(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118302152 A
(43)申请公布日 2024.07.05

(21)申请号 202280075570.X
(22)申请日 2022.11.14
(30)优先权数据
63/279390 2021.11.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/079791 2022.11.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/086980 EN 2023.05.19
(71)申请人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州
(72)发明人 D·P·艾伦 J·M·比尔斯
V·J·科瓦里 P·D·多诺万
K·K·钱 王薇
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 郭慧 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 9/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 47/10(2006.01)
A61M 5/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

可保存制剂

(57)摘要

本文描述了胰岛素-Fc融合物的可保存制剂。所述制剂包括具有足以在糖尿病治疗中每周一次施用的延长的药代动力学和药效学特征的胰岛素-Fc融合物,并且足够稳定以允许储存和使用而没有不可接受的化学或物理稳定性损失。

CN 118302152 A

1.水性无菌药物组合物,其包含:

a)胰岛素-Fc融合物;

b)苯酚;

c)选自苯氧乙醇和苯甲醇的一种或多种另外的防腐剂;

d)张度剂;

e)表面活性剂;和

f)缓冲剂;并且

具有6至7.5的pH;和

其中所述苯酚和一种或多种另外的防腐剂以实现至少12周的使用期而没有不可接受的稳定性损失的浓度存在。

2.权利要求1的组合物,其中苯酚的浓度为1.5-4mg/mL。

3.权利要求1或2的组合物,其中苯酚的浓度为约1.8mg/mL。

4.权利要求1-3任一项的组合物,其中所述另外的防腐剂是苯氧乙醇。

5.权利要求4的组合物,其中苯氧乙醇的浓度为4-14mg/mL。

6.权利要求4的组合物,其中苯氧乙醇的浓度为约4mg/mL。

7.权利要求4的组合物,其中苯氧乙醇的浓度为约8mg/mL。

8.权利要求1-3任一项的组合物,其中所述另外的防腐剂是苯甲醇。

9.权利要求8的组合物,其中苯甲醇的浓度为5-10mg/mL。

10.权利要求9的组合物,其中苯甲醇的浓度为约9mg/mL。

11.权利要求1-10任一项的组合物,其中所述胰岛素-Fc融合物是基础胰岛素-Fc(BIF)。

12.权利要求11的组合物,其中BIF的浓度为5-30mg/mL。

13.权利要求12的组合物,其中BIF的浓度选自约7.15、14.3和28.6mg/mL。

14.权利要求1-13任一项的组合物,其中所述组合物的pH为6.3至6.8。

15.权利要求1-14任一项的组合物,其中所述组合物的pH为约6.5。

16.权利要求1-15任一项的组合物,其中所述张度剂选自氯化钠、甘露糖醇和甘油。

17.权利要求1-16任一项的组合物,其中所述张度剂是甘油。

18.权利要求17的组合物,其中甘油的浓度为15-35mg/mL。

19.权利要求18的组合物,其中甘油的浓度为约17mg/mL。

20.权利要求1-19任一项的组合物,其中所述表面活性剂选自泊洛沙姆188、聚山梨酯20和聚山梨酯80。

21.权利要求19-20任一项的组合物,其中所述表面活性剂是泊洛沙姆188。

22.权利要求21的组合物,其中泊洛沙姆188的浓度为0.01-0.5mg/mL。

23.权利要求22的组合物,其中泊洛沙姆188的浓度为约0.4mg/mL。

24.权利要求1-23任一项的组合物,其中所述缓冲剂选自磷酸盐、柠檬酸盐和TRIS。

25.权利要求24的组合物,其中所述缓冲剂是磷酸盐。

26.权利要求25的组合物,其中磷酸盐的浓度为5-10mM。

27.水性无菌药物组合物,其包含:

a)浓度为5-30mg/mL的BIF;

b)浓度为1.5-4mg/mL的苯酚;

c)浓度为4-14mg/mL的苯甲醇;

d)浓度为15-35mg/mL的甘油;

e)浓度为0.01-0.5mg/mL的泊洛沙姆188;和

f)浓度为5-10mM的磷酸盐;

其中所述组合物具有6.3至6.8的pH。

28.权利要求27的组合物,其中:

a)BIF的浓度选自约7.15、约14.3和约28.6mg/mL;

b)苯酚的浓度为约1.8mg/mL;

c)苯甲醇的浓度为约9mg/mL;

d)甘油的浓度为约17mg/mL;

e)泊洛沙姆188的浓度为约0.4mg/mL;和

f)磷酸盐的浓度选自约5和约10mM;

其中所述组合物具有约6.5的pH。

29.权利要求28的组合物,其中BIF的浓度为约14.3mg/mL,并且磷酸盐的浓度为约5mM。

30.权利要求28的组合物,其中BIF的浓度为约28.6mg/mL,并且磷酸盐的浓度为约10mM。

31.权利要求28的组合物,其中BIF的浓度为约7.15mg/mL。

32.治疗糖尿病的方法,其包括向有需要的人类施用有效剂量的权利要求1-31任一项的药物组合物。

33.一种制品,其包含权利要求1-31的药物组合物的任一种。

34.权利要求33的制品,其是多次使用型小瓶。

35.权利要求33的制品,其是多次使用型笔式注射器。

36.权利要求33的制品,其是用于连续皮下胰岛素输注疗法的泵装置。

可保存制剂

[0001] 本发明涉及胰岛素-Fc融合物的可保存制剂(preserved formulations)。该制剂包括具有足以在糖尿病治疗中每周一次施用的延长的药代动力学和药效学特征的胰岛素-Fc融合物,并且足够稳定以允许储存和使用而没有不可接受的化学或物理稳定性损失。

[0002] 糖尿病是一种慢性障碍,其特征在于由胰岛素分泌、胰岛素作用或两者的缺陷引起的高血糖。1型糖尿病(T1D)的特征在于很少或没有胰岛素分泌能力,并且T1D患者需要胰岛素治疗才能存活。2型糖尿病(T2D)的特征在于由胰岛素分泌受损、胰岛素抵抗、肝葡萄糖输出过多和/或来自所有上述这些的贡献引起的血糖水平升高。在许多T2D的患者中,疾病进展到需要胰岛素治疗。

[0003] 由于T1D患者产生很少胰岛素或不产生胰岛素,有效的胰岛素疗法通常涉及使用两种类型的外源性施用的胰岛素:通过推注提供的速效餐时胰岛素,和每日施用一次或两次以控制两餐之间的血糖水平的长效基础胰岛素。T2D患者的治疗通常从处方减重、运动和糖尿病饮食开始,但当这些措施无法控制升高的血糖时,可能需要口服药物和基于肠降血糖素的疗法。当这些药物仍然不足时,考虑用胰岛素治疗。其疾病已经进展到需要胰岛素治疗的程度的T2D患者通常以每日单次注射长效基础胰岛素开始。

[0004] 目前可获得的基础胰岛素包括以商品名LANTUS®销售的甘精胰岛素、以商品名LEVEMIR®销售的地特胰岛素和以商品名TRESIBA® 销售的德谷胰岛素。这些胰岛素各自适用于每日一次施用,并且可以以可保存制剂获得,所述可保存制剂具有足够的抗微生物效力以允许从单个容器或装置施用多个剂量。

[0005] 涉及现有胰岛素疗法的每日注射的治疗方案可能在施用上是复杂且疼痛的,并且会导致不期望的副作用,如低血糖和体重增加。正在进行研究以开发具有更长的作用持续时间的胰岛素产品;因此,需要比目前可得的胰岛素产品更少的注射,包括如每周一次的低频率。

[0006] 一类这样的胰岛素产品包含激活与抗体的Fc区连接的胰岛素受体的部分,在本文中称为胰岛素-Fc融合物。这样的产品的实例描述在美国专利号9,855,318中,其描述了其化合物和制剂,包括包含常用于胰岛素产品,包括上述每日一次的基础胰岛素的酚类防腐剂间甲酚的制剂。

[0007] 但是,已经发现,具有美国专利号9,855,318和/或目前可得的胰岛素产品中描述的防腐剂浓度的胰岛素-Fc融合物的制剂可能导致不可接受的稳定性问题。因此,需要具有提供足够的抗微生物效力但不会导致不可接受的稳定性问题的防腐剂的新制剂。

[0008] 本发明试图满足这些需求。

[0009] 因此,在一个方面,本发明提供一种水性无菌药物组合物,其包含:

[0010] a)胰岛素-Fc融合物;

[0011] b)苯酚;

[0012] c)选自苯氧乙醇和苯甲醇的一种或多种另外的防腐剂;

[0013] d)张度剂;

[0014] e)表面活性剂;

[0015] f)缓冲剂;和

[0016] 具有6至7.5的pH;和

[0017] 其中所述苯酚和一种或多种另外的防腐剂以实现至少12周的使用期而没有不可接受的稳定性损失的浓度存在。

[0018] 在另一个方面,本发明提供一种水性无菌药物组合物,其包含:

[0019] a)浓度为5-30mg/mL的基础BIF;

[0020] b)浓度为1.5-4mg/mL的苯酚;

[0021] c)浓度为4-14mg/mL的苯甲醇;

[0022] d)浓度为15-35mg/mL的甘油;

[0023] e)浓度为0.01-0.5mg/mL的泊洛沙姆188;和

[0024] f)浓度为5-10mM的磷酸盐;

