



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113365606 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 201980089205.2

(22) 申请日 2019.11.29

(30) 优先权数据

62/773,651 2018.11.30 US

62/821,382 2019.03.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/083022 2019.11.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/109526 EN 2020.06.04

(71) 申请人 伊尔根制药有限公司

地址 爱尔兰沃特福德

(72) 发明人 布鲁斯·皮特·康诺普

多萝西·梅利莎·林恩·斯潘塞

亚加特拉伊·辛哈

唐纳·埃德蒙·克尔科

帕维尔·多米尼克·布切克

凯尔·米歇尔·哈尔布莱布

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 李杰

(51) Int. Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61J 1/05 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

权利要求书10页 说明书102页

序列表21页 附图8页

(54) 发明名称

胃泌酸调节素肽类似物制剂

(57) 摘要

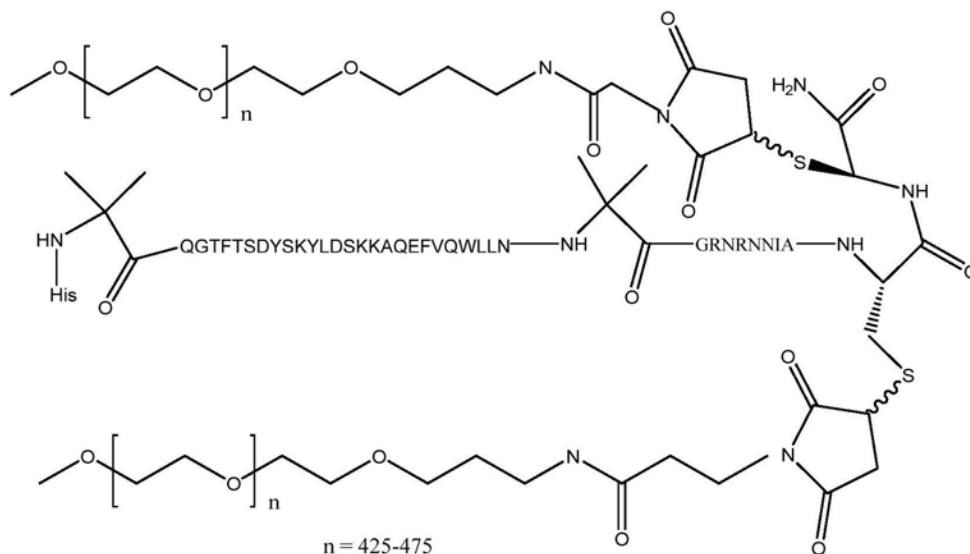
本发明涉及GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如胃泌酸调节素肽类似物)、其药学上可接受的盐、包含其的制剂、及其用于治疗糖尿病和/或肥胖症或相关疾病或病症的用途。

1. 一种稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂,其包含药学上有效量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐和水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH值,

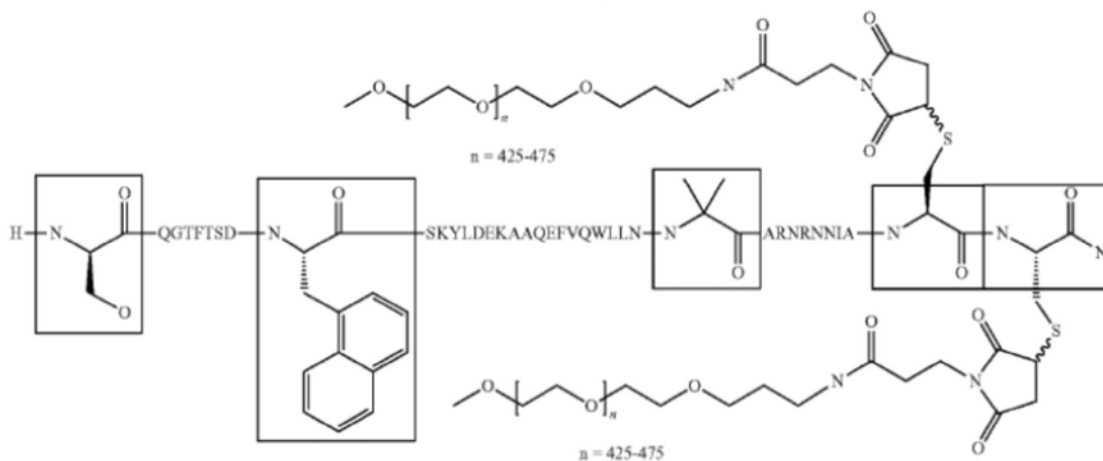
其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是天然胃泌酸调节素、胃泌酸调节素肽类似物或其活性片段。

2. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

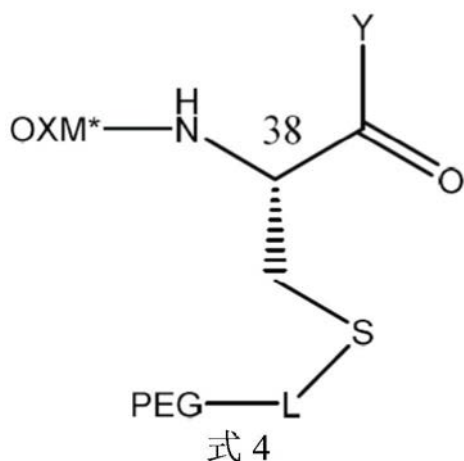
3. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示,



(式 3),



(式 5), 或



其中

L是连接基团，

OXM*是天然OXM、OXM肽类似物、或其活性片段，

PEG是支链或直链聚乙二醇聚合物，

Y是-OH、OR、NR₂或氨基酸，其中所述氨基酸任选地被L-PEG取代，并且其中所述氨基酸任选地被酰胺化，并且

R是H或C₁-C₄烷基基团。

4. 根据权利要求1所述的制剂，其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列：

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:1)

其中

Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG，或不存在，并且

Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG，或不存在，

其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

5. 根据权利要求4所述的制剂，其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉不存在。

6. 根据权利要求4所述的制剂，其中Xaa₃₈是Cys并且Xaa₃₉是Cys-PEG。

7. 根据权利要求4所述的制剂，其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys。

8. 根据权利要求4所述的制剂，其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys-PEG。

9. 根据权利要求4所述的制剂，其中Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在并且Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化。

10. 根据权利要求9所述的制剂，Ala₃₇的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

11. 根据权利要求1所述的制剂，其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列：

His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:6)

其中

Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

12. 根据权利要求11所述的制剂,其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉不存在。

13. 根据权利要求11所述的制剂,其中Xaa₃₈是Cys并且Xaa₃₉是Cys-PEG。

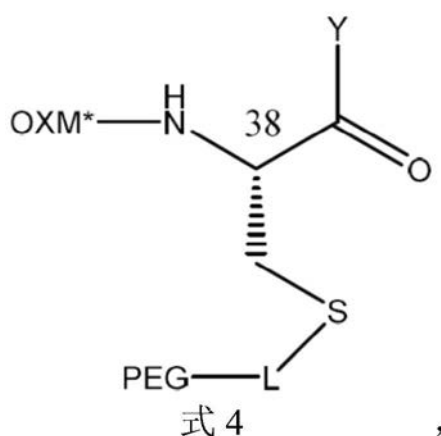
14. 根据权利要求11所述的制剂,其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys。

15. 根据权利要求11所述的制剂,其中Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys-PEG。

16. 根据权利要求11所述的制剂,其中Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在并且Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化。

17. 根据权利要求16所述的制剂,Ala₃₇的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

18. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是由式4的结构表示的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,



