(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102341119 A
(43)申请公布日 2012.02.01

(21)申请号 201080010430.1

(22)申请日 2010.03.03

(30)优先权数据
12/397,219 2009.03.03 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.09.02

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/026073 2010.03.03

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/102020 EN 2010.09.10

(71)申请人 百达尔公司
地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 所罗门·S·斯坦纳
罗德里克·波尔 M·李
罗伯特·豪泽

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
代理人 丁业平 金小芳

(51)Int.Cl.
A61K 38/28(2006.01)
A61K 47/12(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)

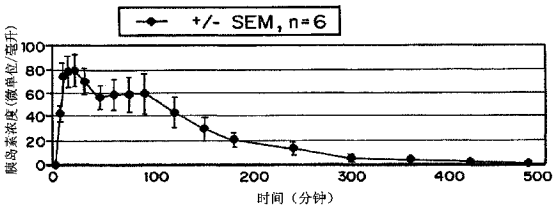
权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 13 页

(54)发明名称

供快速吸收的胰岛素制剂

(57)摘要

本文描述可注射的胰岛素制剂，其稳定性有所提高并且快速起效。所述制剂可以通过皮下、皮内或肌肉内来投予。在优选实施例中，制剂通过皮下注射来投予。制剂含有胰岛素以及螯合剂和溶解剂，以及任选其它赋形剂。在优选实施例中，制剂含有人类胰岛素、锌螯合剂（例如EDTA）和溶解剂（例如柠檬酸或柠檬酸钠）。这些制剂在通过皮下注射投予时，可被迅速地吸收到血流中。



CN 102341119 A

1. 一种胰岛素制剂，其包含胰岛素、解离剂和锌螯合剂，其中所述制剂具有生理 pH 值并且是透明水溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述螯合剂选自由乙二胺四乙酸 (EDTA)、EGTA、柠檬酸三钠 (TSC)、褐藻酸、α 硫辛酸、二巯基丁二酸 (DMSA)、CDTA(1,2- 二氨基环己烷四乙酸）组成的群组。

3. 根据权利要求 2 所述的制剂，其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸 (EDTA)。

4. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述溶解剂是选自由乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、丁二酸、天冬氨酸、马来酸、富马酸和己二酸组成的群组的酸，或其盐。

5. 根据权利要求 4 所述的制剂，其中所述解离剂是柠檬酸或柠檬酸钠。

6. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述 pH 值在 7 到 7.5 之间。

7. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述制剂是通过使胰岛素溶液的 pH 值从约 pH4 升到生理 pH 值来制备。

8. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述胰岛素选自由人类胰岛素、胰岛素类似物和其组合组成的群组。

9. 根据权利要求 8 所述的制剂，其中所述胰岛素是重组人类胰岛素。

10. 一种胰岛素制剂，其包含胰岛素、解离剂和锌螯合剂，其中所述解离剂是盐。

11. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述螯合剂选自由乙二胺四乙酸 (EDTA)、EGTA、柠檬酸三钠 (TSC)、褐藻酸、α 硫辛酸、二巯基丁二酸 (DMSA)、CDTA(1,2- 二氨基环己烷四乙酸）组成的群组。

12. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸 (EDTA)。

13. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述溶解剂是选自由乙酸盐、抗坏血酸盐、柠檬酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐、丁二酸盐、富马酸盐、马来酸盐和己二酸盐与第 I 族金属或第 II 族金属组成的群组的盐。

14. 根据权利要求 13 所述的制剂，其中所述溶解剂选自由钠或钾的抗坏血酸盐、柠檬酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐、丁二酸盐、富马酸盐、马来酸盐和己二酸盐组成的群组。

15. 根据权利要求 13 所述的制剂，其中所述解离剂是柠檬酸钠。

16. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述 pH 值在 7 到 7.5 之间。

17. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述 pH 值为约 4。

18. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述胰岛素选自由人类胰岛素、胰岛素类似物和其组合组成的群组。

19. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述胰岛素是重组人类胰岛素。

20. 根据权利要求 1 所述的制剂，其中所述胰岛素以干粉形式提供于第一容器中，并且所述螯合剂与所述溶解剂中的至少一者提供于含有稀释剂的第二容器中。

21. 根据权利要求 10 所述的制剂，其中所述胰岛素以干粉形式提供于第一容器中，并且所述螯合剂与所述溶解剂中的至少一者提供于含有稀释剂的第二容器中。

22. 根据权利要求 1 所述的制剂，其以冷冻的医药学上可接受的制剂形式提供，用于治疗糖尿病患者。

23. 根据权利要求 10 所述的制剂，其以冷冻的医药学上可接受的制剂形式提供，用于治疗糖尿病患者。

24. 根据权利要求 1 所述的制剂，其以 4℃的透明水溶液形式提供。

25. 根据权利要求 10 所述的制剂，其以 4℃的透明水溶液形式提供。

26. 一种治疗糖尿病个体的方法，其包含注射有效量的根据权利要求 1 所述的可注射胰岛素制剂，所述制剂包含胰岛素和有效量的溶解剂和锌螯合剂，以相较于胰岛素与锌螯合剂和 HCl 的组合，增强所述胰岛素穿过上皮细胞的吸收和输送。

供快速吸收的胰岛素制剂

技术领域

[0001] 本发明属于可注射的速效药物递送胰岛素制剂的一般领域。

背景技术

[0002] 糖尿病概述

[0003] 葡萄糖是一种单糖，身体的所有细胞都使用其来产生能量和供养生命。人类需要一直保持其血液中葡萄糖的最低含量以维持生命。身体产生血糖的主要方式是通过消化食物。当人未从食物消化中获得葡萄糖时，葡萄糖将由组织中的储备产生并由肝脏释放。身体的葡萄糖含量通过胰岛素来调节。胰岛素是一种胰腺天然分泌的肽激素。其帮助葡萄糖进入身体细胞中，以提供生命能源。

[0004] 当健康的个体开始进餐时，胰腺会释放出达到天然峰值的胰岛素，称为第一时相胰岛素释放。除了提供足够的胰岛素来加工从食物消化进入血液中的葡萄糖以外，第一时相胰岛素释放还充当在正在消化食物时让肝脏停止制造葡萄糖的信号。由于肝脏不产生葡萄糖并且有足够的额外胰岛素来加工从消化获得的葡萄糖，所以健康个体的血糖含量保持相对恒定，而且其血糖含量不会变得过高。

[0005] 糖尿病是一种特征为血糖含量异常升高且胰岛素含量不足的疾病。主要有两种类型糖尿病：1 型与 2 型。在 1 型糖尿病中，身体不产生胰岛素。在 2 型糖尿病初期，虽然胰腺能产生胰岛素，但身体不是在适当的时候产生胰岛素，或者身体细胞忽略掉所产生的胰岛素（一种称为胰岛素抵抗的病状）。

[0006] 在存在任何其它的症状前，2 型糖尿病的首要影响之一是丧失进餐诱发的第一时相胰岛素释放。在缺乏第一时相胰岛素释放的情况下，肝脏不会接收到让其停止制造葡萄糖的信号。结果，肝脏将继续产生葡萄糖，而此时，身体开始通过消化食物产生新的葡萄糖。因而，糖尿病患者在进食后血糖含量将变得过高，这是一种称为高血糖症的病状。高血糖症会引起葡萄糖非天然地连接于血液中的某些蛋白质上，干扰这些蛋白质执行它们的正常功能，即维持小血管完整性的能力。随着每次进餐后都发生高血糖症，微小的血管最终将破损并渗漏。高血糖症的长期不良影响包括失明、肾功能丧失、神经损伤，以及神经末梢的感觉丧失和循环不良，这可能需要截肢。

[0007] 在进餐后两到三小时，未经治疗的糖尿病患者的血糖将升高，以致胰腺接收到让其分泌极大量胰岛素的信号。在处于 2 型糖尿病早期的患者中，胰腺仍然可以作出反应并分泌出这么大量的胰岛素。然而，这种情况发生在消化快要结束而且血糖含量应该开始下降的时候。所产生的极大量胰岛素有两方面的不利影响。首先，其使已经受损的胰腺的负担过重，这可能会导致胰腺更迅速地恶化，最终使胰腺无法产生胰岛素。其次，消化后过多的胰岛素导致体重增加，这可能会使疾病状况进一步恶化。

[0008] 当前糖尿病的治疗和其局限性

[0009] 因为 1 型糖尿病患者不产生胰岛素，所以 1 型糖尿病的主要疗法是每日强化胰岛素疗法 (daily intensive insulin therapy)。2 型糖尿病的治疗通常从管理饮食和运动开

始。虽然在短期内有帮助，但对于绝大多数 2 型糖尿病患者来说，单单通过饮食和运动来治疗并不是长期有效的解决方法。当饮食和运动不再足够时，开始用各种非胰岛素口服药物疗法来治疗。这些口服药物疗法是通过增加胰腺产生的胰岛素量、提高胰岛素敏感细胞的敏感性、减少肝脏的葡萄糖输出或者这些机制的一定组合来起作用的。这些治疗的局限性在于，其无法有效地控制疾病，而且一般都会有明显的副作用，例如体重增加和高血压。因为非胰岛素疗法存在这些局限性，所以许多 2 型糖尿病患者会随着时间推移而恶化，最终需要胰岛素疗法来维持其新陈代谢。

[0010] 胰岛素疗法用于治疗糖尿病已长达八十多年。这种疗法通常包含每天注射胰岛素若干次。这些注射由施用长效的基础注射每天一或两次和进餐时间速效的胰岛素注射组成。虽然这种治疗方案公认为有效的，但其仍然有局限性。首先，由于操作不便且打针疼痛，所以患者一般不喜欢亲自注射胰岛素。因此，患者往往不能充分遵照所规定的治疗方案，并且常常不当地用药治疗。

[0011] 更重要地是，即使在适当投予时，胰岛素注射也并非复制胰岛素的天然时间 - 作用型态。尤其是未患糖尿病的人中第一时相胰岛素释放的天然峰值会引起血液胰岛素含量在由进餐产生的葡萄糖进入血液中的若干分钟内上升。而相比之下，注射的胰岛素进入血液缓慢，峰值胰岛素含量出现在常规人类胰岛素注射后的 80 分钟到 100 分钟内。

[0012] 一种可能的解决方法为，在快要进餐的时候将胰岛素直接注射到糖尿病患者的静脉中。在有关胰岛素静脉内注射的研究中，患者显示在进餐后的 3 到 6 个小时对其血糖的控制较好。然而，鉴于多种医学上的原因，在每次进餐前静脉内注射胰岛素并不是一种实用的疗法。

[0013] 胰岛素疗法的一种关键改良是在 20 世纪 90 年代引入速效胰岛素类似物，例如赖脯胰岛素 (insulin lispro ;IL)、门冬胰岛素 (insulin aspart ;IA) 和赖谷胰岛素 (insulin glulisine ;IG)。然而，即使使用这些速效胰岛素类似物，峰值胰岛素含量也通常出现在注射后的 50 分钟到 90 分钟内。由于速效胰岛素类似物未能充分模拟第一时相胰岛素释放，所以使用胰岛素疗法的糖尿病患者仍然存在着在进餐开始时胰岛素含量不足而两餐之间胰岛素过多的问题。这种胰岛素递送的滞后可能导致在进餐开始后就发生高血糖症。此外，两餐之间的过量胰岛素可能引起血糖含量异常低，称为低血糖症。低血糖症会引起心智敏锐度丧失、精神混乱、心率增加、饥饿、发汗和晕厥。在极低葡萄糖含量下，低血糖症会引起意识丧失、昏迷，甚至死亡。根据美国糖尿病协会 (American Diabetes Association) 或 ADA，使用胰岛素的糖尿病患者平均每年发生 1.2 次严重血糖过低事件，其中的许多事件令患者需要送往医院急救室救治。

[0014] 因为胰岛素递送到血液的时程在整个葡萄糖控制中起到如此重要的作用，所以非常需要胰岛素为一种比速效胰岛素类似物更快地到达血液的可注射胰岛素。

[0015] 因此，本发明的一个目标是提供速效的可注射胰岛素组合物，其稳定性有所提高并且快速起效。

发明内容

[0016] 本文描述可注射的胰岛素制剂，其稳定性有所提高并且快速起效。所述制剂可以通过皮下、皮内或肌肉内来投予。在优选实施例中，制剂通过皮下注射来投予。制剂含有胰

岛素以及螯合剂和溶解剂，以及任选其它赋形剂。在优选实施例中，制剂含有人类胰岛素、锌螯合剂（例如 EDTA）和溶解剂（例如柠檬酸或其盐，例如柠檬酸钠）。这些制剂在通过皮下注射投予时，可迅速地吸收到血流中。实例证明，可以使 pH 值增加到生理 pH 值，并且仍然可以实现胰岛素的溶解和快速吸收。

[0017] 在一个实施例中，胰岛素以干粉形式提供于无菌小瓶中。在快要投予时或在投予时，可将其与含有医药学上可接受的载剂（例如水）和任选的锌螯合剂（例如 EDTA）和 / 或溶解剂（例如柠檬酸）的稀释剂混合。在另一个实施例中，pH 值通常为约 4 的胰岛素以冷冻混合物的形式储存，以备解冻后使用。在优选实施例中，胰岛素以 pH 7 的水溶液形式提供，其储存在 4℃下。

附图说明

[0018] 图 1 是胰岛素的三维示意图，其显示暴露的表面电荷和用适当尺寸的分子（“溶解剂和螯合剂”）覆盖以掩蔽电荷。

[0019] 图 2 是曲斯维尔 (transwell) 装置 10 的示意图，曲斯维尔装置 10 用以测量胰岛素从供体腔室 12，穿过 0.1 微米过滤器 16 上的 4-5 层永生化口腔上皮细胞 14 进入到接收腔室 18 中的吸收。

[0020] 图 3a 和 3b 是比较存在和不存在 0.45 毫克 EDTA/ 毫升的情况下穿过图 2 曲斯维尔系统中的口腔上皮细胞的试管内胰岛素输送（累积的胰岛素（微单位））随选择作为溶解剂的酸而变化的图。EDTA 恒定在 0.45 毫克 / 毫升下，同时酸浓度如下变化 :图 3a，天冬氨酸 (0.47 毫克 / 毫升)、谷氨酸 (0.74 毫克 / 毫升)、丁二酸 (0.41 毫克 / 毫升)、己二酸 (0.73 毫克 / 毫升) 和柠檬酸 (0.29 毫克 / 毫升和 0.56 毫克 / 毫升)，pH 值范围 3.2-3.8 ；图 3b，马来酸 (0.32 毫克 / 毫升)、富马酸 (1.28 毫克 / 毫升) 和草酸 (0.32 毫克 / 毫升)，pH 值范围 2-3。选择两个时期 (10 分钟和 30 分钟) 用于比较分析。结果是平均值 ± 测量的标准误差，n = 4。

[0021] 图 4a 和 4b 是穿过图 2 中所示的曲斯维尔系统中的口腔上皮细胞的试管内胰岛素输送（累积的胰岛素（微单位））的图，其比较不同的溶解剂，存在和不存在 0.56 毫克 EDTA/ 毫升和以下等摩尔浓度 (1.50×10^{-3} 摩尔浓度）的酸 :天冬氨酸 (0.20 毫克 / 毫升)、谷氨酸 (0.22 毫克 / 毫升) 和柠檬酸 (0.29 毫克 / 毫升)（图 4a) 和 1.80 毫克 / 毫升柠檬酸（图 4b)。选择两个时期 (10 分钟和 30 分钟) 用于比较分析。

[0022] 图 5 是穿过使用图 2 曲斯维尔系统的口腔上皮细胞的试管内胰岛素输送以比较不同螯合剂的功效的图。图 5 是测量穿过口腔上皮细胞的胰岛素 (1 毫克 / 毫升) 输送的图（累积胰岛素，微摩尔），胰岛素来自含有谷氨酸、柠檬酸或 HCl 并且加有相同摩尔浓度 (4.84×10^{-3} 摩尔浓度) 的不同螯合剂的溶液。螯合剂为无螯合剂（对照）、EDTA、EGTA、DMSA、CDTA 和 TSC。

[0023] 图 6 是与 IL(12 单位) 和 RHI(12 单位) 相比，与柠檬酸和 EDTA 一起制备的胰岛素 (12 单位) 在人类个体中活体内药效作用的图，其测量为平均葡萄糖输注速率 (GIR)/ 千克。

[0024] 图 7 是与 RHI 相比较，与柠檬酸和 EDTA 一起制备的胰岛素在人类中活体内药物动力学作用的图，为胰岛素浓度（微单位 / 毫升）对时间（分钟）。平均值 (±SEM，n = 10)。