[0025] 其中所述组合物具有6至7.5的pH。

[0026] 在另一个方面,本发明提供一种改善血糖控制的方法,其包括向有需要的人类施用有效剂量的本发明的水性无菌药物组合物。

[0027] 此外,本发明提供用于治疗的本发明的水性无菌药物组合物。更特别地,本发明提供用于改善血糖控制的药物组合物。本发明还提供药物组合物在制备用于改善血糖控制的药物中的用途。

[0028] 此外,本发明提供一种制品,其包含本发明的水性无菌药物组合物。更特别地,在某些方面,该制品是多次使用型小瓶、药筒、可重复使用的笔式注射器、一次性笔式装置、用于连续皮下胰岛素输注疗法的泵装置或用于连续皮下胰岛素输注疗法的泵装置中使用的容器封闭系统。

[0029] 本发明涉及具有延长的作用持续时间的胰岛素-Fc融合物的可保存制剂。胰岛素-Fc融合物已经描述在例如美国专利号9,855,318;CN103509118;WO2011/122921;US2015/0196643;WO2018/185131;WO2020/006529;WO2020/074544;WO2021126584;US20210300983;US2021/0324033;和US2021340212中。

[0030] 在某些优选实施方案中,胰岛素-Fc融合物是美国专利号9,855,318中描述的化合物,其被称为基础胰岛素Fc(BIF)或insulin efsitora alfa(CAS登记号2131038-11-2)。BIF包含与人IgG Fc区融合的胰岛素受体激动剂的二聚体,其中胰岛素受体激动剂包含通过使用第一肽接头与胰岛素A链类似物融合的胰岛素B链类似物,并且其中胰岛素A链类似物的C端残基直接融合至第二肽接头的N端残基,且第二肽接头的C端残基直接融合至人IgGFc区的N端残基。BIF的各单体具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列:

[0031]
```
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSL
DQLENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

[0032] (SEQ ID NO:1)。各单体包括在位置7和44、19和57、43和48、114和174以及220和278处的半胱氨酸残基之间的链内二硫键。这两个单体通过在位置80和83处的半胱氨酸残基之间的二硫键连接以形成二聚体。BIF的结构、功能和制备更详细描述在美国专利号9,

855,318中。

[0033] 当在本文中使用时,术语“BIF”是指由具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的两个单体组成的任何胰岛素受体激动剂,包括作为寻求批准胰岛素受体激动剂产品的监管提交的对象的任何蛋白质,其全部或部分依赖于Eli Lilly and Company提交给监管机构的与BIF有关的数据,无论寻求批准所述产品的一方是否实际将胰岛素受体激动剂认定为BIF或使用一些其它术语。

[0034] 本发明的组合物中的胰岛素-Fc融合物的浓度必须足以能够施用具有宽范围胰岛素需求的T2DM和T1DM患者所需的胰岛素剂量范围。目前可得的适合每日一次给药的基础胰岛素产品,如LANTUS(甘精胰岛素)、TOUJEO(甘精胰岛素)、TRESIBA(德谷胰岛素)和LEVEMIR(地特胰岛素)可以以100胰岛素单位(IU)/mL至300IU/mL的浓度获得。在本发明的某些实施方案中,胰岛素-Fc融合物以约100至约2000胰岛素单位(IU)/mL的浓度存在。在某些实施方案中,胰岛素-Fc融合物以约250IU/mL、500IU/mL或1000IU/mL的浓度存在。胰岛素-Fc融合物的浓度也可以表示为每单位体积的质量。例如,在其中胰岛素-Fc融合物是BIF的某些实施方案中,BIF的浓度为约5-30mg/mL。在某些实施方案中,BIF的浓度选自7.15、14.3和28.6mg/mL。

[0035] 本发明的制剂在最初生产时是无菌的,但是,当该组合物在多次使用型小瓶或药筒中提供时,以足够的强度添加与胰岛素-Fc融合物和该制剂的任何其它组分相容的抗微生物防腐剂,以满足多次使用型产品的监管和药典抗微生物防腐要求。这些要求包括被设计为挑战防腐剂抑制或杀死可能不经意引入产品中的微生物的能力的试验。在美国药典(USP)<51>“Antimicrobial Effectiveness Testing”和欧洲药典(Ph.Eur.或EP)5.1.3“Efficacy of Antimicrobial Preservation”中提供了关于进行这些试验的指导。参见例如Meyer,B.D.等人,Antimicrobial preservative use in parenteral products:Past and present.JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES2007,96,(12),3155-3167;Moser,C.L.,Meyer,B.K.,Comparison of compendial antimicrobial effectiveness tests:A review.AAPS PHARM.SCI.TECH 2011,12,(1),222-226。

[0036] 上文提到的验收标准评估了在各个限定时间点的微生物计数的$\log_{10}$减少,并将这些计数与初始时间零接种物水平进行比较。例如,USP标准要求在7天时从初始细菌计数减少不小于1.0-log,在14天时从初始计数减少不小于3.0-log,并且在28天时与14天计数相比无增加。EP B标准被欧盟监管机构视为强制性的,并且要求在24小时时初始细菌计数减少至少1log并在7天时减少3-log。由于其比USP标准更严格,任何满足EP B标准的制剂也满足USP<51>标准。EP A标准是最严格的,要求在6小时减少2-log并在24小时减少3-log。使用许多防腐剂体系难以实现EP A标准,并且为了实现EP A而添加的防腐剂通常对产品具有有害影响和/或处于被认为对患者更可达到有毒的水平。

[0037] 目前可用于皮下施用的治疗性胰岛素产品是多次使用型产品,因此必须满足关于抗微生物效果的监管要求,包括USP和EP B标准。通常用于满足这些要求的防腐剂包括苯酚(CAS No.108-95-2,分子式$C_6H_{50}H$,分子量94.11)和间甲酚(CAS No.108-39-4,分子式C_7H_{80},分子量108.14),如在下表1中列出的产品中。

[0038]

产品	防腐剂	浓度
APIDRA® (谷赖胰岛素) HUMALOG® (赖脯胰岛素) LYUMJEV™ (赖脯胰岛素-aabc)	间甲酚	3.15 mg/mL
HUMULIN® R (人胰岛素)	间甲酚	2.5 mg/mL
LANTUS® (甘精胰岛素) BASAGLAR® (甘精胰岛素)	间甲酚	2.7 mg/mL
FIASP® (门冬胰岛素)	间甲酚	1.72 mg/mL
NOVOLOG® (门冬胰岛素) TRESIBA® (德谷胰岛素)	苯酚	1.50 mg/mL
LEVEMIR® (地特胰岛素)	间甲酚	2.06 mg
	苯酚	1.80 mg

[0039] 表1.市售胰岛素产品中所用的防腐剂的实例

[0040] 但是,在胰岛素-Fc融合物如BIF的制剂中,这些浓度的间甲酚和苯酚导致蛋白质沉淀,因此不能用于提供足以满足USP和EP要求的抗微生物功效。因此,本发明的制剂依赖于使用不同的防腐剂:苯氧乙醇(CAS No.122-99-6,分子式C8H10O2,分子量138.16g/mol)和/或苯甲醇(CAS No.100-51-6,分子式C_7H_8O,分子量108.14g/mol)。具体地,已经发现,通过与苯甲醇和/或苯氧乙醇组合使用一定浓度的苯酚,可以在BIF的所需pH范围内在制剂中满足抗微生物效果标准,而不会引起不可接受的物理稳定性损失。

[0041] 本发明制剂中的苯酚和苯甲醇和/或苯氧乙醇的浓度必须足以确保该制剂满足USP和EP B指导文件中所述的肠胃外产品的最低无菌要求。当在本文中使用时,术语“无菌”是指满足这些最低无菌要求的制剂。

[0042] 但是,这些防腐剂的浓度不得高到造成胰岛素-Fc融合蛋白的不可接受的物理或化学稳定性问题。本发明的组合物足够稳定以允许储存和使用多周(在本文中称为“使用”期)而没有不可接受的稳定性损失。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许至少12周的使用期。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许在冷藏下12周以及在30℃下2周的使用期。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许在25℃下8周的使用期。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许在25℃下12周的使用期。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许在30℃下8周的使用期。在某些实施方案中,该组合物足够稳定以允许在30℃下12周的使用期。

[0043] 关于苯酚,一些多剂量肠胃外药物产品使用5mg/mL苯酚作为防腐剂,但发现该浓度造成BIF制剂中的蛋白质沉淀,因此浓度必须小于5mg/mL。在本发明的某些实施方案中,苯酚的浓度为1.5-4mg/mL。在本发明的某些实施方案中,苯酚的浓度为约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、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0mg/mL。在某些优选实施方案中,苯酚的浓度为1.8-3.5mg/mL。在某些优选实施方案中,苯酚的浓度为约1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4或3.5mg/mL。在某些优选实施方案中,苯酚的浓度为约1.8、2、2.5、3

或3.5m/mL。在特别优选的实施方案中,苯酚的浓度为约1.8mg/mL。应该指出,由于其物理性质,苯酚通常以90％水溶液的形式添加到水性组合物,如本文所述的那些中。例如,在下面描述的许多研究中,苯酚作为“液化蒸馏苯酚”加入,其是90％苯酚和10％水。在这些研究中,列出的苯酚浓度是指添加到组合物中的90％溶液的浓度。因此,用2mg/mL的90％苯酚溶液制备的组合物中的绝对苯酚含量为1.8mg/mL。除非另有说明,例如,如在下面描述的使用90％苯酚溶液的研究中,否则本发明的组合物中包含的苯酚浓度是指绝对苯酚含量。

[0044] 本发明的制剂中的苯氧乙醇或苯甲醇的浓度取决于苯酚的浓度,但必须以足以使制剂在所需pH下无菌的浓度存在。例如,在某些实施方案中,在pH 6.5,9mg/mL苯氧乙醇在不存在苯酚的情况下不足以通过EP B标准,但是当与低至1.8mg/mL的苯酚浓度组合时,低至4mg/mL的浓度可用于通过EP B标准。类似地,在某些实施方案中,9mg/mL苯甲醇甚至不足以通过USP标准,但是当与1.8mg/mL苯酚组合使用时,低至5mg/mL的浓度通过USP标准。

[0045] 在某些实施方案中,苯氧乙醇的浓度为4mg/mL至14mg/mL。在某些实施方案中,苯氧乙醇的浓度为约4、5、6、7、8、9.10、11、12、13或14mg/mL。在某些优选实施方案中,苯氧乙醇的浓度为约4或约8mg/mL。

[0046] 在某些实施方案中,苯甲醇的浓度为5-10mg/mL。在某些实施方案中,苯甲醇的浓度为约5、6、7、8、9或10mg/mL。在某些优选实施方案中,苯甲醇的浓度为约9mg/mL。

[0047] 本发明的制剂的pH为5.5至7.5。在某些实施方案中,pH为约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、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。在某些实施方案中,pH为6至7。在某些实施方案中,pH为约6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。优选地,本发明的制剂的pH至少为胰岛素-Fc融合物的PI。对于包含BIF的制剂,pH优选为至少约6.1。在包含BIF的某些实施方案中,pH为6.2至7.4。在包含BIF的某些实施方案中,pH为6.2至6.9。在包含BIF的某些实施方案中,pH为6.3至6.8。在包含BIF的特别优选的实施方案中,pH为约6.5。

[0048] 如果需要,可以包括缓冲剂。这样的缓冲剂的实例是磷酸盐,例如磷酸氢二钠,柠檬酸盐、乙酸钠和三(羟甲基)氨基甲烷或TRIS。如果需要缓冲化合物,柠檬酸盐或磷酸盐缓冲剂是优选的。在某些实施方案中,本发明的组合物包括浓度为5-10mM的柠檬酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,本发明的组合物包括浓度为5-10mM的磷酸盐。在某些优选实施方案中,本发明的组合物包括浓度为约5、6、7、8、9或10mM的磷酸盐。在某些优选实施方案中,本发明的组合物包括浓度为约5或约10mM的磷酸盐。

