合酐或 N-羟基琥珀酰亚胺或封端基团。本发明还包括连接于蛋白质或肽,优选连接于胰岛素化合物的这些部分。明确的共轭策略将在下文中更详细地讨论。在这些改性部分中,优选的部分为使得所述的胰岛素化合物比相应的未共轭的胰岛素化合物具有更小的亲脂性和 / 或更多的亲水性的那些。本发明包括的这些改性部分进一步包括一个或多个羰基,优选 1、2、3、4 或 5 个羰基;所述的羰基可以被插入到所述的改性部分中,或者 -O- 或 -CH₂- 可用羰基替代。另外,任何 -CH₂- 或 -CH₃ 部分可例如用可以是相同或不同的低级烷基或 -OH 或具有 1、2、3、4 或 5 个 PAG 子单元的 PAG 链替代。选择优选的 R 以使得每个 -O- 被至少 2 个碳与最近的 -O- 分开。本发明还包括支化的改性部分,其中将该部分的两个或更多个连接于分枝部分,例如赖氨酸。

[0510] 本发明实施方案的共轭物的药学特性,例如亲水性 / 亲脂性,可通过例如调节所述改性部分的亲脂和亲水的分数,例如通过增加或降低 PAG 单体的数量、烷基链的类型和

长度、PAG-肽的键的性质和共轭点的数量而改变。所述改性部分-肽的键的确切性质可以改变以使得其在生理 pH 下或在血浆中的水解是稳定的和/或敏感的。本发明还包括结合于多肽,优选结合于胰岛素化合物的任何上述改性部分。优选地,所述改性部分使得所述多肽比相应的未共轭的多肽的溶解度大例如至少 1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5 或 15 倍。本发明的改性部分可以在任何可用的附着点处例如结合于胰岛素化合物,例如人胰岛素。优选的附着点为亲核性残基,例如 A1、B1 和/或 B29。

[0511] 此外,将理解的是本发明的一个方面包括新型改性部分,例如但不限于以羧酸形式的式 VII 和 VIII 的部分。另外,当所述的改性部分包括羧基时,它可转化为混合酐并与肽的氨基反应以形成包含酰胺键的共轭物。在另一个步骤中,所述的羧基可用水溶性碳二亚胺处理并与所述的肽反应以生成包含酰胺键的共轭物。因此,本发明包括本文中提出的新型部分的活化的形式,例如式 VII 和 VIII 的改性部分和本发明的其它新型低聚物的活化的形式,例如碳二亚胺、混合酐或 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0512] 在一些情况下,所述的改性部分可通过结合于所述多肽的 C 端或侧链的氨基酸或系列的 2 个或更多个氨基酸结合于所述的多肽。例如,在一个实施方案中,所述的改性部分在 Thr 的 -OH 或 -C(O)OH 处结合,并且 mm-改性的 Thr 在羧基端基处结合于所述多肽。例如,在一个实施例中,所述的改性部分在 Thr 的 -OH 或 -C(O)OH 处结合,并且该改性的 Thr 结合于脱-Thr 胰岛素化合物的 B29 氨基酸(例如人胰岛素的 B29Lys)。在另一个实施例中,所述的 mm 在源于所述胰岛素化合物 B-链的末端的八肽的 Thr 的 -OH 或 -C(O)OH 处结合,并且将所述的 mm-改性的八肽结合于脱-八肽(des-octa)胰岛素化合物的 B22 氨基酸。根据本说明书,其它的变体对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0513] 2.11 成盐部分

[0514] 在一些实施方案中,所述的改性部分包含成盐部分。所述的成盐部分可以是如本领域技术人员将理解的多种适当的成盐部分,包括但不限于,羧酸盐和铵。在一些实施方案中,如果所述的稀释部分包括成盐部分,则以 n 盐的形式提供所述的胰岛素化合物共轭物。在这些实施方案中,所述的胰岛素化合物共轭物联系于如本领域技术人员将理解的合适的药学可接受的抗衡离子,包括但不限于,阴离子,例如氯、溴、碘、磷酸盐、乙酸盐、碳酸盐、硫酸盐、甲苯磺酸盐和甲磺酸盐,或者阳离子,例如钠、钾、钙、锂和铵。

[0515] 改性部分的上述例子意于是示例性的而不应以任何方式理解为限制性的。本领域技术人员将认识到用于共轭以获得特殊的官能性的合适的部分将可能落在本文中公开的和要求的共轭机制的范围内。因此,可根据本文中公开的原则选择和使用另外的部分。

[0516] 3. 共轭策略

[0517] 一些因素,例如与改性部分共轭的程度、在所述分子上共轭位点的选择和改性部分的选择,可以不同以产生这样的共轭物,其例如在体内较不易于降解,并因此具有增加的血浆半衰期。例如,所述的胰岛素化合物可被改性以包括在合适的附着(即改性部分的共轭)点的,在胰岛素化合物结构上的 1、2、3、4、5 或更多个位点处的改性部分,所述的附着点适合于帮助改性部分结合其上。例如,这些合适的共轭位点可包括氨基酸残基,例如赖氨酸残基。

[0518] 在一些实施方案中,所述的胰岛素化合物共轭物是单共轭物。在另一些实施方案

中,所述的胰岛素化合物共轭物是多共轭物,例如二共轭物、三共轭物、四共轭物、五共轭物等。在所述胰岛素化合物上的改性部分的数量仅由在该胰岛素化合物上的共轭位点的数量限制。在又一些实施方案中,所述的胰岛素化合物共轭物是单共轭物、二共轭物、三共轭物、四共轭物和 / 或五共轭物的混合物。

[0519] 优选的共轭策略是产生涉及母体胰岛素化合物的一些或全部生物活性的共轭物的那些。

[0520] 优选的附着点包括 A1N 端、B1N 端,和 B29 赖氨酸侧链。高度优选所述的 B29 单共轭物和 B1、B29 二共轭物。另一个优选的附着点为所述胰岛素化合物的 C- 肽组分或前导肽组分上的氨基官能团。

[0521] 可以将一个或多个改性部分(即单独的或多个改性部分的结构)结合于所述的胰岛素化合物。在多个改性部分中的改性部分优选是相同的。然而,应当理解在多个改性部分中的改性部分可以互不相同,或者在多个改性部分中的一些改性部分可以相同,而一些可以不同。当将多个改性部分结合于所述的胰岛素化合物时,优选将一个或多个所述的改性部分用可水解的键结合于所述胰岛素化合物,并将一个或多个所述的改性部分用不可水解的键结合于所述胰岛素化合物。或者,将多个改性部分结合于所述胰岛素化合物的所有的键都可以是可水解的,但具有不同程度的水解能力,以使得例如一个或多个所述的改性部分在体内可以相对快速地通过水解从所述的胰岛素化合物上除去,而一个或多个所述的改性部分在体内可以通过水解更慢地从所述的胰岛素化合物上除去。

[0522] 3.1 改性部分对胰岛素化合物的结合

[0523] 优选将所述的改性部分共价结合于所述的胰岛素化合物。在所述改性部分上的多于一个的部分可以共价结合于所述的胰岛素化合物。结合可采用可水解的或不可水解的键或二者的混合(即在不同的共轭位点用不同的键)。

[0524] 在一些实施方案中,利用可水解的键(例如,酯、碳酸酯或可水解的氨基甲酸酯键)将所述的胰岛素化合物结合于所述改性部分。可水解结合的应用将提供作为前体药物的胰岛素化合物共轭物。前体药物手段可能是需要的,如果所述的胰岛素化合物 - 改性部分的共轭物是没有活性的(即该共轭物缺少通过所述胰岛素化合物的一级作用机制而影响身体的能力),例如当所述的改性部分共轭位点在胰岛素化合物的链接区域时。可水解结合的应用还能提供缓释(time-release)或控释效果,在给定时间周期内给药所述的胰岛素化合物,随着一个或多个改性部分从各自的胰岛素化合物 - 改性部分共轭物上断裂可以提供活性药物。

[0525] 在另一些实施方案中,利用不可水解的键(例如不可水解的氨基甲酸酯、酰胺或醚键)将所述的胰岛素化合物结合于所述的改性部分。当希望使治疗有意义的量的胰岛素化合物共轭物在血流中循环有延长的时间周期,例如给药后至少 2 小时时,可优选采用不可水解的键。以不可水解方式的、用于将所述胰岛素化合物共价结合于所述改性部分的键典型地选自一个或多个共价键、酯部分、碳酸酯、氨基甲酸酯部分、酰胺部分和二级胺部分。

[0526] 所述的改性部分可在很多亲核性残基,包括但不限于,亲核性羟基官能团和 / 或氨基官能团处结合所述胰岛素化合物。亲核性羟基官能团可在例如丝氨酸和 / 或酪氨酸残基处找到,并且亲核氨基官能团可在例如组氨酸和 / 或 Lys 残基处,和 / 或在一个或多个所述胰岛素化合物 A 或 B 链的 N 端找到。当将改性部分结合于利尿钠肽的 N 端时,结合优选

形成二级胺。

[0527] 所述的改性部分可在游离 -SH 基团处,例如通过形成硫酯、硫醚或磺酸酯键而结合于所述的胰岛素化合物。

[0528] 所述的改性部分可通过一个或多个氨基结合于所述的胰岛素化合物。在人胰岛素中的例子包括在 A1、B1 和 B29 处的氨基。在一个实施方案中,将单独一个改性部分结合于在所述胰岛素化合物上的单独一个氨基。在另一个实施方案中,将两个改性部分各自结合于在所述胰岛素化合物上不同的氨基。如果有两个改性部分被结合于两个氨基,优选的排列是在 B1 和 B29 处结合。如果有多个聚合物,这些聚合物可以全部相同或者这些聚合物中的一个或多个可以彼此不同。将聚合物结合于胰岛素化合物的多种方法和类型描述于 2001 年 6 月 4 日提交的,名称为“Mixtures of insulin compound conjugates comprising polyalkylene glycol, uses thereof, and methods of making same”的美国专利申请 09/873,899 中,其全部公开内容并入本文中作为参考。

[0529] 在又一些实施方案中,可使用部分前体药物手段,其中将所述改性部分的一部分水解。例如参见 Ekwuribe 等人的美国专利 6,309,633(其全部公开内容并入本文中作为参考),其描述了具有亲水和亲脂组分的改性部分,其中所述的亲脂组分在体内水解以形成微 PEG 化的共轭物。

[0530] 3.2 改性部分的选择和所述胰岛素化合物共轭物及其配合物的性质

[0531] 所述的改性部分可被选择以提供所述胰岛素化合物共轭物及其配合物的希望的性质。对优选的改性部分进行选择以使得所述胰岛素化合物在水溶液中的溶解度比不存在所述改性部分的胰岛素化合物的水溶解度大,优选比母体胰岛素化合物(即相应的未共轭的胰岛素化合物)在水溶液中的溶解度大至少 1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5 或 15 倍。例如,未配位的天然人胰岛素的溶解度在 pH 为约 7.4 时为 ~ 18mg/ml。本发明的发明人已经惊奇地发现比人胰岛素溶解度大至少 1.05、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5 或 15 倍的人胰岛素共轭物的配位方法。

[0532] 在一些实施方案中,所述的改性部分被选择以使得胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 4 至约 8,优选 pH 为约 5 至约 7.5,理想的 pH 为约 7.4 下的水溶解度大于 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、20g/L、50g/L、100g/L 或甚至 150g/L。

[0533] 本发明的胰岛素化合物共轭物在哺乳动物中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的未共轭的胰岛素化合物的口服生物利用度更大。在另一些实施方案中,本发明的胰岛素化合物共轭物在人中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的未共轭的胰岛素化合物的口服生物利用度更大。在一些实施方案中,所述胰岛素化合物共轭物的吸收,例如由所述共轭物的血浆水平测定,是未共轭胰岛素化合物对照的吸收的至少 1.5、2、2.5、3、3.5 或 4 倍。

[0534] 将理解的是,尽管在本发明的一些方面中,所述的改性部分被选择以使得所述的胰岛素化合物共轭物比相应的未共轭的胰岛素化合物溶解度更大,但在另一些方面,所述的改性部分还可以或被另选以使得所述胰岛素化合物共轭物的疏水性等于或大于相应的未共轭的胰岛素化合物。另外,所述的改性部分可被选择以使得所述胰岛素化合物共轭物

的两亲性比相应的未共轭的胰岛素化合物更大。

[0535] 在一些实施方案中,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的水溶解度等于或大于(a)相应的未配位的胰岛素化合物共轭物,(b)相应的未配位的和未共轭的胰岛素化合物,和/或(c)相应的配位的但未共轭的胰岛素化合物的水溶解度。

[0536] 在优选的实施方案中,所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入 Zn^{++} 而降低。在一些实施方案中,所述的改性部分被选择以使得所述胰岛素化合物共轭物的溶解度等于或大于相应未共轭的胰岛素化合物,并且所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低。在另一些实施方案中,所述改性部分被选择以使得所述胰岛素化合物共轭物的溶解度等于或大于相应未共轭的胰岛素化合物,并且所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低,并且所述阳离子配合物的水溶解度大于胰岛素化合物的水溶解度。在另一方面,所述胰岛素化合物共轭物是脂肪酸酰化的胰岛素化合物,所述阳离子是锌。并且所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低。在另一个实施方案中,所述胰岛素化合物共轭物是脂肪酸酰化的胰岛素化合物,其水溶解度等于或大于相应未共轭的胰岛素化合物的溶解度,所述的阳离子是锌,并且所述胰岛素化合物共轭物的水溶解度通过加入锌而降低。

[0537] 在一些优选的实施方案中,所述胰岛素化合物共轭物的亲脂性相对于相应的母体胰岛素化合物而言为 1 或小于 1。与相应的母体胰岛素化合物相比的所述的胰岛素化合物共轭物的相对亲脂性(k_{rel})可例如通过下式确定: $k_{rel} = (t_{共轭} - t_0) / (t_{人} - t_0)$,其中相对亲脂性通过在 40°C 下等度洗脱在 LiChroSorb RP18 (5 μ m, 250 $\times$ 4mm) 高效液相色谱柱上进行测量。下述混合物用作洗脱液:含 10% 乙腈的 pH 为 7.3 的 0.1M 磷酸钠缓冲液,和 50% 的乙腈水溶液。死时间(void time) (t_0)通过注入 0.1mM 硝酸钠确定。将人胰岛素的保留时间通过改变(c) (i)和(c) (ii)混合物之间的比例而调节到至少为 $2t_0$ 。优选地,在这些实施方案中,所述的相对亲脂性约为等于 1 或小于 1 或基本上小于 1。在优选的实施方案中,所述的胰岛素化合物为人胰岛素,并且相对亲脂性为小于 1。优选所述的相对亲脂性为小于约 0.99、0.98、0.97、0.96、0.95、0.94、0.93、0.92、0.91 或 0.90。对于测定胰岛素和胰岛素共轭物的溶解性和/或亲脂性的技术的讨论阐述于 1998 年 5 月 12 日发给 Harelund 等人的,名称为“Acylated insulin”的美国专利 5,750,499,其全部公开内容被并入本文中作为参考。

[0538] 在一个实施方案中,所述的相对亲脂性为如上所述的并且所述的改性部分为具有 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 个碳的碳链,其中所述的碳链包含 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个插入其中的氧基。在另一个实施方案中,所述的相对亲脂性为如上所述的并且所述的改性部分为具有 5、6、7、8、9 或 10 个碳的碳链,其中所述的碳链包含 2、3 或 4 个插入其中的氧基。在相关的实施方案中,所述的相对亲脂性为如上所述的并且所述的改性部分包含 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个聚亚烷基二醇单元。在另一个相关的实施方案中,所述的相对亲脂性为如上所述的并且所述的改性部分包含 1、2 或 3 个聚乙二醇单元和 1、2 或 3 个聚丙二醇单元。

[0539] 4. 金属阳离子组分和配合物的特征

[0540] 所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物包括金属阳离子。用作阳离子组分的适当的金属阳离子包括能够与所述胰岛素化合物共轭物配位、聚集或结晶的任何金属阳离

子。优选将该金属阳离子配位于所述胰岛素化合物共轭物。可使用单个或多个阳离子。所述的阳离子优选不显著氧化所述胰岛素化合物共轭物,即不氧化到提供配合物的程度,除非这是它们想要的目的。

[0541] 在一些实施方案中,所述的金属阳离子是生物适合的。如果阳离子没有显示出对受体身体显著过度的有害作用,例如在注射点处显著的免疫反应,那么该金属阳离子就是生物适合的。然而,将理解的是,在一些情况下,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的益处可超过毒性和其它有害作用的危险,并且因此在这种情况下是可接受的。

[0542] 所需的用于稳定生物活性剂的金属阳离子的可用性和金属阳离子对生物活性剂的比例可由本领域技术人员在粒度降低和/或胶囊化之前和之后通过对金属阳离子稳定化的生物活性剂实施多项稳定性测试,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、反相色谱法和 HPLC 分析而进行测定。

[0543] 金属阳离子适当地组分包括一种或多种单价、二价或三价金属阳离子或其组合。在优选的实施方案中,所述的金属阳离子为第 II 族或过渡金属阳离子。适当的二价阳离子的例子包括 Zn^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 和/或 Mg^{++} 。如果单价阳离子被包括,其优选为 Na^{+} 、 Li^{+} 或 K^{+} 。所述的阳离子优选作为盐,例如氯化物或乙酸盐加入,最优选以 ZnCl_2 和 ZnAc 加入。

[0544] 胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 1:1 至约 1:100,优选约 1:2 至约 1:12,和更优选约 1:2 至约 1:7 或约 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 或 1:7。在具体的实施方案中, Zn^{++} 被用作阳离子组分,所提供的锌阳离子组分对胰岛素化合物共轭物的摩尔比为约 1:1 和约 1:100,优选约 1:2 至约 1:12,和更优选约 1:2 至约 1:7 或约 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 或 1:7。

[0545] 所述阳离子组分优选大于约 90% 的单一阳离子,例如 Zn^{++} 。优选地,所述阳离子大于约 95%、99% 或 99.9% 的 Zn^{++} 。

[0546] 优选地,所述配位的胰岛素化合物共轭物对胰凝乳蛋白酶的降解的耐受性大于相应的未配位的胰岛素化合物共轭物对胰凝乳蛋白酶的降解的耐受性。优选地,所述配位的胰岛素化合物共轭物对胰凝乳蛋白酶的降解的耐受性大于相应的配位的但未共轭的胰岛素化合物对胰凝乳蛋白酶的降解的耐受性。

[0547] 所述配位的胰岛素化合物共轭物在哺乳动物中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的未配位的胰岛素化合物共轭物的口服生物利用度大。在另一些实施方案中,所述的配位的胰岛素化合物共轭物在人中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的未配位的胰岛素化合物共轭物的口服生物利用度大。在一些实施方案中,所述胰岛素化合物共轭物的吸收,例如由该共轭物的血浆水平测定,是未配位的胰岛素化合物的吸收的至少 1.5、2、2.5、3、3.5 或 4 倍。

[0548] 所述配位的胰岛素化合物共轭物在哺乳动物中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的配位的但未共轭的胰岛素化合物的口服生物利用度大。在另一些实施方案中,所述的配位的胰岛素化合物共轭物在人中的口服生物利用度比科学上可接受的对照,例如相应的配位的但未共轭的胰岛素化合物的口服生物利用度大。在一些实施方案中,所述配位的胰岛素化合物共轭物的吸收,例如由该共轭物的血浆水平测定的,是未共轭的胰岛素化合物的吸收的至少 1.5、2、2.5、3、3.5 或 4 倍。

[0549] 5. 配位剂

[0550] 在一些实施方案中,所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物包括一种或多种配位剂。适合用于本发明使用的配位剂的例子包括鱼精蛋白、surfen、珠蛋白、精胺、亚精胺清蛋白、氨基酸、羧酸、聚阳离子聚合物、阳离子多肽、阴离子多肽、核苷酸和反义。参见 Brange, J., Galenics of Insulin compound, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987), 其全部内容被并入本文中作为参考。用于稳定所述组合物的配位剂的可用性可由本领域技术人员根据已有的公开文献测定。在一些实施方案中,所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物明确不包括或基本上没有配位剂。

[0551] 优选的配位剂为鱼精蛋白。在固体剂型中,所述的鱼精蛋白优选以胰岛素化合物对鱼精蛋白为约 3:1 至约 1:3 的摩尔比,更优选约 2:1 至约 1:2 的摩尔比,理想的约 1:1 的摩尔比存在。在一些实施方案中,所述的阳离子-胰岛素混合共轭物组合物明确不包含或基本上没有鱼精蛋白。

[0552] 氨基酸也可用作配位剂,例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸,异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、天冬酰胺、谷氨酸和组氨酸,以及寡肽,例如二甘氨酸。

[0553] 羧酸也适合用作配位剂;例子包括乙酸和羟基羧酸,例如柠檬酸、3-羟基丁酸和乳酸。

[0554] 6 稳定剂

[0555] 在一些实施方案中,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物包括一种或多种稳定剂。优选的稳定剂包括酚类化合物和芳香族化合物。优选的酚类化合物为苯酚、间甲酚和间羟基苯甲酸酯(m-paraben)或其混合物。所提供的稳定剂的量可以是使所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的稳定性相对于科学上可接受的对照,例如相应的没有稳定剂的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的稳定性有所改进的量。

[0556] 7. 配合物的表现形式

[0557] 所提供的配合物可以是干燥固体,例如基本上纯的阳离子-胰岛素化合物共轭物的粉末,或包含与其它药学可接受的组分一起的阳离子-胰岛素化合物共轭物固体的粉末。所述的配合物还可以在水性或有机介质中的溶解状态,和/或在这些介质中的不溶解的固体而被提供。

[0558] 7.1 固体组合物

[0559] 所提供的阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物可以是固体。所述的固体可以例如为干燥状态或为在水溶液、有机溶剂、乳液、微乳中的不溶解状态,或者为 other 非干燥形式。

[0560] 在一个实施方案中,阳离子胰岛素化合物共轭物配合物以纯的处理的固体组合物形式提供。在纯的处理的固体组合物中,胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 3:4 至约 3:0.5 (胰岛素化合物共轭物:阳离子),约 3:3.5 至约 3:1,或理想地为约 3:1。

[0561] 在处理的纯的固体 T 型组合物中(具有阳离子、胰岛素化合物共轭物,而没有鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 3:4 至约 3:0.5 (胰岛素化合物共轭物:阳离子),约 3:3.5 至约 3:1,或理想为约 3:1。在处理的纯的固体 T 型鱼精蛋白组合物中(具有阳离子、胰岛素化合物共轭物和鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的

摩尔比典型地为约 3:6 至约 3:0.5 (胰岛素化合物共轭物:阳离子),约 3:5 至约 3:1,或理想为约 3:2。

[0562] 在处理的纯的固体 R 型(慢(lente))组合物中(具有阳离子、胰岛素化合物和稳定化合物(例如酚类化合物),而没有鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 3:4.5 至约 3:0.9,优选约 3:3.9 至约 3:2.4。在处理的纯的固体 R 型(超慢(ultralente))组合物中(具有阳离子、胰岛素化合物和稳定化合物(例如酚类化合物),而没有鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 3:12 至大于约 3:4.5,优选约 3:9 至约 3:4.8,更优选约 3:6 至约 3:5.4。在处理的纯的固体 R 型鱼精蛋白组合物中(具有阳离子、胰岛素化合物和稳定化合物(例如酚类化合物)和鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比典型地为约 3:12 至约 3:3,优选约 3:9 至约 3:4.5,更优选约 3:6.9 至约 3:5.4。

[0563] 对于单价阳离子,例如 Na^+ ,所述的固体预计具有的胰岛素化合物共轭物对阳离子的比为约 3:6 至约 3:3。

[0564] 本发明的固体组合物,可以例如包括含有本发明的胰岛素化合物共轭物和 / 或阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的组合物,例如粉末。优选的固体组合物以药学可接受的纯度水平提供,即其中没有污染物,所述污染物不可接受地降低所述组合物用于人的适用性。

[0565] 在一些实施方案中,在所提供的组合物中,阳离子-胰岛素化合物共轭物组分为超过约 90% 的结晶体,优选超过约 95% 的结晶体,更优选超过约 99% 的结晶体。在另一些实施方案中,在所提供的组合物中,阳离子-胰岛素化合物共轭物组分为超过约 90% 的无定形固体,优选大于约 95% 的无定形固体,更优选大于约 99% 的无定形固体。

[0566] 在又一些实施方案中,在所提供的组合物中,阳离子-胰岛素化合物共轭物组分以无定形固体和结晶的固体的混合形式存在。例如,无定形固体对结晶固体的比可以为约 1:10 至约 10:1,或约 1:9 至约 9:1,或约 1:8 至约 8:1,或约 1:7 至约 7:1,或约 1:6 至约 6:1,或约 1:5 至约 5:1,或约 1:4 至约 4:1,或约 1:3 至约 3:1,或约 1:2 至约 2:1,或约 1:1。

[0567] 另外,可利用具有不同胰岛素化合物的阳离子-胰岛素化合物的固体,例如包含天然胰岛素化合物的固体与包含胰岛素化合物共轭物的固体的混合物,或者包括一种胰岛素化合物共轭物的固体与包含不同胰岛素化合物共轭物的固体的混合物而提供组合物。

[0568] 另外,所述的固体类型和胰岛素化合物 / 胰岛素化合物共轭物组分都可以不同。例如,利用天然胰岛素化合物和无定形胰岛素化合物共轭物可以提供包含 Zn-胰岛素化合物晶体的组合物,或者可利用天然胰岛素化合物和结晶的 Zn-胰岛素化合物共轭物提供包含无定形 Zn-胰岛素化合物固体的组合物。这些混合物可用于获得物理性质,例如溶解曲线和 / 或药物动力学曲线的不同。

[0569] 所述固体的平均粒度优选为约 0.1 至约 100 微米,更优选 1 至 50 微米,又更优选 1 至 25 微米,理想的是 1 至 15 微米。小的粒度可通过微结晶条件、喷雾干燥、研磨、真空干燥、冷冻干燥等获得。

[0570] 在一个实施方案中,所述的组合物,当干燥时,包含大于约 96 重量 % 的胰岛素化合物和约 0.05、0.1、0.15 或 0.2 至约 4 重量 % 的锌。在另一个实施方案中,所述的组合物,当干燥时,包含大于约 91 重量 % 的胰岛素化合物共轭物,约 0.05、0.1、0.15 或 0.2 至约 4 重

量 % 的锌, 以及约 0.2 至约 5 重量 % 的苯酚。在又一个实施方案中, 所述的组合物, 当干燥时, 包含大于约 82 重量 % 的胰岛素化合物共轭物, 约 0.05、0.1、0.15 或 0.2 至约 4 重量 % 的锌, 以及约 0.2 至约 14 重量 % 的鱼精蛋白。在又一个实施方案中, 所述的组合物, 当干燥时, 包含大于约 71 重量 % 的胰岛素化合物共轭物, 约 0.05、0.1、0.15 或 0.2 至约 4 重量 % 的锌, 约 0.2 至约 14 重量 % 的鱼精蛋白, 和约 0.2 至约 15 重量 % 的苯酚。

[0571] 在另一个实施方案中, 所述的组合物, 当干燥时, 包含约 0.1 至约 2 重量 % 的 Zn^{++} , 以及约 0.08 至约 1 重量 % 的苯酚, 优选约 0.5 至约 1.3 重量 % 的 Zn^{++} , 以及约 0.1 至约 0.7 重量 % 的苯酚, 更优选大于或等于 1 至约 3.5 重量 % 的 Zn^{++} , 以及约 0.1 至约 3 重量 % 的苯酚, 又更优选大于或等于 1.3 至约 2.2 重量 % 的 Zn^{++} , 以及约 0.4 至约 2 重量 % 的苯酚。

[0572] 所述的配合物可以慢型(lente-type)制剂的形式提供。例如, 在优选的干燥的慢型制剂中, 所提供的 Zn 的量为约 0.1 至约 2 重量 %, 并且存在的苯酚的量为约 0.08 至约 1 重量 %, 其余的重量 % 为胰岛素化合物共轭物。理想地, 对于干燥的慢型制剂, 所提供的 Zn 的量为约 0.5 至约 1.3 重量 %, 并且存在的苯酚的量为约 0.1 至约 0.7 重量 %, 其余的重量 % 为胰岛素化合物共轭物。

[0573] 所述的配合物可以超慢型(ultralente-type)制剂的形式提供。例如, 在优选的干燥的超慢型制剂中, 所提供的 Zn 的量为大于或等于 1 至约 3.5 重量 %, 并且存在的苯酚的量为约 0.1 至约 3 重量 %, 其余的重量 % 为胰岛素化合物共轭物。理想地, 对于干燥的超慢型制剂, 所提供的 Zn 的量为大于或等于 1.3 至约 2.2 重量 %, 并且存在的苯酚的量为约 0.4 至约 2 重量 %, 其余的重量 % 为胰岛素化合物共轭物。

[0574] 7.2 液体组合物

[0575] 所述阳离子-胰岛素化合物配合物可以液体中不溶解组分的组分的形式提供。例如所述的液体可以是包含阳离子-胰岛素化合物共轭物作为沉淀的水溶液, 或者所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物可以悬浮液、乳液或微乳的组分的形式提供。所述的液体还可包含伴随着所述不溶解组分的溶解的组分或配合物。

[0576] 7.3 混合物和共晶

[0577] 本发明的组合物可以例如包括配合物混合物、固体混合物、杂化配合物和共晶。

[0578] 因此, 例如, 本发明提供的组合物包括两种或更多种胰岛素化合物共轭物和 / 或未共轭的胰岛素化合物。另外, 如果所述的组合物包括固体, 该固体可具有不同形式。因此, 例如一种固体可以是结晶的, 而另一种固体可以是无定形固体。如其它地方所指出的, 所述固体可以干燥的形式提供, 或者可以液体混合物的固体组分的形式提供。在优选的实施方案中, 本发明的混合物包括两种或多种不同的胰岛素化合物共轭物, 并且不同的胰岛素化合物共轭物具有不同的溶解度。在一个实施方案中, 所述配合物之一包含亲脂性胰岛素化合物共轭物, 并且其它的包含亲水性胰岛素化合物共轭物。在又一个实施方案中, 所述的配合物可包括不同的胰岛素化合物共轭物, 其中一种或多种配合物的循环半衰期为约 1 至约 4 小时, 并且一种或多种配合物的循环半衰期显著大于第一种配合物的循环半衰期。在相关的实施方案中, 所述配合物之一具有速效特性, 而所述配合物的另一种具有中效到长效特性。另外, 所述配合物之一具有适合于基础胰岛素化合物控制的特性, 而另一些具有适合于餐后葡萄糖控制的特性。优选的混合物为 HIM2 和胰岛素的混合物、HIM2 和 IN105 的混合物、IN105 和胰岛素化合物的混合物、IN105 和脂肪酸酰化的胰岛素的混合物、HIM2 和脂

肪酸酰化的胰岛素的混合物。适当的脂肪酸酰化的胰岛素描述于如下美国专利中,其全部内容被并入本文中作为参考:2003年3月11日公告的,名称为“Insoluble compositions for controlling blood glucose”的美国专利6,531,448;2003年1月28日公告的,名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利RE37,971;2002年10月15日公告的,名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利6,465,426;2002年9月3日公告的,名称为“Fatty acid-acylated insulin analogs”的美国专利6,444,641;2002年1月1日公告的,名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利6,335,316;2001年7月31日公告的,名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利6,268,335;2000年4月18日公告的,名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利6,051,551;1999年7月13日公告的,名称为“Acylated Insulin Analogs”的美国专利5,922,675;1997年12月23日公告的,名称为“Preparation of an acylated protein powder”的美国专利5,700,904;1997年12月2日公告的,名称为“Acylated insulin analogs Granted”的美国专利5,693,609;1997年7月8日公告的,名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利5,646,242;1997年5月20日公告的,名称为“Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein”的美国专利5,631,347;2002年9月17日公告的,名称为“Method of acylating peptides and novel acylating agents”的美国专利6,451,974;2000年1月4日公告的,名称为“Acylated insulin”的美国专利6,011,007;1998年5月12日授权的,名称为“Acylated insulin”的美国专利5,750,497;1999年5月18日公告的,名称为“Selective acylation method”的美国专利5,905,140;2003年9月16日公告的,名称为“Insulin derivatives”的美国专利6,620,780;2001年1月26日公告的,名称为“Insulin derivatives”的美国专利6,251,856;2001年4月3日公告的,名称为“Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery”的美国专利6,211,144;2001年10月30日公告的,名称为“Pulmonary insulin crystals”的美国专利6,310,038;和2001年1月16日公告的,名称为“Stabilized insulin compositions”的美国专利6,174,856。特别优选的具有12、13、14、15或16个碳的脂肪酸的单脂肪酸酰化的胰岛素共价结合于人胰岛素的Lys(B29)。

[0579] 在一个实施方案中,本发明提供具有不同胰岛素化合物和/或胰岛素化合物共轭物的共晶。该共晶优选显示出一个或多个如下特征:基本上均匀的溶出度,单独的体内溶出度曲线,和/或单峰的药物动力学特性。优选的共晶为HIM2和胰岛素的共晶,HIM2和IN105的共晶,IN105和胰岛素化合物的共晶。

[0580] 在一个实施方案中,所述的共晶包括人胰岛素,并且与人胰岛素的共结晶降低了相对于相应胰岛素化合物共轭物晶体的溶解度的所述晶体的溶解度。在另一个实施方案中,所述的共晶包括人胰岛素,并且与人胰岛素的共结晶减少了相对于相应胰岛素化合物共轭物晶体的溶解度的所述晶体的溶解度。

[0581] 在另一个实施方案中,所述的共晶包括速效的、快速清除的和/或高效的胰岛素化合物共轭物,和长效的、缓慢清除的和/或低效的胰岛素化合物共轭物。优选所述的共晶具有适合于餐后葡萄糖控制或适合于过夜基础胰岛素化合物控制的PK/PD特性。

[0582] 在另一个实施方案中,本发明提供混合物或共晶,其中胰岛素化合物共轭物包含

有人胰岛素或赖脯胰岛素。本发明的混合物可包括不同的胰岛素化合物共轭物。所述的混合物可包括胰岛素化合物共轭物和未共轭的胰岛素化合物。所述的混合物可包括具有不同胰岛素化合物的不同的胰岛素化合物共轭物。

[0583] 另外,本发明提供具有两种不同的胰岛素化合物共轭物和 / 或胰岛素化合物共轭物和未共轭的胰岛素化合物的配合物。本发明提供两种、三种或更多种不同胰岛素化合物共轭物的杂化共晶。本发明提供具有包含未共轭的胰岛素化合物的胰岛素化合物共轭物的配合物。本发明提供的共晶具有两种或更多种不同亲水性的胰岛素化合物共轭物;两种或更多种不同疏水性的胰岛素化合物共轭物;两种或更多种不同两亲性的胰岛素化合物共轭物;亲水性胰岛素化合物共轭物和亲脂性胰岛素化合物共轭物;亲水性胰岛素化合物共轭物和未共轭的胰岛素化合物;HIM2 和未共轭的胰岛素化合物一起;IN105 和未共轭的胰岛素化合物一起;HIM2 和 IN105 一起;HIM2 与胰岛素化合物和 IN105 一起;以及上述成分的其他组合。如其它地方所提及的,所述配合物可以干燥固体的形式、溶液中溶解的配合物形式和 / 或溶液中未溶解的配合物的形式提供。各种组合可以例如用于提供具有扩展特性的配合物或共晶。

[0584] 8. 本发明配合物的溶解度

[0585] 所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为所述未配位的胰岛素化合物共轭物的水溶解度的约 1/15、1/14、1/13、1/12、1/11、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5 直至约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 <10 倍。上述上限和下限的任何组合落入本发明的范围内。然而,优选的范围为约 1/15 至 <5,更优选为约 1/10 至约 2,理想的为约 1/10 至 <0。在本发明特别令人惊奇的方面,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的水溶解度经常为基本上小于所述胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的水溶解度。然而,将理解的是在一些实施方案中,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的水溶解度可以等于、大于或基本上大于所述胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的水溶解度。

[0586] 在一个令人惊奇的实施方案中,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度为基本上小于相应的未配位的胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的溶解度,并且所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物在 pH 范围从起点约 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9 至终点约 7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8 或 8.9 的水溶液中溶解度保持大于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 或 130g/L。在另一个实施方案中,所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物在 pH 为约 7.4 下的水溶解度为基本上小于相应的胰岛素化合物共轭物在 pH 为约 7.4 的溶液中的溶解度,并且所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物在 pH 范围为约 5.5 至约 8.5,优选 pH 范围为约 6.5 至约 8,更优选 pH 范围为约 6.9 至约 7.8 的水溶液中溶解度保持大于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 或 130g/L。【问题:所述的 g/L 溶解度是利用所述配合物的重量还是所述胰岛素化合物共轭物的重量测定的?】

[0587] 优选选择本发明的胰岛素化合物共轭物以在 pH 等于 $pI \pm$ 约 2.5 的水溶液中生成晶体,其中胰岛素化合物共轭物的浓度为约 0.5mg/ml 至约 50mg/ml,优选约 5mg/ml 至约

30mg/ml,更优选约 15mg/ml 至约 30mg/ml,并且晶体的形成开始于阳离子对胰岛素化合物共轭物的比例为 3、4 或 5 重量%,其中所述的阳离子优选为 Z^{++} 。对于不含鱼精蛋白的单共轭物,晶体优选出现在 pH 为约 4、4.1、4.2、4.3 或 4.4 至约 5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7 或 5.8,优选在 pH 为约 4 至 <6.5,优选约 4 至 <5.8,优选约 4.2 至约 5.5,更优选约 4.4 至约 5.2 的水溶液中。对于不含鱼精蛋白的二共轭物,晶体优选出现在 pH 为约 3.5 至 <5.8,优选约 3.8 至约 5.5,更优选约 4.0 至约 5.2 的水溶液中。对于不含鱼精蛋白的三共轭物,晶体优选出现在 pH 为约 3 至 <5.5,优选约 3.3 至约 5,更优选约 3.8 至约 4.8 的水溶液中。