胰岛素剂量是每一个体 12 单位。

[0025] 图 8 是与 RHI 和 IL 相比较，与柠檬酸和 EDTA 一起制备的胰岛素在 16 个 2 型糖尿病患者中活体内药物动力学的图，为血糖（毫克 / 分升）对时间（分钟）的曲线图。患者试验中使用的剂量根据具体患者而定，基于各患者当前的胰岛素疗法作调整。

[0026] 图 9A 是浓度为 0.17、0.51、1.68 和 3.62 毫克 / 毫升的 RHI 的沉降系数的图。

[0027] 图 9B 是浓度为 0.15、0.56、1.75 和 3.59 毫克 / 毫升的 IL 的沉降系数的图。

[0028] 图 9C 是浓度为 0.16、0.56、1.66 和 3.56 毫克 / 毫升的 IA 的沉降系数的图。

[0029] 图 9D 是浓度为 0.15、0.55、1.72 和 3.48 毫克 / 毫升的 CE100-4 的沉降系数的图。

[0030] 图 10A 是相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布对浓度为 0.18、0.55 和 1.72 毫克 / 毫升的 RHI 的沉降系数的图。

[0031] 图 10B 是相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布对浓度为 0.17、0.57 和 1.82 毫克 / 毫升的 IL 的沉降系数的图。

[0032] 图 10C 是相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布对浓度为 0.19、0.54 和 1.84 毫克 / 毫升的 IA 的沉降系数的图。

[0033] 图 10D 是相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布对浓度为 0.18、0.40 和 0.84 毫克 / 毫升的 CE100-4 的沉降系数的图。

[0034] 图 11 是相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布对浓度为 0.18、0.57、1.74 和 3.52 毫克 / 毫升的 pH 7 对照胰岛素的沉降系数的图。

[0035] 图 12 是胰岛素平均粒径（纳米）随 CE 100-4、CE 100-7 和 CES 100-7 稀释而变化的图。

[0036] 图 13 是糖尿病模型猪中通过 ELISA 获得的胰岛素浓度（微单位 / 毫升）随时间（分钟）而变化的图。

具体实施方式

[0037] 本文描述的可注射人类胰岛素的胰岛素制剂在即将进餐时或在进餐结束时投予。在优选实施例中，制剂将重组人类胰岛素与 FDA 公认安全的特定成分组合。此制剂设计成能比目前市售的速效胰岛素类似物更快地吸收到血液中。此胰岛素制剂的一个关键特征在于，其允许胰岛素从六分子或六聚体形式的胰岛素解离或分离成单体或二聚体形式的胰岛素，并阻止其再缔合成六聚体形式。相信通过有利于单体或二聚体形式，此制剂可允许胰岛素在吸收到体内产生对其所期望的生物作用前，在人体需要呈单一分子形式的胰岛素时更迅速地递送到血液中。出售用于注射的大部分人类胰岛素都是呈六聚体形式。这令身体更加难以吸收，因为胰岛素六聚体必须首先解离形成二聚体，接着再解离形成单体。

[0038] I. 定义

[0039] 除非另外说明，否则如本文所用，“胰岛素”是指人类或非人类的重组、纯化或合成的胰岛素或胰岛素类似物。

[0040] 如本文所用，“人类胰岛素”是胰腺分泌的人类肽激素，不管是从天然来源分离而得还是通过遗传改变的微生物制造而得。如本文所用，“非人类胰岛素”与人类胰岛素相同，但是其来自例如猪或母牛等动物来源。

[0041] 如本文所用，胰岛素类似物是经过改变的胰岛素，其虽然不同于胰腺分泌的胰岛

素，但仍然可被身体用于执行与天然胰岛素相同的作用。通过对基础 DNA 进行基因工程改造，可以改变胰岛素的氨基酸序列，从而改变其 ADME（吸收、分布、新陈代谢和排泄）特征。实例包括赖脯胰岛素、甘精胰岛素 (insulin glargine)、门冬胰岛素、赖谷胰岛素、地特胰岛素 (insulin detemir)。胰岛素也可以例如通过乙酰化进行化学改性。如本文所用，人类胰岛素类似物是经过改变的人类胰岛素，其能够执行与人类胰岛素相同的生物作用。

[0042] 如本文所用，“螯合剂”是指能够与锌离子形成一个或一个以上键的化合物。这些键通常为离子键或配位键。螯合剂可为无机化合物或有机化合物。螯合物 (chelate complex) 是一种络合物，其中金属离子结合于螯合剂的两个或两个以上原子。

[0043] 如本文所用，“增溶剂”是一种可增加物质在溶剂中（例如胰岛素在水溶液中）的溶解度的化合物。增溶剂的实例包括表面活性剂（吐温 (TWEENS)®）；溶剂，例如乙醇；胶束形成化合物，例如氧乙烯单硬脂酸酯；和 pH 值调节剂。

[0044] 如本文所用，“溶解剂”是在加入到胰岛素和 EDTA 中时增强胰岛素相对于 HCl 和 EDTA 在相同 pH 值下的输送和吸收的酸或盐，如使用以下实例中所述的上皮细胞曲斯维尔板分析所测量。HCl 不是溶解剂，但可能是增溶剂。在此分析中测量时，柠檬酸和柠檬酸钠是溶解剂。相信这至少部分地是通过掩蔽胰岛素上的电荷来实现的，其中一些电荷在从六聚体解离期间暴露。

[0045] 如本文所用，“赋形剂”是除螯合剂或溶解剂以外的非活性物质，其用作胰岛素的载剂或用以辅助制造产物的过程。在这些状况下，活性物质溶解于赋形剂或与其混合。

[0046] 如本文所用，“生理 pH 值”在 6.8 到 7.6 之间，优选在 7 到 7.5 之间，最优选为约 7.4。

[0047] 如本文所用，维杰克 (VIAJECT)™ 是用溶解剂（例如柠檬酸）和螯合剂（例如 EDTA）配制的重组人类胰岛素的商标。维杰克 25 单位 / 毫升 (CE 25-4) 含有 25 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、0.82% NaCl（等渗性）和 3 毫克 / 毫升间甲酚。其以冷冻储存的水溶液形式提供，或以由干粉胰岛素与稀释剂（其中至少一者含有柠檬酸和 EDTA）组成的两分装部分试剂盒形式提供。复原混合物与冷冻溶液的 pH 值都为约 pH 4。维杰克 100 单位 / 毫升 (CE 100-4) 含有 100 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、22 毫克 / 毫升甘油和 3 毫克 / 毫升间甲酚。它也以冷冻水溶液形式或由干粉胰岛素与稀释剂组成的两分装部分试剂盒形式提供。复原混合物与冷冻溶液的 pH 值都为约 4。维杰克 100 单位 / 毫升 (CE 100-7) 含有 100 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、22 毫克 / 毫升甘油、3 毫克 / 毫升间甲酚。其以约 pH 7.4 的水溶液形式提供，可储存在 4℃下。通过将 1.8 毫克 / 毫升 EDTA 与柠檬酸三钠加入水中，接着加入 100 单位 / 毫升胰岛素，将 pH 值降到 6，接着将 pH 值升到 7.4 来制造含酸式盐的维杰克 (CSE 100-7)。

[0048] 制剂

[0049] 制剂包括胰岛素、螯合剂和溶解剂以及任选一种或一种以上其它赋形剂。在优选实施例中，制剂适于皮下投予并迅速地吸收到皮下脂肪组织中。溶解剂和螯合剂的选择、溶解剂与螯合剂的浓度以及制剂所调到的 pH 值都对系统的功效具有深远的影响。虽然许多组合都有功效，但是出于包括安全性、稳定性、调节型态和效能在内的许多原因，选择优选

实施例。

[0050] 在优选实施例中，选择至少一种制剂成分来掩蔽活性剂上的电荷。这可以促进胰岛素的跨膜输送，从而加快胰岛素起效并提高胰岛素生物利用率。此外，选择这些成分以形成可以在水性介质中迅速溶解的组合物。优选地，胰岛素迅速地吸收并输送到血浆中，从而快速起效（优选在投予后约 5 分钟内开始并在投予后约 15-30 分钟达到峰值）。

[0051] 例如 EDTA 等螯合剂螯合胰岛素中的锌，从而从胰岛素溶液中除去锌。这会引起胰岛素呈现其二聚体和单体形式并延迟其再组装成六聚体状态。实例中所述的研究表明，解离六聚体的总体尺寸大于锌络合的胰岛素六聚体，锌络合的胰岛素六聚体则形成较小单元。因为六聚体、二聚体和单体以浓度驱动的平衡存在，所以当单体被吸收时，将产生更多的单体。因此，当胰岛素单体通过皮下组织吸收时，其它的二聚体拆解 (dissemble)，形成更多的单体。完全解离的单体形式的分子量不足六聚体形式分子量的六分之一，从而显著地提高胰岛素吸收速度和数量。在螯合剂（例如 EDTA）和 / 或溶解剂（例如柠檬酸）与胰岛素形成氢键的程度上，相信其掩蔽胰岛素上的电荷，促进胰岛素的跨膜输送，从而加快胰岛素起效并提高胰岛素生物利用率。

[0052] 胰岛素

[0053] 胰岛素可从天然来源重组或纯化。胰岛素可以是人类胰岛素或非人类胰岛素。优选是人类胰岛素。在最优选实施例中，胰岛素是人类重组胰岛素。重组人类胰岛素可从许多来源获得。胰岛素也可以是基于人类胰岛素的氨基酸序列，但具有一个或一个以上氨基酸差异的胰岛素类似物，或是经化学改性的胰岛素或胰岛素类似物。

[0054] 胰岛素的剂量视其生物利用率和待治疗的患者而定。胰岛素的剂量范围一般为每一人类剂量 1.5-100 国际单位、优选 3-50 国际单位。通常胰岛素以 100 国际单位小瓶提供。

[0055] 溶解剂

[0056] 某些酸或其盐似乎可掩蔽胰岛素上的电荷，增强吸收和输送，如图 1 中所示。如以下实例中所述的曲斯维尔分析中所测量，相对于盐酸，那些有效地作为溶解剂的酸包括乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、丁二酸、富马酸、马来酸和己二酸。举例来说，如果活性剂是胰岛素，那么优选溶解剂是柠檬酸。盐酸和氢氧化钠是调节 pH 值的优选试剂。HCl 可与任何制剂组合，但其并不是溶解剂。

[0057] 酸的盐包括乙酸钠、抗坏血酸钠、柠檬酸钠、谷氨酸钠、天冬氨酸钠、丁二酸钠、富马酸钠、马来酸钠和己二酸钠。有机酸的盐可以使用多种碱来制备，这些碱包括（但不限于）金属氢氧化物、金属氧化物、金属碳酸盐和碳酸氢盐、金属胺以及例如氯化铵、碳酸铵等铵碱。合适的金属包括单价和多价金属离子。例示性的金属离子包括第 I 族金属，例如锂、钠和钾；第 II 族金属，例如钡、镁、钙和锶；和类金属，例如铝。多价金属离子对于含有以上羧酸基的有机酸来说是理想的，因为这些离子可以同时络合一个以上羧酸基。

[0058] 溶解剂的范围对应于与胰岛素和 EDTA 组合的柠檬酸的有效量，在 9.37×10^{-4} 摩尔浓度到 9.37×10^{-2} 摩尔浓度柠檬酸之间。

[0059] 螯合剂

[0060] 在优选实施例中，锌螯合剂与胰岛素混合。螯合剂可为离子螯合剂或非离子螯合剂。合适的螯合剂包括乙二胺四乙酸 (EDTA)、EGTA、褐藻酸、α 硫辛酸、二巯基丁二酸 (DMSA)、CDTA(1,2- 二氨基环己烷四乙酸）、柠檬酸三钠 (TSC)。盐酸与 TSC 结合使用来调

节 pH 值，而且在此过程中，形成作为溶解剂的柠檬酸。

[0061] 在优选实施例中，螯合剂是 EDTA。螯合剂捕捉胰岛素中的锌，从而促使胰岛素的二聚体形式超过六聚体形式，并促进投予部位周围的组织（例如粘膜或脂肪组织）吸收胰岛素。此外，螯合剂的氢可以键结于活性剂，从而有助于掩蔽胰岛素单体的电荷并促进胰岛素单体的跨膜输送。

[0062] 螯合剂的范围对应于与胰岛素和柠檬酸组合的 EDTA 的有效量，在 2.42×10^{-4} 摩尔浓度到 9.68×10^{-2} 摩尔浓度 EDTA 之间。

[0063] 赋形剂

[0064] 医药组合物可使用一种或一种以上生理学上可接受的载剂以常规方式来配制，所述载剂包含赋形剂和助剂，其促进活性化合物加工成可在医药学上使用的制剂。药物的配制论述于例如胡佛 (Hoover)，约翰 (John E.)，雷明登氏制药科学 (Remington′ s Pharmaceutical Sciences)，马克出版公司 (Mack Publishing Co.)，伊士顿 (Easton)，宾夕法尼亚州 (Pennsylvania)(1975)，和利伯曼 (Liberman, H.A.) 和拉克曼 (Lachman, L.) 编辑，医药剂型 (Pharmaceutical Dosage Forms)，马塞尔·德克尔公司 (Marcel Decker)，纽约 (New York)，纽约州 (N.Y.)(1980) 中。

[0065] 在优选实施例中，胰岛素剂包括一种或一种以上增溶剂，以促进胰岛素剂快速溶解于水性介质中。合适的增溶剂包括湿润剂（例如聚山梨醇酯、甘油和泊洛沙姆 (poloxamer))、非离子型和离子型表面活性剂、食用酸和碱（例如碳酸氢钠）和醇，以及用于控制 pH 值的缓冲盐。

[0066] 稳定剂用以抑制或延迟包括例如氧化反应在内的药物分解反应。可以使用许多稳定剂。合适的稳定剂包括多糖（例如纤维素和纤维素衍生物）和简单的醇（例如甘油）；抑菌剂，例如苯酚、间甲酚和对羟基苯甲酸甲酯；等渗剂，例如氯化钠、甘油和葡萄糖；卵磷脂，例如天然卵磷脂（例如蛋黄卵磷脂或大豆卵磷脂）和合成或半合成卵磷脂（例如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱；磷脂酸；磷脂酰乙醇胺；磷脂酰丝氨酸，例如二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸和二花生酰磷脂酰丝氨酸；磷脂酰甘油；磷脂酰肌醇；心磷脂；神经鞘磷脂）。在一个实例中，稳定剂可以是甘油、抑菌剂和等渗剂的组合。

[0067] II. 制剂的制造方法

[0068] 可注射制剂含有胰岛素、螯合剂和溶解剂。在一个优选实施例中，可注射制剂含有胰岛素、EDTA、柠檬酸、盐水和 / 或甘油。

[0069] 在一个实施例中，皮下可注射制剂是通过混合盐水和甘油、柠檬酸和 EDTA 形成溶液并对溶液灭菌（称为“稀释剂”）来产生。将胰岛素单独加入无菌水中，形成溶液，过滤，并放置指定量在多个独立的无菌注射瓶每一者中。冻干胰岛素溶液，形成粉末，并且应该与稀释剂分开储存以保持其稳定性。在投予前，将稀释剂加入胰岛素注射瓶中。将预定量的胰岛素皮下注射到患者中后，剩余的胰岛素溶液可以优选通过冷冻来储存。

[0070] 在另一个实施例中，胰岛素与 pH 4 的稀释剂组合，无菌过滤到多用途注射小瓶或筒中，并在使用前冷冻。

[0071] 在一个优选实施例中，胰岛素制成于小瓶或筒中的 pH 7.0 的水溶液并保持在 4℃下。

[0072] III. 制剂的使用方法

[0073] 制剂可以通过皮下或肌肉内注射投予。制剂设计成能迅速地吸收和输送到血浆中供全身性递送。

[0074] 含有胰岛素作为活性剂的制剂可以在进餐前或进餐期间投予 1 型或 2 型糖尿病患者。由于吸收迅速，故组合物可以阻断肝脏中肝糖转化成葡萄糖，从而预防高血糖症（此症是糖尿病并发症的主要原因并且是 2 型糖尿病的第一症状）。现用的人类胰岛素标准皮下注射液必须在进食前约 0.5 小时到 1 小时投予以提供低于所需的作用，因为胰岛素吸收过于缓慢而无法阻断肝脏中葡萄糖的产生。另外，如果假定疾病的进程尚属极早时期，那么皮下胰岛素组合物也许能减缓或终止 2 型糖尿病的进展。