[0049] 希望在施用该组合物时尽可能接近地近似匹配注射部位的体液的张度(即,克分子渗透压浓度(osmolality)),因为与体液不近似等渗的溶液在施用时可产生疼痛的刺痛感。因此,希望该组合物在注射部位与体液大致等渗。如果在不存在张度剂的情况下组合物的克分子渗透压浓度足够小于组织的克分子渗透压浓度(对于血液,约300mOsmol/kg;欧洲药典对克分子渗透压浓度的要求>240mOsmol/kg),则通常应该加入张度剂以将组合物的张度提高至约300mOsmol/kg。组合物的克分子渗透压浓度取决于组合物中的其它赋形剂,包括稳定剂的身份和浓度。因此,必须评估组合物中的所有各种赋形剂的浓度以确定是否必须添加张度剂,使用标准技术容易进行这样的评估和确定。参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,David B.Troy和Paul Beringer编辑,Lippincott Williams& Wilkins,2006,第257-259页;Remington:Essentials of Pharmaceutics,Linda Ed

Felton,Pharmaceutical Press,2013,第277-300页。典型的张度剂包括甘油(丙三醇)、甘露糖醇和氯化钠。如果需要加入张度剂,甘油是优选的。在某些实施方案中,甘油的浓度为约10至约50mg/mL。在某些实施方案中,甘油的浓度为约15至约35mg/mL。在某些实施方案中,甘油的浓度选自约15、17、20、21和35mg/mL。在某些优选实施方案中,甘油的浓度为约17mg/mL。

[0050] 本发明的组合物还可以包括其它赋形剂,包括稳定剂,如表面活性剂。公开用于肠胃外药物组合物的表面活性剂的实例包括聚山梨酯,如聚山梨酯20(吐温®20)和聚山梨酯80(吐温80),聚乙二醇,如PEG 400、PEG 3000、TRITON™X-100,聚乙二醇,如聚氧乙烯(23)月桂基醚(CAS号:9002-92-0,以商品名BRIJ®销售),烷氧基化脂肪酸,如MYRJ™,聚丙二醇,嵌段共聚物,如泊洛沙姆188(CAS号9003-11-6,以商品名PLURONIC®F-68销售)和泊洛沙姆407(PLURONIC®F127),山梨糖醇酐烷基酯(例如SPAN®)、聚乙氧基化蓖麻油(例如KOLLIPHOR®、CREMOPHOR®)和海藻糖及其衍生物,如海藻糖月桂酸酯。

[0051] 在某些实施方案中,该组合物包含选自聚山梨酯20、聚山梨酯80和泊洛沙姆188的表面活性剂。最优选的是泊洛沙姆188。在某些实施方案中,表面活性剂的浓度为0.01-10mg/mL或0.1-0.5mg/mL。在表面活性剂是泊洛沙姆188的优选实施方案中,泊洛沙姆188的浓度为约0.4mg/mL。

[0052] 在某些实施方案中,本发明的组合物在制品中提供,如多次使用型小瓶、药筒、可重复使用的笔式注射器、一次性笔式装置、用于连续皮下胰岛素输注疗法的泵装置或用于连续皮下胰岛素输注疗法的泵装置中使用的另一容器封闭系统。在某些实施方案中,组合物在可重复使用的笔式注射器中提供,其可用于提供可以以特定增量调节的可变剂量的胰岛素。例如,在某些实施方案中,这样的笔式注射器包含1500个单位的胰岛素,并且可以以5个单位的增量调节,以在单次注射中递送最多400个单位的剂量。在另一些实施方案中,这样的笔式注射器包含3000个单位的胰岛素,并且可以以10个单位的增量调节,以在单次注射中递送最多800个单位的剂量。

[0053] 如本文所用,术语“约”旨在表示考虑到测量的性质或精度,指示的量或数量可接受的误差程度。例如,如本领域中所理解,误差程度可以通过为该测量提供的有效数字的位数指示,并且包括但不限于对该量或数量报告的最精确有效数字的+/-1的变化。典型的示例性误差程度在给定值或值范围的20%内,优选在10%内,更优选在5%内。除非另有说明,本文给出的数值量是近似的,这意味着在没有明确说明时可以推断出术语“约”。

实施例

[0054] 在防腐剂存在下的构象稳定性

[0055] 对用各种酚类防腐剂配制时的BIF的构象稳定性进行研究。组合物列在下表2中。

[0056]

样品	溶剂	BIF (mg/mL)	间甲酚 (mg/mL)	苯酚 (mg/mL)	苯甲醇 (mg/mL)	溶液 pH
1	水	2	–	–	–	–
2	水	2	3.15	–	–	~6.5
3	水	–	3.15	–	–	–
4	水	2	–	5	–	~6.5
5	水	–	–	5	–	–
6	水	2	–	–	9	~6.5
7	水	–	–	–	9	–

[0057] 表2.对照和样品组合物

[0058] 进行外源性荧光测量以评估BIF的构象稳定性。外源性荧光染料如8-苯胺基-1-萘磺酸盐(ANS)在水性环境中荧光极小,但在极性有机溶剂中变得高荧光。这些荧光染料已经用于检测蛋白质表面上的疏水补丁的暴露,并提供关于蛋白质折叠和解折叠过程的信息。参见例如Hawe,A.等人,Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization.PHARMACEUTICAL RESEARCH 2008,25(7),1487-1499。外源性荧光法是使用Bis-ANS荧光探针测量溶液中蛋白质的表面疏水性的基于平板的方法。使用SpectraMax i3x多模式酶标仪(Molecular Devices,San Jose,USA)测量荧光光谱。将样品置于黑色聚丙烯96孔corning半面积平板中。将含有5μM染料的约100μL样品组合物转移到各孔中并在25℃测量。激发波长(λ_{Ex})为390nm,并且以2-nm步长从420nm至600nm扫描发射光谱。

[0059] 含BIF的组合物的峰值荧光信号提供在下表3中。

[0060]

样品	峰值荧光强度(a.u.)
1	24066400
2	33857500
4	33108600
6	27998820

[0061] 表3.峰值ANS荧光强度测量.

[0062] 如表3中所示,在不存在任何防腐剂的情况下,检测到一些荧光,表明即使在其天然折叠状态下,BIF表面上也存在疏水补丁。一旦加入防腐剂,荧光强度增加。在不存在BIF的情况下,双-ANS和防腐剂没有产生任何荧光信号。因此,观察到的强度归因于BIF和防腐剂分子之间的相互作用以及所导致的蛋白质的部分解折叠,这导致更多疏水补丁的暴露。

[0063] 此外,荧光信号的强度与防腐剂的疏水性相关,其中间甲酚最疏水并产生最强的信号,其次是苯酚和苯甲醇。苯甲醇,在这三种防腐剂中疏水性最低,对BIF构象诱发的扰动最小。

[0064] 在目前可得的胰岛素产品中使用的防腐剂存在下的物理稳定性

[0065] 在pH 6.5制备含有28.6mg/mL BIF和在以多剂量形式销售的胰岛素产品中已经使用的间甲酚和/或苯酚浓度的制剂。将制剂填充到玻璃小瓶中,储存在室温下并通过目视检

查进行测试。结果提供在下表4中：

[0066]

制剂#	防腐剂	外观
1	3.15mg/mL间甲酚	沉淀
2	5mg/mL苯酚	沉淀
3	9mg/mL苯甲醇和3.5mg/mL苯酚	澄清
4	14mg/mL苯氧乙醇和3.5mg/mL苯酚	澄清

[0067] 表4.随防腐剂而变的物理外观观察

[0068] 制剂1-2各自导致BIF原料药的沉淀，表明物理不稳定性。制剂3和4保持澄清，表明BIF原料药保持物理稳定。

[0069] 随pH而变的稳定性

[0070] 在不同缓冲剂基质和pH条件下对2mg/mL BIF制剂进行生物物理可开发性/高通量分析研究。使用差示扫描量热法(DSC)测量熔融起始温度T_m($T_{m,起始}$)。$T_{m,起始}$是折叠的蛋白质开始失去其天然构象的温度，即，$T_{m,起始}$越高，蛋白质越不容易变性。结果提供在下表5中。

[0071]

BIF (mg/mL)	缓冲剂	NaCl (mM)	pH	$T_{m,起始}$(°C)
2	柠檬酸盐，10 mM	25	5.5	60.29
			6.0	63.58
			6.5	65.61
			7.0	66.32
		150	5.5	59.59
			6.0	62.78
			6.5	64.76
			7.0	65.41
	磷酸盐，10 mM	25	6.0	62.86
			6.5	64.06
			7.0	66.39
			7.5	66.90
		150	6.0	63.36
			6.5	64.42
			7.0	65.79
			7.5	66.11

[0072] 表5.随缓冲剂、离子强度和pH而变的DSC $T_{m,起始}$温度

[0073] 当溶液pH从5.5提高至7.5时，$T_{m,起始}$相应增加，无论缓冲剂类型或离子强度如何。

[0074] 还对含有和不含防腐剂的BIF在低于和高于其pI≈6.1的pH条件下的胶体稳定性进行研究。在柠檬酸盐缓冲剂中制备的BIF原料药用于pH滴定，使用1.5N柠檬酸或1N NaOH。

[0075] 目视检查组合物的乳光，其被认为是可能的液-液相分离的前兆。Raut,A.S.;Kalonia,D.S.,Pharmaceuticalperspective on opalescence and liquid-liquid phase separation in protein solutions.Molecular Pharmaceutics 2016,13(5),1431-1444。当pH接近原料药pI时，含有和不含防腐剂的组合物都呈现乳光，并在高于pI的pH下变澄清。

[0076] 这些研究表明,就构象和胶体稳定性而言,BIF青睐高于其pI的pH。

[0077] 防腐剂浓度和抗微生物功效

[0078] 设计研究,以研究包含不同浓度的苯氧乙醇和苯甲醇、含有或不含苯酚的BIF药物产品的制剂的抗微生物功效。在下表7中指定用于制备组合物的材料。

[0079]

材料	CAS#	供应商
BIF原料药	n/a	Eli Lilly
合成甘油	56-81-5	Eli Lilly
泊洛沙姆188	9003-11-6	BASF
苯氧乙醇	122-99-6	A&CAmerican Chemicals
苯甲醇	100-51-6	Avantor
液化蒸馏苯酚[a]	108-95-2	Eli Lilly

[0080] 表7.成分信息[a]“液化蒸馏苯酚”是90％苯酚和10％水。

[0081] 如下表8和9中所述制备含有BIF以及苯酚与苯氧乙醇或苯甲醇的混合物的组合物。

[0082]

#	组合物（mg/mL，或另有说明）						
	BIF	溶剂	甘油	泊洛沙姆 188	防腐剂		pH
					苯氧乙醇	苯酚	
1	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	14	–	6.5
2	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	13	–	6.5
3	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	12	–	6.5
4	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	11	–	6.5
5	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	10	–	6.5
6	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	9	–	6.5
7	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	4	3.5	6.5
8	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	4	2.5	6.5
9	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	4	2	6.5
10	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	4	1.5	6.5
11	45	5 mM 柠檬酸盐	35	0.4	4	1	6.5
12	30	水	20	0.4	4	3	7.5
13	30	水	20	0.4	4	3	7

[0083] 表8.含有苯氧乙醇和液化苯酚的BIF药物产品。

[0084]

#	组合物（mg/mL，或另有说明）						
	BIF	溶剂	甘油	泊洛沙姆188	防腐剂		pH
					苯甲醇	苯酚	
14	30	水	20	0.4	9	–	7.5
15	30	水	20	0.4	9	–	7
16	30	水	20	0.4	9	–	6.5