[0588] 8. 1R 型配合物

[0589] 所述胰岛素化合物共轭物的 R 型 Zn 配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为约 10 至约 150g/L,更优选约 20 至约 130g/L,更优选约 30 至约 110g/L,更优选约 35 至约 60g/L。

[0590] 具有鱼精蛋白的胰岛素化合物共轭物的 R 型 Zn 配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为约 10 至约 110g/L,更优选约 20 至约 85g/L,更优选约 30 至约 70g/L。

[0591] 8. 2T 型配合物

[0592] 所述胰岛素化合物共轭物的 T 型 Zn 配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为约 30 至约 175g/L,更优选约 50 至约 160g/L,更优选约 70 至约 150g/L。

[0593] 具有鱼精蛋白的胰岛素化合物共轭物的 T 型 Zn 配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为约 10 至约 150g/L,更优选约 20 至约 130g/L,更优选约 30 至约 110g/L,更优选约 35 至约 60g/L。

[0594] 8. 3NPH 型配合物

[0595] 所述胰岛素化合物共轭物的 NPH 型配合物在 pH 为约 7.4 时的水溶解度优选为约 1 至约 150g/L,更优选约 5 至约 120g/L,又更优选约 10 至约 90g/L。

[0596] 9. 药学性质

[0597] 所述胰岛素化合物共轭物与阳离子组成的配合物通常产生相对于科学上可接受的对照,例如相应的未配位的胰岛素化合物共轭物而言改进的胰岛素化合物共轭物的药学性质。

[0598] 在一些情况下,所述配位的胰岛素化合物共轭物将显示出相对于科学上可接受的对照,例如相应的未配位的胰岛素化合物共轭物而言扩展的或另外改变的 pK 曲线。在一些情况下,所述的 pK 曲线将显示出赖脯状曲线。利用标准体内实验,例如在小鼠、大鼠、狗或人中可获得 pK 曲线。本文中所描述的用于获得阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物的分析是本发明的一个方面。

[0599] 所述的配合物可显示出改进的化学稳定性。通过将所述配合物暴露于多种分析条件,例如血浆的存在,蛋白酶的存在,肝匀浆的存在,酸性条件的存在,以及碱性条件的存在可获得多种稳定性的特性。当在任何一个或多个这些分析条件下的所述配位的胰岛素化合物共轭物的稳定性大于在相同条件下的未配位的胰岛素化合物共轭物的稳定性时,相对于未配位的胰岛素化合物共轭物的稳定性就是改进的。用于测量在酸性环境中稳定性的优选的分析涉及将所述的配位的胰岛素化合物共轭物在 pH 为 2 的溶液中暴露至少 2 小时,其中该配位的胰岛素化合物共轭物相对于科学上可接受的对照,例如相应的未配位的胰岛素化合物共轭物而言,其降低的降解作用表明改进的稳定性。体内分析也可用于测试稳定性。例

如,所述配位的胰岛素化合物共轭物的稳定性可通过暴露于对象的肠胃道和与适当的对照比较而进行测试。

[0600] 10. 制备方法

[0601] 本发明还提供本文中所描述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的制备方法。该方法通常包括将本文中所所述的一种或多种胰岛素化合物共轭物与本文中所所述的一种或多种阳离子接触以形成固体。

[0602] 对于二价阳离子,例如 Zn^{2+} ,胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比,其用于制备在溶液中具有浓度为约 2mg/ml 至约 50mg/ml 的胰岛素化合物的组合物,通常可以为约 1:15 (胰岛素化合物共轭物:阳离子) 至约 1:0.4,优选约 1:9 至约 1:2。

[0603] 为了制备如上所述的水溶液中的 T 型固体(具有阳离子和胰岛素化合物共轭物,而没有鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比优选为约 1:1.5 至 1:3,理想的为约 1:2。为了制备如上所述的水溶液中的 R 型固体(具有阳离子和胰岛素化合物和稳定化合物(例如酚类化合物),而没有鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比优选为约 1:4 至 1:9,优选为约 1:7 至约 1:9,理想的为约 1:8。

[0604] 为了制备如上所述的水溶液中的 T 型鱼精蛋白固体(具有阳离子和胰岛素化合物共轭物和鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比优选为约 1:1.5 至 1:9,理想的为约 1:2。为了制备如上所述的水溶液中的 R 型鱼精蛋白固体(具有阳离子、胰岛素化合物和稳定化合物(例如酚类化合物),以及鱼精蛋白),胰岛素化合物共轭物对阳离子的摩尔比优选为约 1:2 至 1:15,优选为约 1:7 至约 1:9,理想的为约 1:8。

[0605] 优选将所述的胰岛素化合物共轭物以如下量加入缓冲液中,所述量为经计算达到浓度为大于 2 至约 100g/L,优选约 3、4、5、6、7、8、9 或 10 至约 40g/L,更优选约 10 至约 30g/L。

[0606] 如果所述的阳离子是二价的(例如, Zn^{2+} , Ca^{2+}),其优选以如下的量加入,所述量为经计算达到浓度为约 0.04 至约 10g/L,优选约 0.1 至约 5g/L,更优选约 0.2 至约 4g/L。对于 T 型晶体或 T 型鱼精蛋白晶体,所述的阳离子的浓度优选为约 0.04 至约 1g/L,更优选约 0.1 至约 0.3g/L。对于 R 型晶体或 R 型鱼精蛋白晶体,所述的阳离子的浓度优选为约 1 至约 5g/L,更优选约 1.5 至约 4g/L。

[0607] 如果所述的阳离子是单价的,其优选以如下的量加入,所述量为经计算达到浓度为约 0.08 至约 40g/L,优选约 0.4 至约 20g/L,更优选约 0.8 至约 16g/L。

[0608] 所述的方法可以进一步包括将稳定剂与阳离子和胰岛素化合物共轭物组合。优选的稳定剂如上所述。当使用时,所加的稳定剂的量为足以提供比使用相同试剂和反应条件而没有稳定剂所获得的固体形成更大程度的固体形成。如果所述的稳定剂为酚类化合物(例如苯酚、间甲酚、m-paraben),其加入的量可以是约 10 至约 50 重量%,更优选约 20 至约 40 重量%,又更优选约 25 至约 35 重量%。在更优选的实施方案中,所述的稳定剂为酚类化合物(例如苯酚、间甲酚、m-paraben),其加入的量可以是约 0.01 至约 10 重量%,更优选约 0.01 至约 5 重量%,又更优选约 0.01 至约 1 重量%。因此,在一个实施方案中,所述的方法包括将胰岛素化合物共轭物、阳离子和稳定剂在水溶液中组合以生成阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物,其中所述的组合可产生可溶性配合物和/或结晶的或非结晶的固体。

[0609] 所述的方法可进一步包括使用与上述阳离子和胰岛素化合物共轭物组合的配位

剂,例如鱼精蛋白,并任选还包括稳定剂。

[0610] 为了在 pH 为约 5 至约 8 的水溶液中制备固体,提供的鱼精蛋白的量相对于胰岛素化合物共轭物优选为约 4 至约 45 重量 % (鱼精蛋白 / 胰岛素化合物),优选约 8 至约 25 重量 %,更优选约 9 至约 20 重量 %,理想的是约 10 至约 12 重量 %。对于 T 型固体,优选的 pH 为约 5 至约 6,更优选约 5 至 5.5,又更优选约 5.1 至约 5.3,理想的为约 5.2。对于 R 型固体,优选的 pH 为约 6 至约 7,更优选约 6.2 至 6.8,又更优选约 6.4 至约 6.6,理想的为约 6.5。

[0611] 本发明的发明人已经惊奇地发现 T 型配合物可在稳定剂例如苯酚不存在的情况下转化为鱼精蛋白 T 型配合物。所述的 T 型配合物通过在不存在苯酚的水溶液中将锌与所述胰岛素化合物分子配合而制备。然后将鱼精蛋白加入以将所述 T 型配合物转化为鱼精蛋白 T 型配合物。量和 pH 范围如上所述。

[0612] 因此,在一个实施方案中,所述的方法包括在水溶液中将胰岛素化合物共轭物、阳离子和配位剂组合以产生阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物,其中该组合物可生成可溶性配合物和 / 或结晶的或无定形的固体。在另一个实施方案中,所述的方法包括在水溶液中将胰岛素化合物共轭物、阳离子、配位剂和稳定剂组合以生成阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物,其中该组合物可生成可溶性配合物和 / 或结晶的或无定形的固体。

[0613] 在一些实施方案中,所述的组合物可包括防腐剂。适当的防腐剂的例子包括苯醇、对羟基苯甲酸酯、甘油。稳定剂,例如苯酚、间甲酚和 m-paraben,也可用作防腐剂。甘油和苯酚适当地一起加入以增强抗菌作用。

[0614] 用于制备所述固体的其它组分包括等渗剂,例如 NaCl、甘油和单糖。

[0615] 所述的阳离子胰岛素化合物共轭物固体可典型地相对快速地形成。例如固体形成典型地在 3 天内,经常在 24 小时内完成。在一些例子中,为了改进晶体形成,希望将反应减慢。

[0616] 在本发明的一个实施方案中,所述固体在室温(25°C)下形成,而不需要温度下降诱导固体沉淀。例如,室温对于 R 型和 T 型晶体是有效的。用于形成固体的温度优选约 0 至约 40°C,优选约 17 至约 30°C,更优选约 22 至约 27°C,理想的为约 25°C。

[0617] 在一个实施方案中,所述的方法包括在水溶液中将胰岛素化合物共轭物和金属阳离子组合以提供结晶的或无定形的固体。将要向其中加入阳离子的包含所述胰岛素化合物共轭物的水溶液优选为缓冲溶液,该缓冲溶液的 pH 为所述胰岛素化合物共轭物的 pI $\pm$ 约 1.5,优选 pI $\pm$ 约 1,更优选 pI $\pm$ 约 0.75。这些范围同样也应用于 T 型、R 型和鱼精蛋白配合物。然而,对于中性鱼精蛋白配合物(NPH 型),优选的 pH 为约 7 至约 8.5,更优选约 7.5 至约 8。一旦加入所述金属阳离子,所述的 pH 可轻微变化,并且所述的 pH 可被调整至如上所述的目标 pH 范围。用酚类化合物,pH 范围可有小的变化,并且可用酸或碱将其调至优选的范围。

[0618] 胰岛素化合物共轭物的 pI 值典型地要求 pH 小于约 7,优选小于约 6,更优选小于约 5.5。具有中性改性部分的人胰岛素单共轭物典型地具有约 4.75 $\pm$.25 的 pI 范围。对于人胰岛素二共轭物,所述的 pI 范围典型地为 4.25 $\pm$.25。对于人胰岛素三共轭物,所述的 pI 范围典型地为 3.5 $\pm$.25。

[0619] 合适的缓冲体系的例子包括乙酸铵缓冲液,磷酸钠缓冲液,三羟甲氨基甲烷缓冲液,磷酸钠和乙酸铵的混合物,乙酸钠缓冲液,乙酸钠和乙酸铵的混合物,和柠檬酸缓冲液,

并且任何上述缓冲体系 [A] 还包含乙醇和 / 或乙腈 [B] (例如 A:B 的百分比为约 1:1 至约 10:1)。本发明令人惊奇的方面是阳离子胰岛素化合物共轭物固体可在包含有机溶剂如乙醇或乙腈的水性混合物中形成。

[0620] 本发明一个独特的特色是除了提供有用的阳离子 - 胰岛素化合物共轭物配合物外, 本发明还提供在制备过程中将阳离子 - 胰岛素化合物共轭物从未共轭的胰岛素化合物中分离出来的方法。在这个过程中, 例如, 所述的阳离子 - 胰岛素化合物共轭物可从溶液中沉淀出来, 而溶解的未共轭的胰岛素化合物可通过过滤除去。这一特色减少了在胰岛素化合物共轭物制备中的 2 个步骤: 浓缩步骤和冻干步骤。

[0621] 处理的纯的固体组合物可用标准技术形成, 所述的标准技术为例如离心和 / 或过滤, 随后洗涤 (例如, 用乙醇 / 水), 和冻干或真空干燥。多步洗涤可用于调节苯酚和 / 或阳离子含量。

[0622] 11. 制剂

[0623] 可将所述配合物根据已知技术配制成用于在药物载体中给药的制剂。参见例如, Alfonso R. Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2003 年 6 月), 和 Howard C. Ansel, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 第 7 版 (1999 年 10 月), 其全部内容被并入本文中用作参考, 用于教导关于药物剂型的选择、制备和应用。

[0624] 所述的配合物, 其典型地以无定形或结晶固体的形式, 可与药学可接受的载体组合。所述的载体在与药物组合物中任何其它组分的相容性方面的意义上必需是可接受的, 并且相对于由所述一种或多种活性成分的益处而言不应对象产生过度有害性。所述的载体可以是固体或液体, 或者二者。优选配制为单位剂量制剂, 例如片剂。所述单位剂型可包括, 例如约 0.01 或 0.5 重量 % 至约 95 重量 % 或重量 99% 的阳离子胰岛素混合配合物。所述的药物组合物可通过任何公知的药学技术制备, 所述的药学技术包括但不限于, 任选包括一种或多种附加成分的组分的掺混。

[0625] 合适的药物组合物的例子包括用于口服、直肠、吸入 (例如通过气溶胶)、含服 (例如舌下)、阴道、非肠道 (例如皮下、肌内、皮内、关节内、胸膜内、腹膜内、脑内、动脉内或静脉内)、局部、粘膜表面 (包括气道表面)、鼻表面和经皮给药。在任何给定的情况下最合适的途径将取决于被治疗的状况的性质和严重性, 以及取决于所使用的具体阳离子 - 胰岛素化合物配合物的性质。优选的口服组合物为用于由对象摄食而制备的组合物。理想地, 所述的口服组合物被制备成通过胃可保留或基本上保留和在肠中完全或基本上完全溶出而用于递送所述的活性成分的制剂。合适的经皮系统的例子包括超声导入、离子导入和贴片递送体系。

[0626] 在一个方面, 本发明提供包含一种或多种饱和或不饱和 C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉ 或 C₁₀ 脂肪酸和 / 或这些脂肪酸的盐的脂肪酸组合物。优选的脂肪酸为辛酸、癸酸、肉豆蔻酸和月桂酸。优选的脂肪酸盐为辛酸、癸酸、肉豆蔻酸和月桂酸的钠盐。

[0627] 优选的脂肪酸组合物包括单独脂肪酸或单独脂肪酸盐, 而不包括实质量的其它脂肪酸或脂肪酸盐。在本发明的一个方面, 所述组合物的脂肪酸含量为大于约 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8 或 99.9 重量 % 的单独脂肪酸。在另一个实施

方案中,所述组合物的脂肪酸含量范围为下限约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0 重量%,和上限为约 3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9 或 12.0 重量%。在另一个实施方案中,所述组合物的脂肪酸含量范围为下限约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或 3.0 重量%,和上限为约 3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9 或 12.0 重量%,并且所述组合物的脂肪酸含量为大于约 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8 或 99.9 重量%的单独脂肪酸。

[0628] 这些制剂的活性组分可包括共轭的或未共轭的,配位的或未配位的蛋白质和/或肽。优选的蛋白质和/或肽为本文中所描述的那些。优选的共轭物为本文中所描述的那些。优选的配合物为本文中所描述的那些。优选的口服组合物为用于由对象摄食而制备的组合物。理想地,所述的口服组合物被制备成通过胃可保留或基本上保留和在肠中完全或基本上完全溶出而用于递送所述的活性成分的制剂。在一些情况下,所述的制剂包括肠衣,和在一些情况下,所述的制剂将明确没有肠衣。所述的组合物优选提供为片剂、散剂、硬胶胶囊或软胶胶囊,尽管本文中描述的其它形式也是适合的。

[0629] 本发明的脂肪酸组分可包括脂肪酸酰化的胰岛素。合适的脂肪酸酰化的胰岛素的例子描述于如下美国专利中,其全部内容被并入本文中作为参考:2003 年 3 月 11 日公告的,名称为“Insoluble compositions for controlling blood glucose”的美国专利 6,531,448;2003 年 1 月 28 日公告的,名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利 RE37,971;2002 年 10 月 15 日公告的,名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利 6,465,426;2002 年 9 月 3 日公告的,名称为“Fatty acid-acylated insulin analogs”的美国专利 6,444,641;2002 年 1 月 1 日公告的,名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利 6,335,316;2001 年 7 月 31 日公告的,名称为“Insoluble insulin compositions”的美国专利 6,268,335;2000 年 4 月 18 日公告的,名称为“Method for administering acylated insulin”的美国专利 6,051,551;1999 年 7 月 13 日公告的,名称为“Acylated Insulin Analogs”的美国专利 5,922,675;1997 年 12 月 23 日公告的,名称为“Preparation of an acylated protein powder”的美国专利 5,700,904;1997 年 12 月 2 日公告的,名称为“Acylated insulin analogs Granted”的美国专利 5,693,609;1997 年 7 月 8 日公告的,名称为“Selective acylation of epsilon-amino groups”的美国专利 5,646,242;1997 年 5 月 20 日公告的,

名称为“Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein”的美国专利 5,631,347; 2002 年 9 月 17 日公告的,名称为“Method of acylating peptides and novel acylating agents”的美国专利 6,451,974;2000 年 1 月 4 日公告的,名称为“Acylated insulin”的美国专利 6,011,007;1998 年 5 月 12 日授权的,名称为“Acylated insulin”的美国专利 5,750,497;1999 年 5 月 18 日公告的,名称为“Selective acylation method”的美国专利 5,905,140;2003 年 9 月 16 日公告的,名称为“Insulin derivatives”的美国专利 6,620,780;2001 年 1 月 26 日公告的,名称为“Insulin derivatives”的美国专利 6,251,856;2001 年 4 月 3 日公告的,名称为“Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery”的美国专利 6,211,144;2001 年 10 月 30 日公告的,名称为“Pulmonary insulin crystals”的美国专利 6,310,038;和 2001 年 1 月 16 日公告的,名称为“Stabilized insulin compositions”的美国专利 6,174,856。特别优选的具有 12、13、14、15 或 16 个碳的脂肪酸的单脂肪酸酰化的胰岛素,其共价结合于人胰岛素的 Lys (B29)。

[0630] 适用于口服给药的药物组合物可以分立的单位形式存在,例如胶囊剂、扁胶剂、锭剂或片剂,每个包含预计量的胰岛素化合物共轭物的混合物;例如散剂或颗粒剂;例如以水性或非水液体的溶液剂或悬浮剂;或例如水包油和油包水乳剂。这些制剂可通过任何药理学合适的方法制备,所述的药理学合适的方法包括使胰岛素化合物共轭物的混合物和合适的载体(其可包含一种或多种如上所述的附加组分)关联的步骤。制剂可包括固体悬浮液、配位的阳离子-胰岛素化合物共轭物、未配位的活性组分(例如天然胰岛素化合物,胰岛素化合物共轭物),以及上述物质的混合物。

[0631] 通常,本发明的药物组合物的制备通过均匀和密切地将所述配合物与液体或固体载体,或二者一起掺混,以及然后如果必要将所形成的混合物成形而进行。例如,片剂的制备可通过将包含胰岛素化合物共轭物的粉末或颗粒,任选与一种或多种附加组分压制或模塑而进行。压制的片剂可通过在合适的机器中将任选与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂和/或一种或多种表面活性剂/分散剂混合的以自由流动形式存在的,例如粉末或颗粒的混合物进行压制而制备。模塑的片剂可通过在合适的机器中将利用惰性液体粘合剂润湿的粉末化的组合物进行模塑而制备。

[0632] 适合于含服(舌下)给药的药物组合物包括含有在香味基质,通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶中的胰岛素化合物共轭物的混合物的锭剂(lozenges),和含有在惰性基质,通常为明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶中的胰岛素化合物共轭物的混合物的锭剂(pastilles)。合适的制剂的例子可在美国专利公开 20030229022 (“Pharmaceutical formulation”);20030236192 (“Method of modifying the release profile of sustained release compositions”);20030096011 (“Method of producing submicron particles of a labile agent and use thereof”);20020037309 (“Process for the preparation of polymer-based sustained release compositions”);20030118660 (“Residual solvent extraction method and microparticles produced thereby”);以及美国专利 6,180,141 (“Composite gel microparticles as active principle carriers”);6,737,045 (“Methods and compositions for the pulmonary delivery insulin compound”);6,730,334 (“Multi-arm block copolymers as drug delivery vehicles”);6,685,967 (“Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin

compound”);6,630,169 (“Particulate delivery systems and methods of use”);
6,589,560 (“Stable glassy state powder formulations”);6,592,904 (“Dispersible
macromolecule compositions and methods for their preparation and use “);
6,582,728 (“Spray drying of macromolecules to produce inhaleable dry powders”);
6,565,885 (“Methods of spray drying pharmaceutical compositions”);6,546,929
 (“Dry powder dispersing apparatus and methods for their use”);6,543,448
 (“Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments”);6,518,239 (“Dry
 powder compositions having improved dispersivity”);6,514,496 (“Dispersible
 antibody compositions and methods for their preparation and use”);6,509,006
 (“Devices compositions and methods for the pulmonary delivery of aerosolized
 medicaments”);6,433,040 (“Stabilized bioactive preparations and methods of
 use”);6,423,344 (“Dispersible macromolecule compositions and methods for
 their preparation and use”);6,372,258 (“Methods of spray-drying a drug and a
 hydrophobic amino acid”);6,309,671 (“Stable glassy state powder formulations”);
6,309,623 (“Stabilized preparations for use in metered dose inhalers”);6,294,204
 (“Method of producing morphologically uniform microcapsules and microcapsules
 produced by this method”);6,267,155 (“Powder filling systems, apparatus and
 methods”);6,258,341 (“Stable glassy state powder formulations”);6,182,712
 (“Power filling apparatus and methods for their use”);6,165,463 (“Dispersible
 antibody compositions and methods for their preparation and use”);6,138,668
 (“Method and device for delivering aerosolized medicaments”);6,103,270 (“Methods
 and system for processing dispersible fine powders”);6,089,228 (“Apparatus
 and methods for dispersing dry powder medicaments”);6,080,721 (“Pulmonary
 delivery of active fragments of parathyroid hormone”);6,051,256 (“Dispersible
 macromolecule compositions and methods for their preparation and use”);
6,019,968 (“Dispersible antibody compositions and methods for their preparation
 and use”);5,997,848 (“Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin
 compound”);5,993,783 (“Method and apparatus for pulmonary administration of
 dry powder. alpha. 1-antitrypsin”);5,922,354 (“Methods and system for processing
 dispersible fine powders”);5,826,633 (“Powder filling systems, apparatus and
 methods”);5,814,607 (“Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid
 hormone”);5,785,049 (“Method and apparatus for dispersion of dry powder
 medicaments”);5,780,014 (“Method and apparatus for pulmonary administration of
 dry powder alphas-antitrypsin”);5,775,320 (“Method and device for delivering
 aerosolized medicaments”);5,740,794 (“Apparatus and methods for dispersing
 dry powder medicaments”);5,654,007 (“Methods and system for processing
 dispersible fine powders”);5,607,915 (“Pulmonary delivery of active fragments of
 parathyroid hormone”);5,458,135 (“Method and device for delivering aerosolized
 medicaments”);6,602,952 (“Hydrogels derived from chitosan and poly(ethylene

glycol) or related polymers”) 和 5,932,462 (“Multiarmed, monofunctional, polymer for coupling to molecules and surfaces”) 中找到。另外,合适的缓释制剂描述于 1999 年 10 月 19 日公布的,Cardinal Health 的,名称为“A sustained release pharmaceutical preparation”的美国专利 5,968,554 中,其全部内容被并入本文中作为参考。合适的微粒制剂描述于 2003 年 10 月 30 日公开的,Spherics, Inc. 的,名称为“Methods and products useful in the formation and isolation of microparticles”的国际专利公开 WO/2003-049,701 中。合适的生物粘附制剂描述于 2004 年 5 月 6 日公开的,Spherics, Inc. 的,名称为“Bioadhesive drug delivery system with enhanced gastric retention”的国际专利公开 WO/2003-051,304 中。

[0633] 适用于非肠道给药的根据本发明实施方案的药物组合物包含所述配合物的无菌水性和非水性注射溶液,该制剂优选是与目标受体的血液等渗的。这些制剂可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得所述组合物与目标受体的血液等渗的溶质。水性和非水性无菌悬浮液可包括悬浮剂和增稠剂。这些组合物可存在于单位\剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并可以储存于冷冻干燥的(冻干的)条件下,其只需要在刚好使用前加入无菌液体载体,例如盐水或注射用水。临时注射溶液和悬浮液可从前面所述的种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。例如,可以提供在密封容器中的具有单位剂型的配合物的混合物的,可注射的、稳定的、无菌的组合物。配合物的混合物可以冻干产物的形式提供,该冻干产物能与合适的药学可接受的载体重新组成以形成适用于注射入对象中的液体组合物。非肠道单位剂型典型地包含约 1 微克至约 10 微克的配合物的混合物。当所述的配合物是基本上水不可溶时,可采用生理上可接受足量的乳化剂以足够量将所述配合物乳化于含水载体中。一个有用的乳化剂为磷脂酰胆碱。

[0634] 用于口服给药的固体剂型典型地包括约 2mg 至约 500mg,优选约 10mg 至约 250mg,理想的约 20mg 至约 110mg 的所述配合物。

[0635] 适合于直肠给药的药物组合物优选以单位剂量栓剂的形式存在。这些制剂可通过将所述配合物与一种或多种常规固体载体,例如可可油掺混,和然后将所形成的混合物成形而制备。

[0636] 适用于向皮肤局部应用的药物组合物优选采用软膏剂、霜剂、洗剂、糊剂、凝胶剂、喷剂、气雾剂或油的形式。可用的载体包括凡士林油、羊毛脂、PEG、醇类、透皮促渗剂以及其两种或更多种的组合。

[0637] 适用于经皮给药的药物组合物可以分立的贴片的形式存在,所述的贴片适合于保持与受体的表皮紧密地接触延长的时间。适用于经皮给药的组合物还可通过离子导入递送(参见例如 Pharmaceutical Research 3(6):318(1986))并典型地采用胰岛素化合物共轭物的任选缓冲水溶液的形式。合适的制剂包含柠檬酸盐或 bis/tris 缓冲液(pH 6)或乙醇/水,并包含 0.1 至 0.2M 的活性组分。

[0638] 在优选的实施方案中,所述的配合物作为固体脂肪酸制剂的成分给药,如描述于由 Opawale 等人于 2003 年 8 月 13 提交的美国专利申请 60/494,821 中所述的那样,其全部内容被并入本文中作为参考。

[0639] 在一些实施方案中,所述的胰岛素化合物共轭物可分别从所述阳离子和/或其它需要以形成所述固体的成分提供。例如所述的胰岛素化合物共轭物可以干燥固体,和包括

所述阳离子、稳定剂、防腐剂的缓冲溶液,和/或其它可分别提供的成分的形式提供,以使得使用者可将分离的组分组合以制成所述阳离子-胰岛素化合物共轭物配合物。

[0640] 12. 治疗方法

[0641] 所述阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物及其制剂可用于病症的治疗,其中循环胰岛素化合物增加的量(相对于没有从外源给药胰岛素化合物的情况下由对象提供的量)产生希望的治疗或生理效果。例如,所治疗的病症可以是 I 型或 II 型糖尿病,前驱糖尿病和/或代谢综合症。在一个实施方案中,将所述组合物给药以减轻糖尿病的症状。在另一个实施方案中,向前驱糖尿病对象给药所述组合物以预防或延缓糖尿病的发作。

[0642] 根据本发明的方法给药的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物的有效的量将根据混合物和对象的不同而稍有变化,并将取决于例如对象的年龄和状况,递送的途径和待治疗的状况等因素。这些剂量可根据本领域技术人员已知的常规药理学手段确定。

[0643] 作为一般性建议,约 0.025 至约 10mg/kg 的活性成分(即所述共轭物)的口服剂量将具有治疗效果,其中所有的重量基于胰岛素化合物共轭物的混合物的重量计算。更优选的范围为约 0.06 至约 1mg/kg,和甚至更优选的范围为约 0.125 至约 0.5mg/kg。

[0644] 非肠道给药剂量典型地为约 0.5 μ g/kg 至约 0.5mg/kg,其中所有的重量基于胰岛素化合物共轭物的混合物的重量计算。更优选的范围为约 1 μ g/kg 至约 100 μ g/kg。

[0645] 给药的频率一般为每天一次、两次或三次。或者随所需以控制状况。或者,所述的阳离子-胰岛素化合物共轭物组合物可通过持续灌注而给药。治疗的持续时间取决于待治疗的胰岛素化合物缺乏并可能是持续对象的寿命那样长。所述的配合物可以例如在饭前 0 至 30 分钟内给药。所述的配合物可以例如在临睡前 0 至 2 小时内给药。

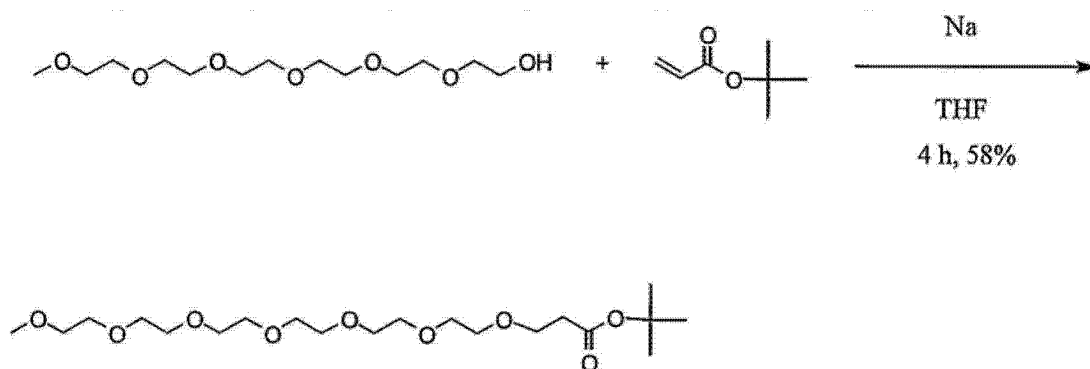
具体实施方式

[0646] 合成实施例

[0647] 下述实施例用于举例说明和解释本发明。

[0648] 1. 被保护的 MPEG₆C₃ 低聚物 (3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-丙酸叔丁酯)的合成

[0649]

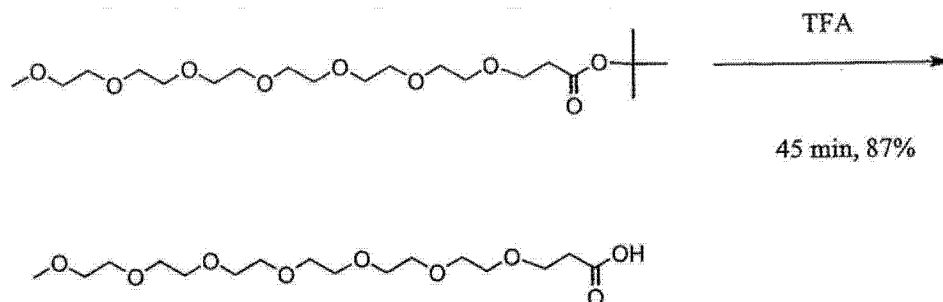


[0650] 将甲基六乙二醇(1.0g, 3.37mmol)和丙烯酸叔丁酯(0.216g, 1.69mmol)溶解于无水 THF (10mL)中。向该溶液中加入金属钠(0.4mg, 0.016mmol)。室温下搅拌 4h 后,将该反应混合物通过加入 1M HCl (15mL)淬灭。然后将淬灭的反应混合物用 CH₂Cl₂ 萃取(1×50mL, 1×25mL)。将有机层干燥(MgSO₄)并浓缩。经硅胶色谱法(乙酸乙酯作为洗脱液)纯化后,

获得的产物为油状物(0.832g, 58%)。

[0651] 2. MPEG₆C₃ 低聚物酸 (3-{2-[2-(2-{2-[2-(2- 甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丙酸) 的合成

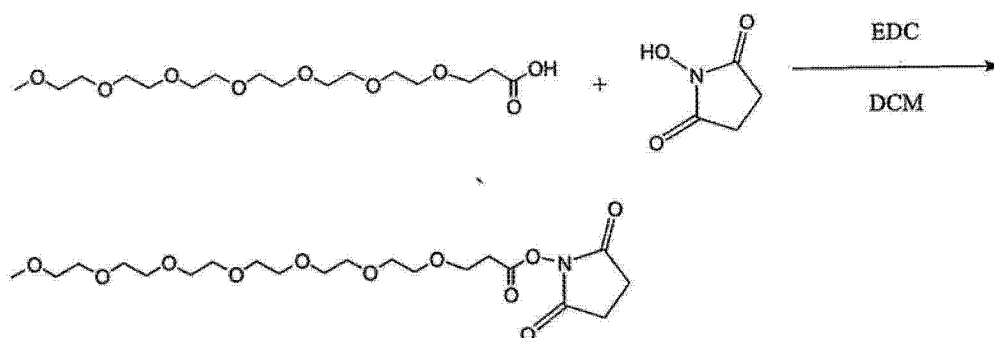
[0652]



[0653] 将所述叔丁酯(0.165g, 0.0389mmol)在三氟乙酸(2.0mL)中通过在室温下搅拌而脱保护。然后将内含物浓缩至恒重(0.125g, 87%)。

[0654] 3. 活化的 MPEG₆C₃ 低聚物 (3-{2-[2-(2-{2-[2-(2- 甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丙酸 2,5- 二氧化吡咯烷-1-基酯) 的合成

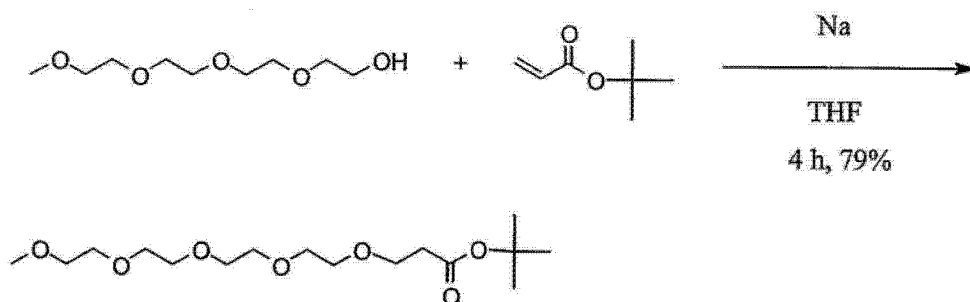
[0655]



[0656] 将所述酸(0.660g, 1.79mmol)和 N- 羟基琥珀酰亚胺(0.2278g, 1.97mmol)溶解于无水 CH₂Cl₂ (15mL) 中。加入乙基二甲氨基丙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, 0.343g, 1.79mmol)。室温下搅拌过夜后, 将该反应混合物用 CH₂Cl₂ 稀释并用水洗涤(2×45mL)。将有机层干燥(MgSO₄)并浓缩至恒重。产物为油状物(0.441g, 53%)。

[0657] 4. 保护的 MPEG₄C₃ 低聚物 (3-(2-{2-[2-(2- 甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酸叔丁酯) 的合成

[0658]

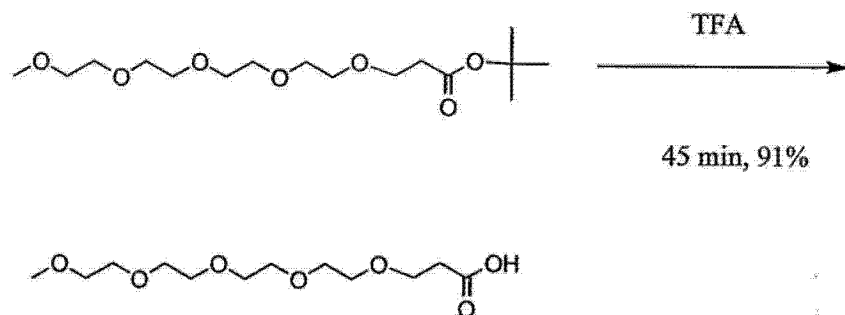


[0659] 将甲基四乙二醇(1.0g, 4.80mmol)和丙烯酸叔丁酯(0.308g, 2.40mmol)溶解于无水 THF (10mL) 中。向该溶液中加入金属钠(0.6mg, 0.024mmol)。室温下搅拌 4h 后, 将该反

应混合物通过加入 1M HCl (15 mL) 淬灭。然后将淬灭的反应混合物用 CH_2Cl_2 萃取 (1 × 50 mL, 1 × 25 mL)。将有机层干燥 (MgSO_4) 并浓缩。经硅胶色谱法 (乙酸乙酯作为洗脱液) 纯化后, 获得的产物为油状物 (1.28 g, 79%)。

[0660] 5. MPEG₆C₃ 低聚物酸 (3-(2-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酸) 的合成

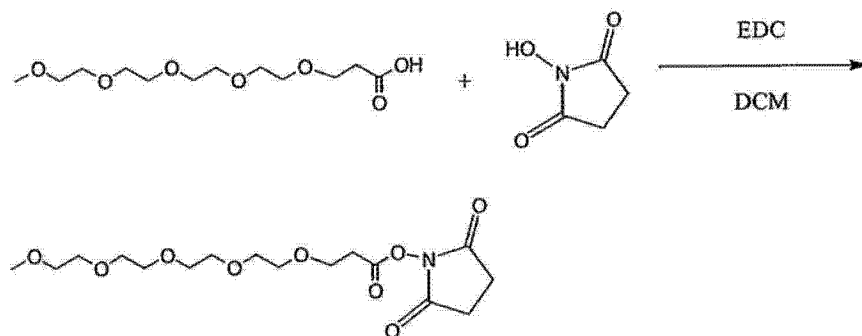
[0661]