[0075] 低 pH 值制剂的优点在于，其可以与百泌达 (BYETTA) ®（艾塞那肽 (exenatide)）、西姆林 (SYMLIN) ®（乙酸普兰林肽 (pramlintide acetate)）和兰特斯 (LANTUS) ®（长效胰岛素类似物）混合，而这三种物质中，由于不混溶性和沉淀，所以其中无一者可以与其它类型的市售胰岛素混合。

[0076] 较高 pH 值胰岛素的优点在于，其在储存期间比较低 pH 值的胰岛素稳定。

[0077] 通过参考以下非限制性的实例进一步地了解本发明。以下胰岛素用于这些实例中。

[0078] 和姆林 (HUMULIN) ® (RHI) 是重组人类胰岛素。每毫升含有 100 单位常规重组人类胰岛素、0.22％间甲酚、1.4％ -1.8％甘油，pH 7。它可以从若干来源购得。

[0079] 美国礼来公司 (Eli Lilly) 的和姆洛 (HUMALOG) ® (IL) 赖脯胰岛素注射液是一种重组人类胰岛素类似物，它是胰岛素 B 链上位置 28 与 29 的氨基酸颠倒时所产生的 Lys(B28)、Pro(B29) 人类胰岛素类似物。每毫升 IL 注射液含有 100 单位赖脯胰岛素、16 毫克甘油、1.88 毫克磷酸氢二钠、3.15 毫克间甲酚、含量调到可提供 0.0197 毫克锌离子的氧化锌、痕量苯酚和注射用水。赖脯胰岛素的 pH 值为 7.0 到 7.8。可以加入 10％盐酸和 / 或 10％氢氧化钠来调节 pH 值。虽然 1 单位 IL 降低葡萄糖的作用与 1 单位常规人类胰岛素相同，但其作用更迅速且持续时间更短。

[0080] 诺夫洛 (NOVOLOG) ® (IA) 是一种可以从诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S) 获得的重组胰岛素类似物。此类似物的位置 B28 上的氨基酸脯胺酸经天冬氨酸单取代，并且此类似物通过重组酵母产生。其以无菌水溶液形式提供，此无菌水溶液含有 100 单位门冬胰岛素 / 毫升、16 毫克 / 毫升甘油、1.50 毫克苯酚 / 毫升、1.72 间甲酚 / 毫升、19.6 毫克锌 / 毫升、1.25 毫克二水合磷酸氢二钠 / 毫升、0.58 毫克氯化钠 / 毫升，用 10％ HCl 或 NaOH 调节 pH 值为 7.2 到 7.6。

[0081] 维杰克 ™ 是一种与柠檬酸和 EDTA 一起配制的重组人类胰岛素。维杰克 25 单位 / 毫升 (CE 25-4) 含有 25 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、0.82％ NaCl（等渗性）和 3 毫克 / 毫升间甲酚。其以冷冻储存的水溶液形式提供，或以干粉胰岛素与稀释剂（其中至少一者含有柠檬酸和 EDTA）组成的两分装部分试剂盒形式提供。复原混合物与冷冻溶液的 pH 值都为约 pH 4。复原粉末为实例中所用的物质。维杰克 100 单位 / 毫升 (CE 100-4) 含有 100 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、22 毫克 / 毫升甘油、3 毫克 / 毫升间甲酚。它也以冷冻水溶液形式或由干粉胰岛素与稀释剂组成的两分装部分试剂

盒形式提供。复原混合物与冷冻溶液的 pH 值都为约 4。仅将冷冻水溶液用于分析离心机数据和马尔文粒度分析仪 (malvern)。维杰克 100 单位 / 毫升 (CE 100-7) 含有 100 单位 / 毫升常规重组人类胰岛素、1.8 毫克 / 毫升柠檬酸、1.8 毫克 / 毫升乙二胺四乙酸二钠、22 毫克 / 毫升甘油、3 毫克 / 毫升间甲酚。它以约 pH 7.4 的水溶液形式提供，可储存在 4℃下。其用于猪的研究中。通过将 1.8 毫克 / 毫升 EDTA 与柠檬酸三钠加入水中，以及加入 100 单位 / 毫升胰岛素和甘油 (22 毫克 / 毫升) 来制造含酸式盐的维杰克 (CSE 100-7)。用氢氧化钠将最终的 pH 值调到 7.4。此用于最终实例中以得到马尔文信息。

[0082] 实例 1 :使用上皮细胞曲斯维尔分析试管内比较随溶解剂而变化的胰岛素的吸收和输送

[0083] 材料与方法

[0084] 口腔上皮细胞生长在曲斯维尔插入物上两周，直到形成多个 (4-5 层) 细胞层，如图 2 中所示。输送研究是通过加入适当溶液到供体孔中并在 10 分钟后从接收孔中除去样品进行。溶液由水、+/-EDTA(0.45 毫克 / 毫升)、NaCl(0.85％ w/v)、1 毫克 / 毫升胰岛素和足以维持 pH 值在 3.8 下的量的酸组成。使用 ELISA 来分析接收孔中的胰岛素量。

[0085] 结果

[0086] 图 3a 和 3b 中显示的结果证明，某些酸更有效地增强胰岛素穿过上皮细胞的吸收和输送。可以容易地测试这些酸，并与使用 HCl 获得的结果相比较，从而可提供测试任何酸并确定其为溶解剂 (即相对于 HCl 增强吸收和输送) 还是非溶解剂的标准。

[0087] 由 pH 值范围在 3.2-3.8 内的酸得到的结果集合在图 3a 中。更强的酸 (pH ＜ 3) 集合在图 3b 中。

[0088] 结果确定，在相同浓度螯合剂下酸的选择对胰岛素穿过细胞培养物的输送具有实质性影响。优选酸是柠檬酸。

[0089] 实例 2 :使用上皮细胞曲斯维尔分析试管内比较随溶解剂浓度而变化的胰岛素的吸收和输送

[0090] 材料与方法

[0091] 使用实例 1 的材料和方法，不过试剂浓度不同。在研究中，加入等摩尔浓度的酸和螯合剂。溶液由水、+/-EDTA(0.56 毫克 / 毫升)、NaCl(0.85％ w/v)、1 毫克 / 毫升胰岛素和以下酸组成 :天冬氨酸 (0.20 毫克 / 毫升)、谷氨酸 (0.22 毫克 / 毫升) 或柠檬酸 (0.20 毫克 / 毫升)。在存在和不存在螯合剂的情况下在 1.8 毫克 / 毫升的较高浓度下测试柠檬酸。此数据在细胞供体腔室给药后 10 分钟和 30 分钟两个时期显示。

[0092] 结果

[0093] 由天冬氨酸 (0.20 毫克 / 毫升)、谷氨酸 (0.22 毫克 / 毫升) 或柠檬酸 (0.29 毫克 / 毫升) 得到的结果展示于图 4a 中。在这种情况下，加入螯合剂未见显著差异。

[0094] 相比之下，使用 1.80 毫克 / 毫升较高浓度柠檬酸的研究显示在螯合剂加入溶液后显著增加 (单侧 t 检验比较)。参见图 4b。这证明，两种组分的浓度对于吸收和输送最佳化来说都很重要。

[0095] 实例 3 :使用上皮细胞曲斯维尔分析试管内比较随螯合剂而变化的胰岛素的吸收和输送

[0096] 材料与方法

[0097] 口腔上皮细胞生长在曲斯维尔插入物上两周，直到形成多个（4-5 层）细胞层。输送研究是通过加入适当溶液到供体孔中并在 10 分钟、20 分钟和 30 分钟后从接收孔中除去样品进行。

[0098] 在即将进行曲斯维尔实验前依照以下方式制备溶液：将 1.8 毫克 / 毫升柠檬酸溶于 0.85％ w/v 盐水中，接着将所示浓度的一种以下螯合剂加入此溶液中：1.80 毫克 / 毫升 EDTA、1.84 毫克 / 毫升 EGTA、0.88 毫克 / 毫升 DMSA 和 1.42 毫克 / 毫升 TSC。因为 CDTA 以其液体形式使用，所以柠檬酸直接加入 CDTA 中。在每种这些情况下，螯合剂的浓度恒定在 4.84×10^{-3} 摩尔下。

[0099] 接着加入 1 毫克 / 毫升胰岛素，并且在必要时再将 pH 值调到 3.8。仅仅使用 HCl 来调节 pH 值的一组对照样品包括在内以供比较。通过加入 0.2 毫升各溶液到供体孔中来进行曲斯维尔实验。

[0100] 使用 ELISA 来分析接收孔中的胰岛素量。

[0101] 结果

[0102] 图 5 中展示 30 分钟胰岛素数据的图。除了相较于由 TSC（柠檬酸三钠）得到的结果外，在使用柠檬酸或谷氨酸时，都有显著更多的胰岛素穿过细胞递送。在 TSC 的情况下，使用 HCl 来调节 pH 值。调节 pH 值会产生柠檬酸，可以解释这些结果。

[0103] 如这些结果所证明，吸收和输送的增强视螯合剂的选择而定。

[0104] 实例 4：在猪中临床前评估基于柠檬酸的胰岛素制剂中的螯合剂

[0105] 材料与方法

[0106] 与公开的研究（波拉姆 (A.Plum)，安格索 (H.Agerso) 和安徒生 (L.Andersen.)，速效胰岛素类似物门冬胰岛素在大鼠、狗和猪中的药物动力学以及门冬胰岛素在猪中的药物动力学 (Pharmacokinetics of the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, in rats, dogs, and pigs, and pharmacodynamics of insulin aspart in pigs). 药物代谢作用与处置 (Drug Metab.Dispos.)，28(2)：155-60(2000)）一致，已经确定消除半衰期是胰岛素吸收的优良决定因素，因为消除的延迟表明从注射部位吸收较慢。因此，执行模型猪研究的非房室模型分析，以检查 PK 和 PD 参数，尤其是消除半衰期。

[0107] 对糖尿病猪皮下注射四种胰岛素制剂中的一种。三种制剂含有螯合剂 (EDTA、EGTA 或 TSC)，第四对照仅仅含有常规人类胰岛素 RHI，不含螯合剂。柠檬酸 (1.8 毫克 / 毫升）用作所有螯合剂制剂中的酸，并且在所有状况下，为达到等渗性和制剂无菌性目的，加入 NaCl 和间甲酚。螯合剂都在 4.84×10^{-3} 摩尔的相同摩尔浓度下。

[0108] 使猪禁食一整夜，并且皮下投予 0.125 单位 / 千克剂量的含有 EDTA 的人类胰岛素 (n ＝ 3) 或 0.08 单位 / 千克剂量的含有 EGTA 或 TSC 的人类胰岛素 (n ＝ 2)。由于在较高剂量下血糖急剧下降，所以降低剂量。确定所有时间点的血糖和胰岛素含量，直到给药后 8 小时。

[0109] 使用具有均匀重量的非房室模型，用威诺林 (Win Nonlin) 执行药物动力学的计算机模拟。表 1 中比较消除半衰期：

[0110] 表 1：比较猪中随螯合剂而变化的血糖

[0111]

胰岛素	半衰期“λz”（分钟 /- 标准差）终末半衰期
RHI/ 不含螯合剂	120
胰岛素 /EDTA	39.1+/-15.8
胰岛素 /EGTA	37.5+/-8.0
胰岛素 /TSC	30.1+/-9.0

[0112]

[0113] 猪的此初步研究中常规人类胰岛素的消除半衰期（120 分钟）与文献中所记载的消除半衰期一致，并用作验证数据的测试点。因为其显著长于静脉内投予后的消除半衰期，所以这证实在注射后从注射部位的吸收一直很缓慢。柠檬酸制剂中的螯合剂清楚地显示这个参数的降低，证明虽然增强程度不同，但这三种螯合剂都可有效地增强常规人类胰岛素的吸收。

[0114] 实例 5 ：在人类临床试验中比较 EDTA- 柠檬酸胰岛素制剂与常规人类胰岛素

[0115] 材料与方法

[0116] 本研究的目标是评估含有胰岛素以及柠檬酸和 EDTA 的测试制剂“CE 25-4”的药效 (PD) 特性。在 10 名禁食的健康志愿者（平均年龄 40 岁 (20-62 岁范围）；BMI 22.5(19.2-24.9) 千克 / 平方米）中进行 5 次正常葡萄糖钳夹 (euglycemic glucose clamp)（博恩斯塔 (Biostator)；目标血糖 90 毫克 / 分升）。使用治疗顺序固定的交叉设计，在腹部皮下注射 12 国际单位常规胰岛素和 12 国际单位 CE 胰岛素制剂。

[0117] 结果

[0118] 结果展示于图 6 和图 7 中。皮下注射 CE 25-4 会产生如下时间 - 作用型态：葡萄糖消耗量的增加比常规人类胰岛素明显更快（图 6）。平均药物动力学数据证实了 PD 结果（图 7）。

[0119] 本研究显示柠檬酸和 EDTA 加入到常规人类胰岛素中可改善胰岛素的吸收速率，如与单独的常规人类胰岛素相比，达到最大浓度的时间更快（图 7）并且起效更迅速（图 6）所证明。

[0120] 实例 6 ：在 1 型糖尿病患者即将进餐时皮下注射 CE 胰岛素、赖脯胰岛素和常规人类胰岛素的情况下这些胰岛素的药物动力学和药效学

[0121] 背景与目标：

[0122] 本研究的目标是测定在 1 型糖尿病患者中标准进餐后 CE 25-4、RHI 和 IL 对餐后血糖 (BG) 波动的作用。

[0123] 材料与方法

[0124] 在进餐前，依靠葡萄糖钳夹（目标 BG 120 毫克 / 分升）稳定 9 名患者 (5 名男性和 4 名女性；年龄 40±10 岁，BMI 24.0±2.0 千克 / 平方米）的 BG。在标准进餐和胰岛素给药前，停止输注葡萄糖。使用治疗顺序固定的交叉研究设计，在即将进餐时向相同的患者皮下注射特定剂量的维杰克™(CE25-4)、IL 或 RHI。随后，连续监测餐后葡萄糖波动 8 小时，并且如果 BG 小于 60 毫克 / 分升，那么再开始输注葡萄糖。在整个研究期间测定血浆胰岛

素含量。

[0125] 结果

[0126] 结果在表 2 中展示为平均值 ± 标准偏差，其比较常规人类胰岛素、胰岛素加上柠檬酸和 EDTA(CE) 以及赖脯胰岛素在皮下注射到进餐后的 2 型糖尿病患者后的胰岛素 Tmax。表 3 中的结果比较相同测试个体的血糖。

[0127] 表 2 ：比较胰岛素 Tmax（分钟）

[0128]

药物动力学	RHI	IL	(CE25-4)
胰岛素 Tmax（分钟）	143±29*	62±37	43±36*

[0129] *p ＜ .001，成对 t 检验

[0130] 表 3 ：比较胰岛素药物动力学血糖

[0131]

药效学 (0-180 分钟）	RHI	IL	CE 25-4
BGTMax（分钟）	93±56*	47±28	41±26*
BG 最大值（毫克 / 分升）	185±44	158±33	157±27
BG 最小值（毫克 / 分升）	103±21	73±31	87±24
BG 最大值 -BG 最小值（毫克 / 分升）	82±30	84±11*	70±18*

[0132] *p ＜ 0.05，成对 t 检验

[0133] RHI 注射后 3 到 8 小时低血糖事件的总数（需要输注葡萄糖的小时数）是 13，而 IL 是 11，以及 CE 25-4 制剂是 4。对于 RHI，在此期间为预防低血糖症而输注的葡萄糖的平均总量是 CE 25-4 的 6 倍，而 IL 则是 CE 25-4 的 2 倍。对于 RHI，每组所有患者正常血糖目标范围以上和以下的面积 (140 毫克 / 分升以上和 80 毫克 / 分升以下的 BG AUC) 总和是 81,895 毫克 / 分升 × 分钟，IL 是 57,423 毫克 / 分升 × 分钟，并且 CE 25-4 是 38,740 毫克 / 分升 × 分钟。平均血糖含量展示于图 8 中。

[0134] CE 25-4 最快地逆转标准进餐后的血糖升高。用 CE 25-4 治疗的患者的餐后葡萄糖波动减弱。相比之下，RHI 的葡萄糖波动最高，这与其吸收速率较慢相符。CE 25-4 的葡萄糖含量可变性（最大值与最小值之间的平均差）明显小于 IL，证明在这些 1 型糖尿病患者中 CE 25-4 对血糖的控制较好。