17	30	水	20	0.4	9	3.5	7.5
18	30	水	20	0.4	9	3	7.5
19	30	水	20	0.4	9	2.5	7.5
20	30	水	20	0.4	9	2	7.5
21	30	水	20	0.4	7	2	7.5
22	30	水	20	0.4	5	2	7.5
23	30	水	14	0.4	8	2	7
24	30	水	14	0.4	8	2	6.5

[0085] 表9.含有苯甲醇和液化苯酚的BIF药物产品

[0086] 约150mL溶液经过0.22-μm PVDF过滤器过滤,并立即转移到灭菌玻璃容器中。将样品储存在5℃直至进行抗微生物功效试验。

[0087] AET通过用各种微生物的纯培养物接种试验溶液来进行,以代表常见的潜在微生物污染物。具体地,用USP<51>和EP 5.1.3中列出的以下微生物接种溶液:巴西曲霉(Aspergillus brasiliensis)孢子、白色念珠菌(Candida albicans)、大肠杆菌(Escherichia coli)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)。将接种的溶液在受控室温(20℃至25℃)储存在冷藏培养箱中。通过接种后最初、6小时、24小时、7天、14天和28天的平板计数测定接种小瓶中的活细胞浓度。将结果与EP 5.1.3和USP<51>中给出的验收标准进行比较,并确定制剂通过或未通过各试验标准。EP“A”标准被认为最严格,其次是EP“B”标准,然后是USP标准。本研究的目的是确定满足EP B和USP标准的BIF药物产品的制剂。

[0088] 含有苯氧乙醇的组合物的结果提供在下表10中:

[0089]

样品#	苯氧乙醇 (mg/mL)	苯酚 (mg/mL)	pH	EP B	USP
1	14	–	6.5	通过	通过
2	13	–	6.5	通过	通过
3	12	–	6.5	通过	通过
4	11	–	6.5	通过	通过
5	10	–	6.5	通过	通过
6	9	–	6.5	未通过	通过
7	4	3.5	6.5	通过	通过
8	4	2.5	6.5	通过	通过
9	4	2	6.5	通过	通过
10	4	1.5	6.5	未通过	通过
11	4	1	6.5	未通过	未通过
12	4	3	7.5	通过	通过
13	4	3	7.0	通过	通过

[0090] 表10.含有苯氧乙醇和液化苯酚的BIF药物产品的AET结果。

[0091] 如表10中所示,苯氧乙醇本身可以是有效的防腐剂。在10mg/mL或更高的浓度下,满足EP B和USP标准。此外,4mg/mL苯氧乙醇和2mg/mL或更高的液化苯酚的组合也能够满足EP B和USP标准。最后,在一定pH范围内满足EP B和USP标准。

[0092] 含有苯甲醇的组合物的结果提供在下表11中。

[0093]

制剂#	苯甲醇(mg/mL)	苯酚(mg/mL)	pH	EPA	EPB	USP
14	9	-	7.5	未通过	未通过	未通过
15	9	-	7.0	未通过	未通过	未通过
16	9	-	6.5	未通过	未通过	未通过
17	9	3.5	7.5	通过	通过	通过
18	9	3	7.5	通过	通过	通过
19	9	2.5	7.5	通过	通过	通过
20	9	2	7.5	通过	通过	通过
21	7	2	7.5	未通过	通过	通过
22	5	2	7.5	未通过	未通过	通过
23	8	2	7.0	未通过	通过	通过
24	8	2	6.5	未通过	通过	通过

[0094] 表11.含有苯甲醇和液化苯酚的BIF药物产品的AET结果。

[0095] 如表11中所见,含有9mg/mL苯甲醇且不含苯酚的溶液未能满足EP B和USP标准,这可能归因于pH范围高于被认为对苯甲醇最佳的pH范围的事实。参见Meyer,B.D.等人,Antimicrobial preservative use in parenteral products:Past and

present.JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2007,96,(12),3155-3167。但是,当与苯酚组合时,BIF药物产品在该pH范围内的溶液满足USP标准,并且,除了含有最低测试浓度的苯甲醇和苯酚的制剂外,满足EP B标准。此外,令人惊讶地,含有9mg/mL苯甲醇和不同浓度的液化苯酚的制剂满足更严格的EP A标准。

[0096] 防腐剂比较-化学和物理稳定性

[0097] 设计研究以测试含有苯酚和苯氧乙醇或苯甲醇的组合的两种BIF制剂的物理和化学稳定性。所用的原料药和赋形剂列在下表12中。

[0098]

材料	CAS#	供应商
BIF原料药(120mg/mL)	n/a	Eli Lilly
一水合磷酸二氢钠	10049-21-5	Eli Lilly
七水合磷酸氢二钠	7782-85-6	Eli Lilly
合成甘油	56-81-5	Eli Lilly
泊洛沙姆188	9003-11-6	BASF
苯氧乙醇	122-99-6	A&C American Chemicals
苯甲醇	100-51-6	Avantor
液化蒸馏苯酚[a]	n/a	Eli Lilly
NaOH,1N	n/a	Fisher Scientific
纯化水	n/a	GE/Hospira

[0099] 表12.成分信息[a]:“液化蒸馏苯酚(QA205HV1E)”是90％苯酚和10％水。

[0100] 制备包含50mg/mL BIF和缓冲剂以及如下表13中所示的其它组分的溶液,所述缓冲剂包含一水合磷酸二氢钠和七水合磷酸氢二钠的组合以得到5mM磷酸盐的缓冲剂强度。

[0101]

	甘油	泊洛沙姆188	苯氧乙醇	苯甲醇	苯酚[a]	pH
1	20	0.4	4	-	3	6.4
2	20	0.4	4	-	3	6.7
3	20	0.4	4	-	3	7.0
4	15	0.4	-	8	2	6.4
5	15	0.4	-	8	2	6.7
6	15	0.4	-	8	2	7.0

[0102] 表13.含有苯酚和苯氧乙醇或苯甲醇的BIF药物产品的组合物:使用纯化水作为溶剂;[a]:研究中列出的“苯酚”是“液化蒸馏苯酚”,其是90％苯酚和10％水。[c]:在配混过程中使用1N NaOH将pH调节至目标pH。

[0103] 溶液经过0.22-μm PVDF过滤器过滤,并立即转移到灭菌玻璃容器中,然后填充到5mL玻璃小瓶中。将小瓶加盖并在5℃、25℃和30℃储存最多六个月。在各个时间点用各种稳定性指示测定对样品进行测试。

[0104] 结果提供在下表14-19中。

[0105]

温度(℃)	时间(月)	1	2	3	4	5	6
5	0	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	1	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	2	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	3	6.4	6.7	7.0	6.4	6.7	7.0
	6	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
25	0	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	1	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	2	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	3	6.4	6.7	6.9	6.4	6.6	7.0
	6	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
30	0	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	1	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	7.0
	2	6.4	6.6	6.9	6.4	6.6	6.9
	3	6.4	6.7	6.9	6.3	6.6	6.9

[0106] 表14.BIF药物产品制剂的pH

[0107]

温度 (℃)	时间 (月)	单体(%)						总聚集体(%)					
		-1	-2	-3	-4	-5	-6	-1	-2	-3	-4	-5	-6
5	0	98.5	98.2	98.0	98.5	98.2	97.8	1.5	1.7	2.0	1.5	1.7	2.2
	1	98.5	98.2	98.0	98.5	98.2	97.8	1.5	1.8	2.0	1.5	1.8	2.2
	2	98.2	98.2	97.9	98.3	98.2	97.8	1.8	1.8	2.1	1.7	1.8	2.2
	3	98.3	98.2	97.9	98.3	98.1	97.8	1.7	1.8	2.0	1.7	1.9	2.2
	6	98.2	98.0	97.9	98.2	98.0	97.6	1.8	2.0	2.1	1.8	2.0	2.4
25	0	98.5	98.2	98.0	98.5	98.2	97.8	1.5	1.7	2.0	1.5	1.7	2.2
	1	98.1	98.0	97.9	98.1	98.0	97.7	1.9	2.0	2.1	1.9	2.0	2.2
	2	98.7	97.7	97.6	97.7	97.7	97.5	2.2	2.3	2.3	2.2	2.3	2.5

[0108]

	3	98.6	97.6	97.4	97.6	97.5	97.3	2.3	2.4	2.4	2.4	2.4	2.5
	6	98.9	97.1	97.0	97.0	96.9	96.9	3.0	2.8	2.8	2.9	3.0	2.9
30	0	98.5	98.2	98.0	98.5	98.2	97.8	1.5	1.7	2.0	1.5	1.7	2.2
	1	98.8	97.8	97.6	97.9	97.7	97.5	2.2	2.2	2.3	2.1	2.2	2.4
	2	98.3	97.1	97.2	97.3	97.1	97.0	2.6	2.7	2.7	2.6	2.8	2.9
	3	98.8	96.9	97.0	96.7	96.9	96.8	3.0	2.9	2.8	3.2	3.0	3.0

[0109] 表15.通过SEC测定的BIF单体和总聚集体

批次#	1个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm
1	111	30	9	3	115	29	8	1	297	81	24	1
2	160	37	9	0	167	37	11	1	135	38	7	0
3	195	66	20	1	239	83	25	3	154	36	9	0
4	172	49	21	1	306	86	26	3	171	53	19	2
5	193	63	14	1	141	46	7	1	163	40	9	1
6	162	55	13	2	111	35	9	1	91	30	7	1

[0110]

批次#	2个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm	≥2 μm	≥5 μm	≥10 μm	≥25 μm
1	747	273	87	8	282	62	12	1	389	112	31	3
2	144	46	9	1	190	53	14	1	248	69	18	1
3	297	103	50	19	171	52	13	0	305	101	35	9
4	418	112	44	7	91	34	15	1	292	67	16	0
5	227	65	25	5	104	30	9	3	356	97	28	4
6	158	64	29	9	141	45	13	2	139	48	11	0

批次#	3个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	≥2	≥5	≥10	≥25	≥2	≥5	≥10	≥25	≥2	≥5	≥10	≥25

[0111]