[0662] 将所述叔丁基酯 (1 g, 3.42 mmol) 在三氟乙酸 (6.0 mL) 中通过在室温下搅拌而脱保护。然后将内含物浓缩至恒重 (0.87 g, 91%)。

[0663] 6. 活化的 MPEG₄C₃ 低聚物 (3-(2-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯) 的合成

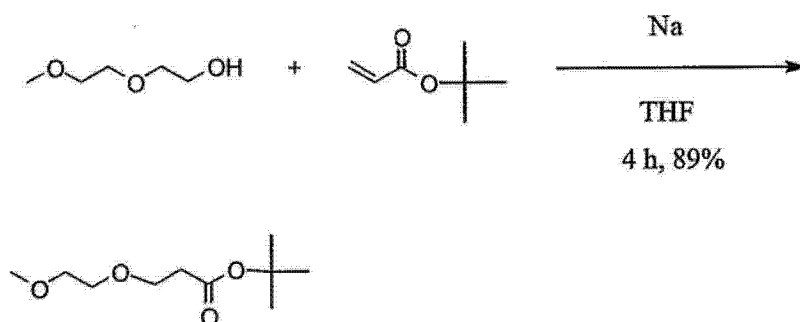
[0664]



[0665] 将所述酸 (0.6 g, 2.14 mmol) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (0.271 g, 2.35 mmol) 溶解于无水 CH_2Cl_2 (20 mL) 中。加入乙基二甲氨基丙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC, 0.409 g, 2.14 mmol)。室温下搅拌过夜后, 将该反应混合物用 CH_2Cl_2 稀释并用水洗涤 (2 × 45 mL)。将有机层干燥 (MgSO_4) 并浓缩至恒重。产物为油状物 (0.563 g, 69%)。

[0666] 7. 保护的 MPEG₄C₃ 低聚物 (3-(2-甲氧基-乙氧基)-丙酸叔丁酯) 的合成

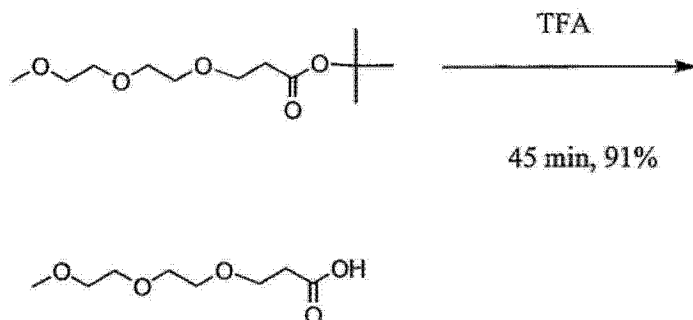
[0667]



[0668] 将甲基四乙二醇 (5.0 g, 41.6 mmol) 和丙烯酸叔丁酯 (2.66 g, 20.8 mmol) 溶解于无

水 THF(20mL)中。向该溶液中加入金属钠(0.47mg, 20.8mmol)。室温下搅拌 4h 后,将该反应混合物通过加入 1M HCl (30mL)淬灭。然后将淬灭的反应混合物用 CH_2Cl_2 萃取(1×100mL, 1×50mL)。将有机层干燥(MgSO_4)并浓缩。经硅胶色谱法(乙酸乙酯作为洗脱液)纯化后,获得的产物为油状物(7.5g, 89%)。

[0669] 8. MPEG₆C₃ 低聚物酸 (3-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-丙酸)的合成
[0670]



[0671] 将叔丁基酯(1g, 4.90mmol)通过在室温下在三氟乙酸(6.0mL)中搅拌而脱保护。然后将内含物浓缩至恒重(0.652g, 89%)。

[0672] 9. 2-[2-(2-丙氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙醇(1)的合成
[0673]



[0674] 将三乙二醇(19.5g, 0.13mol)溶解于四氢呋喃(150mL)中,并将氢化钠(2.60g, 0.065mol)在 0.5h 内分批加入,并将反应物继续搅拌另外的 1h。将溶解于四氢呋喃(30mL)中的 1-溴丙醇(8.0g, 0.065mol)通过滴液漏斗滴加,并将反应物在室温下搅拌过夜。将粗反应混合物通过硅藻土过滤,用 CH_2Cl_2 洗涤并蒸发至干。将所形成的油状物溶解于 CH_2Cl_2 (250mL)中,用饱和 NaCl (250mL)、 H_2O (250mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干。通过柱色谱(硅胶,乙酸乙酯)提供(1)为浅黄色油状物(2.24g, 18% 收率)。

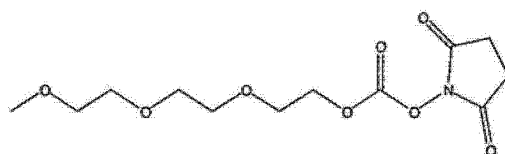
[0675] 10. 碳酸 4-硝基-苯基酯 2-[2-(2-丙氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙酯的合成
[0676]



[0677] 将 4-硝基氯甲酸盐(3.45g, 17.1mmol)和(1)(2.2g, 11.4mmol)溶解于 CH_2Cl_2 (20mL)中。搅拌 10min 后,在室温下加入 TEA (2.1mL, 15mmol)并搅拌过夜,粗反应产物用 CH_2Cl_2 (50mL)稀释,用 1M HCl (50mL)、 H_2O (50mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干。通过柱色谱(硅胶,乙酸乙酯/己烷:3:2)提供(2)为微黄色油状物(2.57g, 63% 收率)。

[0678] 11. 碳酸 2,5-二氧化代-吡咯烷-1-基酯 2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙酯的合成

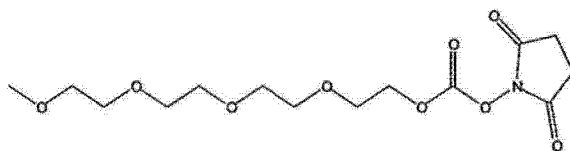
[0679]



[0680] 将三乙二醇单甲基醚(1.0g, 6.1mmol)和碳酸 N,N'-二琥珀酰亚胺基酯(1.87g, 7.3mmol)溶解于乙腈(10mL)中。然后在室温下加入三乙胺(1.3mL, 9.15mmol)并将反应搅拌过夜,将粗反应产物蒸发至干,溶解于饱和 NaHCO_3 (50mL)中,乙酸乙酯(2×50mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干。通过柱色谱(硅胶,乙酸乙酯)提供(1)为澄清油状物(0.367g, 20% 收率)。

[0681] 12. 碳酸 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基酯 2-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酯(1)的合成

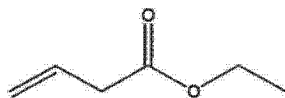
[0682]



[0683] 将四乙二醇单甲基醚(1.0g, 4.8mmol)和碳酸 N,N'-二琥珀酰亚胺基酯(1.48g, 5.8mmol)溶解于乙腈(10mL)中。然后在室温下加入三乙胺(1.0mL, 7.2mmol)并将反应搅拌过夜,将粗反应产物蒸发至干,溶解于饱和 NaHCO_3 (30mL)中,乙酸乙酯(2×30mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干。通过柱色谱(硅胶,乙酸乙酯/MeOH:20:1)提供(1)为澄清油状物(0.462g, 28% 收率)。

[0684] 13. 丁-3-烯酸乙酯的合成

[0685]



[0686] 将醋酸乙烯酯(10.0g, 0.12mol)溶解于乙醇(200mL)中,并加入浓硫酸(0.75mL, 0.014mol)。加热回流反应 4 小时。粗反应产物用乙酸乙酯(200mL)稀释,用 H_2O (200mL)、饱和 NaHCO_3 (200mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干,给出(1)为澄清油状物(3.17g, 23%)。

[0687] 14. 4-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丁酸乙酯的合成

[0688]



[0689] 将三乙二醇单甲基醚(4.27g, 0.026mmol)和丁-3-烯酸乙酯(1.5g, 0.013mol)溶解于四氢呋喃(10mL)中。加入块状的 Na^0 (0.030g, 0.013mmol)并将反应搅拌 4h。将粗反应产物用 1M HCl (20mL)淬灭,乙酸乙酯(3×20mL)洗涤。合并有机层并用 H_2O (2×10mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干,给出(2)为浅黄色油状物(1.07g, 30% 收率)。

[0690] 15. 4-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丁酸的合成

[0691]

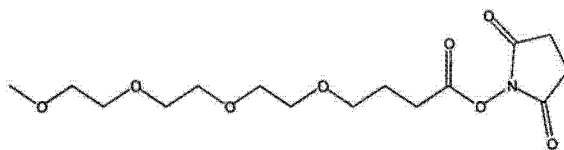


[0692] 将 4-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丁酸乙酯(1.07g, 4.0mmol)溶解于 1M NaOH (10mL)中并将反应搅拌 2h。将粗反应产物用饱和 NaCl (40mL)稀释,用浓 HCl 酸化至 $\text{pH} \sim 2$ 。 CH_2Cl_2 (2×50mL)洗涤, MgSO_4 干燥,并蒸发至干,给出(3)

为澄清油状物(0.945g, 94% 收率)。

[0693] 16. 4-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丁酸 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基酯的合成

[0694]

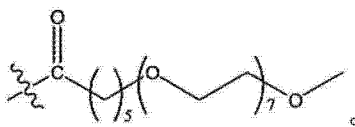


[0695] 将 N-羟基琥珀酰亚胺(0.55g, 4.8mmol) 和 EDCI (1.15g, 6.0mmol) 溶解于 CH_2Cl_2 (7mL) 中。然后加入溶解于 CH_2Cl_2 (2mL) 的 4-{2-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丁酸(0.940g, 3.8mmol) 室温下反应搅拌过夜, 将粗反应产物用 CH_2Cl_2 (21mL) 稀释, 用 1M HCl (30mL), H_2O (30mL) 洗涤, MgSO_4 干燥, 并蒸发至干。柱色谱(硅胶, 乙酸乙酯) 给出(4) 为澄清油状物(0.556g, 43% 收率)。

[0696] 配合物的制备

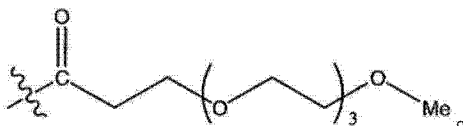
[0697] 本发明的发明人研究了胰岛素化合物共轭物的锌配合物的制备方法。该新方法, 优于已公开的用于胰岛素化合物和胰岛素化合物类似物的配位/结晶的方法, 其被开发以制备 HIM2 的锌配合物。HIM2 是在 B29 位具有结合的改性部分的人胰岛素单共轭物, 其中所述的改性部分具有如下结构:

[0698]



[0699] 其它的配合物用 IN105 制备, 在 B29 位具有结合的改性部分的人胰岛素单共轭物, 其中所述的改性部分具有如下结构:

[0700]



[0701] 所述方法提供三个主要类型, 胰岛素化合物共轭物固体的“T 型”和“R 型”和“鱼精蛋白”阳离子配合物。

[0702] 1. T 型固体的制备和分析

[0703] 1.1HIM2 的 T 型 Zn 配合物(2g/L) 的尝试性制备

[0704] 制备约为 2g/L 的 HIM2 溶液, 其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 10mL 等分试样(20mg 蛋白质) 中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 20 (或 40) μL 的 2 重量 % 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.1(或 5.5)。将该溶液在室温(或 +5 $^{\circ}\text{C}$) 下搅拌 15 分钟, 然后在室温(或 +5 $^{\circ}\text{C}$) 下静置一天以使得固体形成。在将该反应在室温(或在 +5 $^{\circ}\text{C}$) 下静置一天后, 没有晶体或沉淀形成。参见名称为“Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals”的美国专利 5,504,188 的实施例 2。

[0705] 1.2HIM2 的 T 型 Zn 配合物(10g/L 浓度)

[0706] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液, 其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的

10mL 等分试样(100mg 蛋白质)中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 40 μ L 的 10 重量 % 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.20。将该溶液 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 15 分钟,然后在 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下静置五天以使得固体形成。

[0707] 将反应混合物转移至离心管中并在 2000RMP 下离心 10 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2000RMP 下离心 10 分钟,之后将水倾出并将固体用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。同样,将所述样品在约 2000RMP 下离心约 10 分钟,之后将水倾出。该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2000RMP 下离心 10 分钟,之后将乙醇倾出。将样品在冻干机中干燥以给出白色固体。

[0708] 1.3HIM2 的 T 型 Zn 配合物(20g/L 浓度)

[0709] 制备约为 20g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl 。向上述溶液的 10mL 等分试样(200mg 蛋白质)中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 80 μ L 的 10 重量 % 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.37。将该溶液 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 15 分钟,然后在 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下静置四天以使得固体形成。

[0710] 将该反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出并将固体用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。将所述样品再次在约 2600RMP 下离心约 20 分钟,之后将水倾出。该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将样品在冻干机中干燥以给出白色固体。

[0711] 1.4HIM2 的 T 型 Zn 配合物(30g/L 浓度)

[0712] 制备约为 30g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl 。向上述溶液的 50mL 等分试样(1.5g 蛋白质)中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 600 μ L 的 10 重量 % 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.34。将该溶液在 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下静置五天以使得固体形成。

[0713] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤 3 次,每次洗涤都离心和倾出 H_2O 。然后将样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤 3 次。在 2800RMP 下离心 15 分钟,在每次洗涤后将乙醇倾出。将样品在冻干机中干燥以给出白色固体。

[0714] 图 1 和图 2 为利用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄的光学显微照片,其显示生长 24 小时的晶体。在图 1 中,晶体大小为长约 11.3 μM ,直径约 5.3 μM 。在图 2 中,左边的晶体大小为长约 15.1 μM ,直径约 5.9 μM ,右边的晶体大小为长约 9.1 μM ,直径约 5.3 μM 。图 3 为利用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄的光学显微照片,其显示生长 5 天的晶体。在一个方面,本发明包括具有如图 1、2 或 3 所示的形态的晶体。

[0715] 1.5HIM2 的 T 型 Zn 配合物(50g/L 浓度)

[0716] 制备约为 50g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl 。向上述溶液的 10mL 等分试样中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 200 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.23。将该溶液在 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 15 分钟,然后在 +5 $^{\circ}\text{C}$ 下静置四天以使得发生固体形成。

[0717] 将该反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出并将固体

用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。将所述溶液在约 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出并将该固体用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。将所述样品再次在约 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将样品在冻干机中干燥三天。

[0718] 1.6HIM2 的 T 型 Zn 配合物(1g 的规模)

[0719] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 50mL(500mg 蛋白质)等分试样中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 200 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.49。将该溶液在 +5°C 下搅拌 15 分钟,然后在 +5°C 下静置七天以使得发生固体形成。

[0720] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。另外再重复水洗涤两次。然后该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品在冻干机上干燥四天。

[0721] 1.7 在中性 pH 下 HIM2 的 T 型 Zn 配合物(5g 的规模)

[0722] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向该样品中加入 2mL 的 10% ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.05。将该溶液在室温下搅拌过夜使得发生固体形成。

[0723] 将乳状 Zn-HIM2 反应混合物(500mL)部分加入 350mL 细烧结的(4.5–5 μ m)盘式漏斗(disc funnel)(ChemGlass CG1402-28,90mm 直径)。在侧臂烧瓶(side-arm flask)中收集滤液,同时施加真空约 4–6 小时。任选的,滤饼可以用 100mL 冷的 1% ZnCl_2 洗涤,并分别收集滤液。滤饼用 100mL 冰水洗涤,并再次收集滤液。所述滤饼同样用另外 100mL 100% 冰冻乙醇洗涤并再次收集滤液。最后用 100mL 新制的冰水洗涤所述滤饼并收集最终的滤液。将所述的滤饼在真空下干燥和 / 或空气干燥 12–18 小时。干燥后,将滤饼从漏斗上刮下,称重,并通过 HPLC 测量水分 / 蛋白质含量。从多步洗涤步骤中收集的滤液也用 HPLC 分析以测定在操作过程中损失的 Zn-HIM2 的浓度。过滤收回 2.5 重量 % 的 Zn 含量,其中总收率为 98%。

[0724] 1.8 在中性 pH 下 HIM2 的 T 型 Zn 配合物(500mg 的规模)

[0725] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向该样品中加入 200 μ L 的 10% ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.06。将该溶液在 +5°C 下搅拌 15 分钟,然后在 +5°C 下静置 2 天使得发生固体形成。

[0726] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。另外再重复水洗涤两次。然后该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品在冻干机上干燥两天。

[0727] 1.9T 型固体组合物的结果

[0728]

反应	观察结果	溶解度 (mg/mL)	Zn 重量%
9.1.1	没有固体形成	N/A	N/A
9.1.2	白色固体	NEM	NEM
9.1.3	白色固体	NEM	NEM
9.1.4	白色固体	NEM	0.53
9.1.5	白色固体	146	0.66
9.1.6	白色固体	109	0.55
9.1.7	白色固体	ND	2.50
9.1.8	白色固体	ND	1.63

[0729] NEM = 没有足够的物质

[0730] ND = 没有数据

[0731] 2. R 型固体的制备和分析

[0732] 2.1 具有苯酚的在 2g/L 的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物

[0733] 制备约为 2g/L 的 HIM2 溶液,其具有最终 pH ~ 3 含有冰醋酸。向上述溶液的 10mL 等分试样中加入 33 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.89。向该样品中加入 160 μ L 的 10 重量%的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下静置三天以形成更多的沉淀。

[0734] 将反应混合物转移至离心管中并在 3400RMP 下离心 15 分钟。将上清液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 3200RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。然后将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 3200RMP 下离心 15 分钟,之后将乙醇倾出。再次将该样品用 5mL 冷的乙醇洗涤但不离心。使样品沉积于所述管的底部,然后放置于快速真空仪中干燥。

[0735] 2.220g/L 的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0736] 制备约为 20g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 10mL 等分试样中加入 66 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 6.43。向该样品中加入 320 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下放置四天以形成更多的沉淀。

[0737] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出,并将该样品用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。再次将样品在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将样品冷冻干燥三天。

[0738] 2.330g/L 的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0739] 制备约为 30g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH ~ 3 含有 10%HCl。向上述溶液的 10mL 等分试样中加入 99 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 6.47。然后向该样品中加入 480 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下静置四天以形

成更多的沉淀。

[0740] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出,并将该样品用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。再次将样品在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将样品冷冻干燥三天。

[0741] 图 4 显示生长 4 天的固体。该图片用 Zeiss Axiovert 显微镜拍摄。晶体的平均长度为约 9.7 μ M。

[0742] 2.450g/L 的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0743] 制备约为 50g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 10mL 等分试样中加入 165 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 6.82。然后向该样品中加入 800 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下静置四天以形成更多的沉淀。

[0744] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出,并将该样品用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。再次将样品在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将样品冷冻干燥三天。

[0745] 2.51g 规模的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0746] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 50mL 等分试样中加入 165 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 6.42。然后向该样品中加入 800 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下静置七天以形成更多的沉淀。

[0747] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。以相同方式再进行两次水洗涤。然后将该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。以相同方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品放置于冷冻干燥机上四天。

[0748] 2.65g 规模的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物

[0749] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH $\sim$ 3 含有 10% HCl。向 450mL 上述溶液中加入 1500 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.1。然后向该样品中加入 1800 μ L 的 10% 的 ZnCl_2 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下静置过夜以形成更多的沉淀。

[0750] 将上述进行的反应分成三份过滤试验。在试验一中,将反应混合物通过细烧结的漏斗过滤,然后用 1% ZnCl_2 溶液洗涤。将所述物质通过真空过滤干燥过夜。第二个试验经过还包含滤纸的中等烧结的过滤器过滤。然后将物质用乙醇和水洗涤并通过真空过滤干燥过夜。最后,第三个试验通过细烧结漏斗过滤,用 1% ZnCl_2 溶液洗涤,并用乙醇和水洗涤。这些物质同样在真空过滤下干燥过夜。

[0751]

	试验 1 (细烧结, ZnCl ₂ 洗涤, 不用 H ₂ O/EtOH 洗涤)	试验 2 (滤纸, 中等烧结, EtOH/H ₂ O 洗涤)	试验 3 (细烧结, EtOH/H ₂ O 洗涤)
收率	74%	93%	58%
Zn 的重量%	1.99	2.83	2.06
苯酚的重量%	0.033	0.45	1.28

[0752] 2.7 在中性 pH 下 HIM2 的 R 型 Zn 配合物

[0753] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液, 其最终 pH ~ 3 含有 10%HCl。向 50mL 上述溶液中加入 165 μ L 液化的苯酚。然后向该样品中加入 200 μ L 的 10% 的 ZnCl₂ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.18。将该溶液在室温下放置两天以形成沉淀。

[0754] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 20 分钟。然而所述物质在开始没有沉积到所述管的底部, 因此离心约 2 小时。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2800RMP 下离心 60 分钟, 之后将水倾出。另外再重复水洗涤两次。然后该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2800RMP 下离心 60 分钟, 之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤。在第三次 EtOH 洗涤之后物质是混浊的, 将其放置于冰箱中过夜以使反应物沉积更多。将溶剂倾出并将该物质放置于冻干机上两天。

[0755] 2.8R 型固体组合物的结果

[0756]

反应	观察结果	溶解度 (mg/mL)	Zn 重量%	苯酚
9.2.1	白色固体	NEM	NEM	NEM
9.2.2	白色固体	44.75	1.21	0.097
9.2.3	白色固体	50.49	1.74	0.41
9.2.4	白色固体	36.24	2.32	0.52
9.2.5	白色固体	47.7	1.06	0.16
9.2.6	白色固体	ND	见上	见上
9.2.7	白色固体	ND	1.74	1.62

[0757] NEM = 没有足够的物质

[0758] ND = 没有数据

[0759] 3. 鱼精蛋白固体的制备和分析

[0760] 3.1 在酸性 pH 下具有鱼精蛋白的 HIM2 的 T 型 Zn 配合物的制备

[0761] 将鱼精蛋白加入最终 pH ~ 3 含有 10%HCl 的 10g/L 的 HIM2 储备溶液中。向上述溶液的 10mL 等分试样 (100mg 蛋白质) 中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。向该样品中加入 200 μ L 的 10% 的 ZnCl₂ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 pH ~ 5。将该溶液在在 +5°C 下

搅拌 15 分钟,然后在 +5℃ 下静置两天以发生固体形成。

[0762] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。以同样方式再进行两次水洗涤。然后该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品放在冻干机两天。

[0763] 3.2 在中性 pH 下具有鱼精蛋白的 HIM2 的 T 型 Zn 配合物的制备

[0764] 制备约为 30g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 50mL 等分试样 (1.5g 蛋白质) 中加入 1 毫升冰醋酸。将 600 μ L 的 ZnCl_2 溶液加入到反应中,随后加入 225 毫克鱼精蛋白。用浓氢氧化铵将 pH 调至 6.95,并将该溶液在 +5℃ 下静置两天以发生固体形成。

[0765] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。以同样方式再进行两次水洗涤。然后该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品放在冻干机上三天。

[0766] 3.3 在酸性 pH 下具有鱼精蛋白的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0767] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 150mL 等分试样 (1.5g 蛋白质) 中加入液化的苯酚 (2.48mL)。用浓氢氧化铵将反应的 pH 调至 pH ~ 6.75。将 12 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液加入到反应中,随后加入 225 毫克鱼精蛋白。将反应混合物在室温下搅拌 15 分钟,之后在室温下静置两天以使得发生固体形成。

[0768] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。以同样方式再进行两次水洗涤。然后该样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品放在冻干机上两天。

[0769] 3.4 在中性 pH 下具有鱼精蛋白的 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0770] 制备约为 10g/L 的 HIM2 溶液,其 pH ~ 3 含有 10% HCl。向 150mL 反应物中加入液化的苯酚 (495mL)。将 600 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液加入到反应中,随后加入 75 毫克鱼精蛋白。用浓氢氧化铵将反应的 pH 调至 pH 为 7.01。将反应混合物在室温下静置三天以使得发生固体形成。

[0771] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 50mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。以同样方式再进行两次水洗涤。然后该样品用 50mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式再进行两次乙醇洗涤,之后将样品放在冻干机上两天。

[0772] 3.5 鱼精蛋白固体组合物的结果

[0773]

反应	观察结果	溶解度 (mg/mL)	Zn 重量%	苯酚
9.3.1	白色固体	ND	0.66	N/A
9.3.2	白色固体	ND	2.47	N/A
9.3.3	白色固体	36.78	1.22	9.87
9.3.4	白色固体	NEM	NEM	NEM

[0774] NEM = 没有足够的物质

[0775] ND = 没有数据

[0776] 4. 胰岛素化合物二共轭物的制备和分析

[0777] 4.1 在 A1 和 B29 处的胰岛素化合物二共轭物的 T 型 Zn 配合物

[0778] 将具有在人胰岛素的 B29 和 A1 处结合的改性部分 $-C(O)(CH_2)_5(OCH_2CH_2)_7OCH_3$ 的胰岛素化合物二共轭物 (DICON-1) 加到被制成最终 pH 为 3.15 的、具有 10% HCl 的、约 10g/L 的溶液中。向上述溶液的 3.75mL 等分试样中加入冰醋酸至最终浓度为 0.25M。然后向该样品中加入 15 μ L 10% 的 $ZnCl_2$ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 4.90。将该溶液在 +5°C 下搅拌 15 分钟,然后在 +5°C 下静置六天以使得固体形成(产生白色固体)。

[0779] 4.2 在 A1 和 B29 处的胰岛素化合物二共轭物的 R 型 Zn 配合物

[0780] 将 DICON-1 加到被制成最终 pH 为 3.15 的、具有 10% HCl 的、约 10g/L 的溶液中。向上述溶液的 3.75mL 等分试样中加入 12 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.75。向该样品中加入 60 μ L 10% 的 $ZnCl_2$ 溶液。将该溶液在室温下搅拌 15 分钟,然后在室温下放置六天以使得更多沉淀形成(产生白色固体)。

[0781] 将反应混合物转移至离心管中并在 2600RMP 下离心 20 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出并将固体用另外 5mL 冷的 DI 水洗涤。再次将所述样品在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将水倾出。将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2600RMP 下离心 20 分钟,之后将乙醇倾出。将该样品冷冻干燥六天。

[0782] 4.3 二共轭物 B1, B29 (10mg/mL)

[0783] 将 DICON-1 加到约 10g/L 的溶液中,并加入 33 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 5.34。向该样品中加入 160 μ L 10% 的 $ZnCl_2$ 溶液。将该溶液在室温下静置两周以使得发生固体形成(产生白色固体)。

[0784] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤三次。将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,每次洗涤之后将上清液倾出。然后将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤三次。再次将该样品在 2600RMP 下离心 15 分钟,每次洗涤之后将上清液倾出。将样品冷冻干燥两天。

[0785] 4.4 二共轭物 B1, B29 (10mg/mL)

[0786] 将 DICON-1 加到约 20g/L 的溶液中,并加入 66 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.65。向该样品中加入 320 μ L 10% 的 $ZnCl_2$ 溶液。将该溶液在室温下放置两周以使得发生固体形成(产生白色固体)。

[0787] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固

体用 5mL 冷的 DI 水洗涤三次。将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,每次洗涤之后将上清液倾出。然后将该样品用 5mL 200proof 冷的乙醇洗涤三次。再次将该样品在 2600RMP 下离心 15 分钟,每次洗涤之后将上清液倾出。将样品冷冻干燥两天。

[0788] 5. T 型 IN105 固体的制备和分析

[0789] 5. 1IN105 单共轭物的 T 型 Zn 配合物(10g/L 浓度)

[0790] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液(100mg),其具有最终 pH ~ 3 含有 10% HCl。向该样品中加入 50 μ L 10 重量 % 的 ZnCl₂ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.52。将该混浊溶液搅拌并将其在室温下静置五天以使得固体形成。

[0791] 将反应混合物转移至离心管中并在 2900RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 3×10mL 冷的 DI 水洗涤。将该溶液在 2900RMP 下离心 10 分钟,之后将水倾出并将固体用另一部分的冷的 DI 水洗涤。然后该样品用 3×10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2900RMP 下离心 10 分钟,之后将乙醇倾出。将该样品真空干燥给出白色固体(90mg)。

[0792] 5. 2IN105 单共轭物的 T 型 Zn 配合物(1g 规模)

[0793] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液(1g),其最终 pH 为 ~ 3 含有 10%HCl。向该样品中加入 500 μ L 10% 的 ZnCl₂ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 ~ 7.4。将该混浊溶液搅拌 15 分钟并将其在室温下静置 ~ 2 天,之后过滤。

[0794] 将反应混合物在吸尘器真空(house vaccum)下通过烧结玻璃漏斗(细)过滤。将带有过滤物质的烧结玻璃漏斗放置于真空下在玻璃干燥器(glass dessicator)中过夜给出白色细粉(900mg)。

[0795] 5. 3 在中性 pH 下 IN105 单共轭物的 T 型 Zn 配合物(5g 规模)

[0796] 约为 10g/L 的 IN105 溶液(5g,货号 Nobex040706L)被制备为最终 pH 为 ~ 3 含有 10% HCl。向该样品中加入 2mL 10% 的 ZnCl₂ 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 ~ 7.4。然后将该混浊溶液在室温下放置过夜以使得固体形成,之后过滤。

[0797] 将上述进行的反应分到 4×50mL 离心管中,并最初在 3200RPM 下离心共 2 小时。然后将所述物质在 9000RPM 下离心 20 分钟,并在 5°C 下储存过夜。将每只管中的上清液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将所述管倒置并在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将水倾出并将固体用另外 10mL 冷的 DI 水洗涤。再次将样品在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将水倾出。将样品用 2×10mL 200proof 冷的乙醇洗涤,并在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将乙醇倾出。将样品真空干燥两天给出 1.64g 白色粉末(货号 Nobex040730L-A)。

[0798] 5. 4T 型 IN105 固体组合物的结果

[0799]

反应	观察结果	在 pH 为约 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中的溶解度 (mg/mL)	Zn 重量%
9.5.1	白色固体	80-85	0.0
9.5.2	白色固体	10-20	1.67
9.5.3	白色固体	ND	1.88

[0800] 6. R 型 IN105 固体的制备和分析

[0801] 6.1 在中性 pH 下 IN105 共轭物的 R 型 Zn 配合物

[0802] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液(500mg),其最终 pH 为 ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液中加入 200 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液和 165 μ L 液化的苯酚。用浓氢氧化铵将 pH 调至 7.37。然后将该混浊溶液在室温下静置两天以使得固体形成,之后过滤。

[0803] 将反应混合物在吸尘器真空(house vacuum)下通过烧结玻璃漏斗(细)过滤。将带有过滤物质的烧结玻璃漏斗放置于真空下的玻璃干燥器(glass dessicator)中过夜给出白色细粉(440mg)。

[0804] 6.25g 规模的 IN105 共轭物的 R 型 Zn 配合物

[0805] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液(4.2g, 货号 Nobex040706L),其最终 pH 为 ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液中加入 1.5 液化的苯酚和 1.8mL 10% 的 ZnCl_2 溶液。用浓氢氧化铵将 pH 调至 ~ 7.4 。然后将该非常混浊的溶液在室温下放置过夜以使得更多的沉淀形成。

[0806] 将上述进行的反应分到 4 $\times$ 50mL 离心管中,并最初在 3200RPM 下离心 2 小时。然后将所述物质在 9000RPM 下离心 20 分钟,并在 5 $^{\circ}\text{C}$ 下储存过夜。将每只管中的上清液倾出并将固体用 10mL 冷的 DI 水洗涤。将所述管倒置并在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将水倾出并将固体用另外 10mL 冷的 DI 水洗涤。再次将样品在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将水倾出。将样品用 2 $\times$ 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤,并在 3200RPM 下离心 ~ 1 小时,之后将乙醇倾出。将样品真空干燥 2 天给出 2.34g 白色粉末。

[0807] 6.3R 型 IN105 固体组合物的结果

[0808]

反应	观察结果	溶解度 (mg/mL) *	Zn 重量%	苯酚重量%
9.6.1	白色固体	ND	1.85	2.37
9.6.2	白色固体	10-25	1.71	2.66

[0809] ND = 没有数据

[0810] *: 在 pH 约为 7.4 的磷酸盐缓冲液中

[0811] 7. 鱼精蛋白 IN105 固体的制备和分析

[0812] 7.1 在酸性 pH 下具有鱼精蛋白的 IN105 单共轭物的 R 型 Zn 配合物的制备

[0813] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液,其最终 pH 为 ~ 3 含有 10% HCl。向上述溶液的 15mL 等分试样(150mg 蛋白质)中加入液化的苯酚(248 μ L)。用浓氢氧化铵将反应的 pH 调至 pH ~ 6.50 。向该反应中加入 1 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液,随后加入 22.5 微克鱼精蛋白。然后将该反应混合物在室温下搅拌 15 分钟,之后将其在室温下静置两天以使得发生固体形成。

[0814] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 5mL 冷的 DI 水洗涤,将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。以同样方式进行另外两次水洗涤。然后将样品用 10mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式进行另外两次乙醇洗涤,之后将样品真空干燥 2 天。

[0815] 7.2 在中性 pH 下具有鱼精蛋白的 IN105 共轭物的 R 型 Zn 配合物的制备

[0816] 制备约为 10g/L 的 IN105 溶液,其最终 pH 为 ~ 3 含有 10% HCl。向 15mL 反应中

加入液化的苯酚(49.5 μ L)。然后向反应中加入 60 μ L 10% 的 ZnCl_2 溶液,随后加入 7.5mg 鱼精蛋白。用浓氢氧化铵将 pH 调至 pH 为 7.00。将该反应在室温下放置三天以使得固体形成。

[0817] 将反应混合物转移至离心管中并在 2800RMP 下离心 15 分钟。将溶液倾出并将固体用 5.0mL 冷的 DI 水洗涤,将该溶液在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将水倾出。以同样方式进行另外两次水洗涤。然后将样品用 50mL 200proof 冷的乙醇洗涤并在 2800RMP 下离心 15 分钟,之后将乙醇倾出。以同样方式进行另外两次乙醇洗涤,之后将样品真空干燥 2 天。

[0818] 7.3IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物的制备

[0819] 将粗制的包含 25% 有机酸的 15mg/mL 的 IN105 溶液用 1M HCl 调节 pH 至 3.47。将固态苯酚在 40–60°C 的温水浴中熔化并将 0.218mL 加入到反应烧瓶中。然后向反应中加入 0.4mL4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液用 1M NaOH 将该溶液的 pH 调至最终 pH 为 6.6。当调节 pH 时,在如下 pH 值时,抽出 10mL 等分试样:4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4 和 6.6。将这些样品不搅拌静置 24 小时。在显微镜下观察到针状晶体。

[0820] 7.4 包含 30% 有机酸的 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物的制备

[0821] 新制的 15mg/mL 的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将 pH 用 1M HCl 调至 2.81。向该溶液中加入液化的苯酚 0.040mL 和 95% 乙醇 4.25mL。然后将 0.400mL 的 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液加入到反应混合物中。用 50% NH_4OH 将所述溶液的 pH 从 3.7 调至 5.4,并在每个如下 pH 值时,抽出 1mL 等分试样:4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示针状晶体(参见图 5)得自 pH 为 4.0 至 5.2。

[0822] 7.5 在 100mM 乙酸铵缓冲液(30、20 和 10% 乙醇)中 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物的制备

[0823] 新制的 15mg/mL 的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物溶液在 100mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将 pH 用 5M HCl 调至 2.8。向该溶液中加入液化的苯酚 0.040mL 和 95% 乙醇 4.25mL。然后将 0.400mL4% 的酸化 ZnCl_2 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH_4OH 将所述溶液的 pH 从 2.9 调至 5.6,并在每个如下 pH 值时,抽出 0.5mL 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示针状晶体得自 pH 为 4.4 至 4.8。

[0824] 新制的 15mg/mL 的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物溶液在 100mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将 pH 用 5M HCl 调至 2.8。向该溶液中加入液化的苯酚 0.040mL 和 95% 乙醇 2.25mL。然后将 0.400mL4% 的酸化 ZnCl_2 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH_4OH 将所述溶液的 pH 从 2.9 调至 5.6,并在每个如下 pH 值时,抽出 0.5mL 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示环状晶体得自 pH 为 4.8 至 5.4。

[0825] 新制的 15mg/mL 的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物在 100mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将 pH 用 5M HCl 调至 2.8。向该溶液中加入液化的苯酚 0.040mL 和 95% 乙醇 1.15mL。然后将 0.400mL 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH_4OH 将所述溶液的 pH 从 2.8 调至 5.6,并在每个如下 pH 值时,抽出 0.5mL 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示针状晶体得自 pH

为 5.0 至 5.6。

[0826] 7.6 在 20% 有机酸中用 0.1 和 0.2% 苯酚制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0827] 新制的 15mg/mL 的 MPEG₃ 丙酰基胰岛素化合物溶液在 100mM 乙酸铵缓冲液中制备, 并将 pH 用 5M HCl 调至 3.0。向该溶液中加入液化的苯酚 0.010mL 和 95% 乙醇 2.5mL。然后将 0.400mL 4% 的酸化 ZnCl₂ 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH₄OH 将所述溶液的 pH 从 3.2 调至 5.6, 并在每个如下 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示环状晶体得自 pH 为 4.4 至 5.4。