[0135] 实例 7 ：通过光散射表征胰岛素的尺寸 ：

[0136] CE 100-4 在患者中起效极为迅速。为了解迅速吸收型态的基本原理，使用 CE 100-4，与其它市售的重组人类胰岛素和速效胰岛素类似物作比较，进行试管内实验。光散射技术应用于原始产品以及合成细胞外液缓冲液中的连续稀释液。结果显示，CE 100-4 不同于常规重组胰岛素和速效类似物，其在 1 ： 3 稀释后尺寸降低到近乎二聚体的尺寸，符合其迅速吸收的型态。

[0137] 材料与方法

[0138] 为说明这种快速起效的机制，设计试管内实验来研究在合成细胞外液缓冲液中稀释传统制剂的影响，这种稀释行为是一种模拟皮下注射后自然发生的情况的手段。使用光散射技术来评估平均尺寸分布（纳米）。以下市售的速效胰岛素制剂或膳食胰岛素制剂在这些试管内实验中用于比较：IL、IA、RHI 和 CE 100-4。为了比较尺寸，单体 (pH 2.0) 和六聚体锌胰岛素 (pH 7) 的标准制剂用作标准。

[0139] 市售胰岛素的尺寸用 ζ 纳米尺寸分析仪 (Zetasizer nano)（英国马尔文仪器公司 (Malvern Inst，UK)）来表征。将 1 毫升样品放于玻璃比色皿中，并进行分析，以测定溶解状态的胰岛素的平均体积尺寸分布的平均值（纳米）。使用 3 个样品的平均值（每一样品操作若干次）作为比较的基础。在初始全面强度分析后，在 pH 值和缓冲能力与细胞外液类似的缓冲液 (ECF、0.7 毫当量浓度 $MgCl_2$、1.2 毫摩尔浓度 $CaCl_2$、0.2 毫摩尔浓度 KCl、0.5 毫摩尔浓度 Na_2SO_4、104 毫摩尔浓度 NaCl、28.3 毫摩尔浓度 $NaHCO_3$) 中进行 1 ： 2 到 1 ： 16 的连续稀释。测定市售胰岛素和 CE 100-4 各自的所有稀释液的平均尺寸，以了解各制剂的单体 / 二聚体 / 六聚体尺寸分布。

[0140] 胰岛素

[0141] RHI、IL、IA 和 CE 100-4。

[0142] 稀释剂

[0143] 无菌水中 ECF、0.7 毫摩尔浓度 $MgCl_2$、1.2 毫摩尔浓度 $CaCl_2$、2 毫摩尔浓度 KH_2PO_4、2 毫摩尔浓度 KCl、0.5 毫摩尔浓度 Na_2SO_4、104 毫摩尔浓度 NaCl、28.3 毫摩尔浓度 $NaHCO_3$。

[0144] 结果

[0145] 在尺寸测量研究中，未稀释的 CE 100-4 大于 IL、IA 和 RHI。然而，在 1 ： 3 稀释下，CE 100-4 的平均尺寸减少 2 纳米，达到单体 / 二聚体的尺寸，而所研究的其它胰岛素则保持在约 5 纳米的六聚体尺寸。CE 100-4 随着稀释程度增加，进一步减小，而 IL、IA 和 RHI 则不是这样。未稀释的 RHI 看似更小，但 1 ： 1 稀释后，尺寸生长超过 5 纳米，并且直到 1 ： 16 稀释，都保持在此尺寸范围中。

[0146] 未稀释的 CE 100-4 最初看似大于所研究的其它胰岛素，这可能是因为柠檬酸和 EDTA 微弱地吸引到表面，用以通过掩蔽表面电荷进一步提高从皮下部位吸收的速率。电荷可能阻碍吸收。皮下投予后不久，当注射的物质被 ECF 稀释时，在相同稀释下 CE100-4 的平均尺寸小于速效胰岛素类似物和 RHI。

[0147] 实例 8：胰岛素的分析超速离心

[0148] 材料与方法

[0149] 使用分析超速离心研发一组实验，来估算重量平均沉降系数（斯韦柏 (Svedbergs)20℃，水 S(20,w)），重量平均沉降系数与浮力有效摩尔重量成比例。此分析的程序有点不同于光散射尺寸测定。首先，每一样品都用组成与商业产品相同的稀释剂稀释。为实现此，使用分子量截留为 3 千道尔顿的赛替普 (Centriprep)®奥曲塞尔 (Ultracel)-3 膜式过滤装置（美国马萨诸塞州 (MA,USA) 密理博公司 (Millipore Inc)）将胰岛素与稀释剂分开。回收原始稀释剂并分析其中存在的任何胰岛素含量。使用已确认的不含胰岛素的稀释剂来稀释商业产品。

[0150] 这些第一组数据用以表征呈稳定单一物质形式的胰岛素，或在自身稀释剂中从六聚体、二聚体、单体变得的胰岛素。两组数据都是使用分析超速离心获得。通过用制剂稀释

剂精确地稀释获得第一组数据。在市售制剂的情况下，这是通过将胰岛素或类似物与稀释剂分开的赛替普管获得。检查滤液的蛋白质含量，并且在确定后用于第一轮实验中的稀释剂。

[0151] 第二组样品通过用 ECF 缓冲液代替稀释剂制得。为实现此，首先用 ECF 1 ： 2 稀释最浓的样品。接着用 ECF 进一步稀释。在 CE 100-4 的情况下，初始用 ECF 1 ： 4 稀释，以确保越过等电点，消除任何沉淀的物质。这些实验意图模拟皮下注射后的环境。

[0152] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。在 20℃和 55,000 转 / 分下，使用干扰光学系统，用贝克曼 - 科尔特 (Beckman-Coulter) XL- 分析超速离心机进行速度分析。使用装有蓝宝石窗口的双扇形形成界面池 (synthetic boundary cell) 来匹配样品与参考弯液面。转子在真空下 20℃下平衡，并且在 20℃下约 1 小时的时间后，转子加速到 55,000 转 / 分。以 60 秒的时间间隔，获得干扰扫描，持续 5 小时。

[0153] 对数据运行若干分析程序（德克德特 +(DcDt+)2.1.02 版和萨德福特 (Sedfit)11.3b3 版），以提取出每个样品特定的信息。萨德福特程序的数据展示于以下结果中。德克德特是一种独立于模型的沉降系数分布 $g(s^*)$，其利用浓度分布曲线的时间导数。如果随着浓度增加，S 未转变成较高值，那么将强有力地证明不会发生可逆反应（即单体、二聚体、六聚体）。如果稀释后尺寸和形状改变（从六聚体转变到二聚体，再转变到单体），那么将无法估计分子量，但可以从萨德福特程序，获得有关沉降系数 S(w) 的有用信息。此外，这个程序对于使用兰姆方程 (Lamm equation) 的基于模型的数值解法的个别数据组产生直接边界模型。[3] 其绘出连续沉降系数 c(s) 对沉降系数 (s) 的曲线图，从而得出描述沉降物质的相对尺寸的曲线。

[0154] 用胰岛素特定的稀释剂稀释每一种胰岛素：

[0155] A. RHI

[0156] 通过沉降速度超速离心，分析 RHI。估算原液浓度是 3.745 毫克 / 毫升。稀释剂如上所述。

[0157] 以下物理常数是使用程序赛登特普 (Sednterp) 由蛋白质的氨基酸组成算得。[5]

[0158] RHI ：MW_{seq} ＝ 5792 道尔顿，$N_{20,w}$ ＝ 0.726 毫升 / 克

[0159] 使用赛登特普，算得 20℃下稀释密度和粘度分别是 1.00231 克 / 毫升和 0.01041 泊。

[0160] 结果

[0161] 图 9A 显示相对于 RHI™ 的负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。正规化 c(s) 曲线图所显示的数据符合德克德特 + 的 $g(s^*)$ 数据。随着浓度增加，沉降中明显转变到较低 S 值。

[0162] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0163]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	3.05	0.168

2	3.00	0.561
3	3.00	1.678
4	2.84	3.624

[0164] 结论：

[0165] 这些分析表明，在此实验条件下，RHI 最初以六聚体形式存在。较低浓度样品中存在少量较慢沉降的物质，以及似乎是六聚体的二聚体的物质。

[0166] B. IL

[0167] 材料和方法如上所述。

[0168] 结果

[0169] 图 9B 是各浓度的重量平均沉降系数的曲线图。蛋白质在稀释后解离。此外，似乎有少量（＜ 5％）较快沉降的物质，可能是六聚体的二聚体。

[0170] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0171]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	2.78	0.151
2	3.02	0.558
3	3.09	1.755
4	3.10	3.595

[0172] 结论：

[0173] 这些分析表明，在此实验条件下，蛋白质样品 IL 最初以六聚体形式存在。证明 IL 在稀释后解离，而且存在少量似乎是六聚体二聚体的物质。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度、300 微摩尔浓度和 600 微摩尔浓度（单体单元）。

[0174] C. IA

[0175] 材料和方法如上所述。

[0176] 结果

[0177] 图 9C 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。正规化 c(s) 曲线图所显示的数据符合德克德特 + 的 $g(s^*)$ 数据。低浓度下的 c(s) 曲线显示较小物质（单体）的份额，其随着浓度增加而减小。随着浓度增加，沉降中也略微转变到较低 S 值。似乎有少量（＜ 5％）更快沉降的物质，可能是六聚体的二聚体。

[0178] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0179]

池编号	S(20,w)(斯韦柏)	浓度(毫克/毫升)
1	2.72	0.158
2	3.05	0.561
3	3.19	1.655
4	3.14	3.563

[0180] 结论：

[0181] 这些分析表明，在此实验条件下，IA 最初呈六聚体形式存在。证明 IA 在稀释后解离，而且存在少量似乎是六聚体的二聚体的物质。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度、300 微摩尔浓度和 600 微摩尔浓度（单体单元）。

[0182] D.CE-100 4

[0183] 材料和方法如上所述。

[0184] 结果

[0185] 使用萨德福特和 c(s) 模型分析 CE-100 4 的数据库。严格来说，这种模型仅仅适用于无相互作用的混合物，但在相互作用的物质的情况下，其仍然可得出何种物质存在于溶液中的观点。图 9D 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。c(s) 曲线图符合德克德特 + 的 $g(s^*)$ 数据，因为稀释后，明显转变到较低 S 值。较高浓度的 c(s) 曲线图清楚显示 CE 100-4 可能大于六聚体。

[0186] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0187]

池编号	S(20,w)(斯韦柏)	浓度(毫克/毫升)
1	1.85	0.153
2	2.41	0.548
3	3.05	1.722
4	3.56	3.484

[0188] 结论：

[0189] 这些分析表明，在此实验条件下，蛋白质样品 CE 100-4 以单体、二聚体、六聚体和可能更大的寡聚物之间的平衡存在。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度、300 微摩尔浓度和 600 微摩尔浓度（单体单元）。

[0190] 用 ECF 缓冲液稀释：

[0191] 首先，除 CE 100-4 1 ： 4 稀释之外，用 ECF 1 ： 2 稀释市售制剂。这必须不同地处理，以避免经过等电点沉淀，因为其开始于 pH 4。其它的市售胰岛素已为 pH 7，因此，初始稀释是 1 ： 2。

[0192] A. RHI

[0193] 通过沉降速度超速离心，分析 RHI。在用等体积所供应的 ECF 稀释后，估算原液浓度为 1.87 毫克 / 毫升。

[0194] 以下物理常数是使用程序赛登特普由蛋白质的氨基酸组成算得。[5]

[0195] RHI :MW_{seq} = 5792 道尔顿，$N_{20°}$ = 0.726 毫升 / 克

[0196] 使用赛登特普，算得 20℃下稀释密度和粘度分别是 1.00273 克 / 毫升和 0.01043 泊。

[0197] 使用原液，分析中所用的三种池的稀释方案展示于下表中 ：

[0198]

池编号	原液体积（微升）	缓冲液体积（微升）	估算浓度（毫克 / 毫升）
1	45	405	0.19
2	150	300	0.62
3	450	--	1.87

[0199] 11.71 版萨德福特和直接边界模型化程序一起用于使用兰姆方程的基于模型的数值解法的个别数据组。[3]

[0200] 计算连续沉降系数分布 c(s) 模型。相对于其它的分析方法，c(s) 分布曲线图尖锐，因为通过使用摩擦系数的平均值，消除了扩散的增宽效应。

[0201] 结果

[0202] 图 10A 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。正规化 c(s) 曲线图所显示的数据符合德克德特 + 的 g(s^*) 数据。c(s) 曲线图几乎一致，但随着浓度增加，沉降中略微转变到较低 S 值。

[0203] 两种最低浓度样品中似乎有少量（＜ 1％）较慢沉降的物质，以及少量（＜ 3％）较快沉降的物质，可能是六聚体的二聚体。随着浓度增加，较慢物质的减少和较快物质的增加表明，在所研究的浓度范围内，RHI 的自我缔合仅仅略微转变。

[0204] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0205]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	3.25	0.176
2	3.24	0.552
3	3.35	1.721

[0206] 结论 ：

[0207] 这些分析表明，在此实验条件下，RHI 最初以六聚体形式存在。较低浓度样品中存在极少量较慢沉降的物质，以及似乎是六聚体的二聚体的物质。所研究的浓度为约 30 微摩

尔浓度、100 微摩尔浓度和 300 微摩尔浓度（单体单元）。

[0208] IL

[0209] 方法如上所述。

[0210] 结果

[0211] 图 10B 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。正规化 c(s) 曲线图所显示的数据符合德克德特 + 的 g(s*) 数据。低浓度下的 c(s) 曲线显示较小物质（或许是二聚体）的显著影响，其随着浓度增加而减少。随着浓度增加，沉降中也略微转变到较低 S 值。

[0212] 似乎有少量（＜ 2％）较快沉降的物质，在两种较高浓度样品中尤其明显。

[0213] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0214]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	3.17	0.167
2	3.12	0.568
3	3.17	1.820

[0215] 结论：

[0216] 这些分析表明，在此实验条件下，IL 最初以六聚体形式存在。证明 IL 在稀释后解离，而且存在少量似乎是六聚体的二聚体的物质。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度和 300 微摩尔浓度（单体单元）。

[0217] 门冬胰岛素 (IA)

[0218] 方法如上所述。

[0219] 结果

[0220] 图 10C 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。正规化 c(s) 曲线图所显示的数据符合德克德特 + 的 g(s*) 数据。低浓度下的 c(s) 曲线显示有少量较小物质（单体 / 二聚体），其随着浓度增加而减少。随着浓度增加，沉降中也略微转变到较低 S 值。此图清楚地显示，蛋白质在稀释后略微解离。此外，似乎有少量（最高浓度样品中约 3％）较快沉降的物质，可能是六聚体的二聚体。

[0221] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0222]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	3.10	0.186
2	3.23	0.544

3	3.24	1.848

[0223] 结论：

[0224] 这些分析表明，在此实验条件下，IA 最初以六聚体形式存在。证明 IA 在稀释后解离，而且存在少量似乎是六聚体的二聚体的物质。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度和 300 微摩尔浓度（单体单元）。

[0225] D.CE 100-4

[0226] 材料

[0227] 在用 3 体积所供应的 ECF 稀释 1 体积溶液后，估算原液浓度为 0.936 毫克 / 毫升。

[0228] 方法

[0229] 使用原液，分析中所用的 4 个池的稀释方案展示于下表中：

[0230]

池编号	原液体积（微升）	缓冲液体积（微升）	估算浓度（毫克 / 毫升）
1	90	360	0.19
2	200	250	0.42
3	450	--	0.94

[0231] 结果

[0232] 使用萨德福特和 c(s) 模型分析 CE 100-4 的数据集。严格来说，这种模型仅仅适用于无相互作用的混合物，但在相互作用的物质的情况下，其仍然可得出何种物质存在于溶液中的观点。图 10D 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。c(s) 曲线图符合德克德特 + 的 $g(s^*)$ 数据，因为稀释后，明显转变到较低 S 值。最高浓度的 c(s) 曲线图清楚地显示 CE 100-4 可能大于六聚体。

[0233] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0234]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	1.61	0.178
2	1.95	0.40
3	3.14	0.84

[0235] 这些分析表明，在此实验条件下，在最高浓度下 CE 100-4 以单体、二聚体、六聚体和可能更大的寡聚物之间的平衡存在。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、70 微摩尔浓度和 145 微摩尔浓度（单体单元）。

[0236] 用 HCl pH 2 或 NaOH pH 7 调节的水中对照

[0237] 以下物理常数是使用程序赛登特普由蛋白质的氨基酸组成算得。[5]