其中

L是连接基团,

OXM*是天然OXM、OXM肽类似物、或其活性片段,

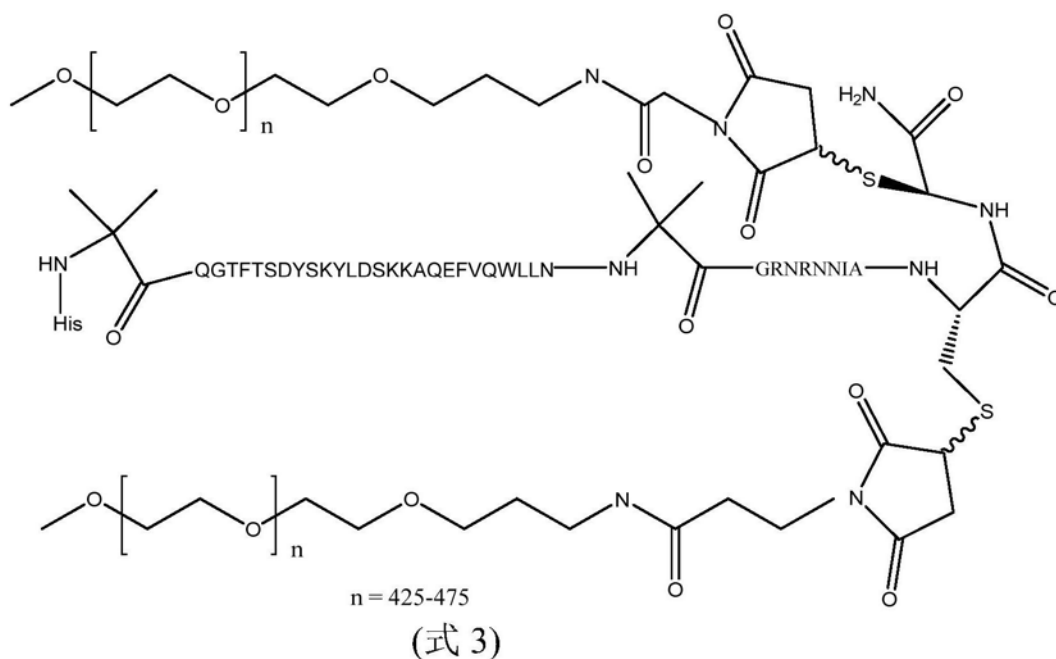
PEG是支链或直链聚乙二醇聚合物,

Y是-OH、OR、NR₂或氨基酸,其中所述氨基酸任选地被L-PEG取代,并且其中所述氨基酸任选地被酰胺化,并且

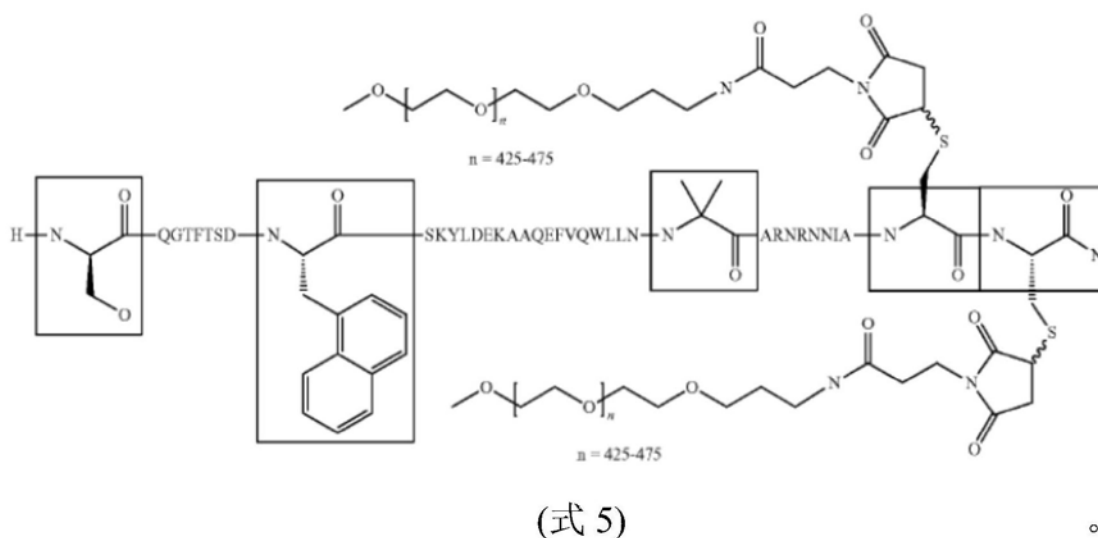
R是H或C₁-C₄烷基基团。

19. 权利要求18所述的制剂,其中Y是被L-PEG基团取代的半胱氨酸,并且其中所述连接基团L附接至所述半胱氨酸上的S原子。

20. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是由式3的结构表示的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,



21. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是由式5的结构表示的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,



22. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂含有通过RP-HPLC测量的约10.0%或更少的总杂质和小于约5%的任何单一单独杂质。

23. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂含有通过尺寸排阻色谱法测量的约10.0%或更少的总杂质和小于约5%的任何单一单独杂质。

24. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂基本上不含去稳定物质。

25. 根据权利要求24所述的制剂,其中所述去稳定物质是半胱氨酸。

26. 根据权利要求25所述的制剂,其中半胱氨酸的量小于25mM。

27. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂含有小于100mM的氯化钠。

28. 根据权利要求1所述的制剂,其还包含张力剂。

29. 根据权利要求28所述的制剂,其中所述张力剂包括山梨糖醇。

30. 根据权利要求1所述的制剂,其还包含基于所述液体制剂的总体积计约0.001% (w/

v) 至约1% (w/v)的一种或多种防腐剂。

31. 根据权利要求30所述的制剂,其中所述防腐剂是间甲酚、苯酚和/或苯甲醇。

32. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐以约5mg/mL至约150mg/mL或约20mg/mL至约150mg/mL的浓度范围存在于合适的小瓶中。

33. 根据权利要求32所述的制剂,其中所述浓度为约70mg/mL。

34. 根据权利要求32所述的制剂,其中所述合适的小瓶是一次性使用的小瓶。

35. 根据权利要求32所述的制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是乙酸盐的形式。

36. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述缓冲溶液选自乙酸盐缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液和组氨酸缓冲溶液。

37. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

38. 根据权利要求1所述的制剂,其中pH值为约4.5至约6.5。

39. 根据权利要求1所述的制剂,其中pH值为约4.5。

40. 根据权利要求1所述的制剂,其还包含一种或多种另外的药学上可接受的赋形剂。

41. 根据权利要求40所述的制剂,其中所述另外的赋形剂是甲硫氨酸、甲硫氨酸的衍生物、精氨酸和/或精氨酸的衍生物。

42. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂具有不超过500mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

43. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂具有约10至约60cP的粘度。

44. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂具有小于10N的松脱力和小于30N的滑动力的可注射性。

45. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂不引起或引起很少的注射部位反应。

46. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂至少稳定5次冻/融循环。

47. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂在30°C/65%RH下至少稳定48小时,并且在5°C下稳定12个月。

48. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含在pH值为约4.5的10mM乙酸盐缓冲溶液中的70mg/mL的式3。

49. 一种药物组合物,其包含GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,以及选自甲硫氨酸、山梨糖醇和缓冲溶液的药学上可接受的赋形剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示。

50. 一种治疗患有2型糖尿病的患者方法,其包括向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

52. 根据权利要求50所述的方法,其中所述液体剂型每周施用一次。

53. 根据权利要求50所述的方法,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

54. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

55. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是乙酸盐的形式。

56. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液, 并且所述溶液还包含甲硫氨酸。

57. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述液体剂型基本上不含氯化钠。

58. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述液体剂型基本上不含半胱氨酸。

59. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂以约5至约150mg/mL的浓度范围在合适的容器或递送装置中。

60. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述液体剂型的pH在4.5和6.5之间。

61. 根据权利要求50所述的方法, 其中施用给所述患者的剂量为约20至约150mg/周。

62. 根据权利要求50所述的方法, 其中施用给所述患者的剂量为约0.5至约1.5mg/kg/周。

63. 一种降低有需要的患者的HbA1c的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

65. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述液体剂型每周施用一次。

66. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由所述式3的化合物表示。

67. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂以约70mg/mL的浓度在合适的容器或递送装置中。

68. 根据权利要求63-67中任一项所述的方法, 其中所述GLP-2和/或胰高血糖素受体激动剂被施用30周。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述患者的HbA1c水平与基线相比降低约1.30%。