[0828] 新制的 15mg/mL 的 MPEG₃ 丙酰基胰岛素化合物在 100mM 乙酸铵缓冲液中制备, 并将 pH 用 5M HCl 调至 3.0。向该溶液中加入液化的苯酚 0.020mL 和 95% 乙醇 2.5mL。然后将 0.400mL 4% 的酸化 ZnCl₂ 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH₄OH 将所述溶液的 pH 从 3.3 调至 5.6, 并在每个如下 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6。将该样品不搅拌下静置 24 小时。24 小时后拍摄的显微镜照片显示环状晶体得自 pH 为 4.4 至 5.2。

[0829] 7.7 以 8 克规模, pH 为 4.8 和室温下制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0830] 新制的 15mg/mL 的 MPEG₃ 丙酰基胰岛素化合物溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备, 并将 pH 用 5M HCl 调至 2.0。向该溶液中加入液化的苯酚 2.13mL 和 95% 乙醇 225mL。然后将 21.3mL 4% 的酸化 ZnCl₂ 溶液加入到反应混合物中。用 5M NH₄OH 将所述溶液的 pH 调至 4.8。将该样品不搅拌下放置 24 小时, 之后收集晶体。在显微镜照片中 T = 0 处看到针状晶体。

[0831] 通过将反应混合物分到 6×250mL 离心管中收集所述晶体。将所述管在 10℃ 下在 10,000RPM 下旋转 8 分钟, 之后将上清液倾出。然后向每个管中加入 10mL 冷水, 之后将所述的 6 个管合并成 2 个管。离心过程用冷水再重复一次和用冷乙醇再重复 2 次。然后将晶体用桌式冻干机干燥 2 天。该过程产生的产率相对于原料为 93 重量 %。

[0832] 7.8 以 1.5 克规模, pH 为 4.8 和室温下制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0833] 新制的 MPEG₃ 丙酰基胰岛素化合物(IN 105)溶液通过将 1.52g 固体 IN105 溶解于 pH 为 7.5 的 100mL 250mM 的乙酸铵中而制备。该溶液的 pH 用 5M HCl/5M NH₄OH 调至 2.8。将固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向反应烧瓶中加入 400 μL 熔化的苯酚和 42.5mL 95% 乙醇。然后向反应烧瓶中加入 4mL 4% 的酸化 ZnCl₂ 水溶液。将形成的溶液的 pH 用 5M NH₄OH 调至 4.8。然后将该反应不搅拌静置 48 小时, 之后收集晶体。在 12 小时后通过显微镜下观察到针状晶体形成。

[0834] 通过将反应浆液分到 4×50mL 离心管中收集所述晶体。开始, 将所述管在 1000RPM 下旋转 8 分钟, 然后将上清液倾出。在每个管中的晶体用 1×5mL 等分试样的冰水洗涤并在 3000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。用 1×5mL 等分试样的冰水, 然后用 1×5mL 等分试样的冷冻的乙醇重复洗涤 / 旋转过程。然后在真空干燥器中将晶体干燥过夜。该过程产生的产率相对于原料为 73 重量 %。

[0835] 7.9 以 1.5 克规模, pH 为 4.4 和室温下制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0836] 新制的 MPEG₃ 丙酰基胰岛素化合物(IN 105)溶液通过将 1.50g 固体 IN105 溶解于 pH 为 7.5 的 100mL 250mM 的乙酸铵中而制备。该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.6。将固态

苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向反应烧瓶中加入 400 μ L 熔化的苯酚和 42.5mL 95% 乙醇。然后向反应烧瓶中加入 4mL 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。将形成的溶液的 pH 用 5M NH_4OH 调至 4.4。然后将该反应不搅拌静置 22 小时,之后收集晶体。在 2 小时后通过显微镜下观察到针状晶体的混合物和沉淀的形成。反应混合物在 21 小时后通过显微镜显示完全结晶。

[0837] 通过将反应浆液转移到 1×250mL 离心管中收集所述晶体。将所述管在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。将晶体用冰水的 1×20mL 等分试样洗涤并在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。用冰水的 1×20mL 等分试样,然后用冷冻的乙醇的 2×20mL 等分试样和最后用冰水的 1×20mL 等分试样重复洗涤 / 旋转过程。然后在真空干燥器中将晶体干燥过夜。该过程产生的产率相对于原料为 67 重量 %。

[0838] 7.10 以 8.0 克规模, pH 为 4.8 和室温下制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0839] 新制的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物(IN 105)溶液通过将 7.98g 固体 IN105 溶解于 pH 为 7.5 的 533mL 250mM 的乙酸铵中而制备。该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.4。将固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向反应烧瓶中加入 2.13mL 熔化的苯酚和 225mL 95% 乙醇。然后向反应烧瓶中加入 21.3mL 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。将形成的溶液的 pH 用 5M NH_4OH 调至 4.8。然后将该反应不搅拌静置 21 小时,之后收集晶体。反应混合物在 2 小时后通过显微镜显示完全结晶。

[0840] 通过将反应浆液分到 6×250mL 离心管中收集所述晶体。将所述管在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。在每个管中的晶体用冰水的 1×10mL 等分试样洗涤并然后在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。用冰水的 1×10mL 等分试样,然后用冷冻的乙醇的 2×10mL 等分试样和最后用冰水的 1×10mL 等分试样重复洗涤 / 旋转过程。然后在真空干燥器中将晶体干燥 2 天。该过程产生的产率相对于原料为 87 重量 %。

[0841] 7.11 以 10.0 克规模, pH 为 4.8 和室温下制备 IN105 的 R 型结晶的 Zn 配合物

[0842] 新制的 MPEG_3 丙酰基胰岛素化合物(IN105)溶液通过将 10.06g 固体 IN105 溶解于 pH 为 7.5 的 670mL 250mM 的乙酸铵中而制备。该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.6。固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向反应烧瓶中加入 2.7mL 熔化的苯酚和 285mL 95% 乙醇。然后向反应烧瓶中加入 27mL 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将形成的溶液的 pH 用 5M NH_4OH 调至 4.4。然后将该反应不搅拌静置 21 小时,之后收集晶体。在 2 小时后通过显微镜观察到反应混合物显示完全结晶。

[0843] 通过将反应浆液分到 6×250mL 离心管中收集所述晶体。最初将所述管在 10℃ 下,在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。在每个管中的晶体用冰水的 1×10mL 等分试样洗涤并然后在 10,000RPM 下旋转 8 分钟。然后将上清液倾出。用冰水的 1×30mL 等分试样,然后用冷冻乙醇的 2×30mL 等分试样和冰水的 1×30mL 等分试样重复洗涤 / 旋转过程。然后用台式冻干机中将所得晶体干燥 3 天。该过程产生的产率相对于原料为 89 重量 %。

[0844] 8. 采用有机溶剂结晶的 HIM2 的 Zn 配合物的制备和分析

[0845] 8.1 HIM2 的 R 型 Zn 配合物的制备

[0846] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 3.5mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 600 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.14 调至 6.0 并

在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4 (参见图 6A)、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 (参见图 6B)、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 时为针状晶体。pH 为 4.6–6.0 范围内显示出各种形状和大小的大的,结晶状固体。

[0847] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 3.5mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 400 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.22 调至 6.0 并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2 (参见图 7A)、5.4、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.6–6.0 范围内各种形状和大小的结晶状固体。

[0848] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 3.5mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 200 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.19 调至 6.0,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 (参见图 7B)、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4–4.6 范围内各种形状和大小的结晶状固体。在 pH 为 4.8–5.2 范围内显示更均匀的针状晶体。

[0849] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 2.6mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 600 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.04 调至 6.0,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 (参见图 8A)、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4–4.6 范围内为板状、雪片状晶体。

[0850] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 2.6mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 400 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.05 调至 6.0,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 (参见图 8B)、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.0 时为针状晶体,在 pH 为 5.2 时为结晶状固体,在 pH 为 5.4 时为板状、雪片状晶体。

[0851] Rxn6 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.95。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 2.6mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 200 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.09 调至 6.0 并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样:4.2、4.4、4.6、4.8 (参见图 9A)、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.8–5.6 时为针状晶体和结晶状固体。

[0852] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 250 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.97 调至 5.8 并

在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.6–5.8 时为结晶状沉淀。

[0853] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 200 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.06 调至 5.8 并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 (参见图 9B)、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.6–5.6 时为结晶状沉淀。

[0854] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 150 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.09 调至 5.8,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.0–5.2 时为各种大小和形状的晶体。

[0855] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 40 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 100 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.09 调至 5.8,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0 (参见图 10A)、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.0 时为针状晶体,和在 pH 为 5.2–5.6 时为各种大小和形状的结晶物质。

[0856] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 20 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 250 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.08 调至 5.8,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH4.8–5.8 时为结晶状沉淀。

[0857] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 20 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 200 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.05 调至 5.8,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌放置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示非常小的结晶状固体。

[0858] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 20 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混合物中加入 200 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.05 调至 5.8,并在每个如下希望 pH 值时,抽出 500 μ L 等分试样 :4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌放置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示非常小的结晶状固体。

[0859] 新制的 15mg/mL 的 HIM2 溶液在 250mM 乙酸铵缓冲液中制备,并将溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.76。向该溶液中加入 20 μ L 液化的苯酚和 4.25mL 95% 乙醇。然后向该反应混

合物中加入 100 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.06 调至 5.8, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 500 μ L 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8。然后将该样品不搅拌放置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示非常小的结晶状固体。

[0860] 9. HIM2 和 IN105 与锌的共晶

[0861] 9. 1HIM2 和 IN105 的 R 型共晶的 Zn 配合物的制备

[0862] 9. 250:50 (HIM2:IN105)

[0863] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 37.3mg HIM2 和 36.4mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.84。将固态苯酚在 40–60 $^{\circ}\text{C}$ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 80 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.19 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 4 小时。在 4 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 至 5.6 时得到各种大小和形状的晶体。

[0864] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 37.1mg HIM2 和 35.9mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 3.03。将固态苯酚在 40–60 $^{\circ}\text{C}$ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.38 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0 (参见图 11A)、5.2 (参见图 11B)、5.4 和 5.6 (参见图 12A)。然后将该样品不搅拌静置 4 小时。在 4 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 至 5.6 时得到大部分是短的针状晶体。

[0865] 9. 370:30 (HIM2:IN105)

[0866] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 53.4mg HIM2 和 23.2mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.62。将固态苯酚在 40–60 $^{\circ}\text{C}$ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 80 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.02 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2 (参见图 12B)、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 1 小时。在 1 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 至 5.6 时得到各种大小和形状的晶体状沉淀。

[0867] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 53.6mg HIM2 和 24.5mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.89。将固态苯酚在 40–60 $^{\circ}\text{C}$ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.28 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2 (参见图 13A)、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 1 小时。在 1 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.6 至 4.8 时得到大部分各种大小和形状的晶体状沉淀, 和在 pH 为 5.0 至 5.4 时得到许多短的针状晶体。

[0868] 9. 430:70 (HIM2:IN105)

[0869] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 23.3mg HIM2 和 54.7mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.84。将固态苯酚在

40–60℃的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 80 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.27 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 1 小时。在 1 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 至 5.0 时得到大部分各种大小和形状的晶体状沉淀, 和在 pH 为 5.2 至 5.6 时得到很少的针状晶体。

[0870] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 24.8mg HIM2 和 54.9mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 3.09。将固态苯酚在 40–60℃的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 3.47 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6 (参见图 13B)。然后将该样品不搅拌静置 1 小时。在 1 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.4 至 5.0 时得到大部分各种环形大小的晶体状沉淀, 和在 pH 为 5.2 至 5.6 时得到各种形状和大小的晶体。

[0871] 9.5HIM2 和 IN105 的 R 型共晶的 Zn 配合物的制备

[0872] 9.650:50 (HIM2:IN105)

[0873] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 37.4mg HIM2 和 35.9mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.60。将固态苯酚在 40–60℃的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.15 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH = 4.6–5.6 时得到各种形状和大小的晶体固体。

[0874] 9.770:30 (HIM2:IN105)

[0875] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 57.0mg HIM2 和 24.5mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.43。将固态苯酚在 40–60℃的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.92 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6 (参见图 14A)、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.0–5.2 时得到针状晶体。

[0876] 9.830:70 (HIM2:IN105)

[0877] 新制的 HIM2 和 IN105 的溶液通过将 24.1mg HIM2 和 53.8mg IN105 溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.35。将固态苯酚在 40–60℃的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.60 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0 (参见图 14B)、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.0–5.2 时得到针状晶体。

[0878] 9. 9HIM2 和人胰岛素的 R 型共晶的 Zn 配合物的制备

[0879] 9. 10 50:50 (HIM2: 胰岛素)

[0880] 新制的 HIM2 和胰岛素的溶液通过将 39.2mg HIM2 和 36.7mg 胰岛素溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 2.53。将固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 水溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.82 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2 (参见图 15A)、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.2 和 5.4 时得到各种形状和大小的晶体状固体。在 pH 为 5.6 时得到许多微小的针状晶体。

[0881] 9. 1170:30 (HIM2: 胰岛素)

[0882] 新制的 HIM2 和胰岛素的溶液通过将 56.5mg HIM2 和 20.2mg 胰岛素溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 3.23。将固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.82 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 5.2 和 5.6 时得到各种形状和大小的晶体状固体。

[0883] 9. 1230:70 (HIM2: 胰岛素)

[0884] 新制的 HIM2 和胰岛素的溶液通过将 21.8mg HIM2 和 49.2mg 胰岛素溶解于 4mL 的 pH7.5 的 250mM 乙酸铵中而制备。将该溶液的 pH 用 5M HCl 调至 3.23。将固态苯酚在 40–60℃ 的温水浴中熔化。向该反应烧瓶中加入 16 μ L 熔化的苯酚和 1.75mL 95% 乙醇。然后向该反应烧瓶中加入 40 μ L 4% 的酸化 ZnCl_2 溶液。然后将该溶液的 pH 用 5M NH_4OH 从 2.93 调至 5.60, 并在每个如下希望 pH 值时, 抽出 0.5mL 等分试样: 4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4 (参见图 15B) 和 5.6。然后将该样品不搅拌静置 24 小时。在 24 小时后拍摄的显微照片显示在 pH 为 4.8 时得到板状、雪花状晶体。在 pH 为 5.0 时, 得到针状和雪花状晶体的混合物。在 pH 为 5.2–5.6 时, 观察到许多细小的针状晶体。

[0885] Zn 配合物的水溶解度

[0886] 将 200 μ L 的 0.1M 磷酸缓冲盐 (PBS, 过滤过, pH = 7.4) 加入到 1mL 锥形反应小瓶中。向该小瓶中缓慢加入少量样品直至观察到饱和。周期性地, 将该溶液涡旋。在饱和时, 将该小瓶放置于小离心管中并将该样品在室温下在 2000RPM 下离心 3min。离心后, 从上清液移出 10 μ L 样品并冲稀在 490 μ L 缓冲盐 (0.1M PBS) 中。该稀释的样品通过 HPLC 分析以测定其浓度。

[0887]

共轭物	溶解度	Zn	苯酚
IN105	~26 mg/mL	N/A	N/A
ZnIN105	15 mg/mL - 20 mg/mL	0.44%	0.76%
ZnIN105	~24 mg/mL	0.61%	1.11%
ZnIN105	15 mg/mL - 20 mg/mL	0.63%	1.04%

[0888] Zn IN105 配合物的体外酶抗性实施例

[0889] 胰岛素化合物共轭物(IN105)在 10mM 磷酸钠缓冲液(pH 约为 7.4)中提供,其浓度通过 HPLC 测定(该溶液用缓冲液稀释使得母体化合物和共轭物为等摩尔比~0.6mg/mL)。将亲脂的胰凝乳蛋白酶重新悬浮于 1mM HCl 中至浓度为~7.53U/mL。将每个样品的 1.53mL 等分试样加入到样品管中,并将 0.850mL 加入到对照管中。每个样品用 4 个对照管一式两份地测试样品。将等分试样在 37℃下在恒温混匀器中孵育 15 分钟。然后将 17 μL 胰凝乳蛋白酶加入到每个样品管中。向每个对照管中加入 5 μL 的 1mM HCl。在加入后从样品管和对照管中立即移出 200 μL,并放入预先等分入离心管中的 50 μL 的 1% TFA 中。该样品用作 T = 0。

[0890] 胰岛素化合物(没有 Zn)、IN105 (没有锌)和胰岛素化合物(正规的胰岛素化合物)的取样过程在如下间隔重复:0、2、5、8、12、15 和 30 分钟。所述对照的取样过程在如下间隔重复:0、8、15、30 分钟。对于 T 型和 R 型样品,该过程在如下间隔重复 0、5、8、12、30、40 和 60 分钟。所述 Zn 配合物的对照的取样过程在如下间隔重复:0、12、40 和 60 分钟。将样品储存在 -20℃,直至可以通过 HPLC 进行分析。运行 HPLC 以确定相对于每个消化各自的 T = 0 分钟的降解百分比。对于每个消化,将剩余百分比的自然对数对时间作图并进行线性回归。利用下式计算半衰期: $t_{1/2} = -0.693 / \text{斜率}$ 。

[0891] 在 0.6mg/mL 蛋白质的结果

样品	半衰期	锌含量	苯酚含量
胰岛素化合物(没有锌)	4.9 分钟	0.0	--
IN105 (没有锌)	12.5 分钟	0.0	--
IN105 (没有锌)	11.1 分钟	0.0	--
胰岛素化合物, USP (正规胰岛素化合物)	11.6 分钟	0.3 至 1 重量%	--
IN105 (R 型锌配合物)	55.3 分钟	1.85 重量%	2.37 重量%
IN105 (T 型锌配合物)	54.8 分钟	1.88 重量%	--

[0893] 制剂实施例

[0894] 1. 液体制剂实施例

[0895] 1. 1R6 型 Zn-HIM2 的缓冲溶盐的缓冲液研究

[0896]

组分	在 1 mL 溶液中的量
磷酸二钠盐	1.88 mg
胰岛素组分	3.7 mg (100 单位)
甘油	16.0 mg
苯酚 (或间甲酚)	3.0 mg
锌	0.037 mg (1 重量%的胰岛素) *
pH	7.4 至 7.8**

[0897] * 通过加入氯化锌将锌的量调至基于在锌 HIM2 固体中的锌含量的每 3.7mg/mL 胰岛素的 0.037mg/mL。

[0898] **pH 可以用 10% HCl 和 / 或 10% 氢氧化钠调节。

[0899] 1.2 癸酸 / 月桂酸制剂的口服液体稀释剂的制备

[0900] 将约 60% 的需要体积的无菌水转移到合适的容器中。向该容器中加入适量的 (如下表所示) 氨丁三醇、三乙醇胺、柠檬酸酐和氢氧化钠丸, 并很好地混合直至溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。随所需地用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后通过扁平烤盘上温热而将温度调至 45-50°C 并保持在温度。然后向该温热的溶液中加入癸酸并混合直至所述癸酸溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。如所需的, 用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后将该溶液混合 5 分钟。加入适量的无菌水至 100% 所需的体积, 并进行良好混合。

[0901]

组分	百分比 (% w/v)
氨丁三醇	4.24
三乙醇胺	5.22
柠檬酸酐	6.72
氢氧化钠丸	1.88
癸酸	0.50
月桂酸	0.50
氢氧化钠, 1N	随所需地调节 pH 至 7.7-7.9
盐酸, 1N	随所需地调节 pH 至 7.7-7.9
无菌水	稀释至所需的体积

[0902] 称出必要的 IN105、HIM2 或 ZnHIM2 的量以获得用于给药研究的合适的浓度, 例如称出 1mg IN105 (蛋白质) 并与 1mL 制剂结合以产生在制剂中的 1mg/mL IN105。

[0903] 1.3 油酸 / 癸酸 / 月桂酸 / 胆酸盐制剂口服液体稀释剂的制备

[0904] 将 R 型 Zn HIM2 的口服液体制剂制成具有下表所示的组成:

[0905]

组分	百分比 (% w/v)
氨丁三醇	4.24
三乙醇胺	5.22
柠檬酸酐	6.72
氢氧化钠丸	1.88
胆酸钠	3.00
油酸	1.00
癸酸	0.50
月桂酸	0.50
三氯蔗糖溶液 (Sucralose Solution)	0.80
草莓香料	0.40

[0906]

氢氧化钠, 1N	随所需地调节 pH 至 7.7-7.9
盐酸, 1N	随所需地调节 pH 至 7.7-7.9
无菌水	稀释至所需的体积

[0907] 制备口服液体样品以含有等量于 1mg/mL 蛋白质的 R 型 Zn HIM2 (ZnHIM2-R)。将该 ZnHIM2-R 从冰箱中 (-20°C) 移出, 放置于干燥器中并使其达到室温。将等量于 1mg/mL 蛋白质的 R 型 ZnHIM2 按如下步骤制备到口服液体稀释溶液中。称量 6.4mg ZnHIM2-R。然后将 5.0mL 口服液体稀释剂转移到容器中并温和地涡旋混合。该溶液需要约 45 分钟溶解。所形成的溶液为悬浮液(混浊外观)。给药前, 将该溶液温和地涡旋 60 秒以确保该溶液为均匀溶液。对于 ZnHIM2-R, 蛋白质含量为 78.6%, 1mg/mL 当量, 量 = 5mL。ZnHIM2-R 的量 = $(1\text{mg/mL}) / (0.786) \times (5.0\text{mL}) = 6.4\text{mg}$ 。ZnHIM2-R 的浓度 = $(6.4\text{mg}) / (5.0\text{mL}) = 1.28\text{mg/mL}$ (相当于调节到对于蛋白质含量的 1mg/mL)。

[0908] 1.4 癸酸液体制剂的制备

[0909] 将所需的无菌水体积的约 60% 转移到适当的容器中。向该容器中加入适量(如下表所指出的)的氨丁三醇、三乙醇胺、柠檬酸酐和氢氧化钠丸, 并进行良好混合直至溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。随所需地用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后通过扁平烤盘上温热而将温度调至 45-50°C 并保持在该温度。然后向该温热的溶液中加入癸酸并混合直至所述癸酸溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。如所需的, 用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后将该溶液混合 5 分钟。加入适量的无菌水至 100% 所需的体积, 并进行良好混合。

[0910]

组分	百分比 (% w/v)
氨丁三醇	4.24
三乙醇胺	5.22
柠檬酸酐	6.72

[0911]

氢氧化钠丸	1.88
癸酸	0.9、1.5、3.0 或 6.0
氢氧化钠, 1N	随所需地调节 pH
盐酸, 1N	随所需地调节 pH
无菌水	至所需的体积

[0912] 称出必要的 IN105 的量以获得用于给药研究的合适的浓度, 例如称出 1mg IN105 (蛋白质) 并与 1mL 制剂结合以产生在制剂中的 1mg/mL IN105。

[0913] 1.5 癸酸盐和 / 或月桂酸盐在磷酸缓冲液中的液体制剂

[0914] 制备 100mM 磷酸钠缓冲液, pH 为 7.8 或 8.2。将 1.17 克一水合磷酸一钠盐转移到 1 升烧瓶中。将约 500mL 无菌水加入并进行良好混合直至溶解。然后加入 24.58g 六水合磷酸二钠并进行良好混合直至溶解。用无菌水稀释至体积并进行良好混合。经过 0.22 μ m 过滤器过滤。用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8 或 8.2。

[0915] 对于 IN105, 将适当体积的 pH 为 7.8 或 8.2 的磷酸盐缓冲液的 60% 转移至合适的容器中。然后加入计算量的癸酸盐以产生 3%w/v 的终溶液并进行良好混合直至溶解。然后用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8 或 8.2。用 pH 为 7.8 或 8.2 的磷酸缓冲液稀释至适当的体积 (例如 100mL)。

[0916]

组分	% w/v
癸酸钠	3.0
100 mM 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.8 或 8.2	足量至 100%

[0917] 对于 BN-054, 称量 400 克在适当容器中的 pH 为 7.8 的 100mM 磷酸钠缓冲液。加入 9.7 克癸酸钠和 11.1 克月桂酸钠并进行良好混合直至溶解。加入适量的 pH 为 7.8 的 100mM 磷酸钠缓冲液至等于净重为 500 克。

[0918]

组分	% w/v
癸酸钠	1.94
月桂酸钠	2.22
100 mM 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.8	足量至 100%

[0919] 1.6 含有精氨酸或三乙醇胺的液体制剂

[0920] 制备 pH 为 7.8 的 100mM 磷酸钠缓冲液, 将 1.17 克一水合磷酸一钠盐转移到 1 升烧瓶中。将约 500mL 无菌水加入并进行良好混合直至溶解。然后加入 24.58g 六水合磷酸二钠并进行良好混合直至溶解。用无菌水稀释至体积并进行良好混合。经过 0.22 μ m 过滤器过滤。用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8。

[0921] 将适当体积的 pH 为 7.8 的磷酸盐缓冲液的 60% 转移至合适的容器中。然后向该容器中加入适量的(如下表所指出的)精氨酸或三乙醇胺并进行良好混合直至溶解。然后加入计算量的癸酸盐以产生 3%w/v 的终溶液并进行良好混合直至溶解。然后用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8。用 pH 为 7.8 的磷酸缓冲液稀释至适当的体积(例如 100mL)。

[0922]

组分	% w/v
癸酸钠	3.0
月桂酸钠	0.4 或 1.2
100 mM 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.8	足量至 100%

[0923] 称出必要的 IN105 的量以获得用于给药研究的合适的浓度, 例如称出 1mg IN105 (蛋白质) 并与 1mL 制剂结合以产生在制剂中的 1mg/mL IN105。

[0924] 1.7 含有辛酸的液体制剂

[0925] 将所需的无菌水体积的约 60% 转移到适当的容器中。向该容器中加入适量(如下表所指出的)的氨丁三醇、三乙醇胺、柠檬酸酐和氢氧化钠丸, 并进行良好混合直至溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。随所需地用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后通过将溶液在扁平烤盘上温热而将温度调至 45-50°C 并保持在该温度。然后向该温热的溶液中加入辛酸并混合直至所述辛酸溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。如所需的, 用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后将该溶液混合 5 分钟。加入适量的无菌水至 100% 所需的体积, 并进行良好混合。

[0926]

组分	百分比 (% w/v)
氨丁三醇	4.24
三乙醇胺	5.22
柠檬酸酐	6.72
氢氧化钠丸	1.88
辛酸	3.0
氢氧化钠, 1N	随所需地调节 pH
盐酸, 1N	随所需地调节 pH
无菌水	至所需的体积

[0927] 称出必要的 IN105 的量以获得用于给药研究的合适的浓度, 例如称出 1mg IN105 (蛋白质) 并与 1mL 制剂结合以产生在制剂中的 1mg/mL IN105。

[0928] 1.8 含有亚油酸的液体制剂

[0929] 制备 pH 为 7.8 的 100mM 磷酸钠缓冲液, 将 1.17 克一水合磷酸一钠盐转移到 1 升烧瓶中。将约 500mL 无菌水加入并进行良好混合直至溶解。然后加入 24.58g 六水合磷酸二钠并进行良好混合直至溶解。用无菌水稀释至体积并进行良好混合。经过 0.22 μ m 过滤器过滤。用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8。

[0930] 将适当体积的 pH 为 7.8 的磷酸盐缓冲液的 60% 转移至合适的容器中。然后加入计算量的亚油酸钠盐以产生 3%w/v 的终溶液并进行良好混合直至溶解。然后用 1N HCl 或 1NaOH 将 pH 调至 7.8。用 pH 为 7.8 的磷酸缓冲液稀释至适当的体积 (例如 100mL)。

[0931]

组分	% w/v
亚油酸钠盐	3.0
100 mM 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.8	足量至 100%

[0932] 1.9 癸酸盐和 / 或月桂酸液体制剂的制备

[0933] 将所需的无菌水体积的约 60% 转移到适当的容器中。向该容器中加入适量 (如下表所指出的) 的氨丁三醇、三乙醇胺、柠檬酸酐和氢氧化钠丸, 并进行良好混合直至溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。随所需地用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后通过将溶液在扁平烤盘上温热而将温度调至 45-50°C 并保持在 45-50°C。然后向该温热的溶液中加入癸酸和 / 或月桂酸并混合直至所述癸酸和 / 或月桂酸溶解。将温度调至 21-25°C (或室温) 并测量该液体的 pH。如所需的, 用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将 pH 调至 7.7-7.9。然后将该溶液混合 5 分钟。加入适量的无菌水至 100% 所需的体积, 并进行良好混合。

	组分	% w/v
	氨丁三醇	4.24
	三乙醇胺	5.22
[0934]	柠檬酸酐	6.72
	氢氧化钠丸	1.88
	癸酸	0、0.1 或 0.9
	月桂酸	0、0.9 或 0.1
	氢氧化钠, 1N	随所需地调节 pH
	盐酸, 1N	随所需地调节 pH
[0935]	无菌水	至所需的体积

[0936] 称出必要的 IN105 的量以获得用于给药研究的合适的浓度, 例如称出 1mg IN105 (蛋白质) 并与 1mL 制剂结合以产生在制剂中的 1mg/mL IN105。

[0937] 2. 固体制剂实施例

[0938] 2.1 利用 Nobex-IN105-[854]- 的癸酸盐 / 月桂酸盐固体剂型的制备和溶出特性

[0939] 将约 58mg 癸酸钠、57mg 月桂酸钠、286mg 甘露醇、30mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg(蛋白质)Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。

[0940] 固体剂型(片剂) 制剂 Nobex-IN105-[854], 每片 58mg 癸酸盐和 57mg 月桂酸盐

	组分	mg 每片
	癸酸钠	58
	月桂酸钠	57
[0941]	甘露醇	286
	Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	30
	Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0942] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水, 桨速为 50rpm, 介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流动相 A) 和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为 :0 分钟 100% 流动相 A, 11 分钟 65% 流动相 A, 15 分钟 20% 流动相 A, 16 分钟 20% 流动相 A, 17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白质)、286mg 甘露醇、58mg 癸酸钠、57mg 月桂酸钠和 30mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab) 的 Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出试验的溶出数据 :

[0943] Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出特性数据总结, 溶出的 IN105%

	Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出特性数据总结, 溶出的癸酸盐 %			
	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
[0944]	5	71	72	72
	10	86	94	90
	15	87	96	92
	30	89	96	93
	45	90	96	93
	60	87	96	92
	Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出特性数据总结, 溶出的月桂酸盐 %			
	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
[0946]	5	98	93	96
	10	102	104	103
	15	101	104	103
	30	102	105	104
	45	102	104	103
	60	102	105	104
	Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出特性数据总结, 溶出的月桂酸盐 %			
	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
[0948]	5	72	75	74
	10	90	89	90
	15	91	90	91
	30	88	91	90
	45	89	91	90
	60	91	90	91
[0949]	2.2 固体剂型(片剂) 配方制剂, 每片 143mg 癸酸盐和 140mg 月桂酸盐			
[0950]	制剂 Nobex-IN105-[856] 的制备			
[0951]	将约 143mg 癸酸钠、140mg 月桂酸钠、150mg 甘露醇、30mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg (蛋白质) Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。			
[0952]	固体剂型(片剂) 制剂 Nobex-IN105-[854], 每片 143mg 癸酸盐和 140mg 月桂酸盐			
[0953]				

组分	mg 每片
癸酸钠	143
月桂酸钠	140
甘露醇	150
Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	30
Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0954] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水, 桨速为 50rpm, 介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流动相 A)和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为: 0 分钟 100% 流动相 A, 11 分钟 65% 流动相 A, 15 分钟 20% 流动相 A, 16 分钟 20% 流动相 A, 17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白质)、150mg 甘露醇、143mg 癸酸钠、140mg 月桂酸钠和 30mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab)的 Nobex-Zn-IN105 片剂 [854] 的溶出试验的溶出数据:

[0955] Nobex-Zn-IN105 片剂 [856] 的溶出特性数据总结, 溶出的 IN105%

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	43	31	37
10	66	53	60
[0956] 15	81	72	77
30	98	97	98
45	98	99	99
60	96	98	97

[0957] Nobex-Zn-IN105 片剂 [856] 的溶出特性数据总结, 溶出的癸酸盐 %

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	36	32	34
10	68	57	63
[0958] 15	89	79	84
30	105	103	104
45	105	103	104
60	105	104	105

[0959] Nobex-Zn-IN105 片剂 [856] 的溶出特性数据总结, 溶出的月桂酸盐 %

	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
	5	35	25	30
	10	61	44	53
[0960]	15	74	61	68
	30	93	88	91
	45	93	91	92
	60	93	92	93

[0961] 2.3 固体剂型(片剂) 配方制剂, 每片 143mg 癸酸盐

[0962] 制剂 Nobex-IN105-[859] 的制备

[0963] 将约 143mg 癸酸钠、150mg 甘露醇、30mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg (蛋白质) Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。

[0964] 固体剂型(片剂) 制剂 Nobex-IN105-[854], 每片 143mg 癸酸盐

	组分	mg 每片
	癸酸钠	143
[0965]	甘露醇	150
	Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	30
	Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0966] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水, 桨速为 50rpm, 介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流动相 A)和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为 :0 分钟 100% 流动相 A, 11 分钟 65% 流动相 A, 15 分钟 20% 流动相 A, 16 分钟 20% 流动相 A, 17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白质)、150mg 甘露醇、143mg 癸酸钠和 30mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab)的 Nobex-Zn-IN105 片剂的溶出试验的溶出数据 :

[0967] Nobex-Zn-IN105 片剂 [859] 的溶出特性数据总结, 溶出的 IN105%

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	11	26	19
10	63	58	61
[0968] 15	84	80	82
30	86	88	87
45	88	88	88
60	87	89	88

[0969] Nobex-Zn-IN105 片剂 [859] 的溶出特性数据总结, 溶出的癸酸盐 %

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	61	43	52
10	93	72	83
[0970] 15	99	95	97
30	99	100	100
45	99	100	100
60	99	100	100

[0971] 2.4 固体剂型(片剂) 配方制剂, 每片 286mg 癸酸盐

[0972] 制剂 Nobex-IN105-[860] 的制备

[0973] 将约 286mg 癸酸钠、150mg 甘露醇、30mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg (蛋白质) Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。

[0974] 固体剂型(片剂) 制剂 Nobex-IN105-[860], 每片 286mg 癸酸盐

组分	mg 每片
癸酸钠	286
[0975] 甘露醇	150
Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	30
Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0976] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水, 桨速为 50rpm, 介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流动相 A)和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为: 0 分钟 100% 流动相 A, 11 分钟 65% 流动相 A, 15 分钟 20% 流动相 A, 16 分钟 20% 流动相 A, 17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白

质)、150mg 甘露醇、286mg 癸酸钠和 30mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab)的 Nobex-Zn-IN105 片剂的溶出试验的溶出数据：

[0977] Nobex-Zn-IN105 片剂 [860] 的溶出特性数据总结,溶出的 IN105%

	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
	5	28	19	24
	10	53	44	49
[0978]	15	70	68	69
	30	92	90	91
	45	92	92	92
	60	92	93	93

[0979] Nobex-Zn-IN105 片剂 [860] 的溶出特性数据总结,溶出的癸酸盐 %

	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
	5	29	35	32
	10	52	66	59
[0980]	15	70	84	77
	30	99	99	99
	45	99	99	99
	60	99	100	100

[0981] 2.5 固体剂型(片剂) 配方制剂,每片 100mg 癸酸盐

[0982] 制剂 Nobex-IN105-[861] 的制备

[0983] 将约 100mg 癸酸钠、150mg 甘露醇、25mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg (蛋白质) Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。

[0984] 固体剂型(片剂) 制剂 Nobex-IN105-[861],每片 100mg 癸酸盐

	组分	mg 每片
[0985]	癸酸钠	100
	甘露醇	150
[0986]	Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	25
	Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0987] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水,桨速为 50rpm,介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流

动相 A)和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为 :0 分钟 100% 流动相 A,11 分钟 65% 流动相 A,15 分钟 20% 流动相 A,16 分钟 20% 流动相 A,17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白质)、150mg 甘露醇、100mg 癸酸钠和 25mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab)的 Nobex-Zn-IN105 片剂的溶出试验的溶出数据：

[0988] Nobex-Zn-IN105 片剂 [861] 的溶出特性数据总结,溶出的 IN105%

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	77	41	59
10	94	84	89
15	96	90	93
30	95	91	93
45	95	91	93
60	97	89	93

[0990] Nobex-Zn-IN105 片剂 [861] 的溶出特性数据总结,溶出的癸酸盐 %

采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
5	97	79	87
10	101	99	100
15	101	103	102
30	101	103	102
45	101	104	103
60	101	104	103

[0992] 2.6 固体剂型(片剂)配方制剂,每片 150mg 癸酸盐

[0993] 制剂 Nobex-IN105-[862] 的制备

[0994] 将约 150mg 癸酸钠、150mg 甘露醇、25mg 羟基乙酸淀粉钠和 6mg (蛋白质) Nobex-IN105 转移到一片称重纸上并充分混合。将该掺混物转移到压具上并在约 350psi 下压制以形成片剂。

[0995] 固体剂型(片剂)制剂 Nobex-IN105-[862],每片 100mg 癸酸盐

	组分	mg 每片
	癸酸钠	150
[0996]	甘露醇	150
	Explotab (羟基乙酸淀粉钠)	25
	Nobex-IN105 (蛋白质)	6

[0997] 利用 USP 仪的 2 个溶出单元进行溶出测试。溶出介质为水, 桨速为 50rpm, 介质体积为 500mL。溶出试样通过 HPLC 利用梯度体系进行分析。流动相为含有 0.1% TFA 的水(流动相 A)和含有 0.1% TFA 的乙腈(流动相 B)。应用的梯度为 :0 分钟 100% 流动相 A, 11 分钟 65% 流动相 A, 15 分钟 20% 流动相 A, 16 分钟 20% 流动相 A, 17 分钟 100% 流动相 A。检测波长为 214nm 和色谱柱为 C18 (150×2mm)。下表和图总结了对于包含 6mg Zn-IN105 (蛋白质)、150mg 甘露醇、150mg 癸酸钠和 25mg 羟基乙酸淀粉钠(Explotab)的 Nobex-Zn-IN105 片剂的溶出试验的溶出数据 :