	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
1	158	47	14	3	281	67	26	6	605	145	35	5
2	156	47	22	6	241	101	48	21	285	87	39	12
3	147	31	4	1	215	60	19	4	195	61	19	5
4	469	144	54	6	369	113	57	15	499	180	87	42
5	210	87	51	23	151	40	11	0	375	114	48	11
6	138	77	56	23	185	62	24	6	246	94	49	16

[0112] 表16.通过HIAC测定的BIF药物产品制剂的不溶性微粒物(sub-visible particulate matter)

[0113]

批次#	1个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	>2 μm	≥5 μm	≥5 μm & > 0.85 AR	CF	>2 μm	>5 μm	≥5 μm& > 0.85 AR	CF	>2 μm	>5 μm	≥5 μm& > 0.85 AR	CF
1	550	108	23	0.22	648	42	35	0.84	1246	113	37	0.32
2	233	52	13	0.26	242	63	18	0.29	232	52	23	0.45
3	400	118	37	0.31	340	67	48	0.73	223	47	33	0.71
4	583	225	18	0.08	440	150	52	0.34	307	93	33	0.36
5	477	147	37	0.25	178	67	35	0.53	343	60	33	0.56
6	825	152	23	0.15	88	33	8	0.25	128	40	20	0.5
批次#	2个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	>2 μm	≥5 μm	≥5 μm& > 0.85 AR	CF	>2 μm	>5 μm	≥5 μm& > 0.85 AR	CF	>2 μm	>5 μm	≥5 μm& > 0.85 AR	CF
1	475	82	20	0.24	731	158	83	0.53	1308	183	90	0.49

[0114]

2	495	137	35	0.26	305	75	28	0.38	427	113	72	0.63
3	716	252	85	0.34	758	95	52	0.54	318	82	23	0.29
4	536	200	25	0.12	963	227	88	0.39	1415	213	77	0.36
5	490	193	32	0.16	297	45	32	0.7	367	127	37	0.29
6	48	13	5	0.38	175	52	17	0.32	190	67	10	0.15
批次#	3 个月(份/mL)											
	5℃				25℃				30℃			
	> 2 μm	≥ 5 μm	≥ 5 μm& > 0.85 AR	CF	> 2 μm	> 5 μm	≥ 5 μm& > 0.85 AR	CF	> 2 μm	> 5 μm	≥ 5 μm& > 0.85 AR	CF
1	710	168	20	0.12	1328	63	35	0.55	1460	170	120	0.71
2	278	88	15	0.17	906	62	35	0.57	318	42	33	0.8
3	523	160	25	0.16	373	52	42	0.81	355	52	45	0.87
4	1511	615	48	0.08	708	97	37	0.38	750	100	45	0.45
5	402	130	10	0.08	378	65	40	0.62	357	38	25	0.65
6	117	37	5	0.14	310	48	22	0.45	330	58	40	0.69

[0115] 表17.通过MFI测定的不溶性微粒物。CF＝循环分数.

[0116]

温度	时间(月)	BIF 主峰纯度(%)						总杂质(%)					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
5℃	0	78.9	78.4	78.4	78.5	78.6	77.5	21.1	21.6	21.6	21.5	21.4	22.5
	1	79.5	79.8	79.4	79.8	79.8	79.3	20.5	20.2	20.6	20.2	20.2	20.7
	2	77.9	77.2	77.7	76.9	76.8	77.0	22.1	22.8	22.3	23.1	23.2	23.0
	3	78.8	78.7	79.5	80.1	78.7	78.6	21.2	21.3	20.5	19.9	21.3	21.4
	6	79.9	79.0	78.3	78.7	80.0	78.9	20.1	21.0	21.7	21.3	20.0	21.1
25℃	0	78.9	78.4	78.4	78.5	78.6	77.5	21.1	21.6	21.6	21.5	21.4	22.5
	1	80.2	79.7	79.1	79.9	79.6	79.4	19.8	20.3	20.9	20.1	20.4	20.6
	2	75.6	75.4	72.4	74.4	72.4	72.4	24.4	24.6	27.6	25.6	27.6	27.6

[0117]

	3	76.8	75.9	71.7	76.4	74.5	72.8	23.2	24.1	28.3	23.6	25.5	27.2
	6	74.7	70.7	67.2	73.4	71.2	67.0	25.3	29.3	32.8	26.6	28.8	33.0
30℃	0	78.9	78.4	78.4	78.5	78.6	77.5	21.1	21.6	21.6	21.5	21.4	22.5
	1	79.3	78.3	76.0	79.4	78.5	75.9	20.7	21.7	24.0	20.6	21.5	24.1
	2	75.7	72.2	69.1	75.1	72.5	68.6	24.3	27.8	30.9	24.9	27.5	31.4
	3	73.9	70.2	66.8	73.0	69.5	65.5	26.1	29.8	33.2	27.0	30.5	34.5

[0118] 表18.通过RP-HPLC测定的BIF主峰纯度和总杂质

[0119]

温度(℃)	时间(月)	BIF主峰(%)						总酸性变体(TAV)(%)						总碱性变体(TBV)(%)					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
5	0	65.1	65.1	65.0	65.1	65.2	65.1	32.3	32.3	32.4	32.3	32.2	32.3	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
	1	64.2	63.9	63.0	64.1	63.8	63.3	32.7	33.0	33.9	32.7	33.1	33.7	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0
	2	62.2	61.1	60.8	62.1	61.7	61.0	34.7	35.1	36.1	34.8	35.2	35.9	3.2	3.1	3.1	3.1	3.2	3.1
	3	62.1	61.7	59.8	61.6	61.6	60.9	34.7	35.1	36.4	34.8	34.9	35.7	4.1	3.8	3.8	3.7	3.4	3.4
	6	60.7	59.6	57.2	59.7	59.7	58.1	34.7	35.8	38.1	35.0	36.2	37.7	4.4	4.4	4.5	3.9	3.9	4.0
25	0	65.1	65.1	65.0	65.1	65.2	65.1	32.3	32.3	32.4	32.3	32.2	32.3	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
	1	61.1	59.1	55.8	61.0	59.2	55.7	35.7	37.8	41.4	35.8	37.8	41.6	3.2	3	2.8	3.2	3.0	2.8
	2	55.5	52.2	46.8	55.6	52.1	46.6	41.3	44.9	50.6	41.3	45.0	50.8	3.2	2.9	2.6	3.1	2.9	2.6
	3	52.4	47.8	40.6	53.0	47.9	40.9	43.5	48.4	55.7	43.5	48.5	56.1	4.1	3.9	3.6	3.5	3.6	3.0
	6	42.7	36.0	26.4	43.5	36.2	26.4	52.2	59.2	69.4	52.2	59.8	69.9	4.9	4.6	3.9	4.2	3.8	3.4
30	0	65.1	65.1	65.0	65.1	65.2	65.1	32.3	32.3	32.4	32.3	32.2	32.3	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
	1	56.5	52.8	47.4	56.5	53.1	46.8	40.3	44.4	50.1	40.3	44.1	50.6	3.1	2.8	2.5	3.1	2.8	2.5
	2	46.9	40.7	33.0	47.0	40.9	32.2	50.2	56.7	64.9	50.1	56.6	65.7	3.0	2.5	2.1	2.9	2.5	2.1
	3	42.2	35.8	26.5	43.2	35.7	26.2	53.7	60.5	70.2	53.3	61.2	71.0	4.1	3.7	3.2	3.5	3.1	2.8

[0120] 表19.通过AEX测定的BIF主峰、总酸性变体和总碱性变体

[0121] 如表14中所示,溶液pH在整个研究期间保持恒定。来自SEC和不溶性颗粒的结果也证实样品在各pH下物理稳定,如总聚集体(表15)和通过HIAC或MFI测定的微粒物(表16和17)所示。使用RP-HPLC和AEX评估制剂的化学稳定性。如总杂质(表18)和总酸性变体(表19)所反映,制剂表现出相当的化学稳定性,并且在这一研究中在pH 6.4最稳定。

[0122] 稳定性

[0123] 设计研究以评估3-mL药筒中的多次使用型BIF药物产品的稳定性和功能性。所有组合物用5mM磷酸盐、21mg/mL甘油和0.4mg/mL泊洛沙姆制备。组合物的其它特征提供在下表20中。

[0124]

组合物 ID	BIF (mg/mL)	苯甲醇 (mg/mL)	苯酚(mg/mL)[a]	pH	密度(g/cc)	粘度(cPs)
A	15	–	–	6.6	1.0081	1.203
B	–	9	2	6.6	1.0045	1.123
1	15	9	2	6.6	1.0089	1.244
2	15	9	2	6.3	1.0089	1.248
3	15	8.1	1.8	6.4	1.0088	1.243
4	15	9.9	2.2	6.4	1.0089	1.242
5	15	8.1	1.8	6.8	1.0089	1.238
6	15	9.9	2.2	6.8	1.0090	1.242

[0125] 表20.测试的制剂的溶液特征。[a]:研究中列出的“苯酚”是“液化蒸馏苯酚”,其是90%苯酚和10%水。

[0126] 将组合物填充到3-mL玻璃药筒中,并用硅化氯丁基柱塞和不含DNR的盘式密封件封闭。药筒在5℃、25℃、30℃或35℃储存最多6个月。如下表21中所示抽取样品以供测试。

[0127]

试验方法	性质	单位	温度	时间点				
				0	1	2	3	6
SEC	单体 总聚集体 总碎片	%	5℃	X	X	X	X	X
			25℃		X	X	X	X
			30℃		X	X	X	–
			35℃		X	X	X	–
RP-HPLC	主峰纯度 总杂质	%	5℃	X	X	X	X	X
			25℃		X	X	X	X