[0238] IC-pH7 ：MW_{seq} ＝ 5792 道尔顿 ；$N_{20°}$ ＝ 0.726 毫升 / 克

[0239] 使用赛登特普，算得 20℃下稀释密度和粘度分别是 0.99823 克 / 毫升和 0.01002 泊。

[0240] 内部对照 IC pH7

[0241] 方法

[0242] 使用含 pH 7NaOH 的水作为稀释剂，分析中所用的 4 个池的稀释方案展示于下表中：

[0243]

池编号	原液体积（微升）	缓冲液体积（微升）	估算浓度（毫克 / 毫升）
1	25	475	0.19
2	75	375	0.62
3	250	250	1.87
3	450	--	3.745

[0244] 连续沉降系数分布 c(s)。

[0245] 相对于其它的分析方法，c(s) 分布曲线图尖锐，因为通过使用摩擦系数的平均值，消除了扩散的增宽效应。

[0246] 结果

[0247] 使用萨德福特和 c(s) 模型分析 IC-pH7 的数据集。严格来说，这种模型仅仅适用于无相互作用的混合物，但在相互作用的物质的情况下，其仍然可得出何种物质存在于溶液中的观点。图 11 显示相对于负载浓度正规化的 c(s) 分布的曲线图。c(s) 曲线图符合德克德特 + 的 $g(s^*)$ 数据，因为稀释后，明显转变到较低 S 值。

[0248] 下表中给出针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值，相对于标准条件校正。

[0249]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	2.43	0.18
2	2.90	0.57
3	3.04	1.74
4	3.10	3.52

[0250] 分析表明，在此实验条件下，样品 IC-pH7 在最低程度稀释下以二聚体 - 六聚体平衡存在，在此处所用的三种最高浓度下强烈偏向于六聚体状态。所研究的浓度为约 30 微摩尔浓度、100 微摩尔浓度、305 微摩尔浓度和 620 微摩尔浓度（单体单元）。

[0251] 内部对照 IC pH 2

[0252] 方法：

[0253] 如上所述用 0.01N HCl 稀释胰岛素。

[0254] 结果：

[0255] 首先使用萨德福特和 c(s) 模型分析 IC-pH2 的数据集，以很好地估计负载浓度。针对各负载浓度的重量平均沉降系数所获得的值与使用德克德特 + 测得的值非常一致。下文给出如使用萨德福特测定的 $S_{20,w}$ 值的表。

[0256]

池编号	S(20,w)（斯韦柏）	浓度（毫克 / 毫升）
1	1.26	0.17
2	1.28	0.56
3	1.28	1.77
4	1.28	3.61

[0257] 这些分析表明，在此实验条件下，IC-pH2 主要以单一物质（推测是胰岛素单体）存在，未显示有进一步自我缔合的倾向。由于缺乏任何支持电解质，故溶剂条件非常不理想。所研究的浓度为 30 微摩尔浓度、97 微摩尔浓度、305 微摩尔浓度和 620 微摩尔浓度（单体单元）。

[0258] 沉降分析的总结论

[0259] 使用德克德特软件估算 RHI 分子量确定，在整个稀释范围内其分子量与六聚体 (35.6±1.6 千道尔顿）相符。作为单体胰岛素 (2.29 纳米）的标准，pH 2 胰岛素的对照值具有 1.28S(20, w) 的沉降系数值，此值在连续稀释液中基本上保持不变，证实其处于单体状态。不稳定的对照 pH 7 胰岛素在全浓度下是六聚体，但处于与较小二聚体形式的动态平衡中，如在 pH 7 稀释剂中稀释后尺寸减小所证明。IA 和 IL 开始于六聚体尺寸范围，并且在 ECF 中 1 ： 16 稀释后具有一小群单体 / 二聚体形式。CE 100-4 下较高比例的单体 / 二聚体粒子与其更迅速吸收的型态相符。

[0260] 实例 10 :测定柠檬酸钠和 EDTA 加入 pH 7.4 胰岛素中对胰岛素尺寸的影响

[0261] 因为在猪模型中 CES 100-4 的 pH 值升高到 7 显示吸收迅速，并且通过马尔文粒度分析仪测得尺寸减小，所以设计另一种方法来看在 pH 7.4 下柠檬酸三钠代替柠檬酸是否也起作用。

[0262] 材料与方法

[0263] 将乙二胺四乙酸二钠 (1.8 毫克 / 毫升）和柠檬酸三钠 (1.8 毫克 / 毫升）溶于含甘油 (22 毫克 / 毫升）的水中。将 3.8 毫克 / 毫升浓度的胰岛素加入溶液中。逐滴加入氢氧化钠，使 pH 值升高到 7.4。接着利用马尔文粒度分析仪分析未稀释物质的平均粒径，接着用细胞外液缓冲液 (ECF) 稀释，并且在连续稀释的每一点上都测定尺寸。

[0264] 结果

[0265] 在酸和中性环境中，将用 ECF 缓冲液稀释的柠檬酸钠胰岛素 pH 7.4CSE 100-7 与

柠檬酸制剂相比较。结果展示于图12中。图12是胰岛素平均粒径(纳米)随CE 100-7pH7.5和含有柠檬酸钠代替柠檬酸的CES 100-7pH 7.4的稀释而变化的图。

[0266] 结果证明,可以通过在中性pH值下在溶解状态下混合柠檬酸钠、EDTA和胰岛素而产生迅速解离的胰岛素。平均粒径最初大于典型的六聚体,推测是表明六聚体正在解离并呈松散缔合的胰岛素分子多聚体的形式。在注射后环境(ECF中稀释)中1:2稀释后,胰岛素迅速解离成较小单元,很可能是胰岛素二聚体。新的制剂行为完全像最初在pH 4下制备,接着达到pH 7的柠檬酸/EDTA胰岛素制剂一样。

[0267] 实例11:糖尿病模型猪中的柠檬酸EDTA胰岛素pH 7

[0268] 材料与方法

[0269] 通过混合胰岛素(3.8毫克/毫升)、乙二胺四乙酸二钠(1.8毫克/毫升)、柠檬酸(1.8毫克/毫升)、甘油和间甲酚(3毫克/毫升)并且用HCl调节pH值到4来制备胰岛素。接着通过加入NaOH,使溶液的pH值升到pH 7。这暂时地使制剂穿过胰岛素的等电点,产生混浊的混合物,当达到最终的pH值7.4时,混合物变澄清。在猪进食前,CE 100-7以膳食胰岛素形式给予猪。

[0270] 首先投予六只雄性糖尿病模型猪(30-50千克)0.25单位/千克的测试胰岛素,随即喂给其500克的标准猪食。在喂食前-30分钟、-20分钟、-10分钟、0分钟,接着给药后5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、75分钟、90分钟、120分钟、150分钟、180分钟、240分钟、300分钟、360分钟、420分钟、480分钟获得血液样品。通过颈静脉导管获得2毫升血液样品,其中一滴用以使用标准葡萄糖带状法检查葡萄糖测量,并且用K_2EDTA处理剩余的样品并冷冻血浆样品供未来分析。

[0271] 结果

[0272] pH 7制剂的药物动力学曲线展示于图13中。这种极快速的形态与实例6中糖尿病患者中所示的数据相符。在模型糖尿病猪中,含有柠檬酸和EDTA的酸制剂的pH值很好地升到7。这种pH值改变可引起柠檬酸变成柠檬酸钠。因此,酸的盐形式应该与酸一样地起作用。

[0273] 所属领域的技术人员根据以上描述将显而易知本发明的修改和变化,并且这些修改和变化欲在随附权利要求书的范围内。

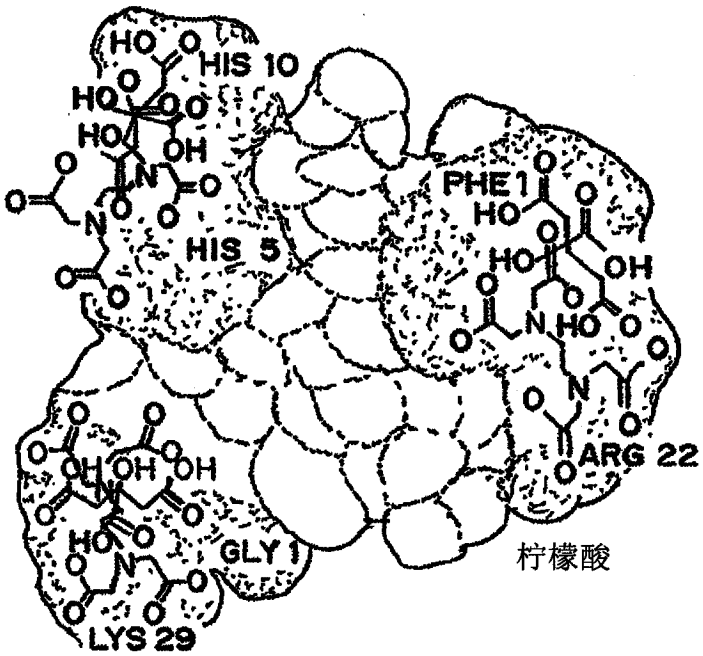

HIS 10
HIS 5
PHE 1
ARG 22
GLY 1
LYS 29
柠檬酸

图 1

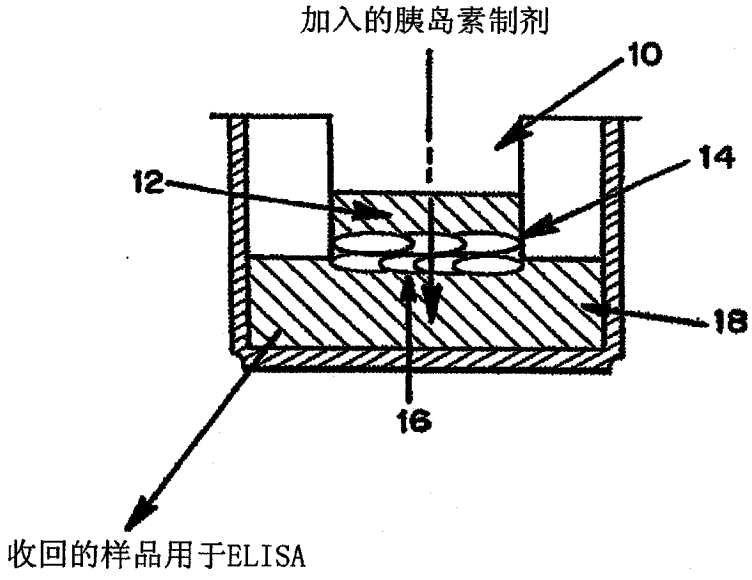

加入的胰岛素制剂
10
12
14
18
16
收回的样品用于ELISA

图 2

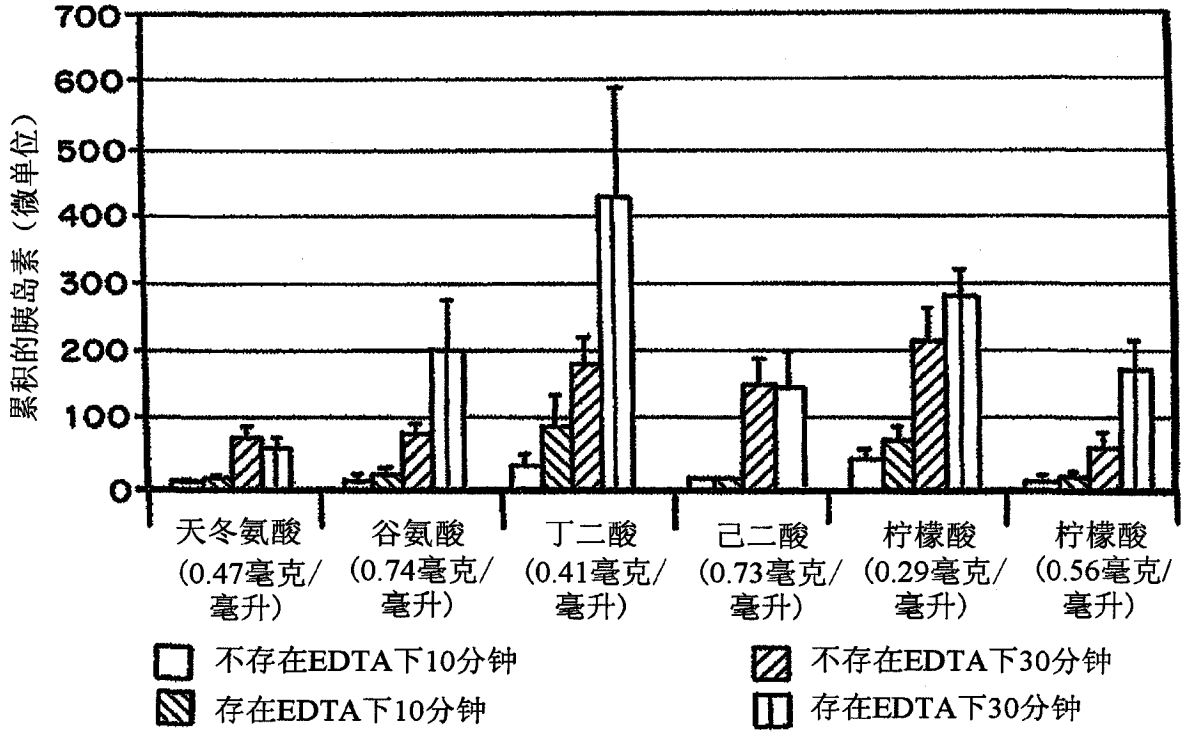

累积的胰岛素（微单位）
700
600
500
400
300
200
100
0
天冬氨酸 (0.47毫克/毫升)
谷氨酸 (0.74毫克/毫升)
丁二酸 (0.41毫克/毫升)
己二酸 (0.73毫克/毫升)
柠檬酸 (0.29毫克/毫升)
柠檬酸 (0.56毫克/毫升)
不存在EDTA下10分钟
存在EDTA下10分钟
不存在EDTA下30分钟
存在EDTA下30分钟

图 3A

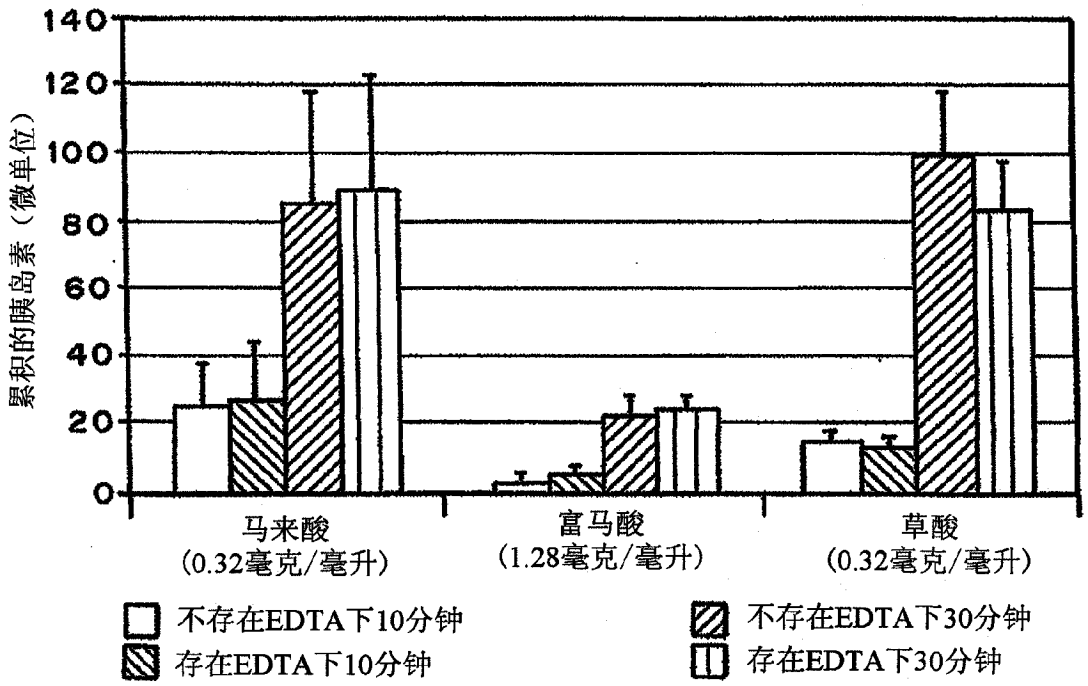

累积的胰岛素（微单位）
140
120
100
80
60
40
20
0
马来酸 (0.32毫克/毫升)
富马酸 (1.28毫克/毫升)
草酸 (0.32毫克/毫升)
不存在EDTA下10分钟
存在EDTA下10分钟
不存在EDTA下30分钟
存在EDTA下30分钟