[0998] Nobex-Zn-IN105 片剂 [862] 的溶出特性数据总结, 溶出的 IN105%

	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
	5	76	41	59
[0999]	10	93	87	90
	15	95	99	97
	30	96	98	97
	45	97	98	98
[1000]	60	98	97	98

[1001] Nobex-Zn-IN105 片剂 [862] 的溶出特性数据总结, 溶出的癸酸盐 %

	采样时间 (分钟)	容器 1(溶解%)	容器 2(溶解%)	平均 (溶解%)
	5	84	51	68
	10	98	88	93
[1002]	15	98	97	98
	30	98	98	98
	45	98	98	98
	60	98	98	98

[1003] 体外酶抗性实施例

[1004] 将胰岛素化合物共轭物(HIM2)在 10mM 磷酸钠缓冲液(pH 为约 7.4)中提供, 并且它们的浓度通过 HPLC 测定(所述溶液用缓冲液稀释以使得母体化合物和共轭物为等摩尔

比 $\sim 0.6\text{mg/mL}$)。将冻干的胰凝乳蛋白酶悬浮于 1mM HCl 中至浓度为 7.53U/mL 。将每个样品的 1.53mL 等分试样加入到样品管中, 和将 0.850mL 加入到对照管中。每个样品用 4 个对照管一式两份地测试样品。将等分试样在 37°C 下在恒温混匀器中孵育 15 分钟。然后将 $17\ \mu\text{L}$ 胰凝乳蛋白酶加入到每个样品管中。向每个对照管中加入 $5\ \mu\text{L}$ 的 1mM HCl 。在加入后从样品管和对照管中立即移出 $200\ \mu\text{L}$, 并放入预先等分入离心管中的 $50\ \mu\text{L}$ 的 1% TFA 中。该样品用作 $T = 0$ 。

[1005] 胰岛素(没有 Zn)、HIM2 (没有 Zn) 和胰岛素(正规的胰岛素化合物)的取样过程在如下间隔重复: 0、2、5、8、12、15 和 30 分钟。所述对照的取样过程在如下间隔重复: 0、8、15、30 分钟。对于 T 型和 R 型样品, 该过程在如下间隔重复 0、5、8、12、30、40 和 60 分钟。所述 Zn 配合物的对照的取样过程在如下间隔重复: 0、12、40 和 60 分钟。将样品储存在 -20°C , 直至可以通过 HPLC 进行分析。运行 HPLC 以确定相对于每个消化各自的 $T = 0$ 分钟的降解百分比。对于每个消化, 将剩余百分比的自然对数对时间作图并进行线性回归。利用下式计算半衰期: $t_{1/2} = -0.693/\text{斜率}$ 。

[1006] 在 0.6mg/mL 蛋白质下的结果

	样品	半衰期	锌含量	苯酚含量
[1007]	胰岛素化合物 (没有锌)	7-9 分钟	--	--
	HIM2 (没有锌)	12-15 分钟	--	--
	胰岛素, USP (正规胰岛素化合物)	26-29 分钟	0.3 至 1 重量%	--
	HIM2 (R 型锌配合物)	51-78 分钟	1.1 重量%	0.1 至 0.25 重量%
	HIM2 (T 型锌配合物)	51 分钟	0.55 重量%	--
	HIM2 (R 型锌/鱼精蛋白配合物)	95-120 分钟	2.0 至 2.1 重量%	5.3 至 6.2 量%
	DICON-1 (R 型锌配合物)	24-26 分钟	ND	ND

[1008] 在 0.3mg/mL 蛋白质下的结果

	样品	半衰期	锌含量	苯酚含量
	胰岛素化合物（没有锌）	4-5 分钟	--	--
	HIM2（没有锌）	7-9 分钟	--	--
[1009]	胰岛素，USP （正规胰岛素化合物）	7-8 分钟	0.4 至 1 重量%	--
	HIM2 （R 型锌配合物）	19-21 分钟	1.1 重量%	0.1 至 0.25 重量%
	HIM2 （T 型锌配合物）	12-15 分钟	0.55 重量%	--

[1010] 体内实施例

[1011] 1. 长期小鼠血糖分析 (MBGA)

[1012] 5 只雄性小鼠 (Charles River Laboratories; 25-30g) 的六对给药组接受皮下注射胰岛素化合物共轭物 (测试物) 或重组人胰岛素。所述的测试物用含有 0.1 重量 % 的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (0.01M, pH 约为 7.4) 重新组成, 并以 100、66.6、43.3、30、20 和 13.3 μ g/kg 给药。胰岛素用含有 0.1 重量 % 的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (0.01M, pH 约为 7.4) 重新组成, 并以 50、33.3、21.7、15、10 和 6.7 μ g/kg 给药。在由大腿和腹股沟形成的袋中接受皮下给药后, 动物在室温下返回笼子 30 分钟, 然后快速麻醉并进行终端放血。将血样收集在肝素试管中用于血糖测定。如果推迟进行血糖测定, 则所述试管要储存在冰水中, 并在分析之前重新温热至室温。

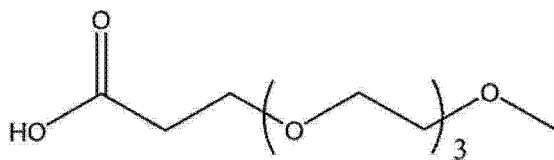
[1013] 血浆葡萄糖采用血糖仪 (例如 One Touch® Basic; Lifescan) 进行测量, 该仪器每天开始使用时根据制造商的说明书进行校准。然后胰岛素化合物共轭物功效相对于标准曲线进行计算, 所述的标准曲线被形成用于所述重组人胰岛素响应。计算基于重组人胰岛素具有 27.4 IU/mg 的功效的假设。

[1014] 结果示于图 16-20 中。图 16 显示 HIM2 的 MBGA 生物效能曲线。图 17 显示 Zn-HIM2 胰岛素化合物产物 R 型的 MBGA 生物效能曲线。图 18 显示 Zn-HIM2 胰岛素化合物产物 T 型的 MBGA 生物效能曲线。图 19 显示具有鱼精蛋白的 Zn-HIM2 胰岛素化合物产物的 MBGA 生物效能曲线。图 20 显示 R 型鱼精蛋白配合物在给药后 30 和 90 分钟的葡萄糖降低效果。这些结果显示 HIM2 的生物效能没有由于与 Zn^{++} 配位而显著性降低。所述的 R 型鱼精蛋白配合物 (参见图 17[7]) 显示在 30 分钟比在 90 分钟更大的葡萄糖下降。

[1015] 另外, 图 21-24 显示具有如下结构的 IN-186、IN-192、IN-190、IN-191、IN-189、N-178、IN-193、IN-194、IN-185、IN-196 和 IN-197 的生物效能曲线:

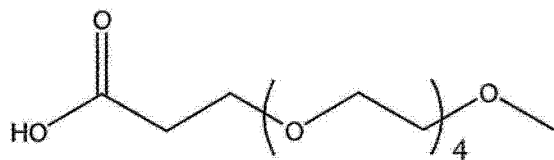
[1016] B1 单共轭物, IN-186:

[1017]



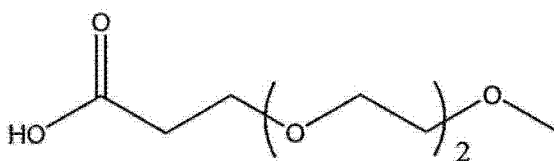
[1018] B29 单共轭物, IN-194 :

[1019]



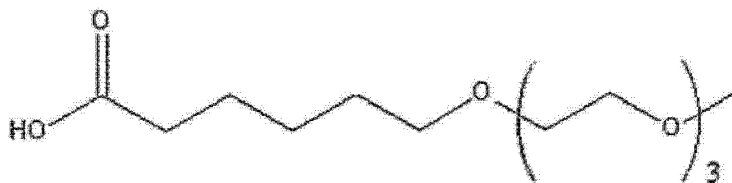
[1020] B29 单共轭物, IN-197 :

[1021]



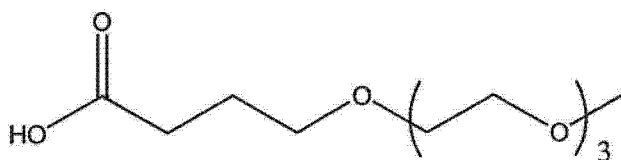
[1022] B29 单共轭物, IN-178 :

[1023]



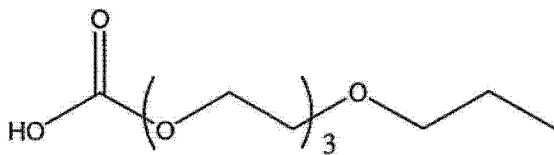
[1024] B29 单共轭物, IN-190 :

[1025]



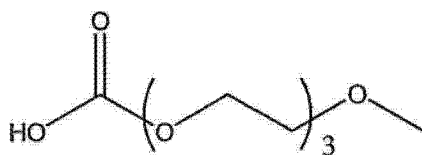
[1026] B29 单共轭物, IN-196 :

[1027]



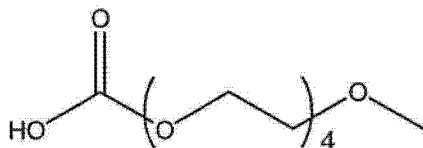
[1028] B29 单共轭物, IN-191 :

[1029]



[1030] B29 单共轭物, IN-189 :

[1031]



[1032] 2. 狗夹(clamp)研究

[1033] 2.1 初始 HIM2 研究

[1034] 通过外科手术(异氟烷麻醉)在股动脉中放置导管而制备狗($n = 3$ 或 6)。让这些动物恢复 16-17 天,之后将它们禁食过夜并在清醒状态下进行研究。60 分钟平衡期后,有 20 分钟控制期,之后通过口腔给药。 Zn^{++} -HIM2R 型胰岛素化合物在缓冲液中测试,所述的缓冲液如在实施例中所示的那样制备。另外, R 型和 NPH 型配合物在包含癸酸和月桂酸的口服液体剂中测试,所述的口服液体剂如在实施例中所示的那样制备。

[1035] 所有 3 个测试样品只在一剂量水平(所述的剂量水平基于前述试验结果确定)下测试。然后通过 4 小时下肢静脉灌注 D-20 而将血浆葡萄糖水平夹在血糖恒定(euglycemic)值。在 -20、0、5、10、20、30、45、90、120、180 和 240 分钟采集血样(4mL)用于测量葡萄糖、胰岛素化合物和 C-肽。动脉血血样随所需的获得以夹住所述血浆葡萄糖水平。在每个实验中共采集 72mL 血。

[1036] 进行如下测定:葡萄糖灌注速率、胰岛素化合物浓度、C-肽浓度和血浆 C-肽水平(以估计内源性胰岛素化合物的释放)。所需的用以维持高血糖的葡萄糖灌注速率提供胰岛素化合物作用的指标。

[1037] 在实验后,所述导管的空的一端进行皮下埋植并让这些狗恢复 2 星期,之后进行另一项使用不同测试物的研究。随机对动物给药并且这些动物被给药总共 3 次,狗的总数为 6 只。

[1038] 图 25 和 26 显示研究结果

[1039] 2.2 初始 IN105 研究

[1040] 本研究在禁食过夜的清醒的杂种狗身上进行,所述的杂种狗已经给食基于干重的 34% 蛋白质、46% 糖类、14.5% 脂肪和 5.5% 纤维。每只动物在实验前约 3 星期如另外地方(1)所述的将硅橡胶导管插入到股动脉中。在实验日,在局部麻醉的情况下将所述导管从其皮下袋中取出。测试物:Nobex-IN105(货号 KJ-173-095&KJ-173-116)在口服脂肪酸制剂中(Nobex-IN-[753]-040422)提供,浓度为 1.0mg/mL。每只狗接受 0.25mg/kg 口服剂量的 Nobex-IN105 (1.0mg/mL@0.25mL/kg 给药体积)。在 $t = 0$ 时给药 Nobex-IN105,并且通过头静脉灌注葡萄糖(D-20)以保持血糖恒定。如前所述(1)的那样抽取动脉血样品用于测量胰岛素和葡萄糖。实验完成后,将动脉导管皮下埋植,如在初始外科手术过程中那样。

[1041] 在实验过程中,一只狗在给药后立即呕吐,并只有一部分狗被给药。因此,该实验结果以包含和不包含得自这只狗的数据而进行报导。

[1042] 在口服给药 Nobex-IN105 之后,在所有 6 只狗中,动脉血浆胰岛素水平上升,包括异常值(口服 -2i)。给药 10 分钟后,平均动脉胰岛素从 $6.0 \pm 1.4 \mu\text{U/mL}$ ($6.3 \pm 1.7 \mu\text{U/mL}$, $n = 5$) 上升至峰值的 $109.4 \pm 31.4 \mu\text{U/mL}$ ($127.8 \pm 30.1 \mu\text{U/mL}$, $n = 5$),然后下降以使得经过 150 分钟后,所有的狗恢复到基线胰岛素水平(图 27 和 28)。

[1043] 通过葡萄糖灌注维持血糖恒定。在动脉胰岛素(图 27 和 28)平均葡萄糖灌注速率

曲线下面积(AUC₀₋₂₄₀)较大上升的动物中所需的维持最大血糖恒定的葡萄糖灌注速率是 $578.5 \pm 144.5 \text{ mg/kg/min}$ ($669.4 \pm 137.7 \text{ mg/kg/min}$, $n = 5$)。

[1044] 2.3 固体制剂

[1045] 利用葡萄糖夹模型筛选制剂的研究在禁食过夜的清醒杂种狗身上进行,所述狗已经给食基于干重的 34% 蛋白质、46% 糖类、14.5% 脂肪和 5.5% 纤维。在实验前约 3 周,每只动物如另外地方所描述的(参见 1)将硅橡胶导管插入到股动脉中。在实验日,在局部麻醉的情况下将所述导管从其皮下袋中取出。所用测试物包含在不同液体制剂中的 1.0 mg/mL Zn IN105,或每胶囊或片含有 5–6mg 的 IN105。在每个实验中的每只狗连续两次接受约 0.25 mg/kg 的口服液体剂量或包含 5 或 6mg 的胶囊或片,第一次在 $t = 0$ 时,第二次在 $t = 120$ 分钟时。通过头静脉灌注葡萄糖(D-20)以保持血糖恒定。在一些情况下,研究时间在给药后延长,其中所述的作用持续超过 120 分钟。如前所述(参见 1)的那样抽取动脉血样品用于测量胰岛素、葡萄糖和 C 肽。实验完成后,动脉导管被放置于皮下组织中。

[1046] 制剂,无论溶液剂和固体剂型,都是用不同水平的脂肪酸、缓冲液、稀释剂和崩解剂制备的。为了使变量最小化,所述的液体和固体制剂包含相同水平 IN105 和每种赋形剂(癸酸、月桂酸、辛酸、肉豆蔻酸、亚油酸),因此变化只有相对量的脂肪酸含量、缓冲液、稀释剂(甘露醇和微晶纤维素),和 / 或崩解剂(Explotab)。对葡萄糖灌注速率和 IN105 吸收(血浆胰岛素免疫反应)数据进行评估和与每个给药的制剂进行比较。

[1047] 最初,进行实验以将优化的液体制剂(参见 2)简化和改进为可以更易于转化为固体剂型的液体制剂。这通过将所述游离脂肪酸替代为相应的钠盐(例如将癸酸替代为癸酸钠),以及除去被认为是不再需要的缓冲组分(柠檬酸、三乙醇胺、氨丁三醇、氢氧化钠)而进行。另外,对其它脂肪酸,例如亚油酸、辛酸和肉豆蔻酸,以及所述氨基酸,精氨酸的对于 IN105 吸收作用的作用进行检测。

[1048] 在每个实验用一只或两只狗进行原型筛选的初始设定后,几乎没有原型制剂在另外的狗中被选择和测试,以更好地确定制剂和个体动物之间的可变性和一致性。

[1049] 对很多候选制剂开发溶出方法和进行溶出研究以评价 IN105 和所述脂肪酸含量的溶出特性。

[1050] 结果

[1051] 在初步实验中,用在 $3\% \text{ w/v}$ 的癸酸钠的磷酸盐缓冲液的溶液中的 IN105 给药,而没有另外的赋形剂,显示出(图 29–30)与优化的液体制剂相比类似的反应,所述的优化的液体制剂包含在三乙醇胺 / 柠檬酸 / 氨丁三醇 / 氢氧化钠缓冲液中的 $3\% \text{ w/v}$ 的癸酸。这说明所述脂肪酸的钠盐形式显示与所述酸形式相当的性质,并说明另外的缓冲组分对所述制剂没有贡献。

[1052] 在评价用 3% 辛酸或 3% 亚油酸代替 3% 癸酸盐的备选脂肪酸的单独研究中,没有备选物显示出显著的效果。辛酸的使用导致对于低至中等水平的葡萄糖的需要,而亚油酸的使用没有导致任何葡萄糖灌注的需要,这说明没有作用。这两种制剂都显示相对低水平的动脉胰岛素。包含精氨酸的液体制剂没有显示对于 GIR 或 IN105 的相关的益处。

[1053] 在初级研究中,固体制剂作为填充入硬胶胶囊的粉末掺混物和利用 Carver 压具手工压制的片剂进行评价。所述的胶囊,6mg 的 IN105 (胰岛素等同物, 0.25 mg/Kg) 与 57mg 癸酸盐 / 57mg 月桂酸盐的粉末掺混物,显示在第一次给药最长至 120 分钟时没有显著的效

果,而在第二次给药观察到 GIR 与 IN105 同时吸收的显著的效果,其中其水平从 0 至 120 分钟很好的大于基线。该数据说明在胶囊剂型中的 IN105 中可变的但潜在的延迟应答。胶囊相对于片剂溶出仅微小地延迟,尽管可能几乎没有体外 / 体内相关性。

[1054] 在初始的原型片剂筛选研究中,包含 6mg 的 IN105 和 150mg 的甘露醇,30mg 羟基乙酸淀粉钠,含有 143mg 癸酸盐,含有或不含有 143mg 月桂酸盐的片剂显示比含有 54mg 癸酸盐或 / 和 54mg 月桂酸盐的相同的片剂显著更高的 GIR 和 IN105 吸收(图 31、32 和 33)。这说明相对于增加癸酸盐和月桂酸盐的水平,较高的 GIR 和 IN105 水平具有合理的剂量反应。所述片剂显示对 IN105 填充的胶囊早的和相同的 GIR 反应时间。另外,所述的 IN105 片剂显示在所有给药的狗中胰岛素的动脉血浆上升。

[1055] 在一系列的最终实验中,3 种原型片剂制剂(包含 143mg 癸酸盐和 140mg 月桂酸盐的制剂 [856];包含 286mg 癸酸盐的 [860] 和包含 150mg 癸酸盐的 [862]) 被选择用于在 5 只狗中(对每个制剂 3 只不同的狗)进行评价以估算性能一致性(图 34-37)。在所有 3 只狗和在所有 18 个剂量(3 只狗 $\times$ 3 片 $\times$ 2 剂量每只)中动脉血浆胰岛素水平随着相应的,在口服给药 6mg (胰岛素等同物)的被配制到包含 150mg 或 280mg 癸酸盐或 143mg/140mg 癸酸盐 / 月桂酸盐的片剂中的 IN105 之后的, GIR 反应而上升(图 31-32 和图 38-42)。所述的 C-肽水平(ng/ml),在用 150mg 和 280mg 癸酸盐片剂的情况下,其平均值($n = 2$)显示在第一次给药期间从初始水平的 0.30 ± 0.05 降低至 0.22 ± 0.02 ,和在第二次给药期间从初始水平的 0.1 ± 0.05 降低至 0.02 ± 0.0 ,和在用 140mg/140mg 癸酸 / 月桂酸片剂的情况下,显示在第一次给药期间从初始水平的 0.21 ± 0.05 降低至 0.05 ± 0.02 ,和 0.18 ± 0.05 降低至 0.18 ± 0.01 。这说明由外源性 IN105 胰岛素对从胰腺分泌产生的 C 肽产生抑制。

[1056] IN105 的所有三种原型片剂在剂量之间和在狗中和在狗之间,包括在不同的天,显示相同的 IN105 吸收水平和导致的葡萄糖灌注速率。

[1057] 在最终的研究中,其中采用 6 只狗的组,一只狗(3 号狗)用所有的液体和固体剂量几乎没有反应。为了更准确地表现这样的结果,所示的数据用和不用得自 3 号狗的结果都被提出。没有采集全部剂量的(不好的强饲法、呕吐等)或具有内源性胰岛素的狗的数据被忽略。

[1058] 溶出研究:片剂和胶囊剂的典型的样品经历溶出测试(如上所述)。

[1059] 讨论

[1060] 这些研究表明包含癸酸钠盐,或者癸酸钠和月桂酸钠盐的原型 IN105 片剂,其含有甘露醇和崩解剂羟基乙酸淀粉钠和含有 6mg IN105 (约 0.25mg/kg),将其口服给药导致显著的和一直提高的动脉血浆胰岛素,这需要葡萄糖灌注以维持血糖恒定。

[1061] 这些原型片剂导致 IN105 水平和 GIR 速率与包含相当水平的癸酸盐或月桂酸盐的液体制剂相比至少一样好和好像更好。所述的原型片剂形式维持口服液体制剂的吸收曲线。所选择的原型片剂(例如含有 280mg 和 150mg 癸酸盐的片剂, $n = 6$, GIR 的 $\text{AUC} = 496 \pm 117$ 和 500 ± 275) 的口服相对生物利用度显然比液体制剂(例如, 3w/v 癸酸液体制剂, $n = 5$, GIR 的 $\text{AUC} = 189 \pm 92$ 和 198 ± 119) 更好。

[1062] 所示的数据说明包含癸酸钠作为唯一脂肪酸,并含有甘露醇和崩解剂,羟基乙酸淀粉钠的片剂在固体剂型的进一步发展中用于临床研究。数据还说明胰岛素水平在口服给药在选择的原型癸酸盐片剂形式(癸酸钠为 150mg 或 286mg) 中的 IN105 后稳定地达到

峰值,其中典型的 T_{max} 为在给药后约 20 分钟,和在两个剂量中, C_{max} 为约 59.0 ± 20.1 和 $62.9 \pm 25.4 \mu$ 单位 /mL。在每次给药后,所述的血浆胰岛素水平保持升高接近于 C_{max} 水平 10-15 分钟,并且在整个 120 分钟内都超过基础水平。利用这些片剂的需要维持血糖恒定的 GIR 在两个剂量都在约 30 至 40 分钟时达到 T_{max} ,并且 GIR 的 C_{max} 达到平均 8.4 ± 1.99 和 $7.41 \pm 2.18 \text{mg/kg/分钟}$ 。所述的片剂剂型比所述优化的液体制剂需要较高的 GIR C_{max} ($7.4-8.4$ 对 $4.5-5.4$) 和需要较长的葡萄糖灌注时间(100-120 分钟对 60-90 分钟)才能维持血糖恒定。

[1063] 与历史性 SQ 和吸入胰岛素的动脉血浆胰岛素水平相比,这些原型片剂明显提供类似于 SQ 和吸入给药的最大胰岛素水平,并且其胰岛素曲线相似于吸入胰岛素的胰岛素曲线(图 34-37)。

[1064] 所述的原型片剂实验说明所选择的原型片剂适合作为固体剂型用于进一步的 105 未来发展的评价,以聚焦到产生可利用片剂压具生产的临床制剂。

[1065] 本说明书被分成章节,其目的仅是用于更容易地参考。章节和标题不意于限制本发明的范围。这里所描述的实施例的目的是用来举例说明本发明的许多方面和特点,而不意于限制本发明的范围。