			30℃		X	X	X	–
			35℃		X	X	X	–
AEX	主峰纯度 总酸性变体 总碱性变体	%	5℃	X	X	X	X	X
			25℃		X	X	X	X
			30℃		X	X	X	–
			35℃		X	X	X	–
通过 HIAC	≥2 μm	份/mL	5℃	X	X	X	X	X

[0128]

测定的微粒物	≥5 μm		25℃		X	X	X	X
	≥10 μm		30℃		X	X	X	–
	≥25 μm		35℃		X	X	X	–
通过 MFI 测定的微粒物	≥2 μm	份/mL	5℃	X	X	X	X	X
	≥5 μm		25℃		X	X	X	X
	≥5 μm 且纵横比≥0.85		30℃		X	X	X	–
	循环分数		35℃		X	X	X	–

[0129] 表21.分析试验

[0130] 对于HIAC或MFI数据没有观察到与pH、储存条件或制剂组成相关的明显趋势。通过HIAC测定的颗粒计数都在≥10μm和≥25μm测量规格内。

[0131] SEC、RP-HPLC和AEX的结果提供在下表22-24中。

[0132]

温度(℃)	月	单体(%)							总聚集体(%)						
		-A	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-A	-1	-2	-3	-4	-5	-6
5	0	95.8	95.7	96.3	95.7	95.6	95.7	95.6	4.2	4.3	3.7	4.3	4.4	4.3	4.4
	1	95.9	95.8	96.1	95.8	95.7	95.8	95.8	4.1	4.2	3.9	4.2	4.3	4.2	4.2
	2	96.0	95.8	96.3	95.8	95.8	95.8	95.8	4.0	4.2	3.7	4.2	4.2	4.2	4.2
	3	95.9	95.8	95.9	95.8	95.8	92.3	95.9	4.1	4.2	4.1	4.2	4.2	7.7	4.1
	6	96.0	96.0	95.9	95.9	95.9	96.0	96.0	4.0	4.0	4.1	4.1	4.1	4.0	4.0
25	0	95.8	95.7	96.3	95.7	95.6	95.7	95.6	4.2	4.3	3.7	4.3	4.4	4.3	4.4
	1	96.3	96.2	96.1	96.1	96.1	96.3	96.3	3.7	3.8	3.9	3.9	3.9	3.7	3.7
	2	96.3	96.2	96.1	96.1	96.1	96.4	96.4	3.6	3.8	3.9	3.9	3.9	3.6	3.6
	3	96.3	96.2	96.0	96.1	96.0	96.4	96.4	3.6	3.8	4.0	3.9	3.9	3.6	3.6
	6	96.3	96.2	95.8	96.0	95.9	96.5	96.5	3.6	3.7	4.1	3.9	4.0	3.4	3.4
30	0	95.8	95.7	96.3	95.7	95.6	95.7	95.6	4.2	4.3	3.7	4.3	4.4	4.3	4.4
	1	96.4	96.3	96.1	96.2	96.1	96.4	96.4	3.6	3.7	3.8	3.8	3.8	3.6	3.5
	2	96.3	96.2	95.9	96.0	95.9	96.5	96.4	3.6	3.8	4.1	3.9	4.0	3.5	3.5
	3	96.2	96.1	95.8	95.9	95.9	96.5	96.4	3.7	3.8	4.1	4.0	4.0	3.4	3.4
35	0	95.8	95.7	96.3	95.7	95.6	95.7	95.6	4.2	4.3	3.7	4.3	4.4	4.3	4.4
	1	96.5	96.2	96.1	96.0	96.0	96.4	96.4	3.5	3.7	3.9	3.9	3.9	3.5	3.5
	2	96.5	96.1	96.0	95.9	95.9	96.6	96.4	3.4	3.8	3.9	4.0	4.0	3.3	3.5
	3	96.3	94.8	94.3	95.4	95.0	96.2	95.6	3.5	5.0	5.5	4.4	4.8	3.6	4.2

[0133] 表22.通过SEC测定的单体和总聚集体

[0134]

温度(℃)	时间(月)	主峰纯度(%)								总杂质(%)							
		-A	-B	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-A	-B	-1	-2	-3	-4	-5	-6
5	0	78.6	n/a	78.3	78.0	78.1	78.0	77.9	78.0	21.4	n/a	21.7	22.0	21.9	22.0	22.1	22.0
	1	78.3	n/a	78.0	78.1	78.0	78.2	77.9	78.3	21.7	n/a	22.0	21.9	22.0	21.8	22.1	21.7
	2	75.6	n/a	76.4	76.4	76.8	75.8	76.7	76.1	24.4	n/a	23.6	23.6	23.2	24.2	23.3	23.9
	3	77.9	n/a	78.0	78.4	77.7	78.4	77.9	77.9	22.1	n/a	22.0	21.6	22.3	21.6	22.1	22.1
	6	74.0	n/a	74.5	74.0	74.1	74.7	72.4	73.5	26.0	n/a	25.5	26.0	25.9	25.3	27.6	26.5
25	0	78.6	n/a	78.3	78.0	78.1	78.0	77.9	78.0	21.4	n/a	21.7	22.0	21.9	22.0	22.1	22.0
	1	77.7	n/a	77.0	77.6	77.2	76.9	75.9	77.1	22.3	n/a	23.0	22.4	22.8	23.1	24.1	22.9
	2	72.1	n/a	74.7	75.1	74.4	74.8	73.4	72.7	27.9	n/a	25.3	24.9	25.6	25.2	26.6	27.3
	3	75.5	n/a	74.4	75.9	76.2	76.2	72.0	71.4	24.5	n/a	25.6	24.1	23.8	23.8	28.0	28.6
	6	70.0	n/a	66.6	68.9	68.6	68.8	64.2	64.6	30.0	n/a	33.4	31.1	31.4	31.2	35.8	35.4
30	0	78.6	n/a	78.3	78.0	78.1	78.0	77.9	78.0	21.4	n/a	21.7	22.0	21.9	22.0	22.1	22.0
	1	76.5	n/a	76.3	77.0	76.6	76.6	74.6	74.8	23.5	n/a	23.7	23.0	23.4	23.4	25.4	25.2
	2	70.4	n/a	71.9	72.9	73.2	72.5	69.6	69.8	29.6	n/a	28.1	27.1	26.8	27.5	30.4	30.2
	3	71.3	n/a	68.9	71.4	71.0	71.3	67.0	66.3	28.7	n/a	31.1	28.6	29.0	28.7	33.0	33.7
35	0	78.6	n/a	78.3	78.0	78.1	78.0	77.9	78.0	21.4	n/a	21.7	22.0	21.9	22.0	22.1	22.0
	1	73.9	n/a	73.1	74.8	74.6	74.5	71.8	71.5	26.1	n/a	26.9	25.2	25.4	25.5	28.2	28.5
	2	68.7	n/a	67.5	70.2	69.5	69.4	64.8	64.4	31.3	n/a	32.5	29.8	30.5	30.6	35.2	35.6
	3	66.0	n/a	62.3	68.2	66.1	65.9	58.5	58.4	34.0	n/a	37.7	31.8	33.9	34.1	41.5	41.6

[0135] 表23.通过RP-HPLC测定的主峰纯度和总杂质

[0136]

温度(℃)	时间	主峰(%)							总酸性变体(TAV)(%)						
		-A	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-A	-1	-2	-3	-4	-5	-6
5	0	61.5	60.4	60.5	60.7	60.6	60.6	60.3	35.3	33.1	32.7	33.1	32.5	33.2	32.9
	1	61.7	60.5	60.6	60.8	60.4	60.4	60.2	35.1	32.8	32.4	32.8	32.3	33.2	32.6
	2	60.6	59.9	60.1	60.7	59.6	59.6	59.1	36.9	35.2	34.8	34.6	35.2	35.8	35.8
	3	61.2	61.6	62.4	61.6	61.8	61.1	61.7	35.7	35.8	35	35.8	35.6	36.3	35.8
	6	64.4	61.7	63	62.6	62.7	61.5	61.4	33.2	32.5	31	31.9	31.1	33	32.5
25	0	61.5	60.4	60.5	60.7	60.6	60.6	60.3	35.3	33.1	32.7	33.1	32.5	33.2	32.9
	1	58	56.8	58.3	57.6	57.5	55.3	55	38.8	36.5	34.8	35.8	35.2	38.3	37.9
	2	54.3	51.7	55.3	54.7	53.9	49.6	49.7	43.2	43.3	39.4	40.4	40.7	45.8	45.1
	3	51.5	50.4	53.5	52.5	52.9	46.4	46.3	45.3	47.2	43.9	45	44.7	51.5	51.7
	6	45.8	40.4	47.1	45.4	44.7	34.9	34.5	51.8	54.1	46.9	49.2	49.1	60.1	59.8
30	0	61.5	60.4	60.5	60.7	60.6	60.6	60.3	35.3	33.1	32.7	33.1	32.5	33.2	32.9
	1	53.9	52.3	54.7	54.1	53.7	49.3	49	42.7	41	38.2	39.3	39	44.4	44
	2	46.4	43.9	49.2	48.4	48	39.8	39.3	51.1	51.1	45.4	46.7	46.5	55.7	55.6
	3	39.7	38.5	45.1	43.2	43.1	33.5	33.1	57.1	59.6	52.5	54.6	54.8	65	65.5
35	0	61.5	60.4	60.5	60.7	60.6	60.6	60.3	35.3	33.1	32.7	33.1	32.5	33.2	32.9
	1	47.3	44.8	49	47.9	47.4	41.1	39.8	49.5	48.5	43.8	45.7	45.3	52.8	53.2
	2	35.2	32.6	39.2	36.9	36.3	27	26.5	55.9	62.6	55.4	58.4	58.3	68.7	68.7
	3	26.3	24.1	32.4	29.5	29.1	18.4	17.8	70.6	74.7	65.9	68.9	69.5	80.7	81.4
	总碱性变体(TBV)(%)														

[0137]

温度(℃)	-A	-1	-2	-3	-4	-5	-6
5	3.1	6.3	6.7	6.1	6.9	6.1	6.8
	3	6.6	6.9	6.3	7.1	6.3	7.1
	2.5	4.9	5.2	4.7	5.2	4.6	5.1
	3.1	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5
	2.5	5.8	6	5.6	6.1	5.4	6.2
25	3.1	6.3	6.7	6.1	6.9	6.1	6.8
	3	6.6	6.8	6.4	7.2	6.3	7
	2.5	5	5.3	4.9	5.4	4.6	5.3
	3.3	2.3	2.6	2.5	2.4	2.1	2