图 3B

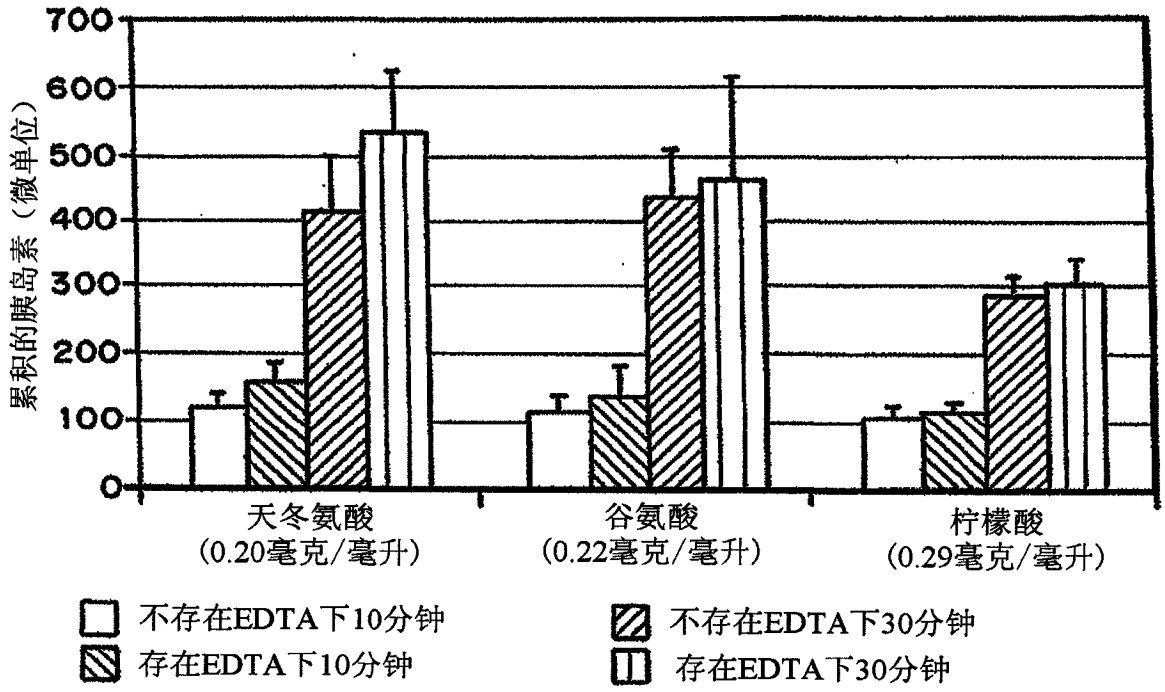

累积的胰岛素（微单位）
700
600
500
400
300
200
100
0
天冬氨酸
(0.20毫克/毫升)
谷氨酸
(0.22毫克/毫升)
柠檬酸
(0.29毫克/毫升)
不存在EDTA下10分钟
存在EDTA下10分钟
不存在EDTA下30分钟
存在EDTA下30分钟

图 4A

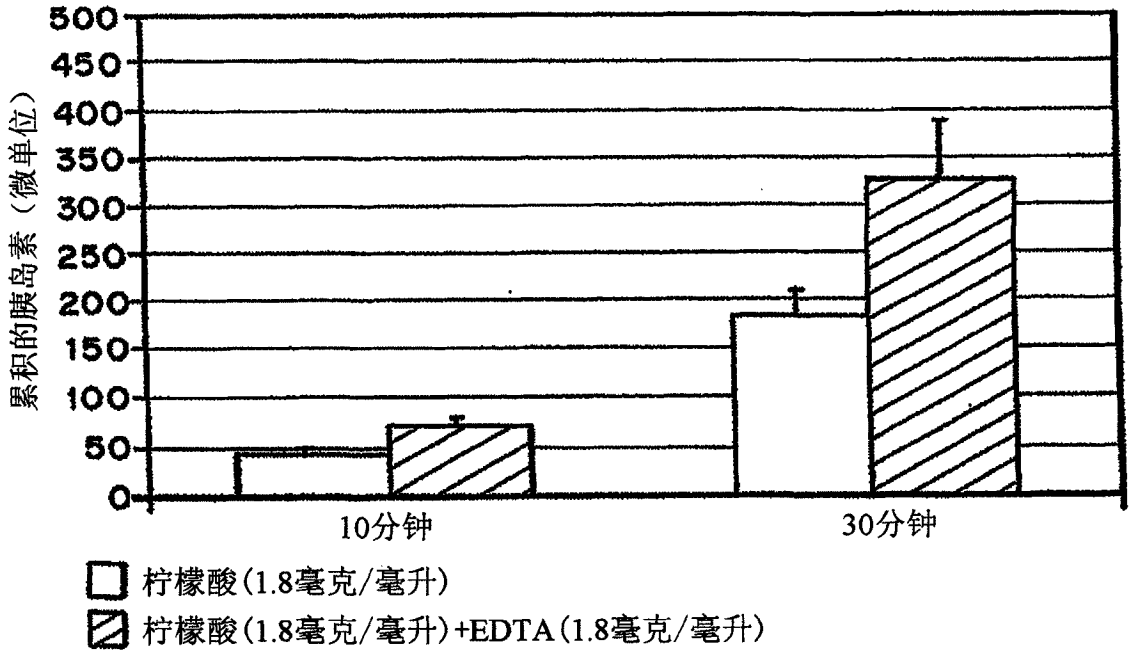

累积的胰岛素（微单位）
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
10分钟
30分钟
柠檬酸(1.8毫克/毫升)
柠檬酸(1.8毫克/毫升)+EDTA(1.8毫克/毫升)

图 4B

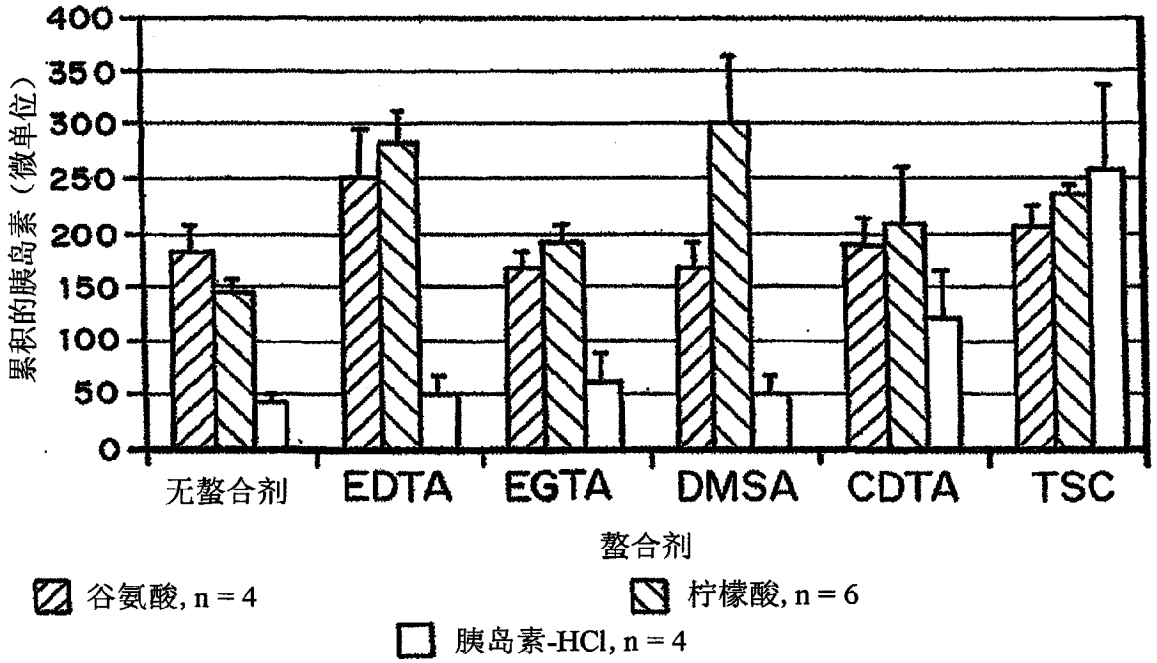

400
350
300
250
200
150
100
50
0
累积的胰岛素（微单位）
无螯合剂
EDTA
EGTA
DMSA
CDTA
TSC
螯合剂
谷氨酸, n = 4
柠檬酸, n = 6
胰岛素-HCl, n = 4

图 5

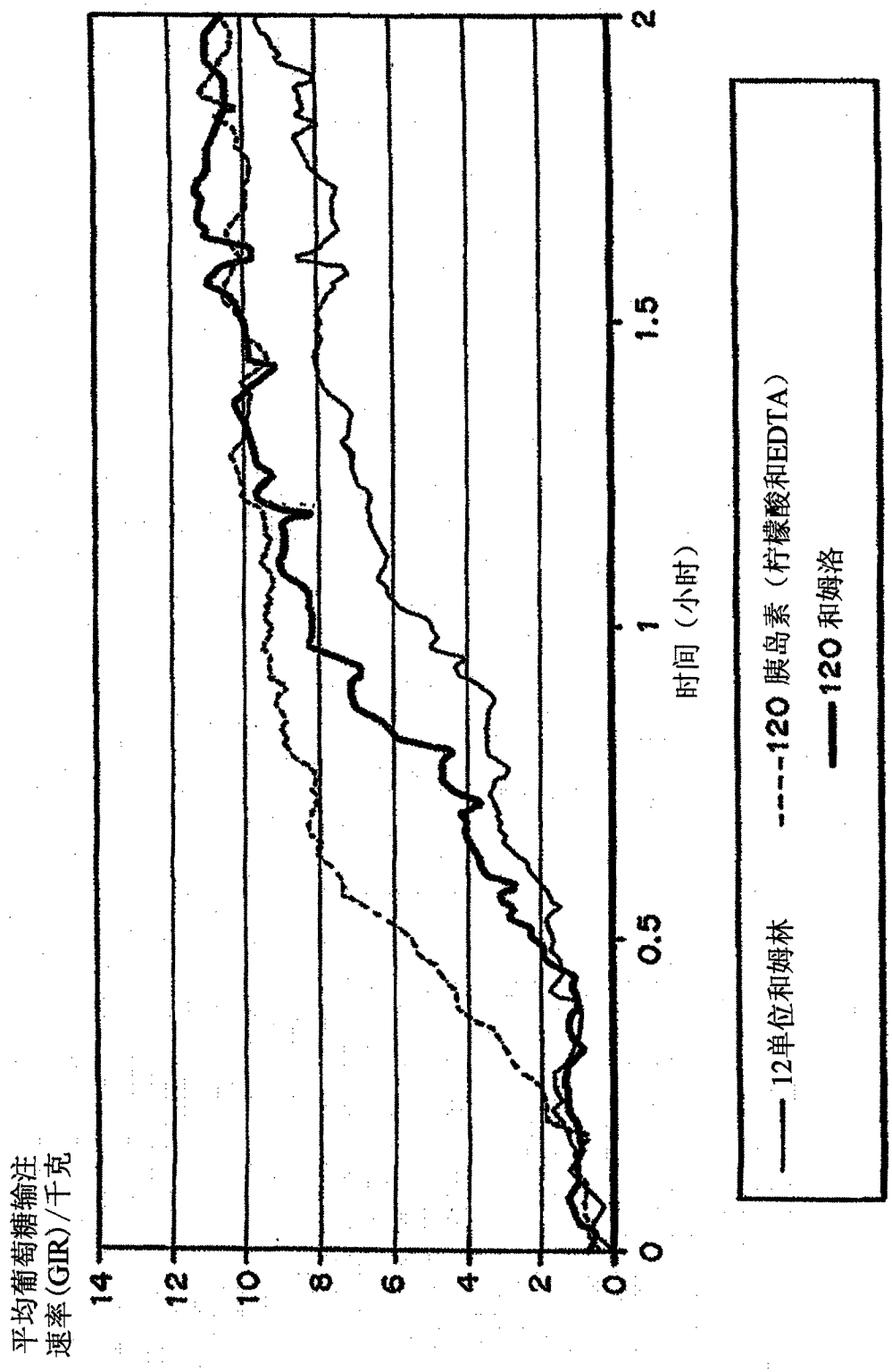

平均葡萄糖输注
速率(GIR)/千克
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0.5
1
1.5
2
时间（小时）
12单位和姆林
120 胰岛素（柠檬酸和EDTA）
120 和姆洛

图 6

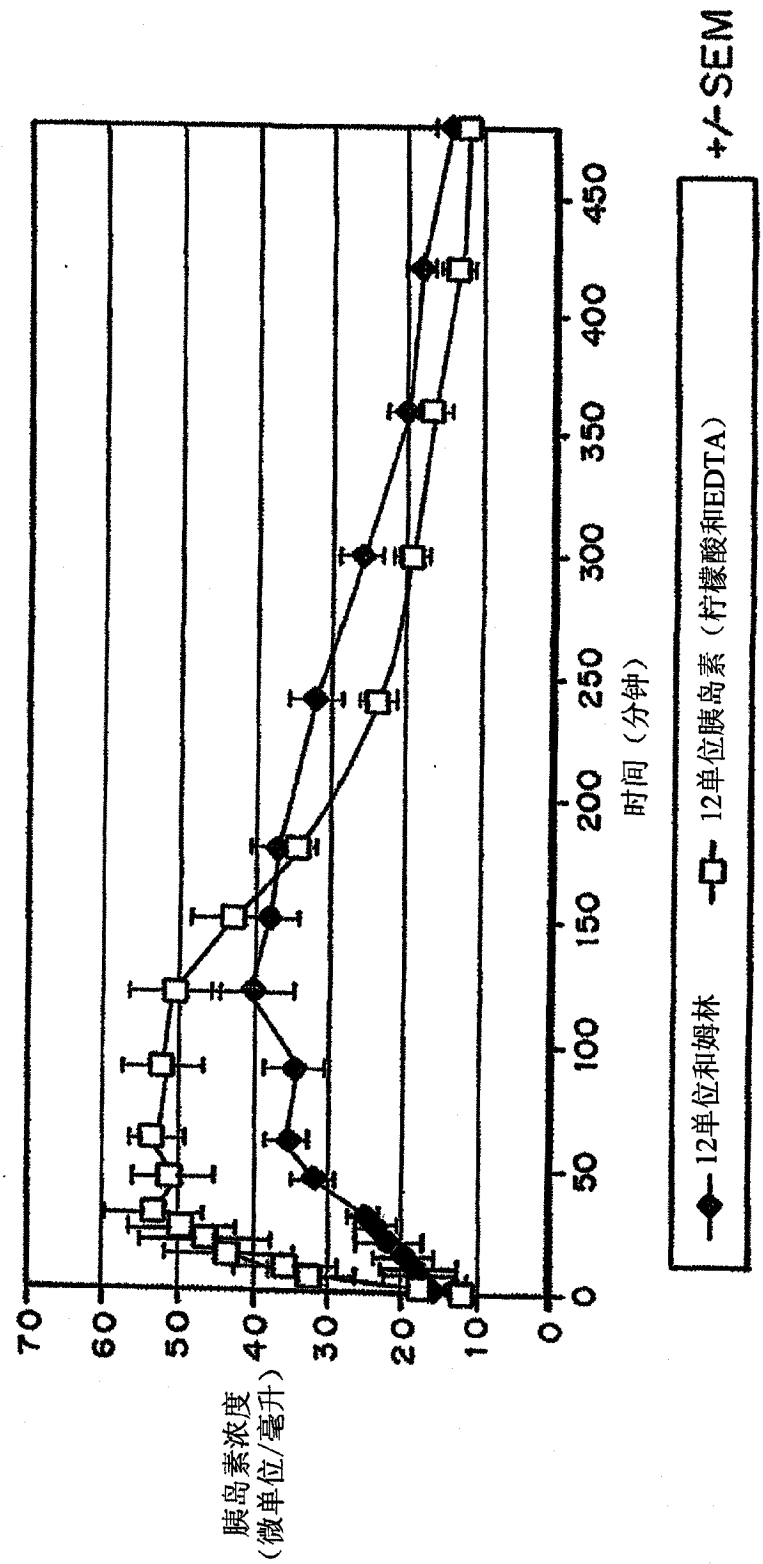

胰岛素浓度
（微单位/毫升）
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
时间（分钟）
12单位和姆林
12单位胰岛素（柠檬酸和EDTA）
+/-SEM