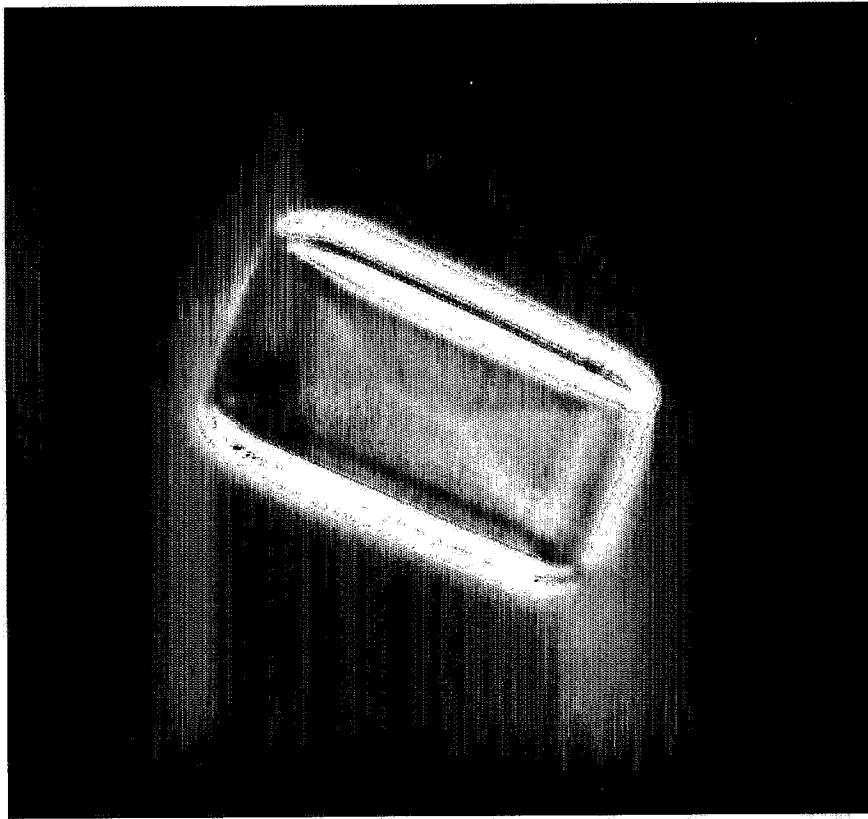


图 1

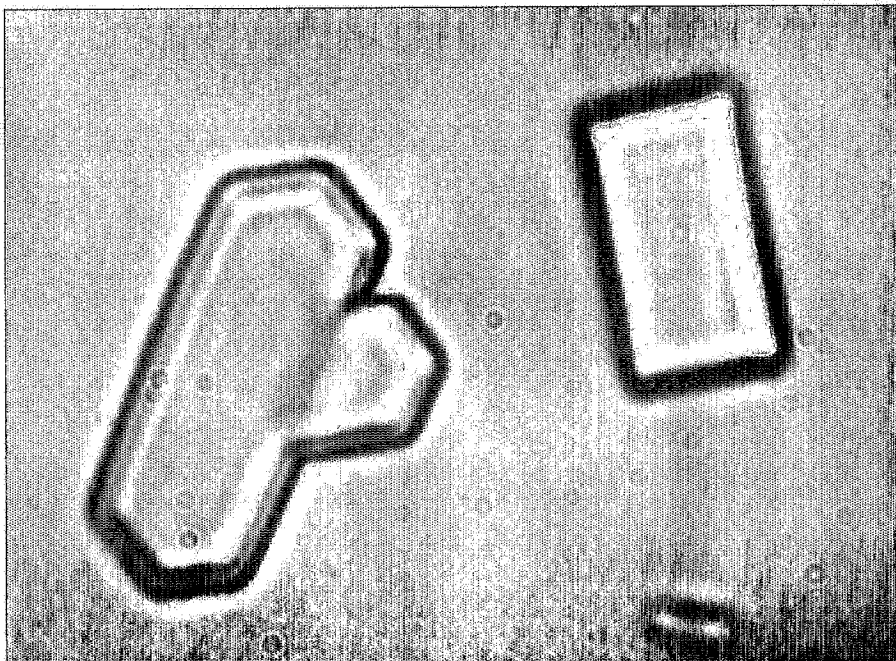


图 2

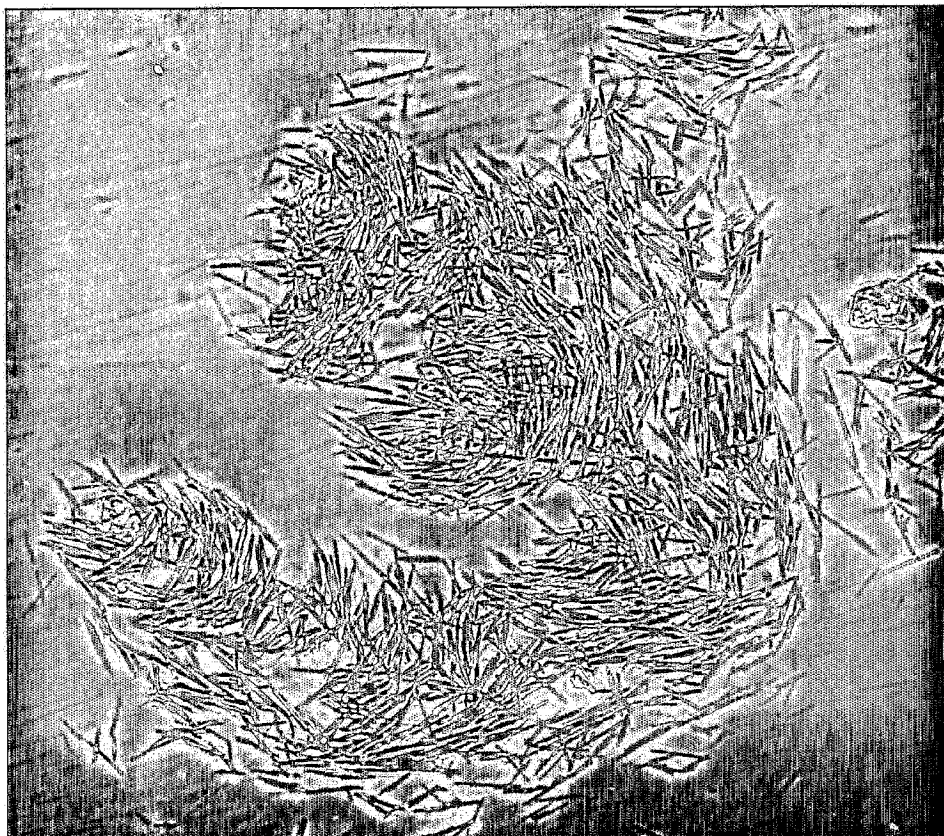


图 3

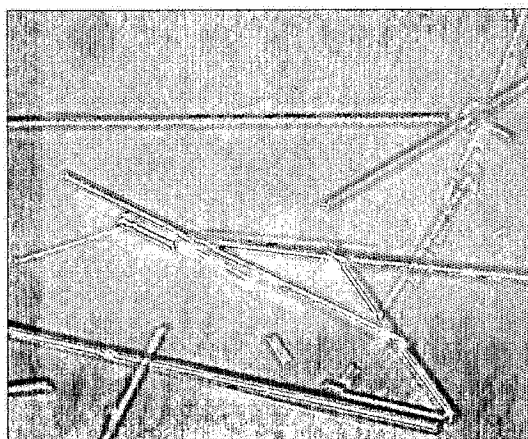


图 4

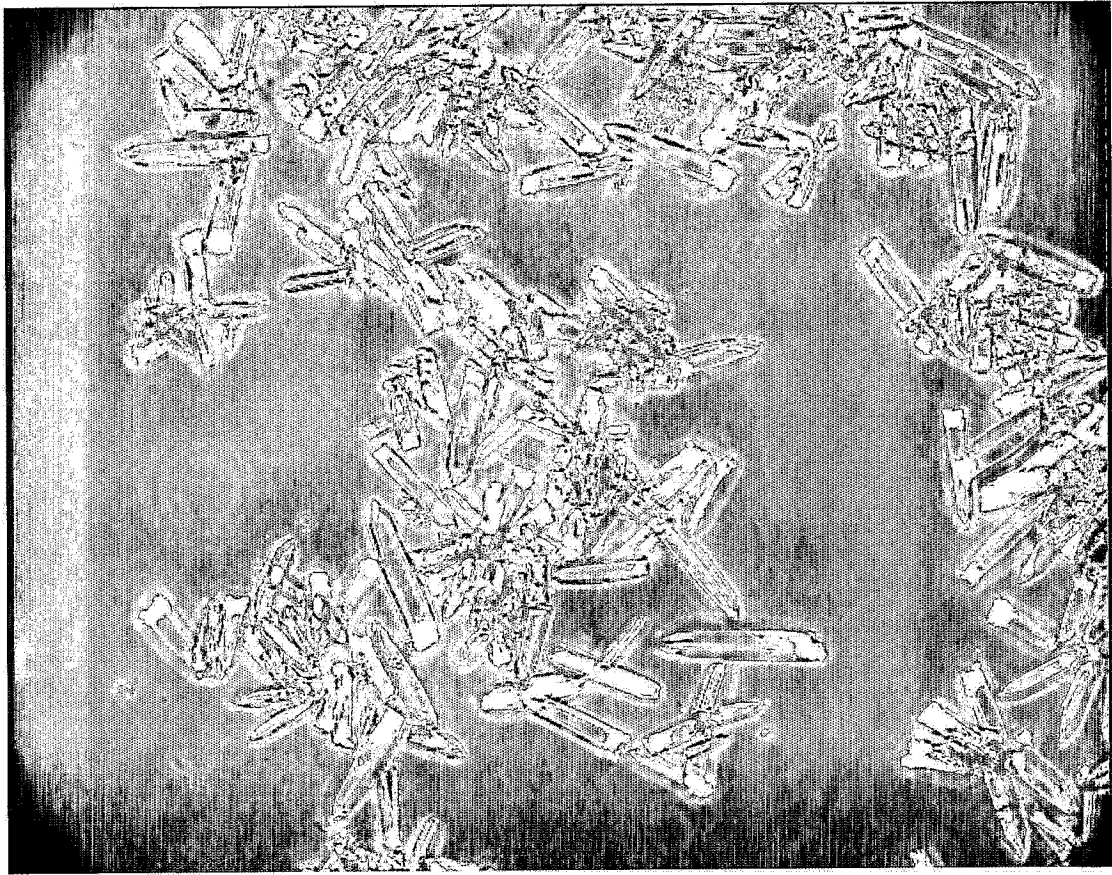


图 5

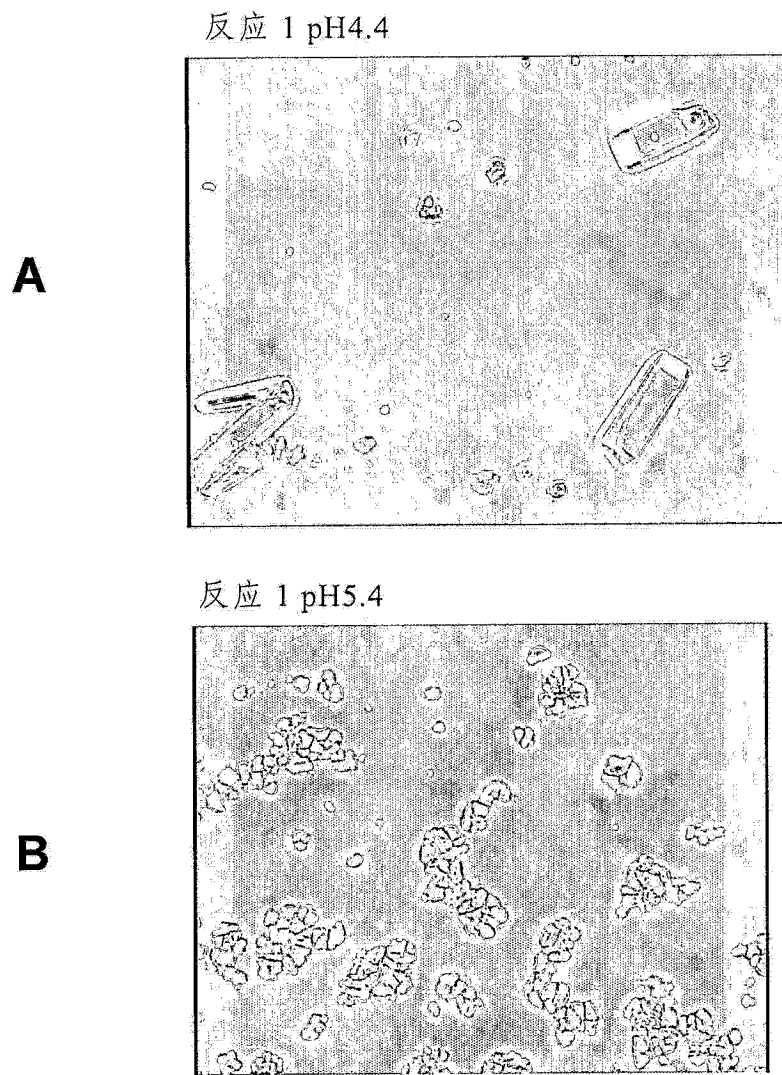


图 6

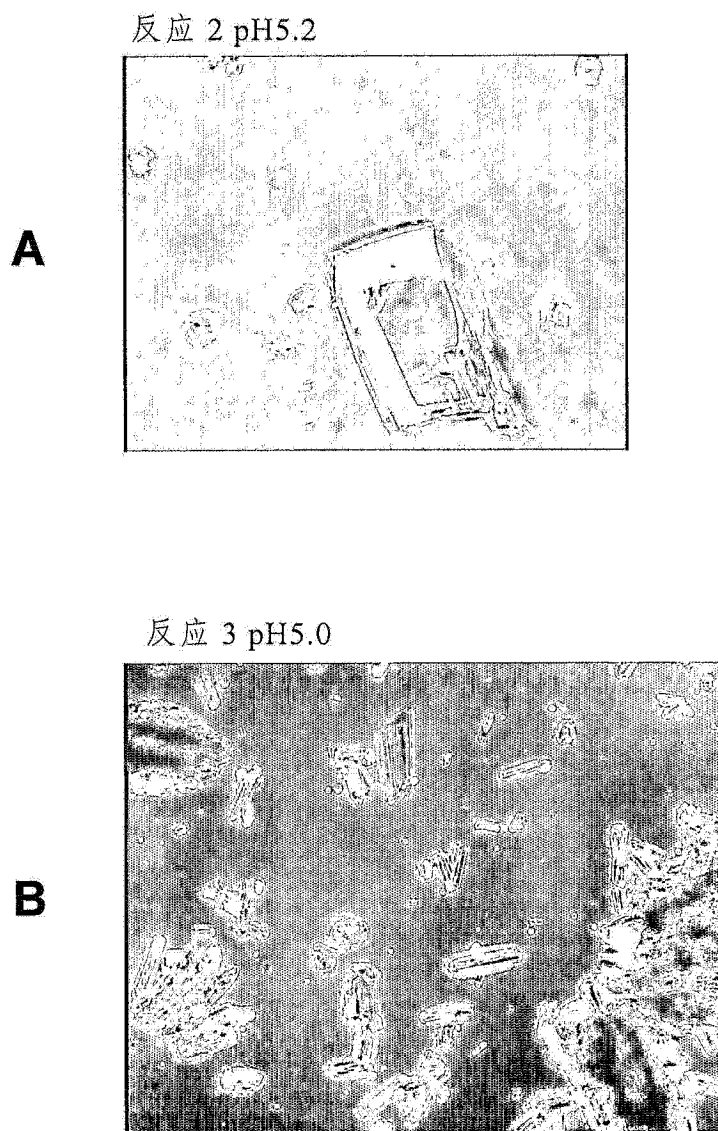


图 7

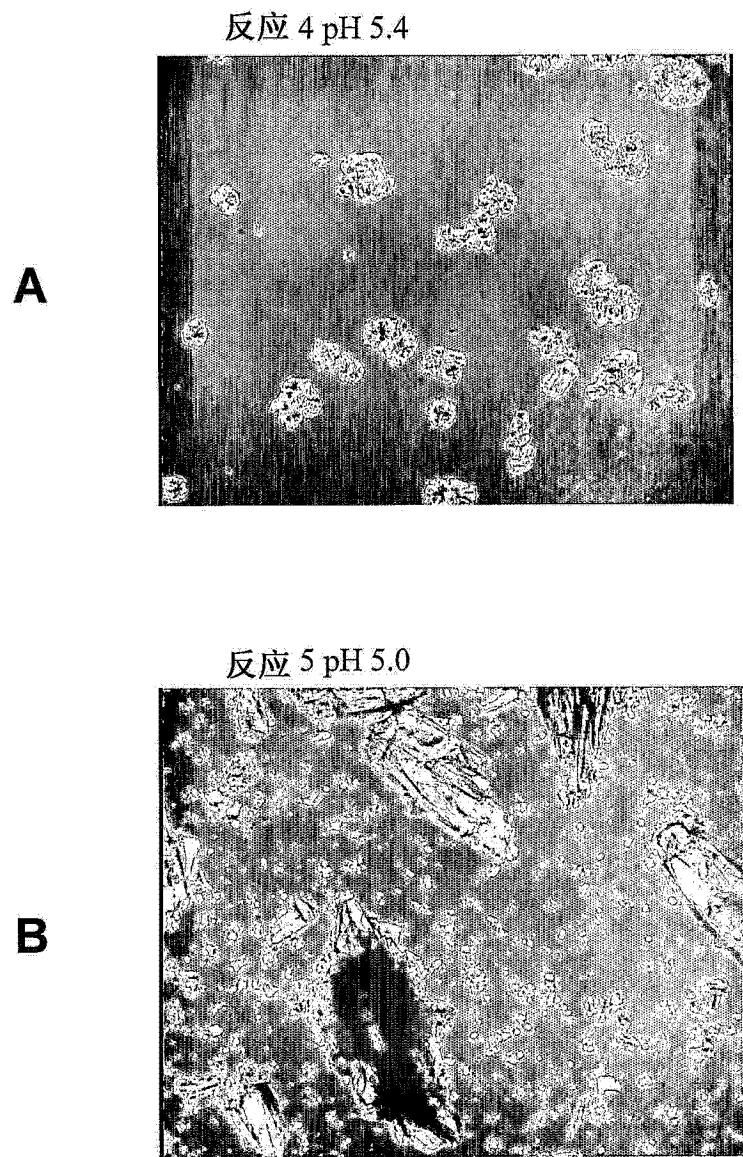


图 8

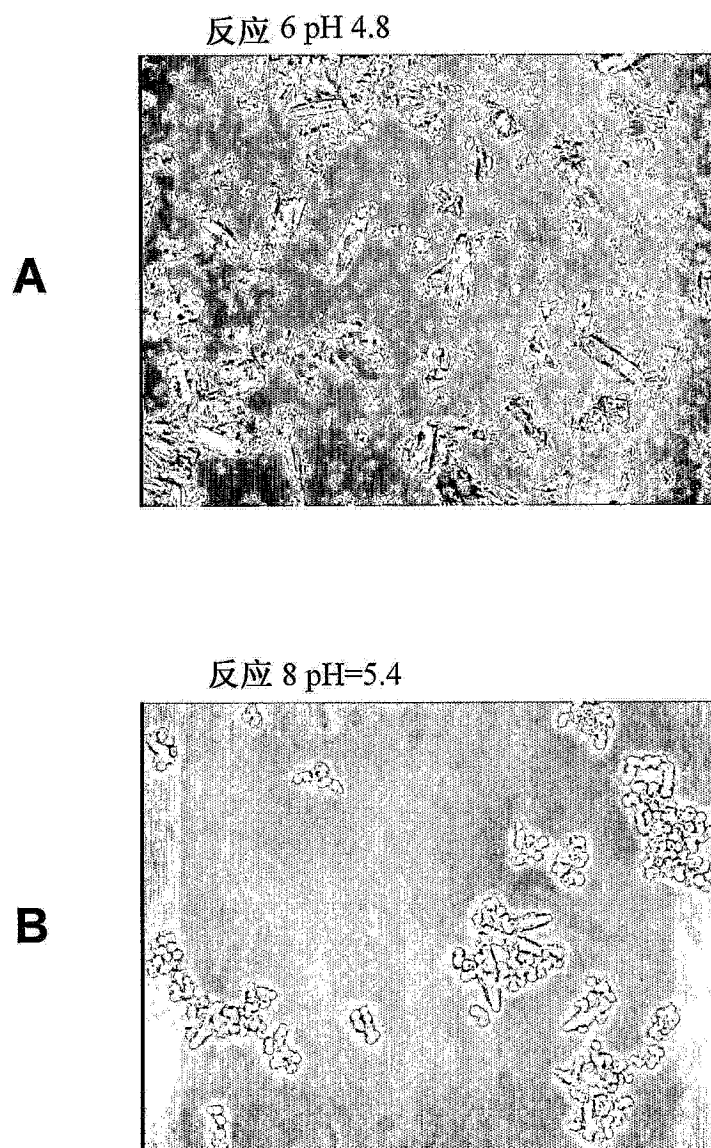


图 9

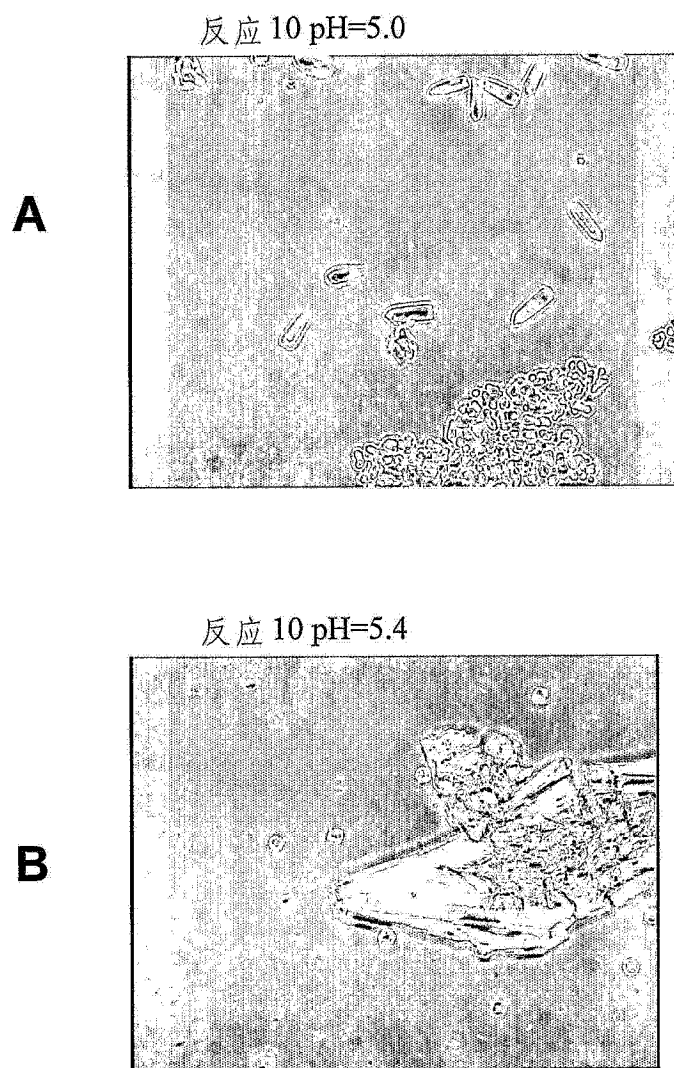


图 10

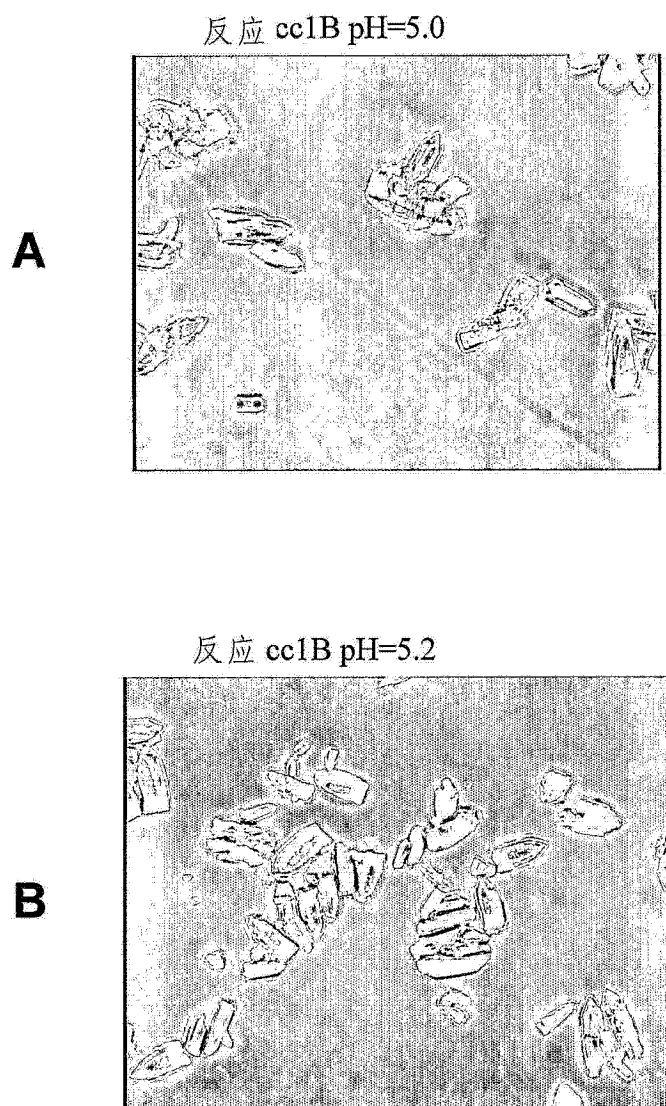


图 11

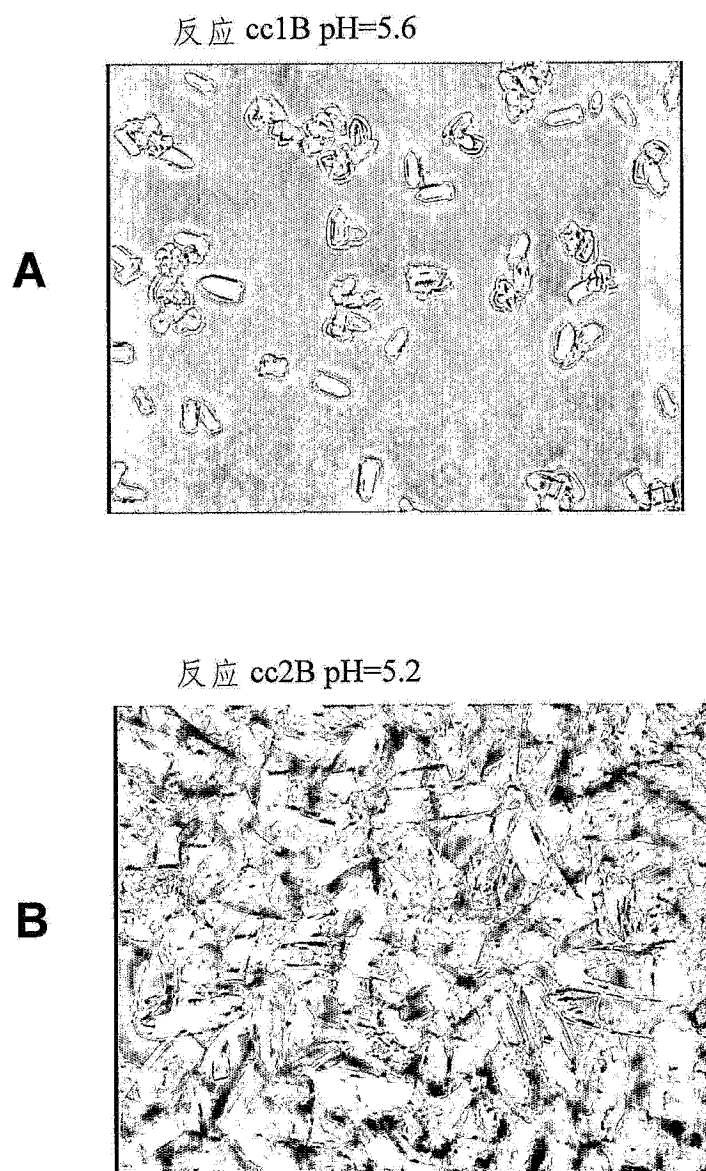


图 12

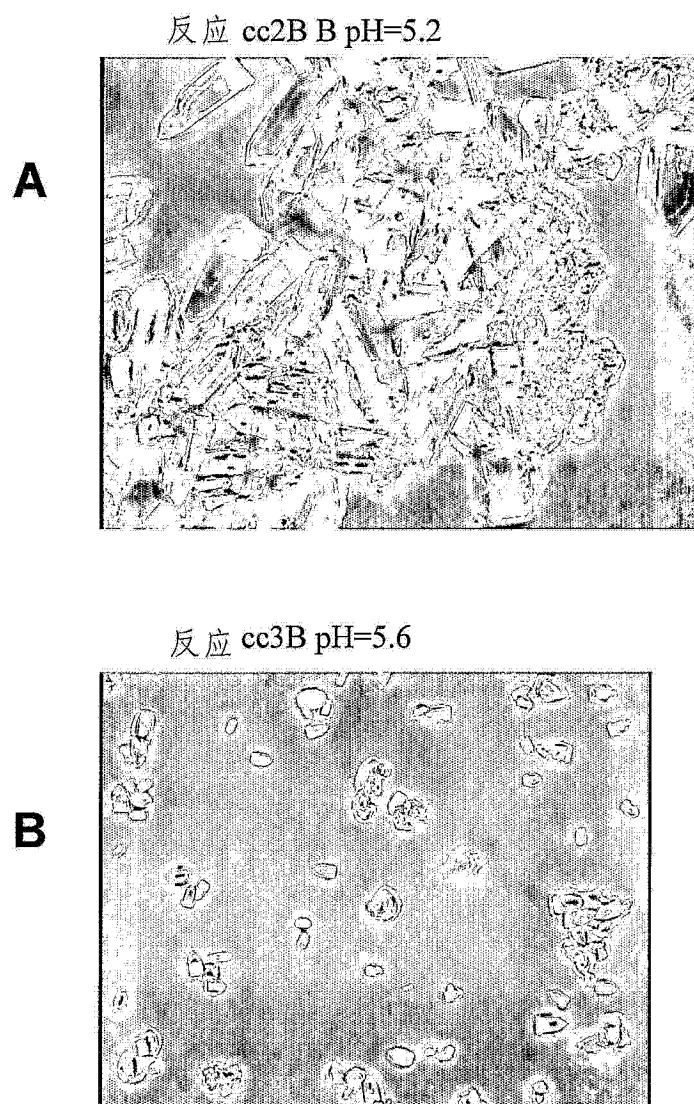
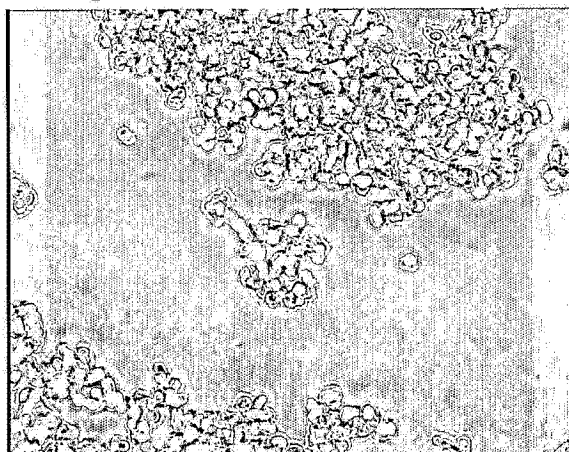


图 13

反应 cc5a pH = 4.6

A



反应 cc6a pH = 5.0

B

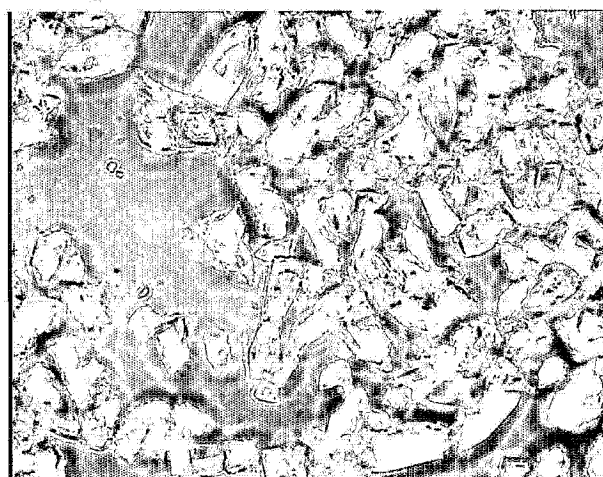
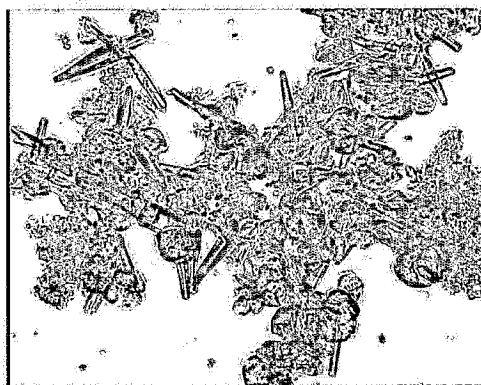