	2.5	5.5	6	5.4	6.2	5	5.8
30	3.1	6.3	6.7	6.1	6.9	6.1	6.8
	3.2	6.5	7	6.5	7.2	6.2	6.9
	2.5	5	5.4	4.9	5.6	4.5	5.2
	3.2	1.9	2.4	2.2	2.1	1.6	1.5
35	3.1	6.3	6.7	6.1	6.9	6.1	6.8
	3	6.5	7.1	6.3	7.2	6	6.9
	2.4	4.8	5.4	4.8	5.4	4.3	4.8
	3	1.1	1.7	1.5	1.4	0.9	0.9

[0138] 表24.通过AEX测定的主峰、总酸性变体和总碱性变体

[0139] 如表22中所见,所有制剂在5℃、25℃和30℃表现良好,对照和试验样品之间没有显著差异,表明苯甲醇和苯酚在所研究的浓度下没有诱导显著的蛋白质变性。在35℃观察到的聚集体生长主要由热应力驱动,因为样品之间不存在明显趋势。

[0140] 如表23中所见,在5℃,在对照和试验样品之间不存在差异。在25℃、30℃和35℃可以看到差异。在这些温度,总杂质的生长随pH升高而增加。

[0141] 类似地,如表24中所见,在5℃,TAV的生长可忽略不计。TAV生长在升高的温度(25℃、30℃和35℃)下显著,并且与pH的升高相关联。

[0142] 总之,测试的防腐剂对制剂稳定性表现出极小影响,而影响稳定性的主要因素是pH和温度。在5℃,制剂保持稳定,几乎没有聚集生长和化学降解,但随着储存温度提高(25℃、30℃和35℃),降解相应地加速。对于所有研究组(study arms),不溶性微粒物在规格内。总之,来自这一研究的结果显示了测试制剂的稳健性。

[0143] 随pH而变的化学稳定性

[0144] 设计研究,以研究含有和不含防腐剂的BIF制剂在高于其pI的pH条件下的化学稳定性。

[0145] 如下表25中所示制备的含防腐剂的组合物。

[0146]

批次#	组合物(mg/mL) [a]						pH [c]
	BIF	磷酸盐缓冲剂(mM)	甘油	泊洛沙姆 188	苯甲醇	苯酚 [b]	
1	15	5	21	0.4	9	2	6.2
2	15	5	21	0.4	9	2	6.3
3	15	5	21	0.4	9	2	6.4
4	15	5	21	0.4	9	2	6.5
5	15	5	21	0.4	9	2	6.6
6	15	5	21	0.4	9	2	6.7
7	15	5	21	0.4	9	2	6.8
8	15	5	21	0.4	9	2	6.9

[0147] 表25.BIF药物产品的组合物。[a]:使用纯化水作为溶剂;[b]:“苯酚”是“液化蒸馏苯酚”,其是90％苯酚和10％水;[c]:在样品制备过程中使用1N NaOH将pH调节至目标pH。

[0148] 如下表26中所示制备不含防腐剂的组合物。

[0149]

批次#	组合物(mg/mL) [a]		pH [b]
	BIF	磷酸盐缓冲剂(mM)	
9	2	5	6.1
10	2	5	6.3
11	2	5	6.4
12	2	5	6.5
13	2	5	6.6
14	2	5	6.7
15	2	5	6.8
16	2	5	7.0

[0150] 表26.BIF药物产品的组合物。[a]:使用纯化水作为溶剂;[b]:在样品制备过程中使用1N NaOH将pH调节至目标pH。

[0151] 所有溶液经过0.22-μm PVDF过滤器过滤,并立即转移到灭菌玻璃容器中。在层流罩中,将溶液填充到玻璃小瓶中。将小瓶加盖并在5℃和30℃储存最多三个月。在适当的时间,取出样品并进行测试。

[0152] 通过阴离子交换色谱法(AEX)评估化学稳定性。结果提供在下表27中。

[0153]

温度(℃)	时间(月)	总酸性变体(TAV) (%)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
5	0	37.3	37.1	37.1	37.4	37.2	36.2	36.7	36
	1	37.6	37.6	37.7	37.8	37.8	37.9	38.1	38.2
	2	37.4	37.6	37.7	37.5	37.7	37.6	38	38.4
	3	37.6	37.6	37.4	37.6	38	38.2	38	38.4
30	0	37.3	37.1	37.1	37.4	37.2	36.2	36	36
	1	40.7	41.2	41.9	42.3	43.3	44.2	45.1	45.9
	2	44.1	45.1	46.4	47.6	49	51.1	53.8	54.9
	3	48.2	49.5	51.1	53.4	55.6	58.1	60.7	63.3

[0154] 表27.如通过AEX测定的含防腐剂的制剂中的TAV

[0155]

温度(℃)	时间(月)	总酸性变体(TAV) (%)							
		9	10	11	12	13	14	15	16
5	0	34.8	35.3	34.9	35.2	35.3	35.2	35.1	35.4
	1	34.3	34.3	35	34.4	34.6	34.8	35.2	35.1
	2	35.4	35.5	35.3	35.9	35.7	35.7	36.2	36.2
	3	34.6	34.8	34.8	34.5	35.1	35.4	35.7	36
30	0	34.8	35.3	34.9	35.2	35.3	35.2	35.1	35.4
	1	37.4	38.4	38.8	37.6	41	42.6	43.5	46.1
	2	73.4	43.9	45.8	46.9	48.7	51.1	52.6	55.9
	3	45.5	49.1	51.4	51.7	53.8	58.1	60.4	64.3

[0156] 表28.如通过AEX测定的未防腐制剂中的TAV

[0157] 如表27-28中所见,在5℃,总酸性变体(TAV)的生长可忽略不计,而在30℃,生长以pH敏感的方式发生。这些组合物中的防腐剂的存在不会实质影响稳定性。

[0158] 保质期和使用中(in-use)

[0159] TAV被认为是BIF的最相关的化学稳定性指示测定,因此上表27-28中所述的结果用于保质期和使用中(in-use)估计。以下等式用于析出时间点(t)处的储存温度(T)的加速效应,以将时间尺度收缩到单个任意参考温度(T_{Ref})。

[0160] $$e^{\frac{-E_a}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{T_{Ref}}\right)} \cdot t = t_{Ref}$$

[0161] 使用21.5kcal/mol的表观活化能(E_a)值,参考温度为5℃。Raut,A.S.;Kalonia,D.S.,Pharmaceuticalperspective on opalescence and liquid-liquid phase separation in protein solutions.Molecular Pharmaceutics 2016,13(5),1431-1444。通过将分析观察结果对照时间作图而实证评估E_a为约21.5kcal/mol的假设的有效性,或用E_a=21.5kcal/mol缩放至5℃。如果真实E_a不同于假设值,会出现在其中一个温度下一致的趋势,即假设的E_a没有充分考虑温度影响并且真实E_a不同于当前估算值的证据。当前的稳定性结果没有表明E_a为21.5kcal/mol的假设是无效的。因此,上表27-28中的数据充当确定在

冷藏条件下的长期稳定性的工具。在表29中给出在使用条件下各产品保质期的在5℃的等效月数。

[0162]

产品保质期和使用条件	在5℃的等效月数
在5℃24个月	24个月
在5℃24个月+在30℃2周	35.4个月
在5℃24个月+在30℃4周	46.8个月

[0163] 表29.保质期和使用条件与在5℃的时间之间的关系

[0164] 表27-28中的数据显示,在此类实施方案中优选的药物产品pH为约6.5或更低。

[0165] 临床研究

[0166] 设计健康参与者中的临床研究以比较与含有防腐剂和张度剂的基质相关的急性注射部位疼痛强度。各参与者在第1至5期的第1天接受一次0.6-mL SC注射。未施用活性药物。5种溶液制剂如下:

[0167]

制剂	组成		
	缓冲剂	张度剂	防腐剂
1	未缓冲(水)	甘油	苯氧乙醇(0.4% w/v)+ 苯酚(0.3% w/v)
2	5 mM 柠檬酸盐	甘油	苯氧乙醇(0.4% w/v)+ 苯酚(0.3% w/v)
3	未缓冲(水)	甘油	苯甲醇(0.8% w/v)+ 苯酚(0.2% w/v)
4	5 mM 柠檬酸盐	甘油	苯甲醇(0.8% w/v)+ 苯酚(0.2% w/v)
5	未缓冲(水)	甘油	无

[0168] 表30.用于测试注射部位疼痛的制剂.

[0169] 使用100-mm视觉模拟量表(VAS)评估和量化注射部位疼痛,其中0表示“无疼痛”,100表示“最严重的可想象疼痛”。按治疗和时间点列举和总结数据。

[0170] 使用混合效应模型由各制剂在注射后的各时间点的VAS疼痛评分分析连续注射部位疼痛。该模型是按照注射后的测量时间点,并且包括治疗(溶液制剂)、队列内的注射顺序(该周期的第一、第二、第三、第四或第五次注射)、作为固定因子的队列(参与者随机分配至的注射序列组)和作为随机效应的参与者。Kenward-Roger方法用于估计分母自由度。最小二乘(LS)平均值的III型检验用于统计比较;还报告了差异的95%置信区间(CI)。如果95% CI不包括零,LS平均值的差异被认为是统计学显著的。

[0171] 列出所有不良事件(AE)。总结了治疗后出现的AE。列出任何严重不良事件(SAE)。

[0172] 在预定时间点和对自发报告的ISR收集注射部位反应(ISR)问卷。在频率表中按治疗列举和总结ISR数据。

[0173] 所有溶液制剂,包括参比制剂,耐受性良好,大多数参与者报告注射部位疼痛的严重程度低(小于10mm)。对于所有制剂,在所有时间点(注射后0至60分钟),76%至100%的参与者报告VAS疼痛评分小于10mm并且平均VAS疼痛评分为0.2至7.1mm。

[0174] 通过SC注射施用的所有溶液制剂,包括参比制剂,对参与者而言耐受良好。没有死亡或SAE。一名参与者由于如研究人员所判断的与研究干预无关的AE而中断。AE的频率总体上较低。所有治疗后出现的不良事件(TEAE)的严重程度均为轻度或中度,并且如研究人员

所判断,TEAE无一与研究干预相关。与参比制剂相比,在注射试验制剂后,在10至60分钟的预定时间点报告ISR的参与者更少,并且自发报告的ISR更少。轻度疼痛是在预定时间点和自发报告的事件中最常报告的ISR参数。

[0175] 序列

[0176] SEQ ID NO:1

[0177]

```
          10        20        30        40        50        60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
          70        80        90        100       110       120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
          130       140       150       160       170       180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
          190       200       210       220       230       240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
          250       260       270       280       290
ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```