图 7

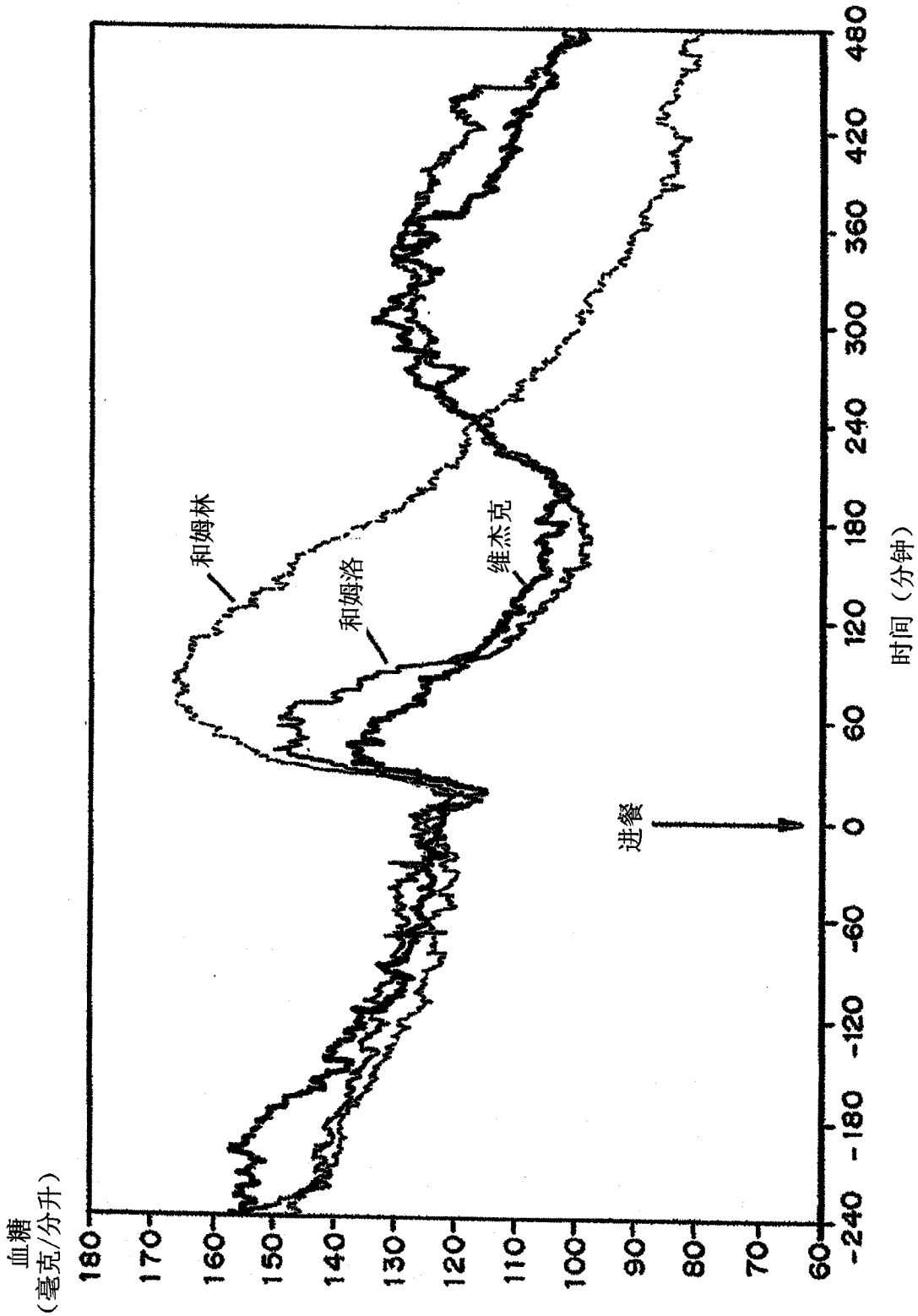

血糖
（毫克/分升）
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
-240
-180
-120
-60
0
60
120
180
240
300
360
420
480
时间（分钟）
和姆林
和姆洛
维杰克
进餐

图 8

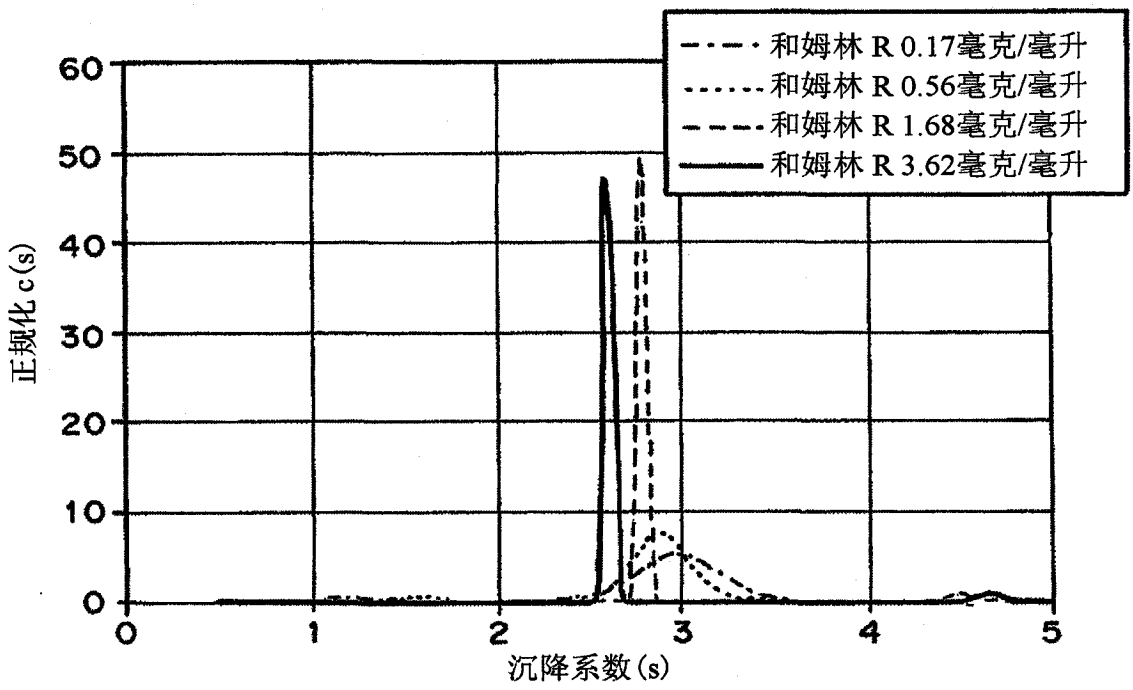

和姆林 R 0.17毫克/毫升
和姆林 R 0.56毫克/毫升
和姆林 R 1.68毫克/毫升
和姆林 R 3.62毫克/毫升
正规化 c(s)
沉降系数(s)
0
10
20
30
40
50
60
0
1
2
3
4
5

图 9A

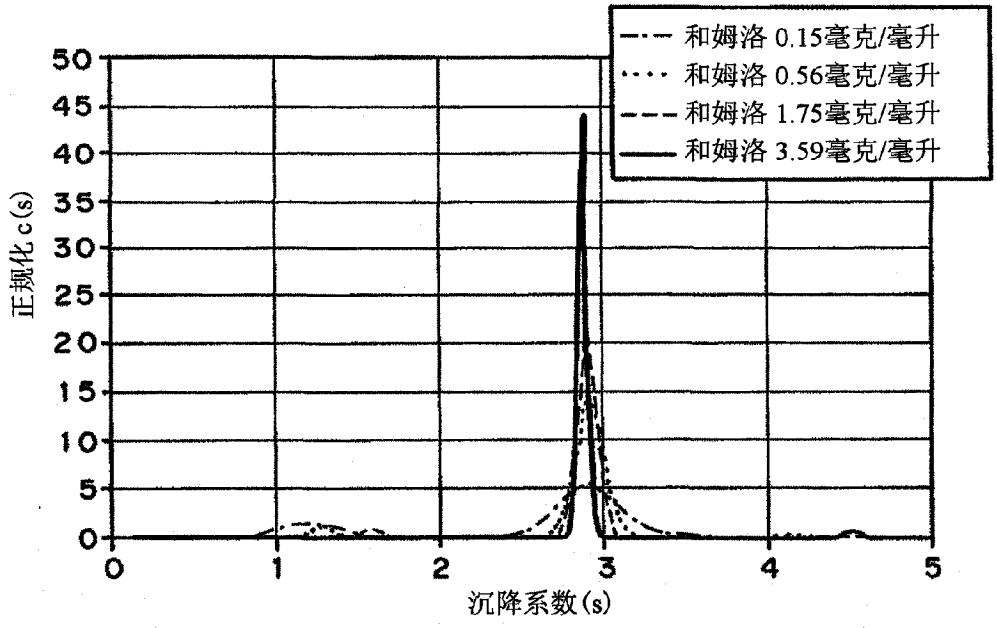

和姆洛 0.15毫克/毫升
和姆洛 0.56毫克/毫升
和姆洛 1.75毫克/毫升
和姆洛 3.59毫克/毫升
正规化 c(s)
沉降系数(s)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
1
2
3
4
5

图 9B

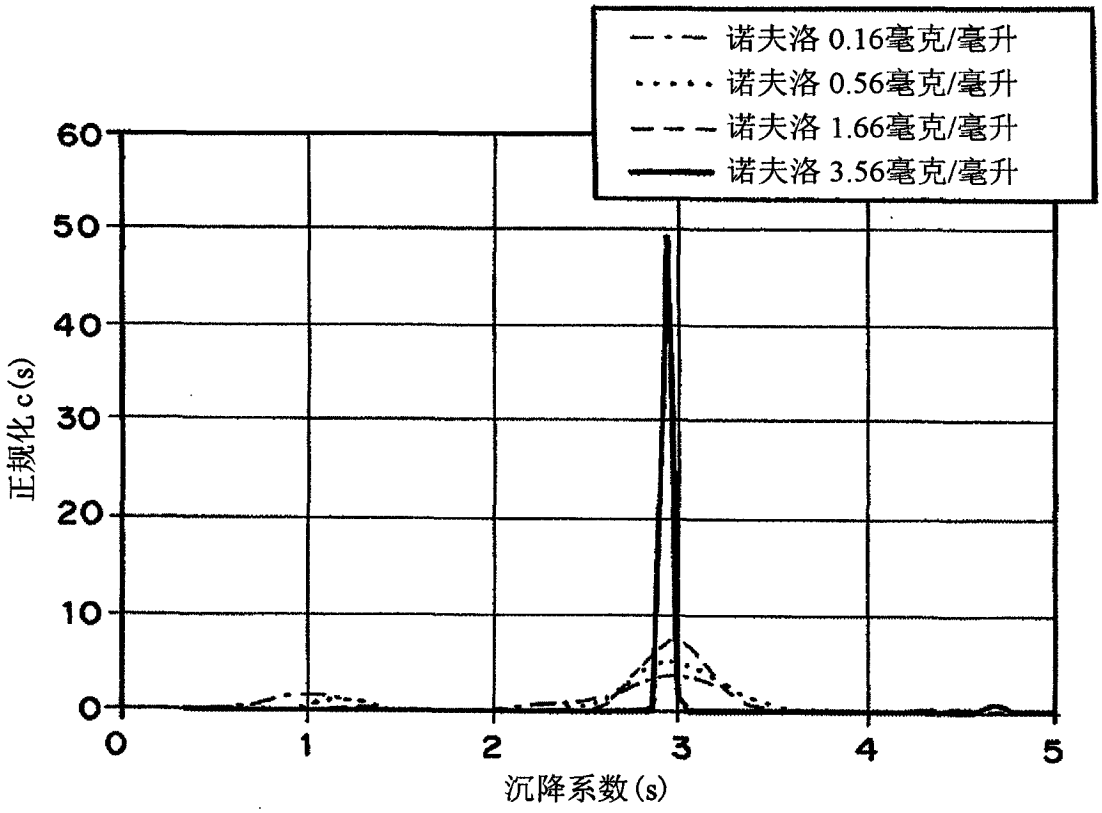

诺夫洛 0.16毫克/毫升
诺夫洛 0.56毫克/毫升
诺夫洛 1.66毫克/毫升
诺夫洛 3.56毫克/毫升
正规化 c(s)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
沉降系数(s)

图 9C

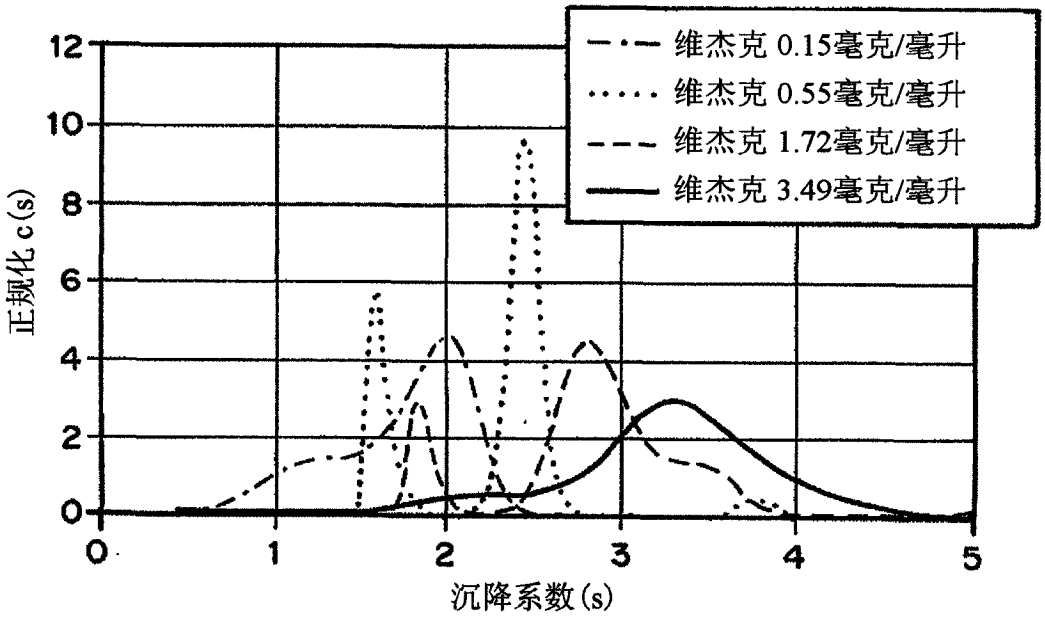

维杰克 0.15毫克/毫升
维杰克 0.55毫克/毫升
维杰克 1.72毫克/毫升
维杰克 3.49毫克/毫升
正规化 c(s)
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
沉降系数(s)

图 9D

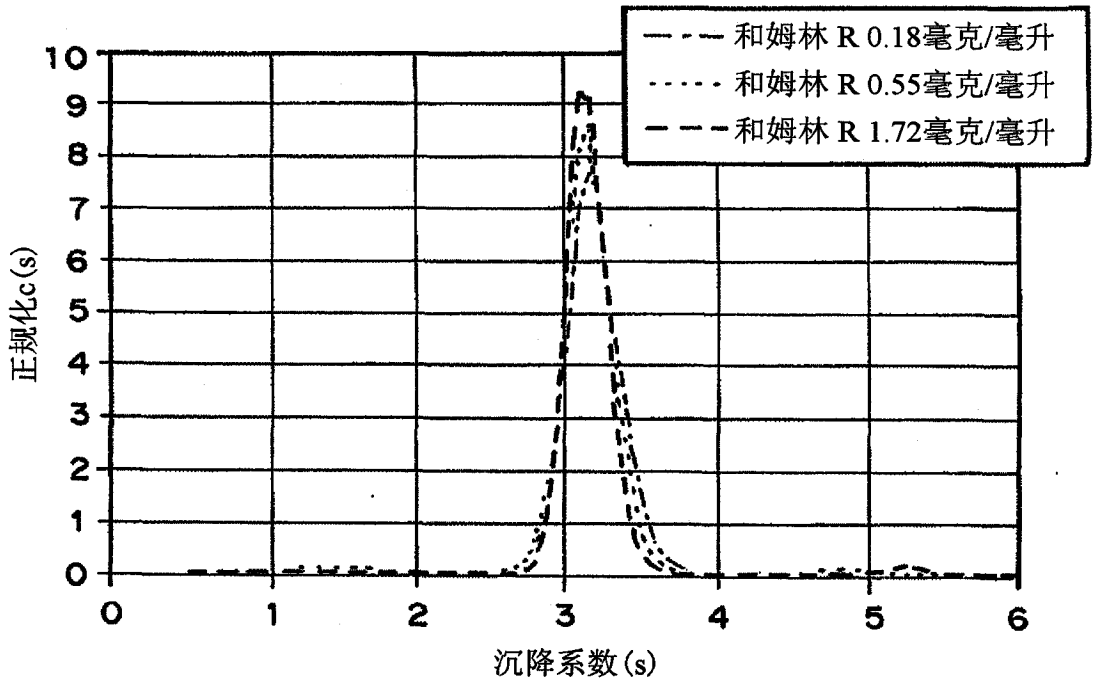

和姆林 R 0.18毫克/毫升
和姆林 R 0.55毫克/毫升
和姆林 R 1.72毫克/毫升
正规化c(s)
沉降系数(s)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