图 14

反应 cc7 pH=5.2

A



反应 cc9 pH=5.4

B

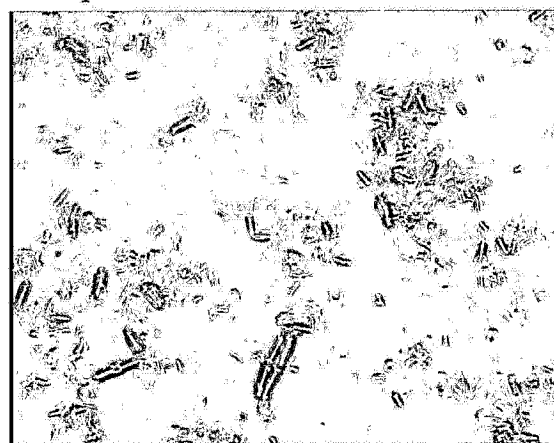


图 15

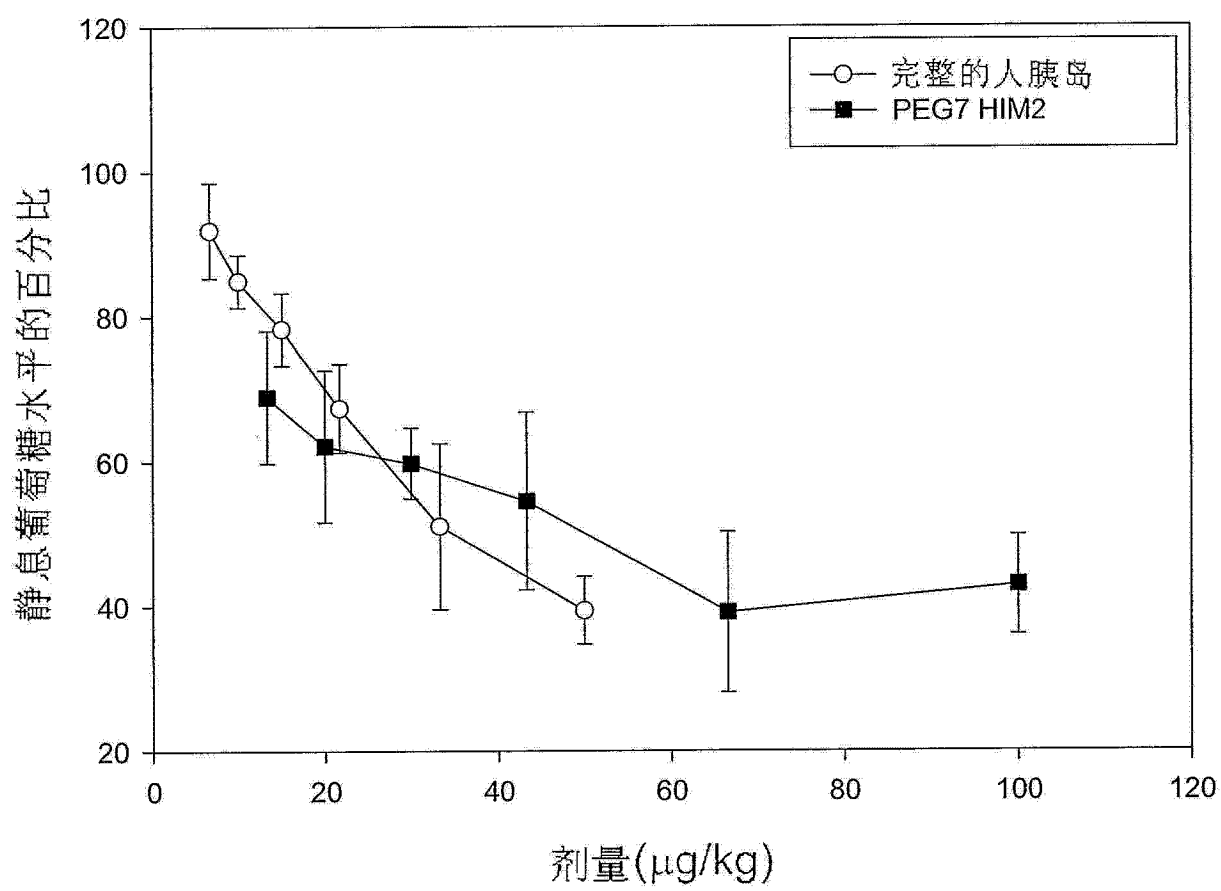


图 16

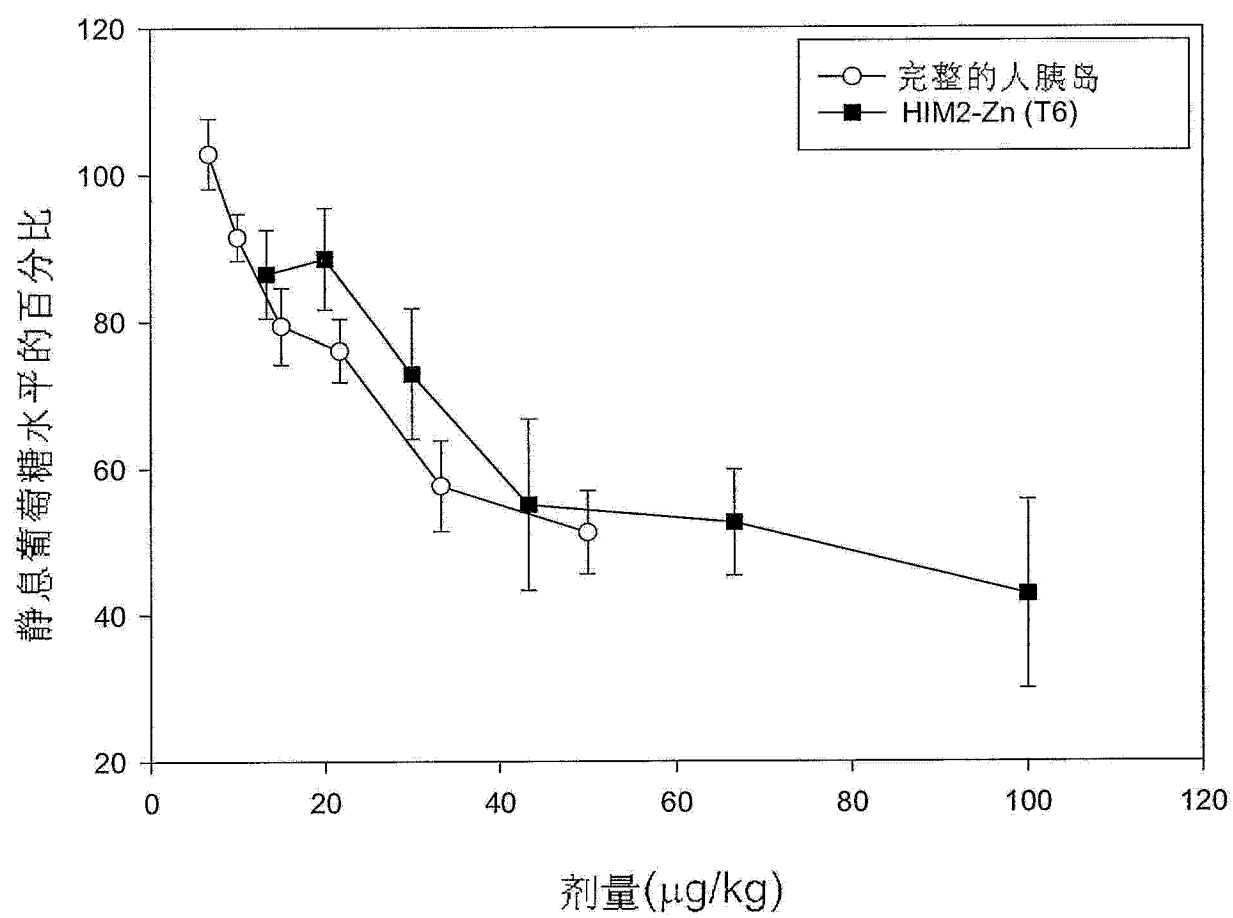


图 17

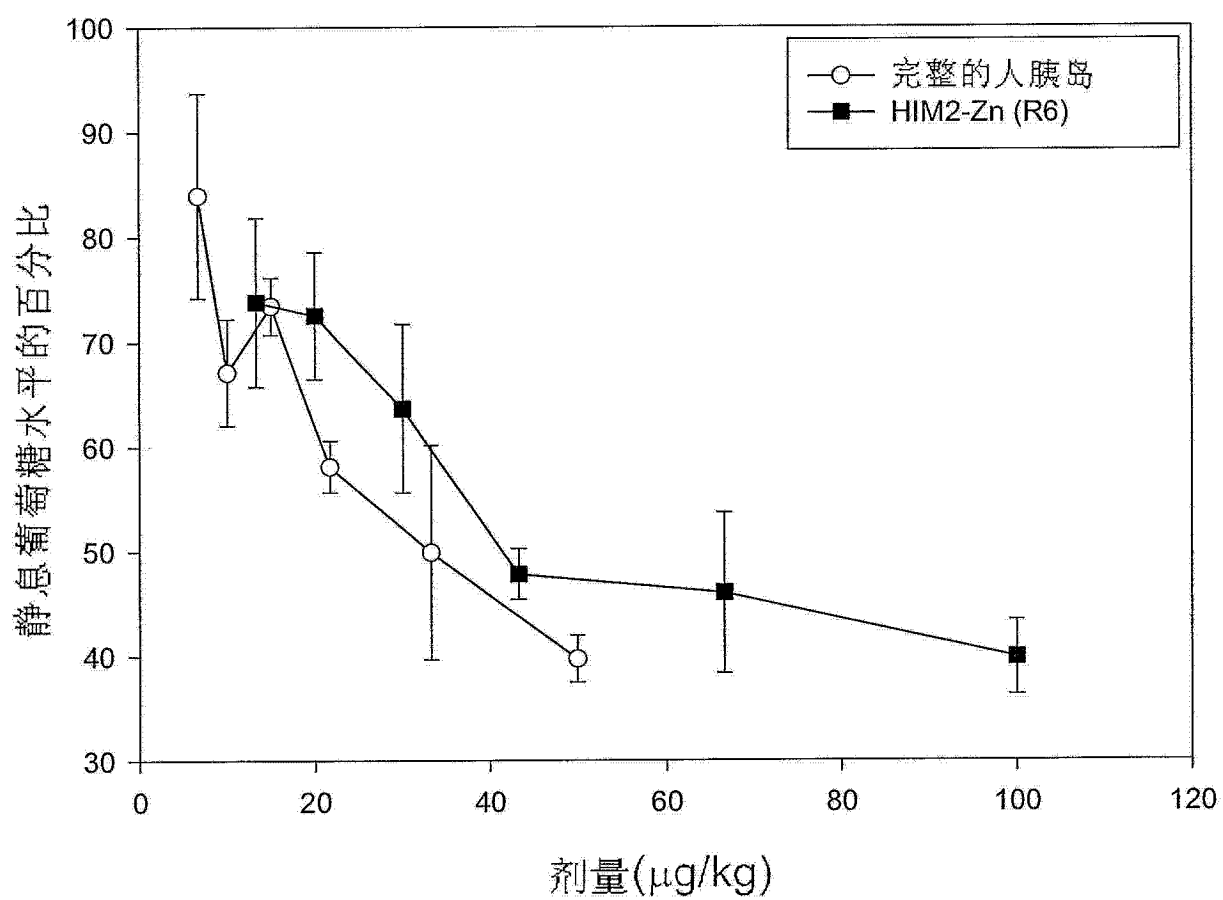


图 18

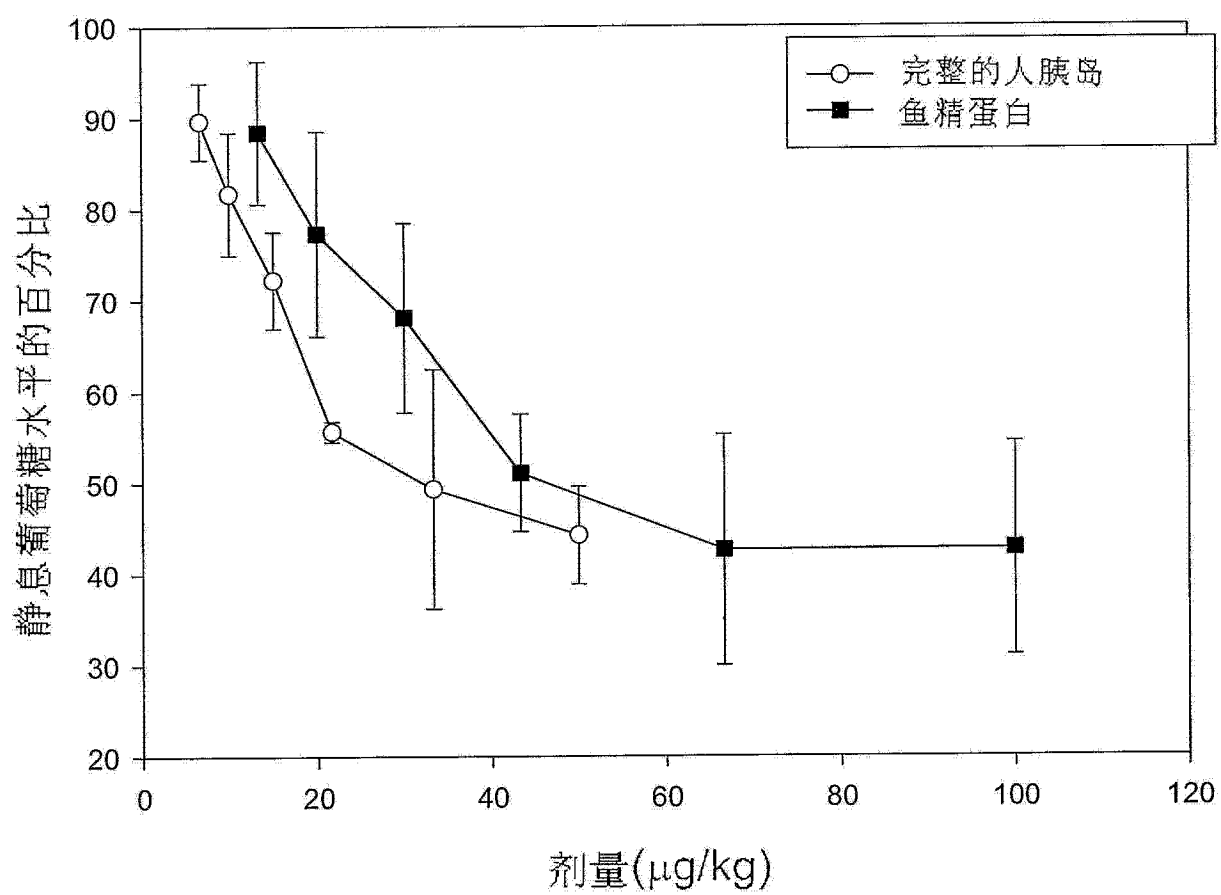


图 19

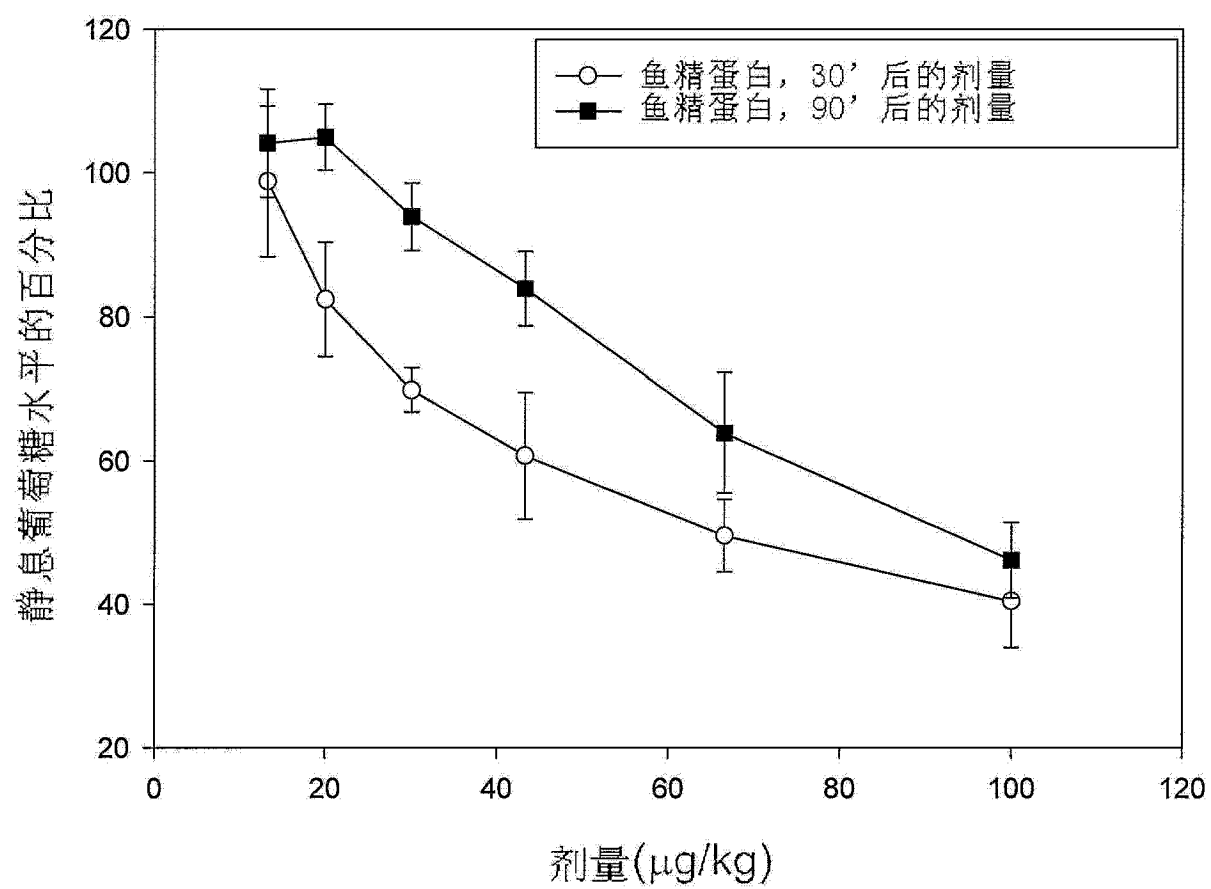


图 20

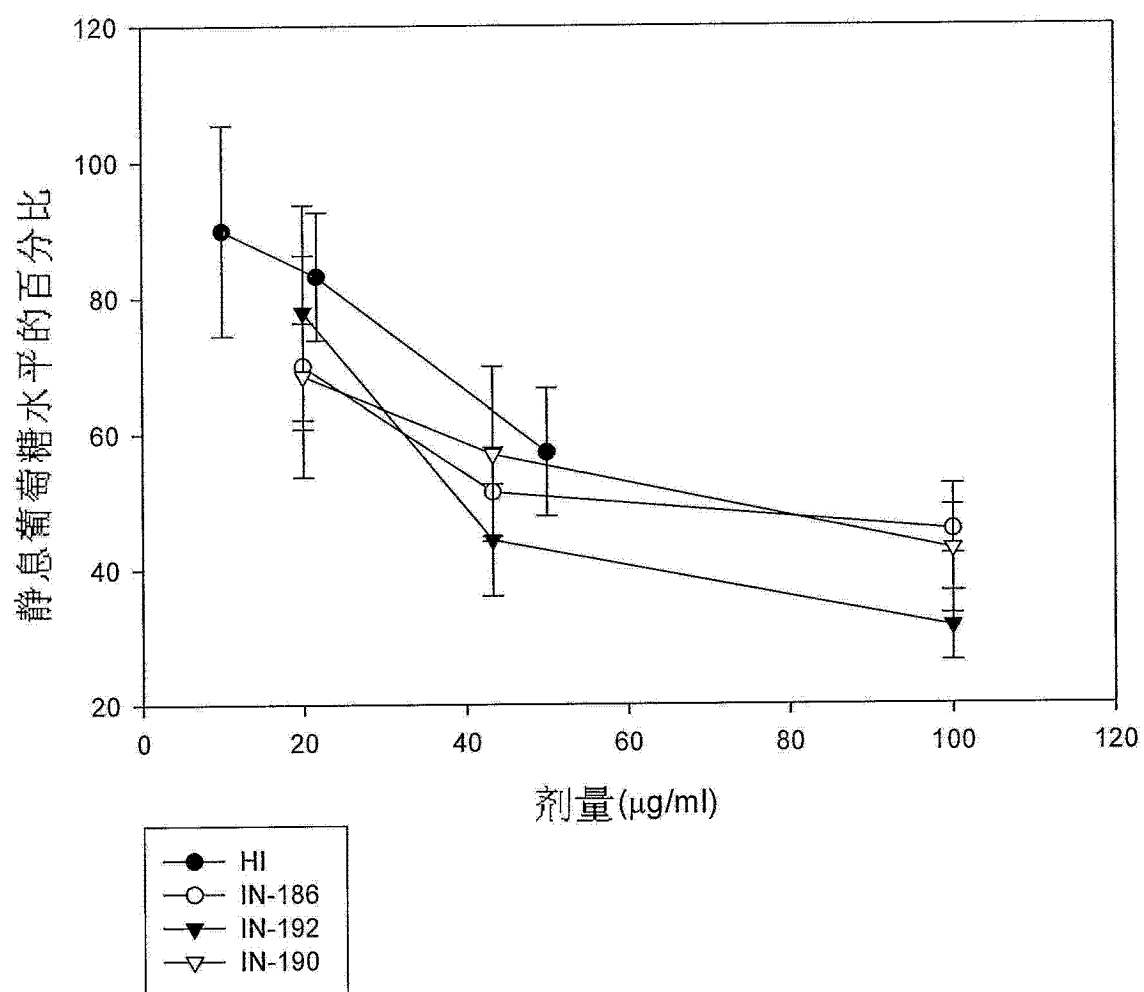


图 21

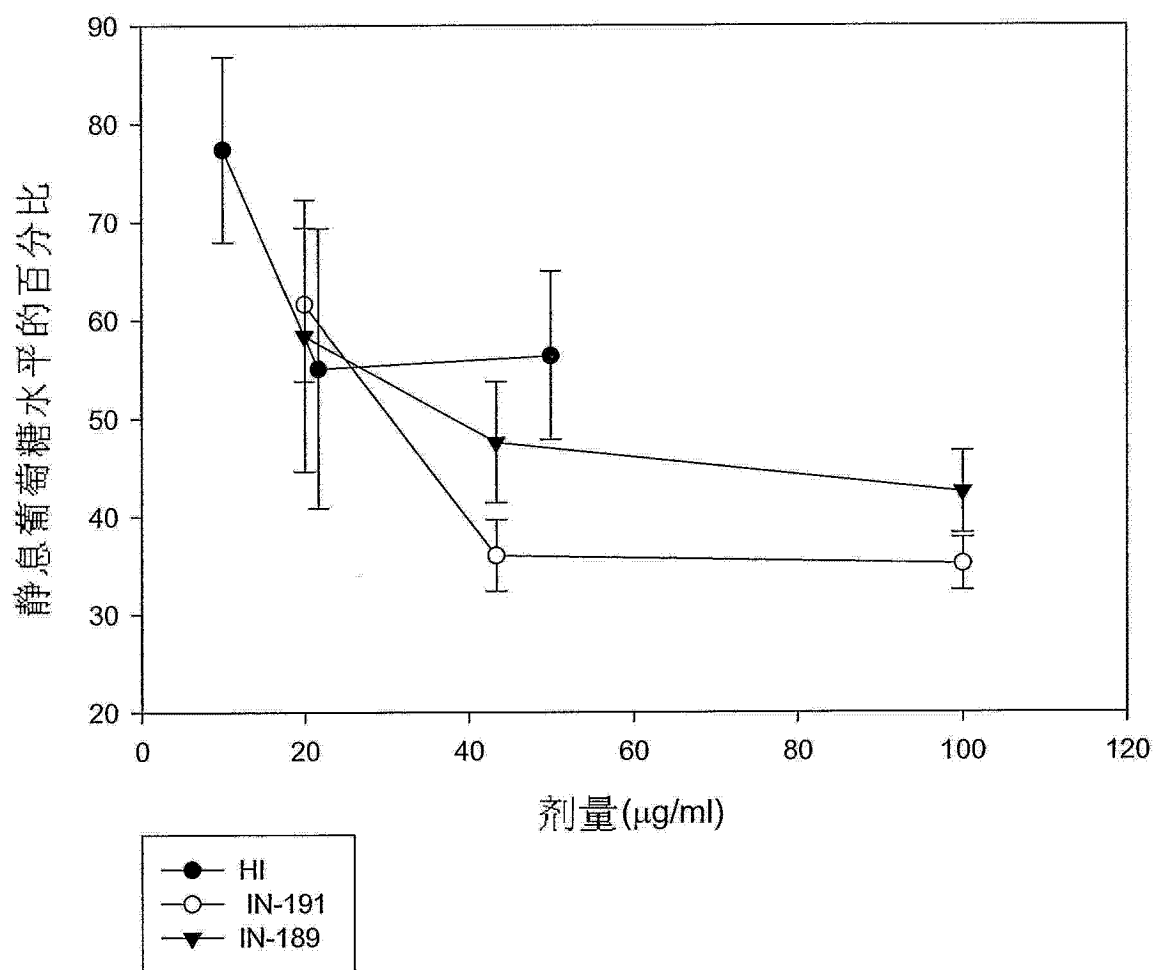


图 22

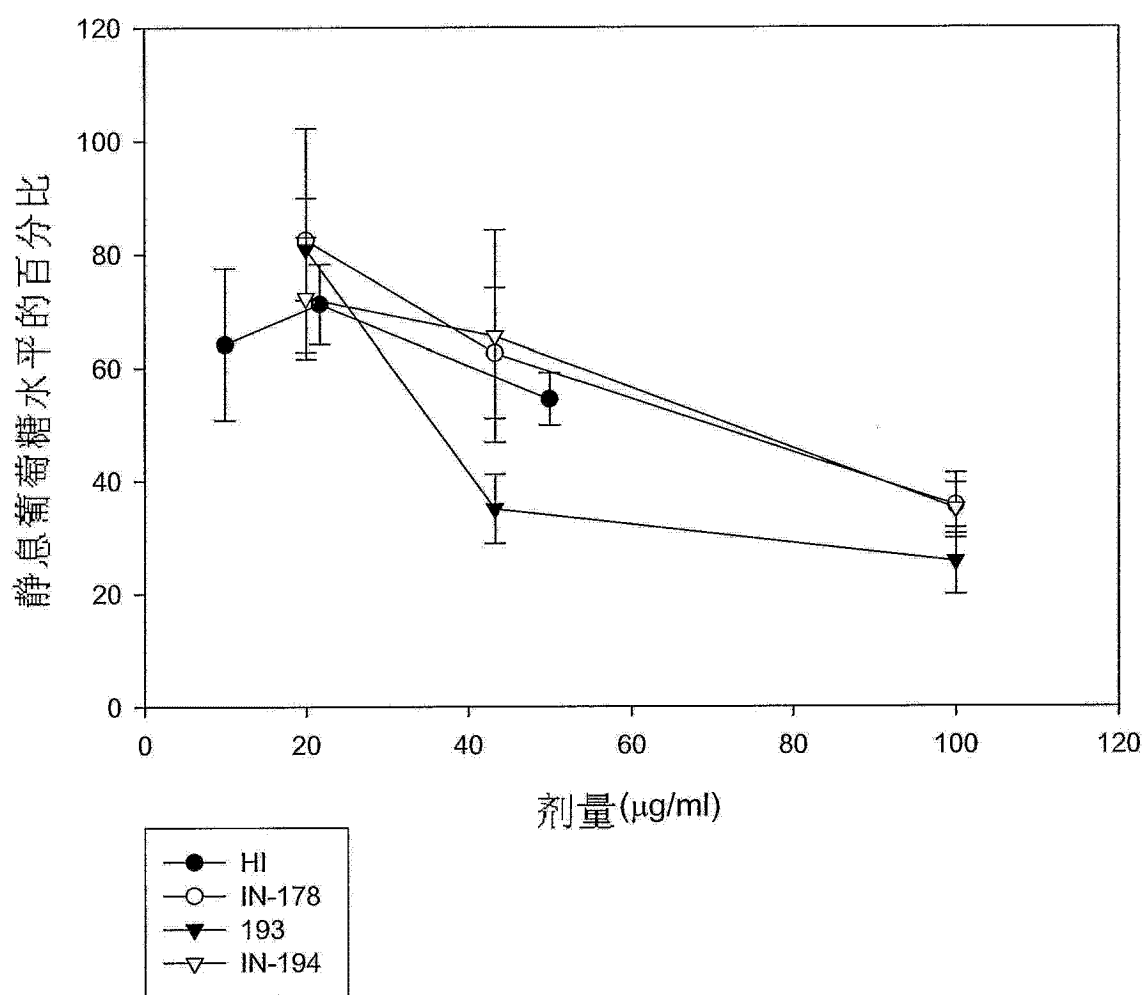


图 23

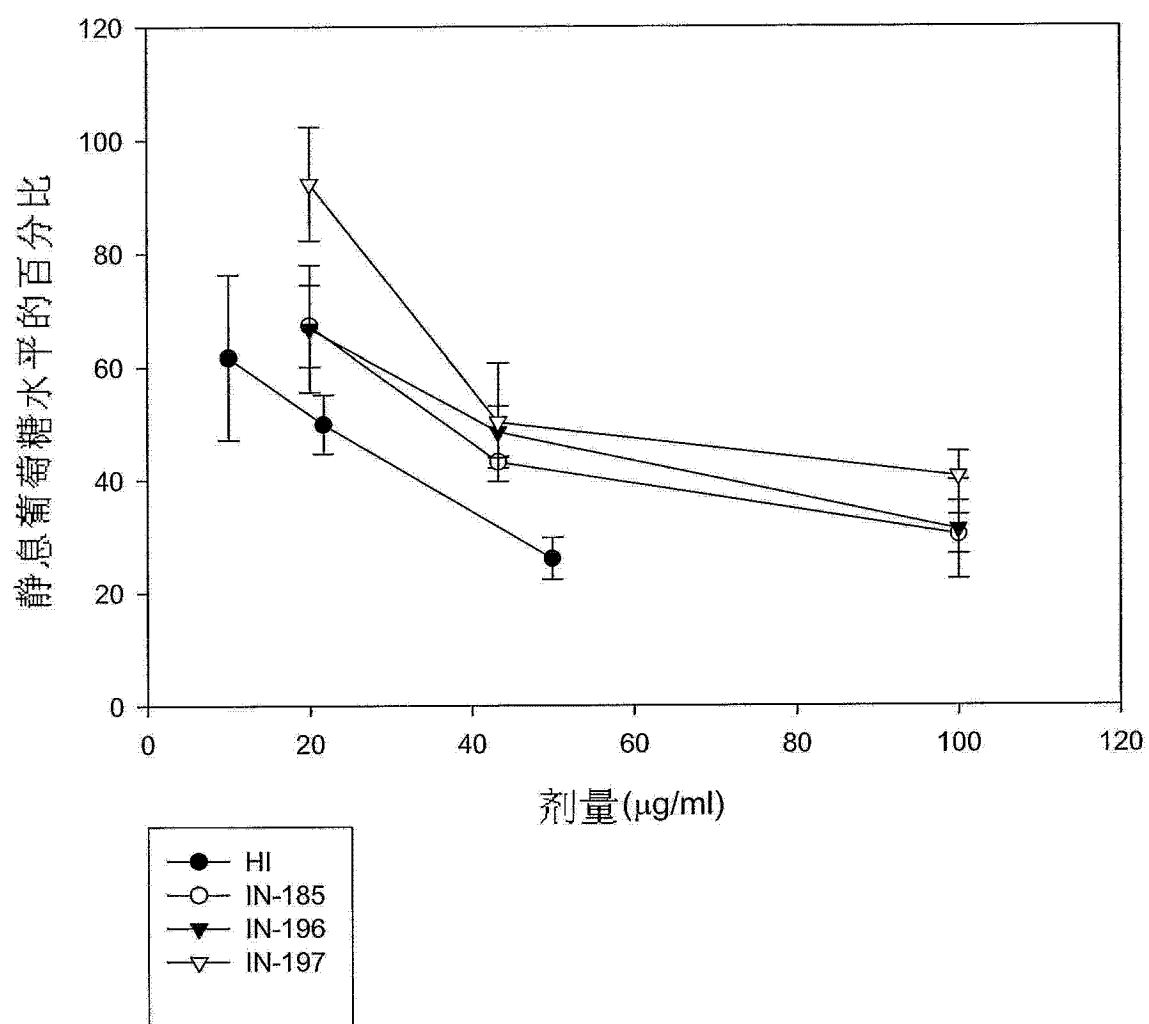


图 24

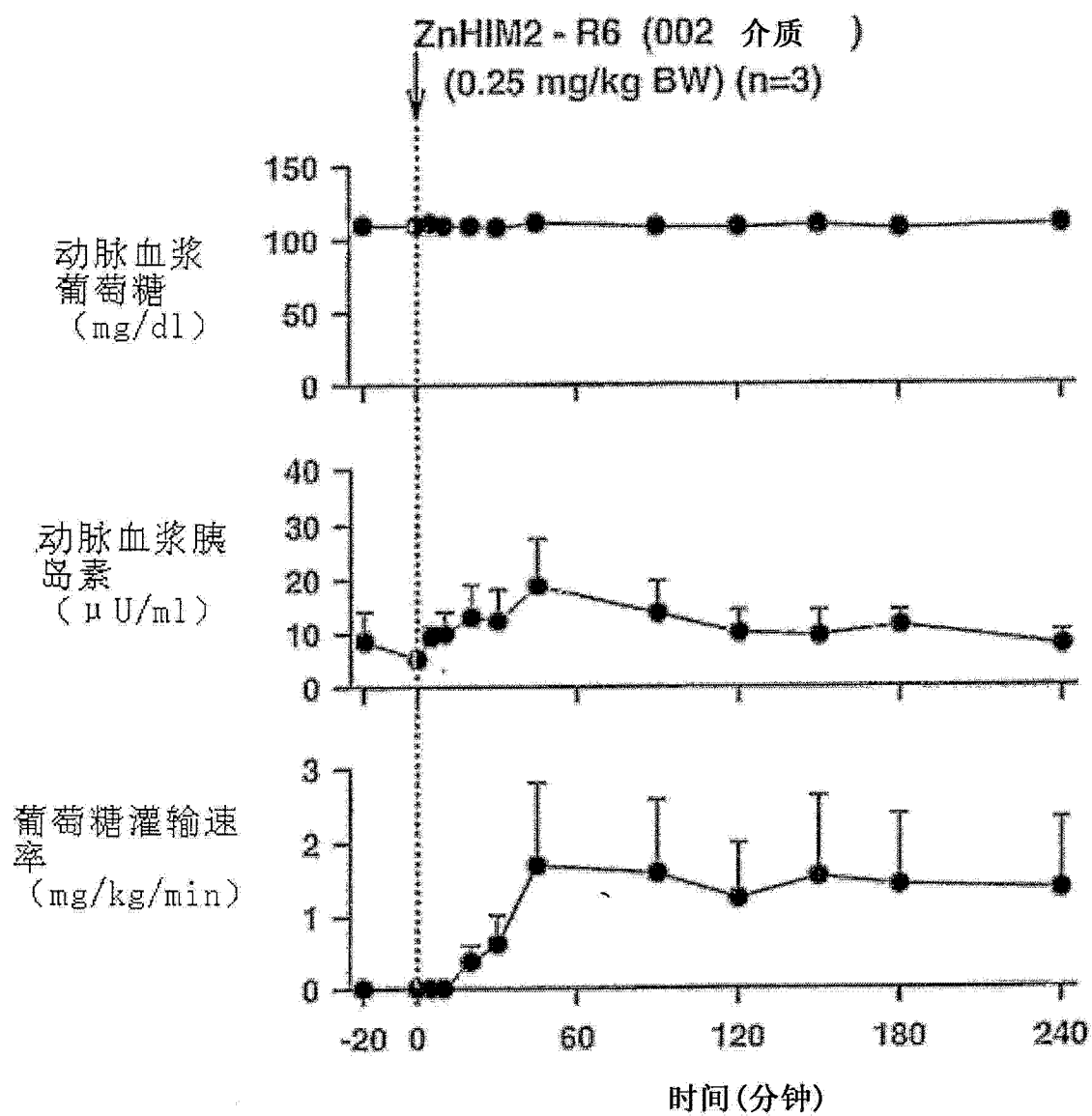


图 25

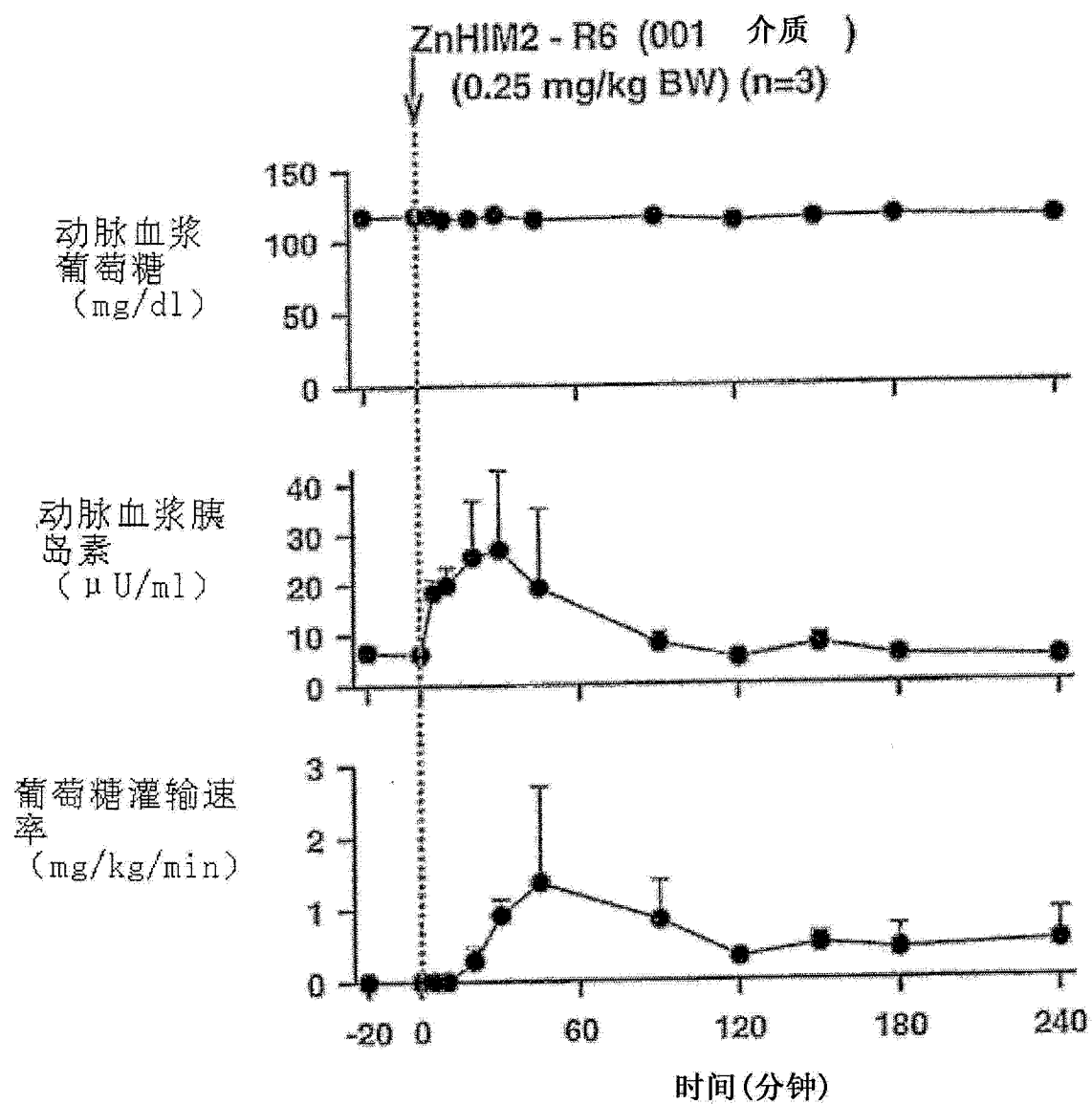


图 26

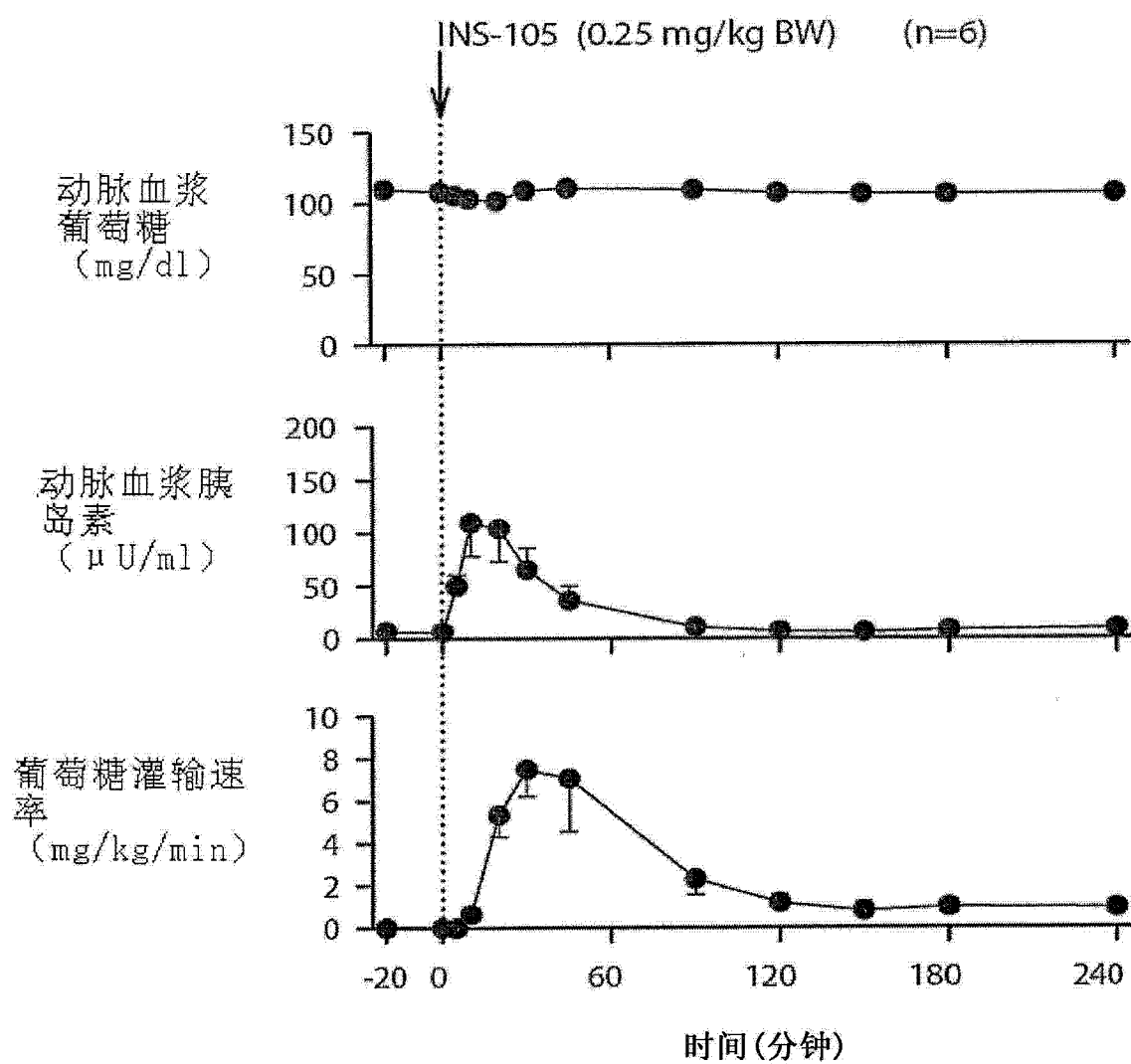


图 27

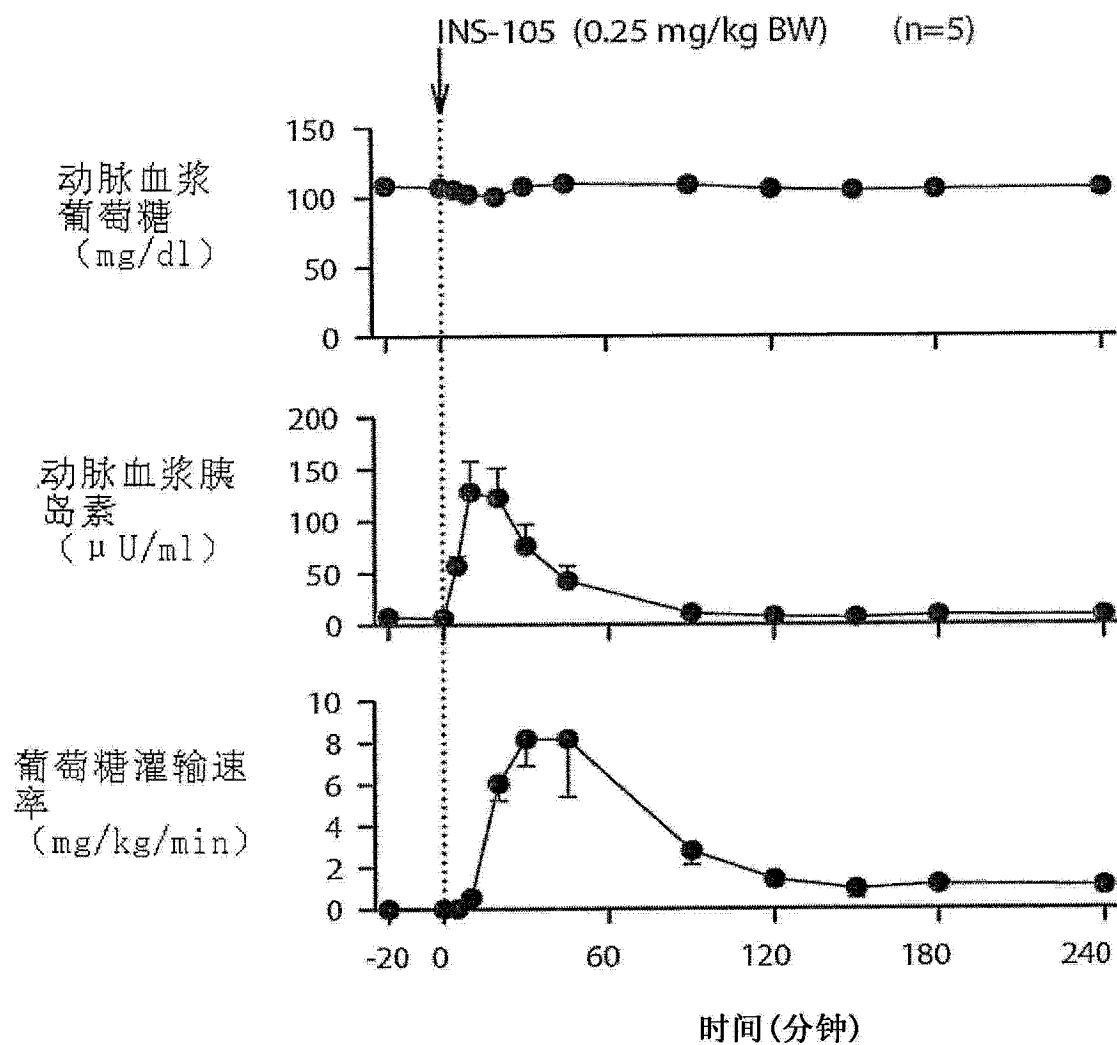


图 28

口服液体制剂中[820]中的IN-105

含有8.0%癸酸盐的制剂

口服剂量0.25mg/kg

动脉血浆葡萄糖，葡萄糖灌注速率以及动脉血浆胰岛素

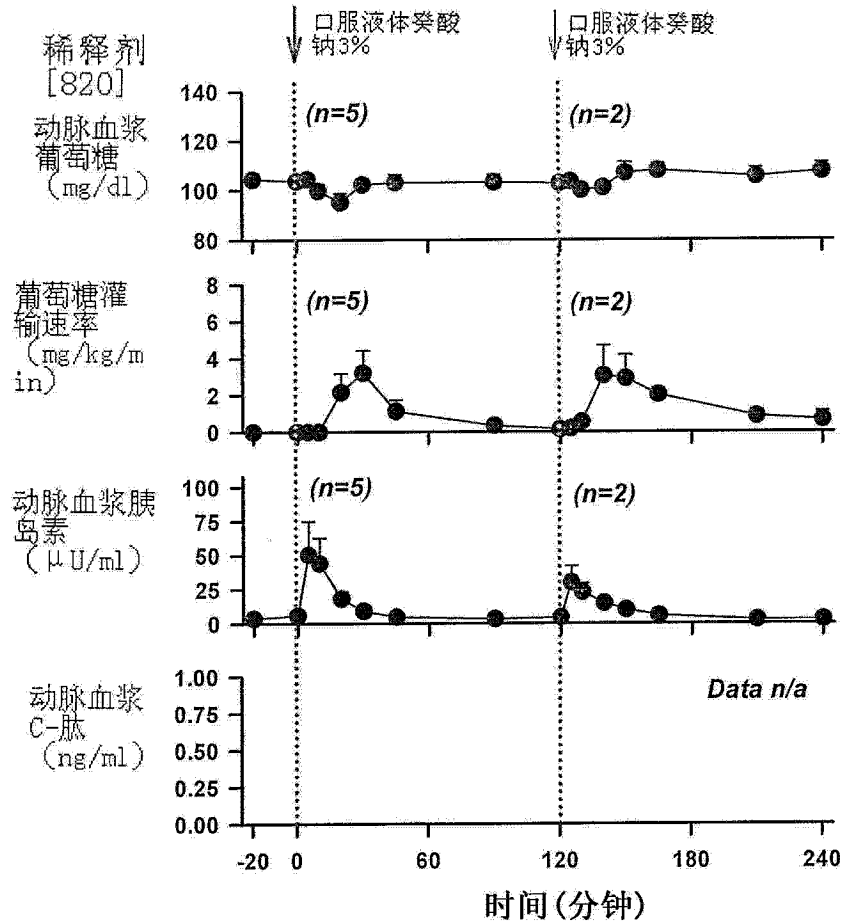


图 29

口服液体制剂中[820]中的IN-105
含有3.0%癸酸盐的制剂
口服剂量0.25mg/kg
动脉血浆胰岛素以及葡萄糖灌输速率曲线下的面积

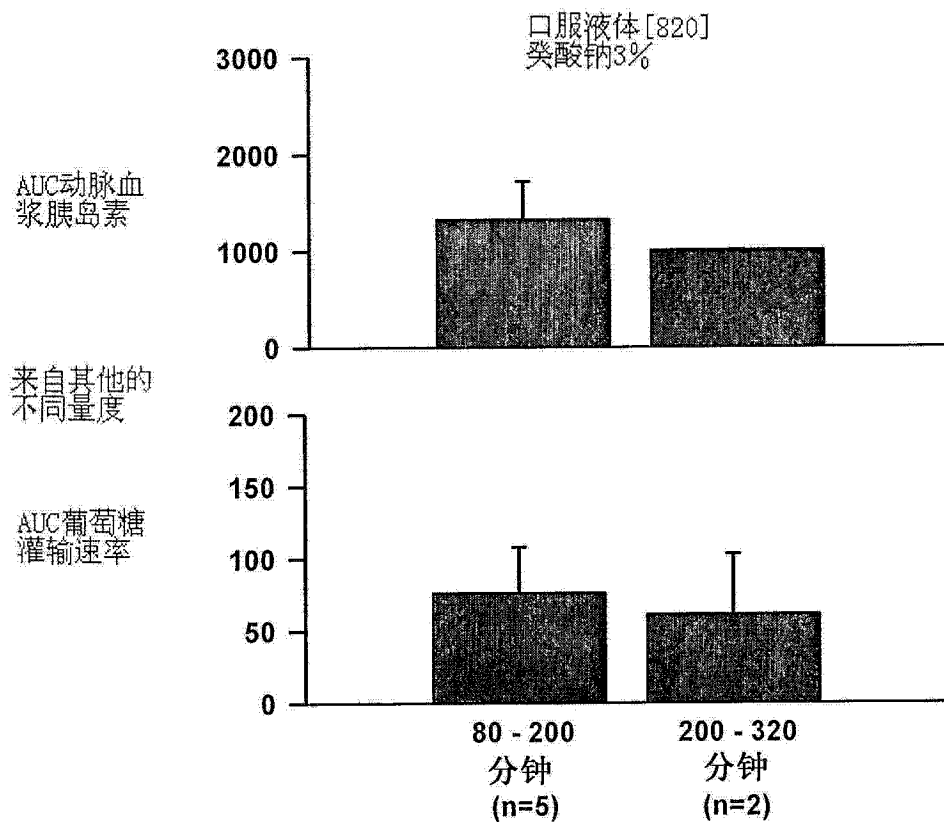


图 30

片剂[856]

每片含有143mg癸酸盐和140mg月桂酸盐的制剂

口服剂量0.25mg/kg

动脉血浆葡萄糖，葡萄糖灌输速率以及动脉血浆胰岛素

片剂剂[856]

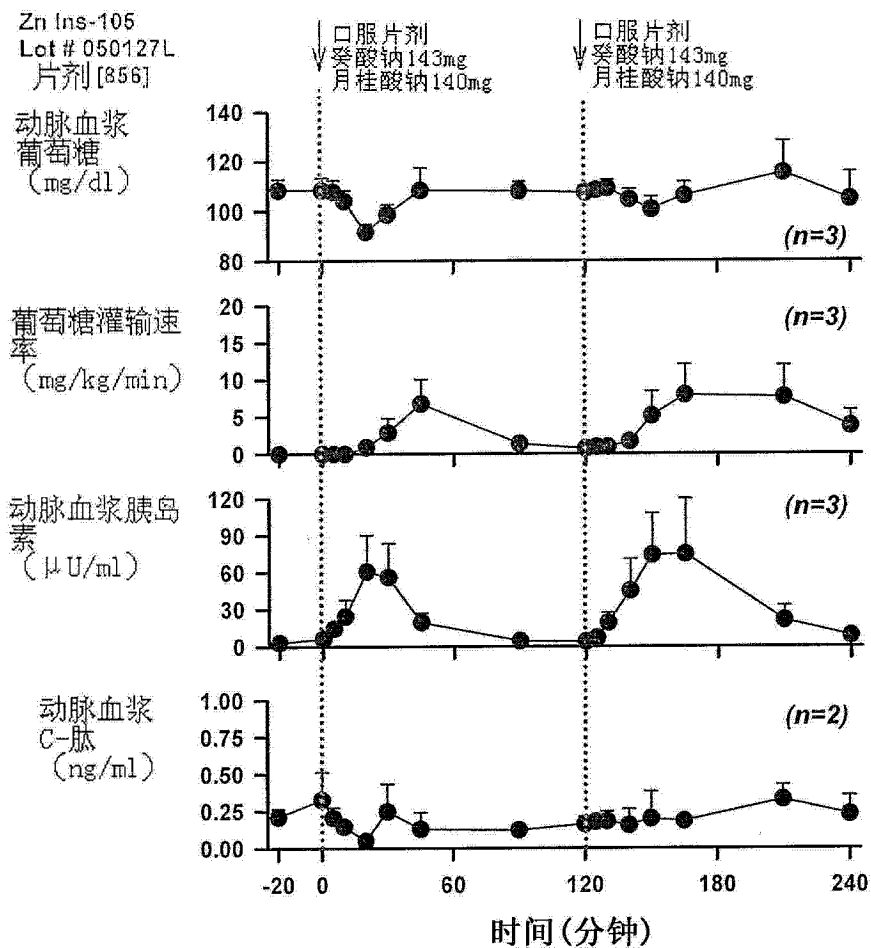


图 31

片剂[856]
每片含有~140mg/140mg癸酸盐和月桂酸盐的制剂
口服剂量0.25mg/kg
动脉血浆胰岛素以及葡萄糖灌输速率曲线下的面积

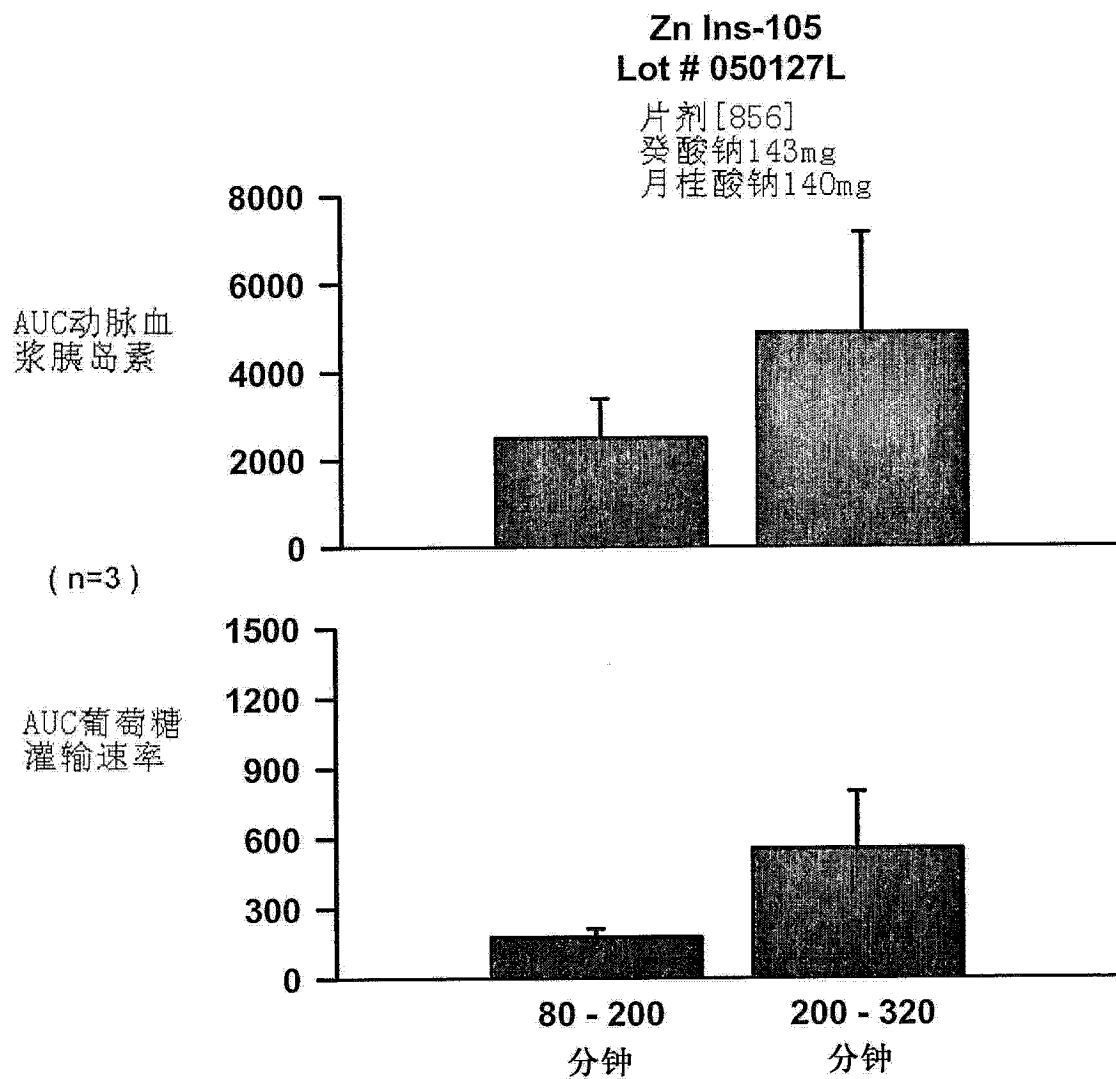


图 32

固体剂型（片剂）制剂[854]
每片含有58mg癸酸盐和57mg月桂酸盐的制剂
口服剂量0.25mg/kg
动脉血浆葡萄糖，葡萄糖灌注速率以及动脉血浆胰岛素
片剂剂[854]

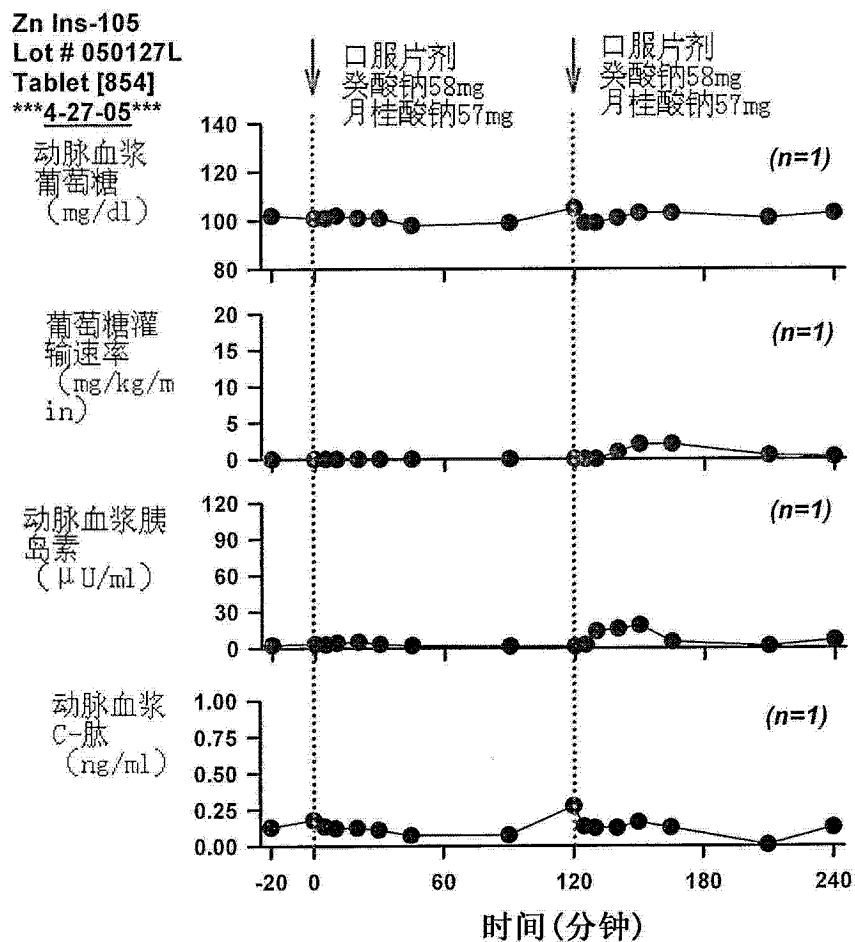
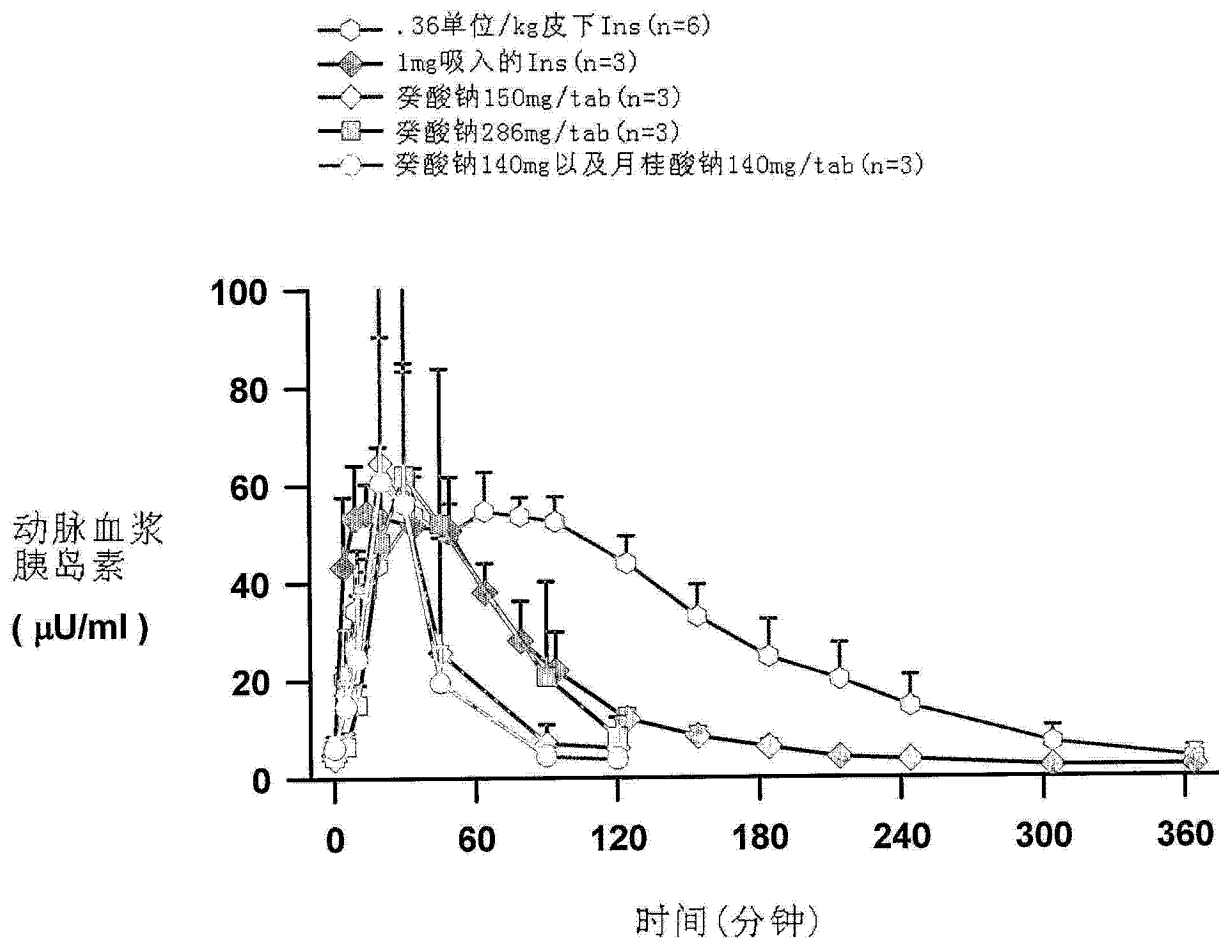


图 33

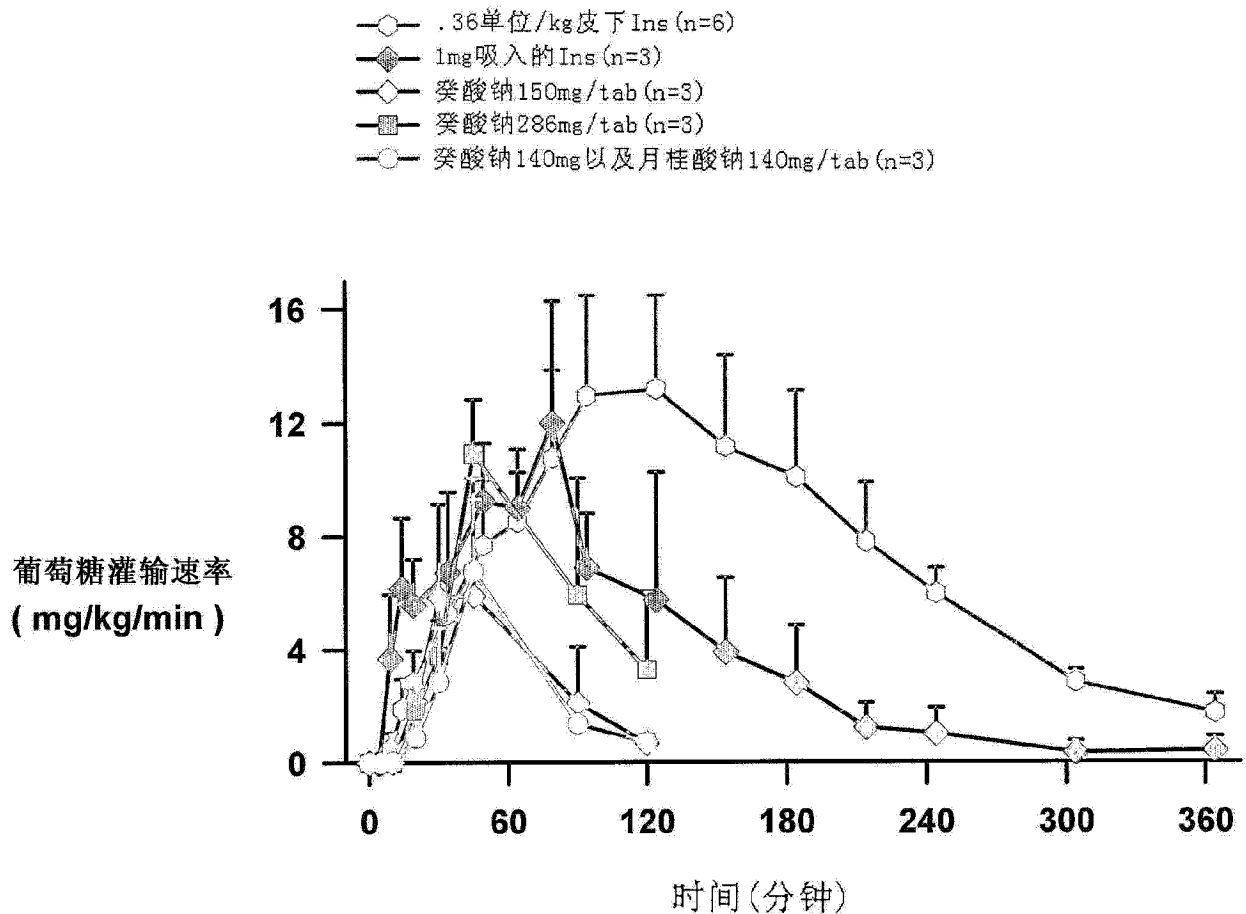
单位剂量给药ZN IN-105原型片剂（6mg或0.25mg/kg单位剂量）后动脉血浆胰岛素的水平以及与SQ*和吸入*单位剂量常规胰岛素的比较



*来自同一狗模型的历史数据

图 34

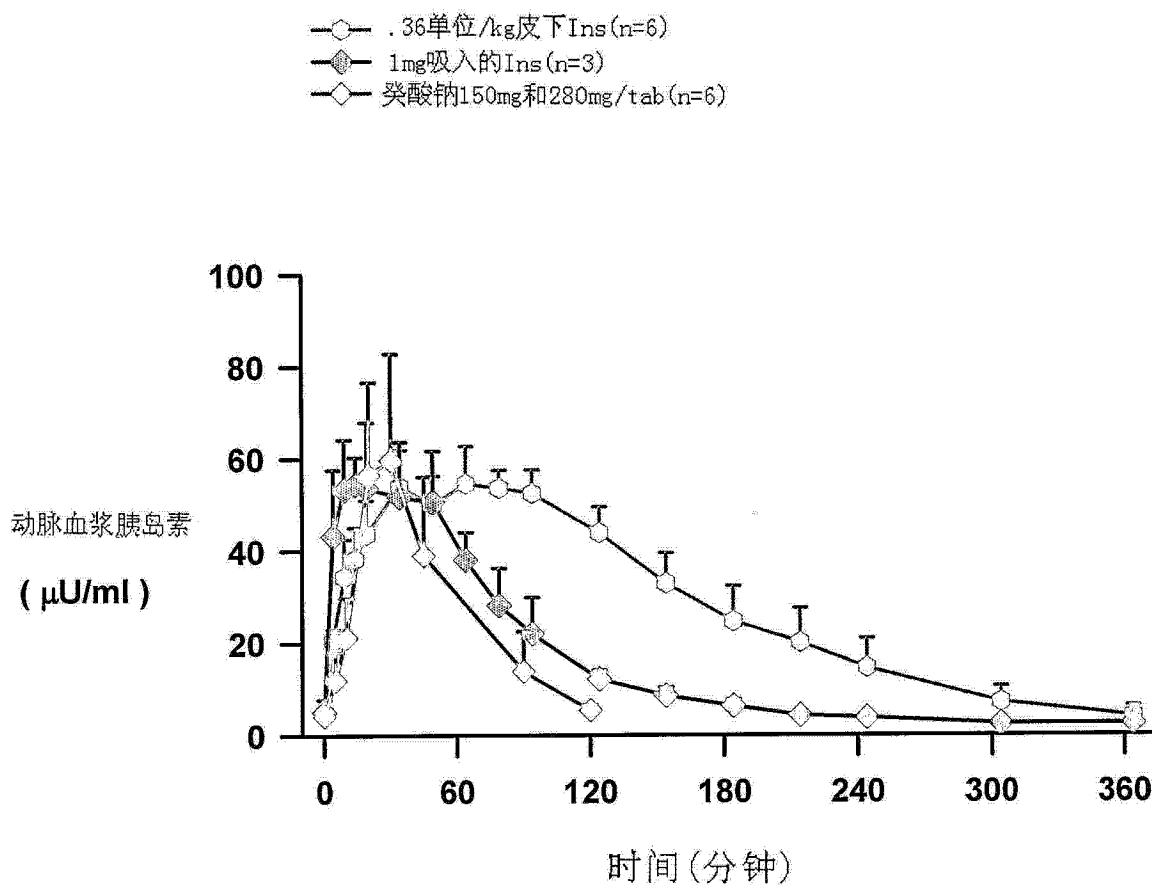
单位剂量给药ZN IN-105原型片剂（6mg或0.25mg/kg单位剂量）后葡萄糖灌注速率（GIR）
以及与SQ*和吸入*单位剂量常规胰岛素的比较



* 来自同一狗模型的历史数据

图 35

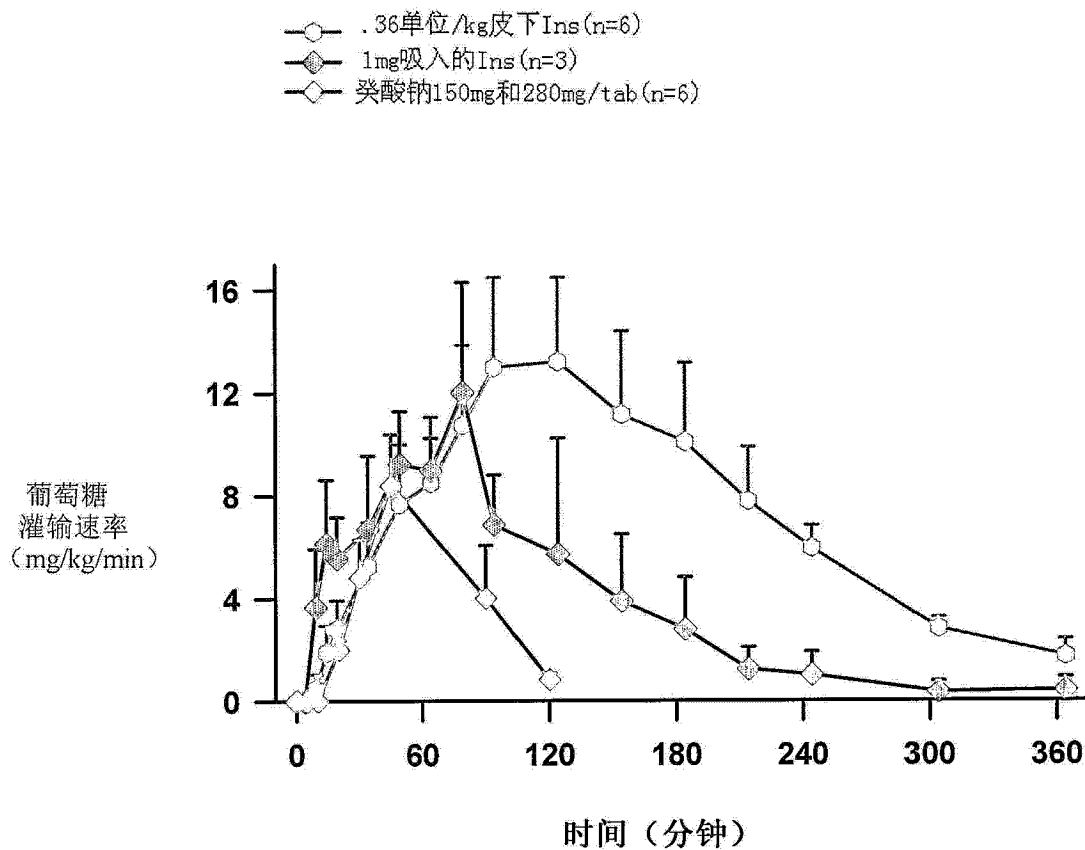
单位剂量给药ZN IN-105的选择的原型片剂后动脉血浆胰岛素水平
以及与SQ*和吸入*单位剂量常规胰岛素，每片含有150mg和280mg
癸酸盐的制剂
口服剂量0.25mg/kg的比较



* 来自同一狗模型的历史数据

图 36

单位剂量给药 ZN IN-105 的选择的原型片剂后葡萄糖灌注速率(GIR)
以及与 SQ*和吸入*单位剂量常规胰岛素，每片含有 150mg 和 280mg 癸
酸盐的制剂口服剂量 0.25mg/kg 的比较



* 来自同一狗模型的历史数据

图 37

片剂[860]
每片含有 286mg 癸酸盐的制剂
口服剂量 0.25mg/kg
动脉血浆葡萄糖, 葡萄糖灌输速率, 动脉血浆胰岛素以及 C-肽水平

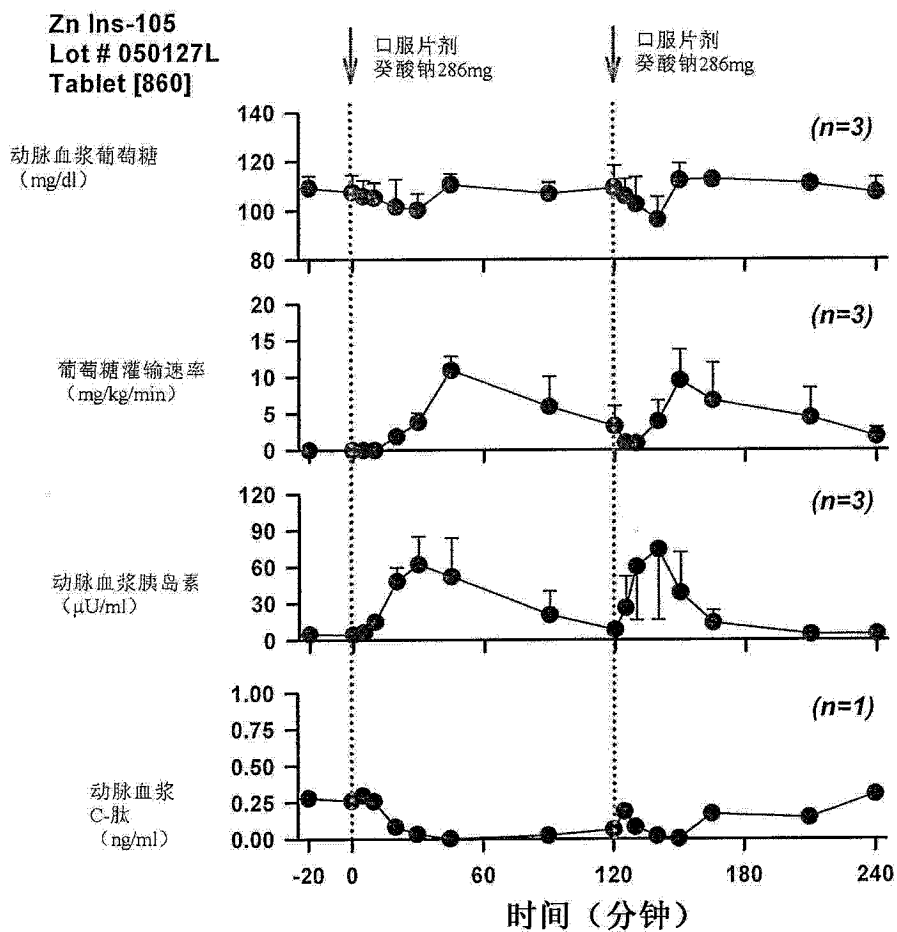


图 38

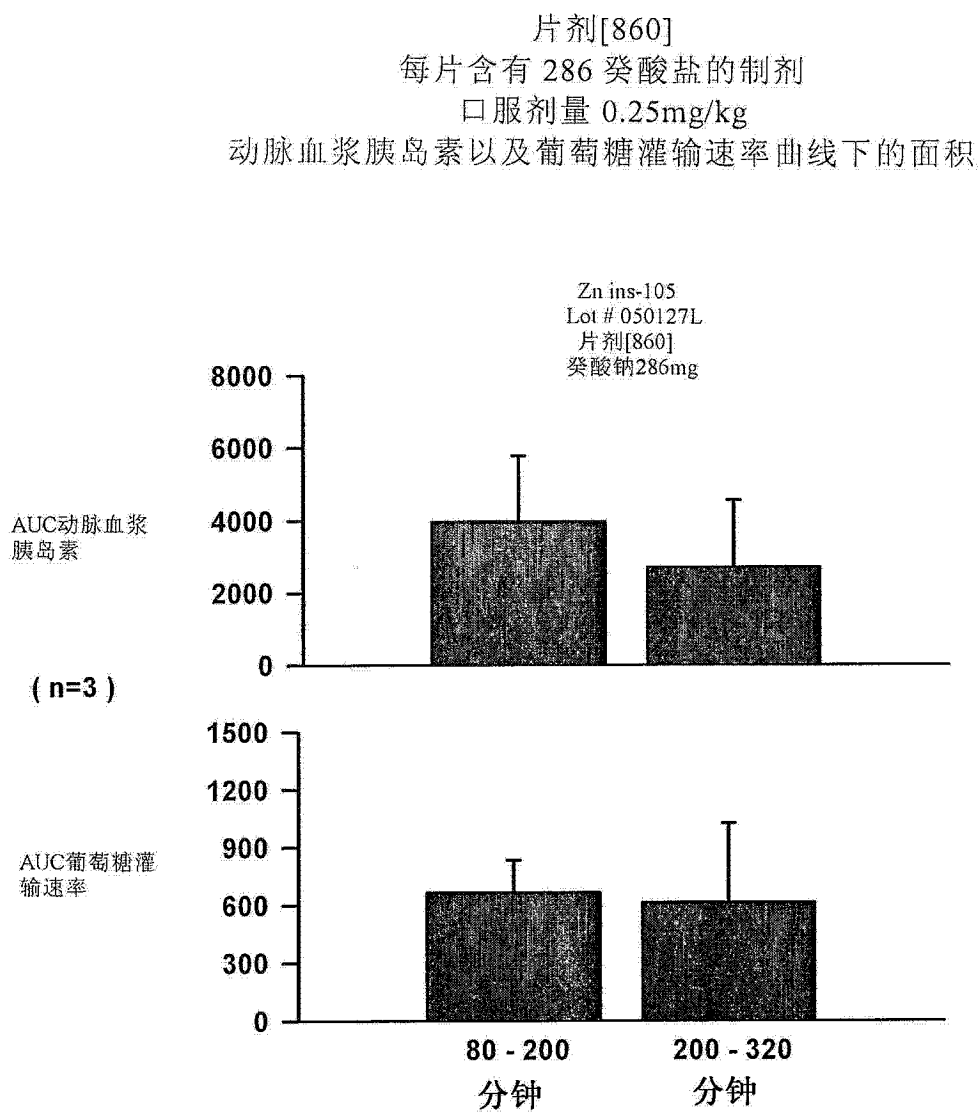


图 39

片剂[862]/[859]
每片含有 150mg 癸酸盐的制剂
口服剂量 0.25mg/kg
动脉血浆葡萄糖, 葡萄糖灌注速率, 动脉血浆胰岛素以及 C-肽水平

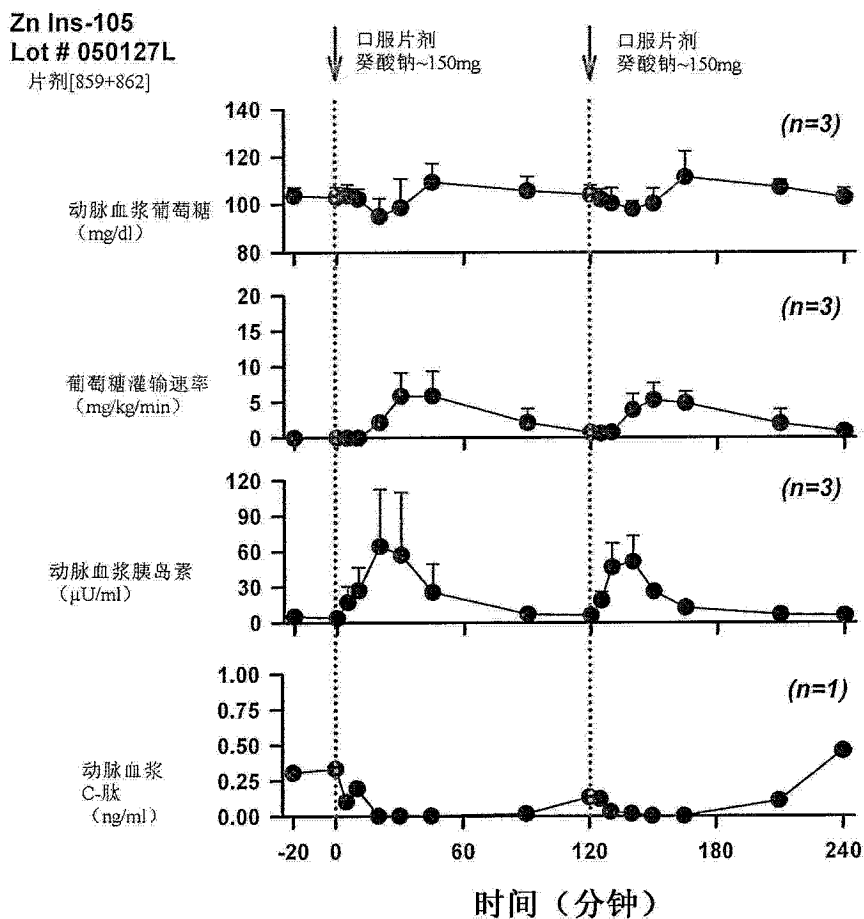


图 40

片剂[862]和 [859]
每片含有~150 癸酸盐的制剂
口服剂量 0.25mg/kg
动脉血浆胰岛素以及葡萄糖灌输速率曲线下的面积

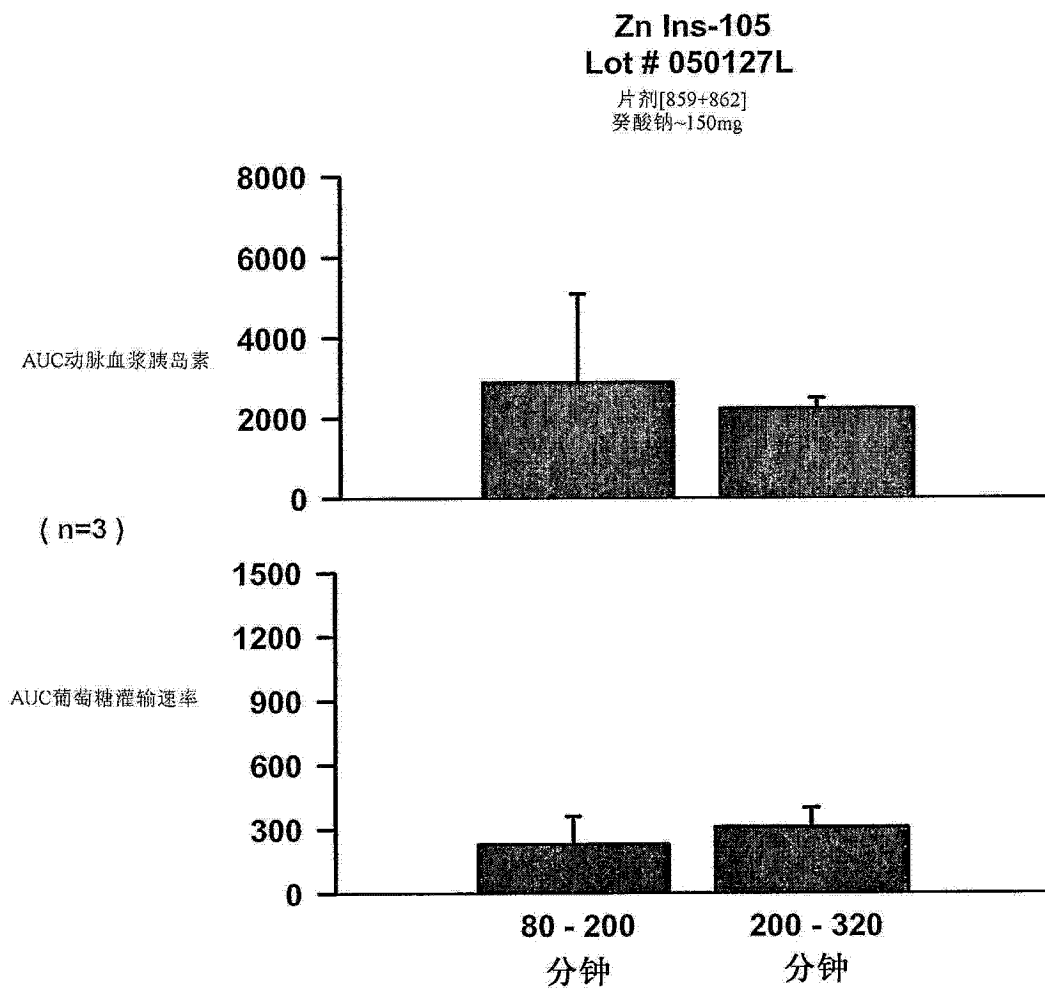


图 41

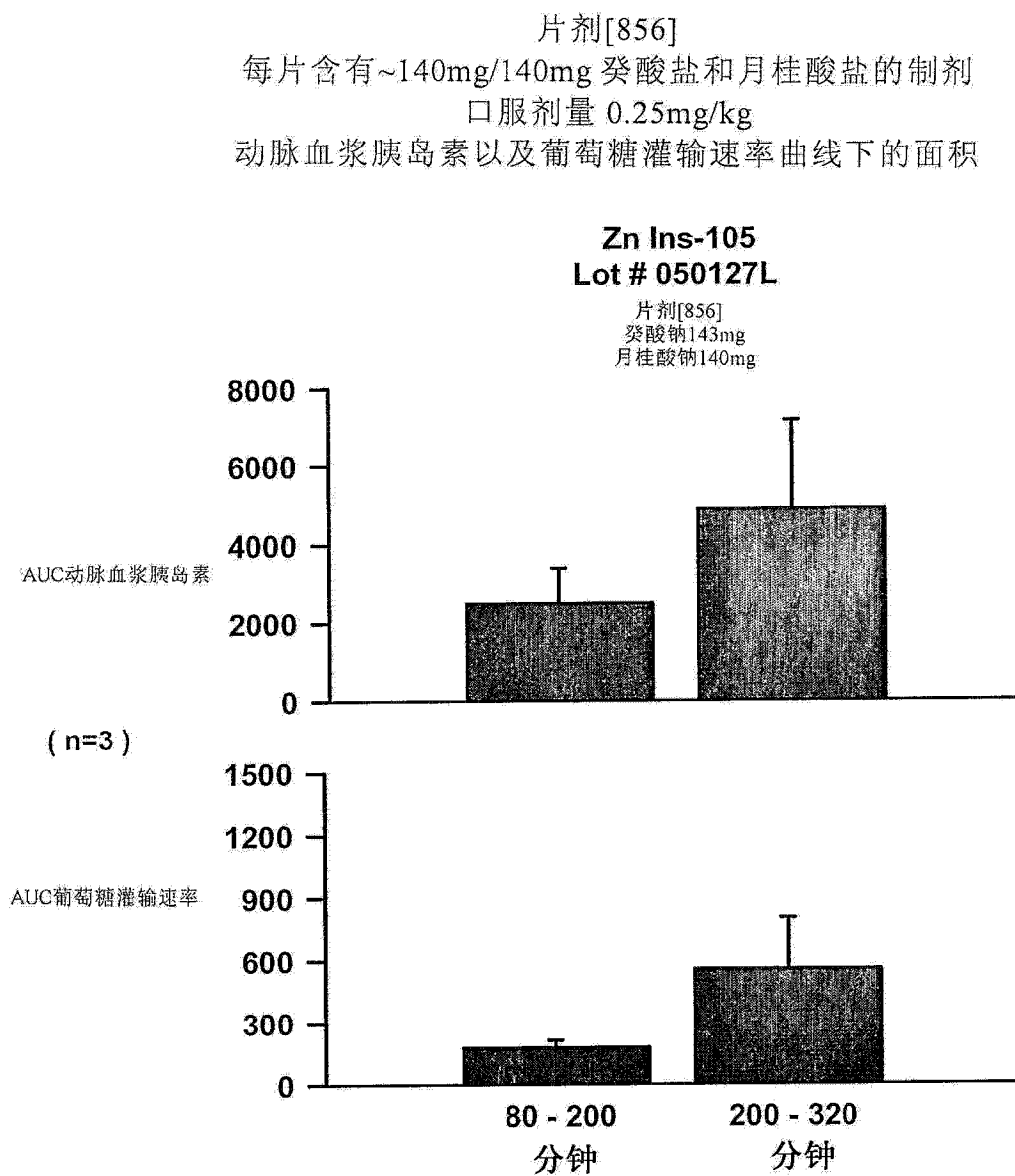


图 42