图 10A

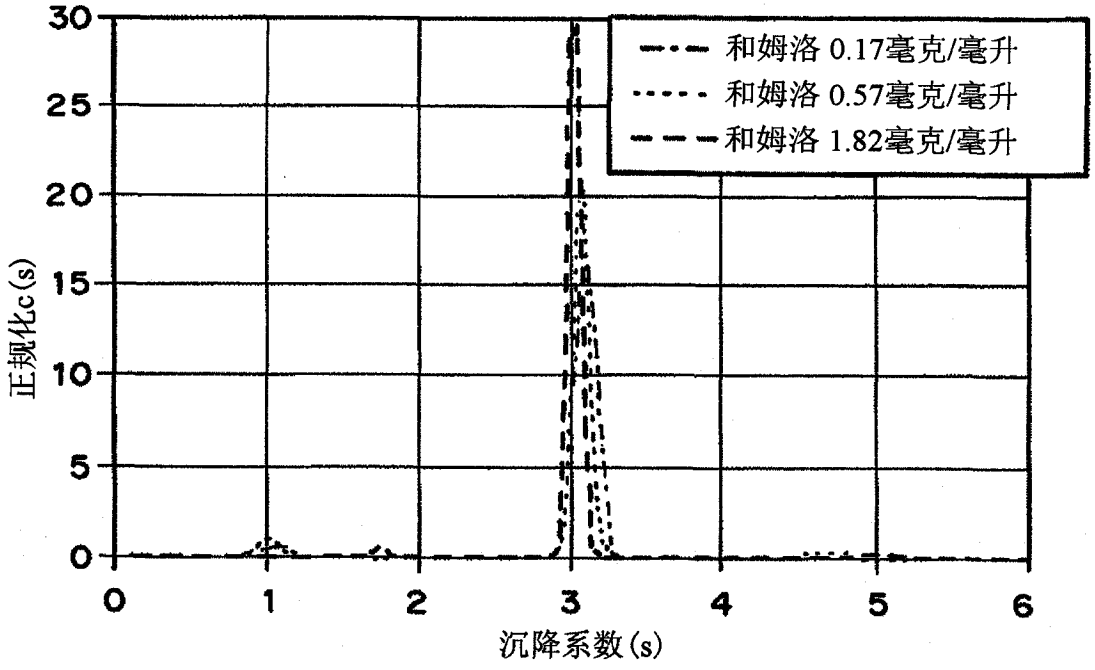

和姆洛 0.17毫克/毫升
和姆洛 0.57毫克/毫升
和姆洛 1.82毫克/毫升
正规化c(s)
沉降系数(s)
0
5
10
15
20
25
30
1
2
3
4
5
6

图 10B

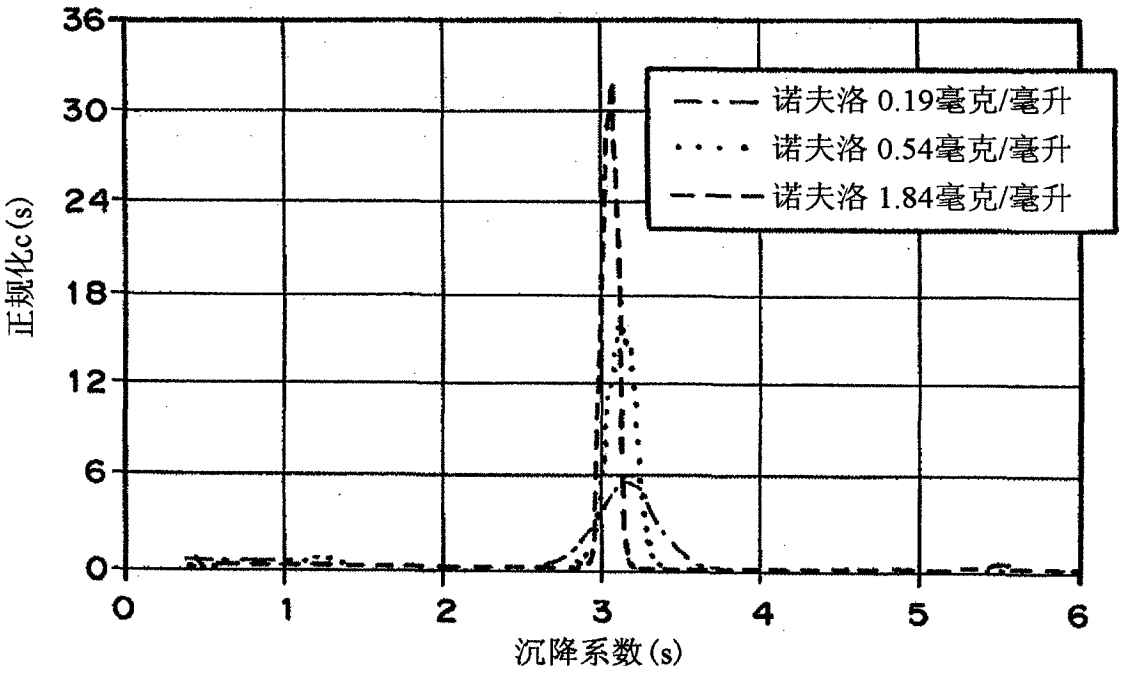

36
30
24
18
12
6
0
0
1
2
3
4
5
6
正规化c(s)
沉降系数(s)
诺夫洛 0.19毫克/毫升
诺夫洛 0.54毫克/毫升
诺夫洛 1.84毫克/毫升

图 10C

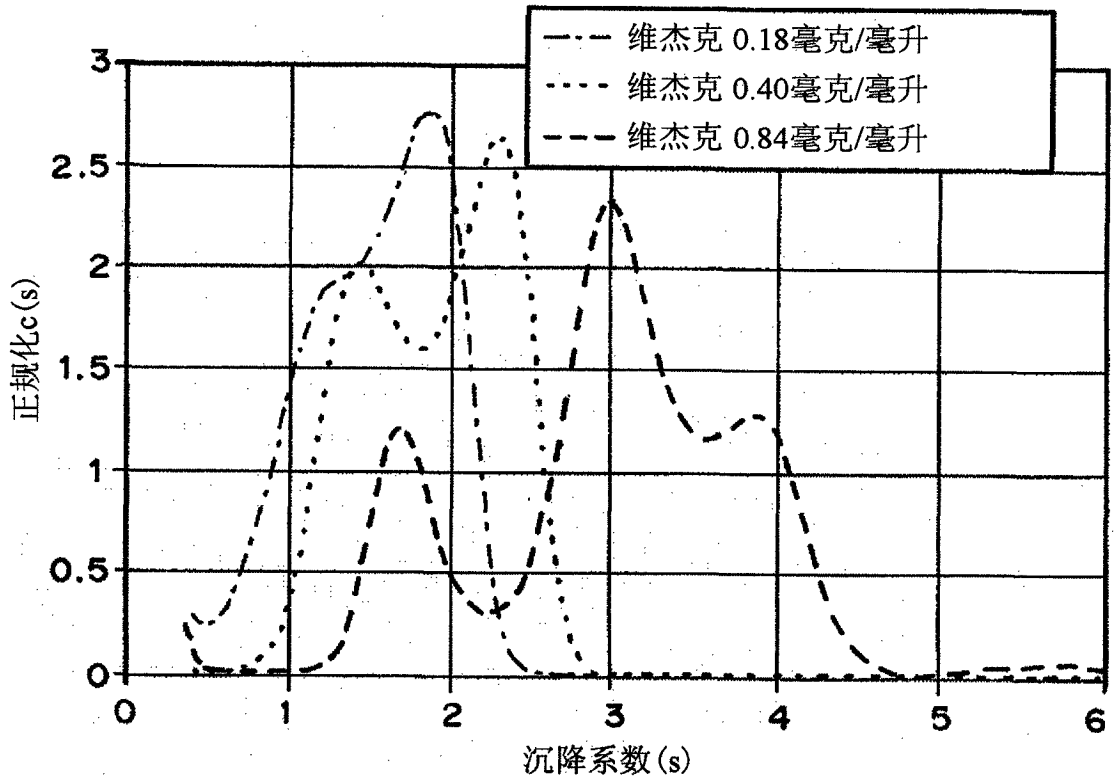

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
2
3
4
5
6
正规化c(s)
沉降系数(s)
维杰克 0.18毫克/毫升
维杰克 0.40毫克/毫升
维杰克 0.84毫克/毫升

图 10D

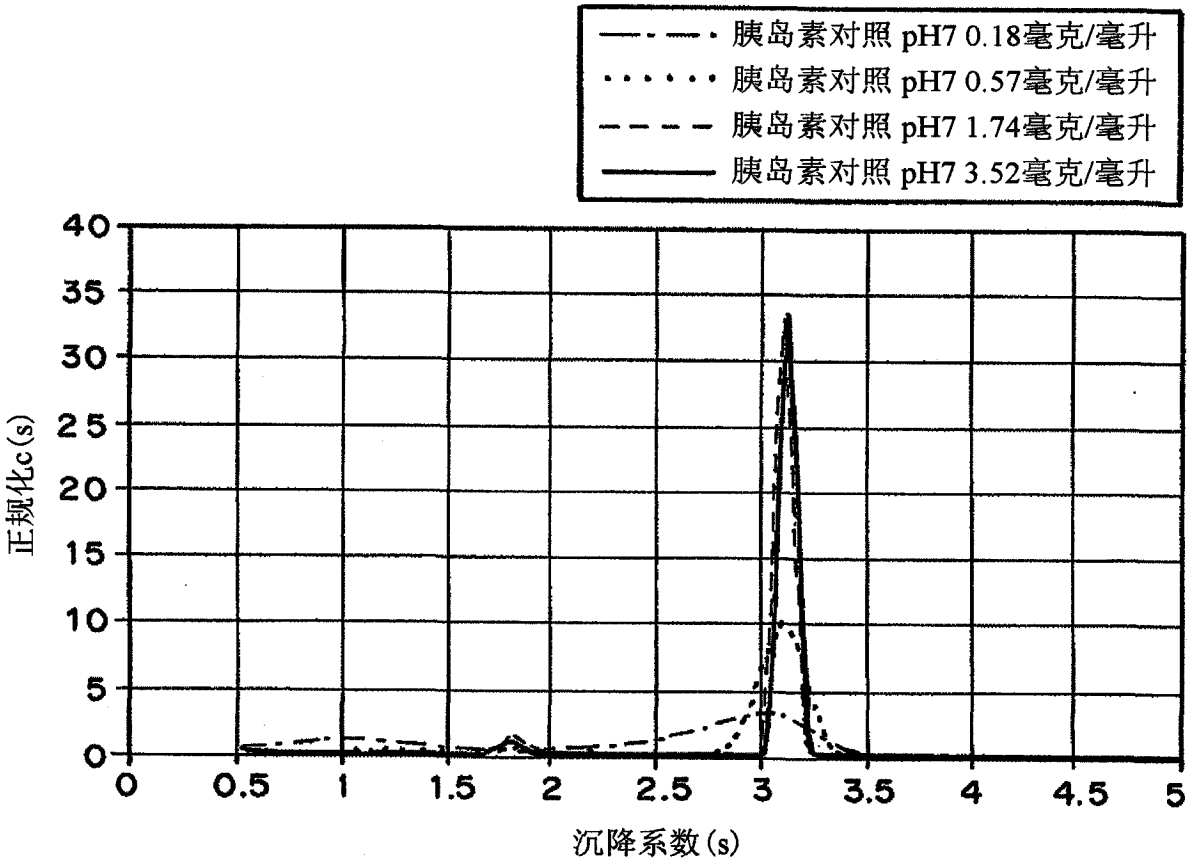

胰岛素对照 pH7 0.18毫克/毫升
胰岛素对照 pH7 0.57毫克/毫升
胰岛素对照 pH7 1.74毫克/毫升
胰岛素对照 pH7 3.52毫克/毫升
正规化c(s)
沉降系数(s)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5

图 11

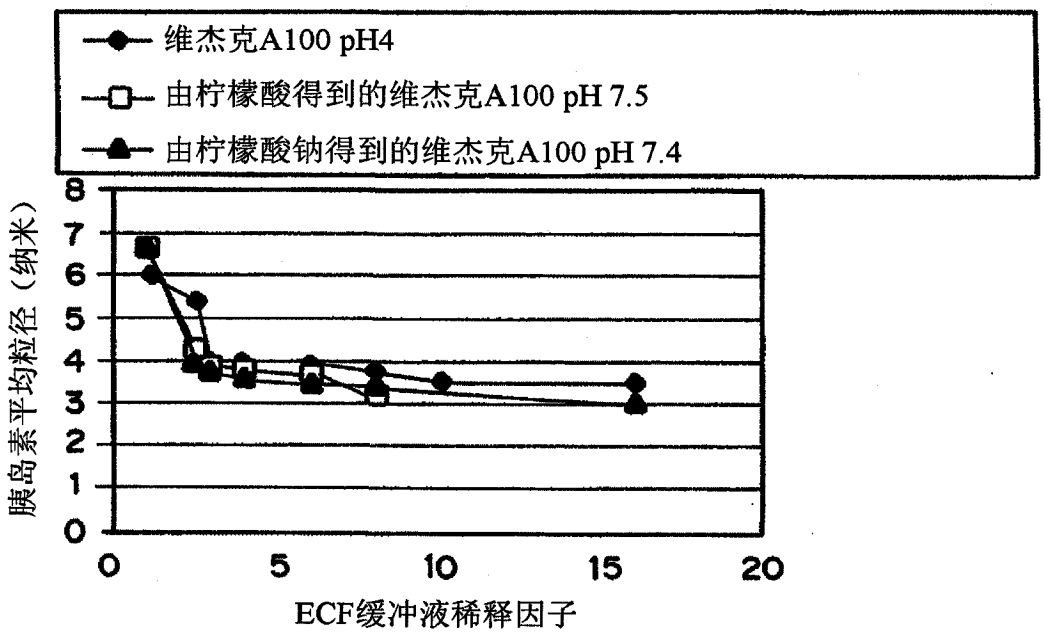

维杰克A100 pH4
由柠檬酸得到的维杰克A100 pH 7.5
由柠檬酸钠得到的维杰克A100 pH 7.4
胰岛素平均粒径（纳米）
ECF缓冲液稀释因子
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
5
10
15
20

图 12

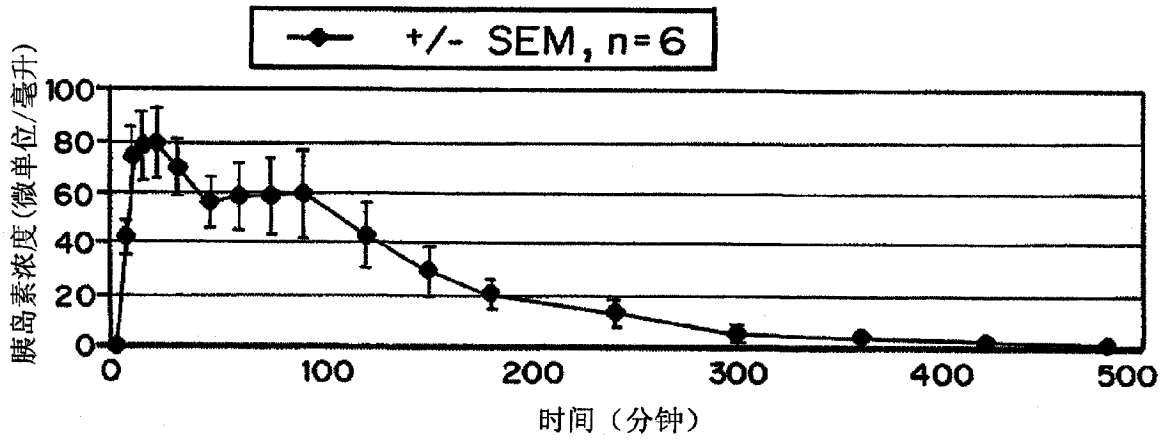


图 13