70. 一种降低有需要的患者的体重的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

72. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述液体剂型每周施用一次。

73. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

74. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂以约70mg/mL的浓度在合适的容器或递送装置中。

75. 根据权利要求70-74中任一项所述的方法, 其中所述GLP-2和/或胰高血糖素受体激动剂被施用30周。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述患者的体重与基线相比减少约4.4kg。

77. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述患者的体重与基线相比减少至少5%。
78. 一种治疗2型糖尿病患者的方法, 其包括通过每周一次皮下施用向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的有效周剂量范围为约10至约150mg/周。
79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。
80. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述稳定制剂从预填充注射器、药筒、注射笔、自动注射器或小瓶施用。
81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述预填充注射器、筒、自动注射器、注射笔或小瓶含有具有70mg/mL的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的缓冲溶液。
82. 一种预填充注射器, 其具有权利要求1-48中任一项所述的稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。
83. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。
84. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述制剂具有约4.0至约7.0的pH值。
85. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述制剂包含乙酸盐缓冲溶液。
86. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述制剂基本上不含氯化钠。
87. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述制剂基本上不含半胱氨酸。
88. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述制剂包含甲硫氨酸的药学上可接受的赋形剂。
89. 根据权利要求82所述的预填充注射器, 其中所述药学上可接受的赋形剂为甲硫氨酸。
90. 一种多剂量容器, 其包含权利要求1-48中任一项所述的稳定液体制剂。
91. 一种GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的药学上可接受的盐, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段, 或由式3、4或5的化合物表示。
92. 根据权利要求91所述的药学上可接受的盐, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。
93. 根据权利要求91所述的药学上可接受的盐, 其中所述盐为盐酸盐、氢溴酸盐、抗坏血酸盐、马来酸盐或乙酸盐。
94. 根据权利要求91所述的药学上可接受的盐, 其中所述盐是乙酸盐。
95. 一种GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的乙酸盐, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段, 或由式3、4或5的化合物表示。
96. 根据权利要求95所述的乙酸盐, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。
97. 一种GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的盐酸盐, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段, 或由式3、4或5的化合物表示。
98. 一种GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂, 其包含权利要求90所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的乙酸盐和水性缓冲溶液以及一种或多种额外的药学上可接受

的赋形剂,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH值。

99.一种制剂,其包含在10mM乙酸盐缓冲溶液中的70mg/mL的式3的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,其中所述制剂具有约4.5的pH值。

100.一种制备聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的乙酸盐的方法,其包括

(a) 将胃泌酸调节素 (OXM) 肽类似物溶解在缓冲溶液中以形成OXM肽类似物溶液,其中所述缓冲溶液具有约6.6至约7.0的pH值;

(b) 将所述OXM肽类似物溶液加入搅拌的PEG溶液中以产生含有粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物的反应混合物,其中通过将PEG溶解在与溶解步骤(a)的所述OXM肽类似物的缓冲溶液相同的缓冲溶液中来形成PEG溶液;

(c) 将反应混合物的pH用乙酸调节至约3.95至约4.05;以及

(d) 在HPLC柱上用一定梯度的乙腈和稀乙酸水溶液纯化所述粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物,随后浓缩并冻干以提供所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的乙酸盐。

101. 根据权利要求100所述的方法,其中步骤(d)的所述HPLC柱是反相HPLC柱。

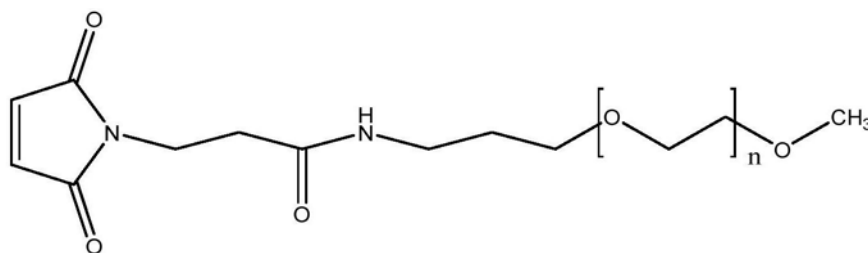
102. 根据权利要求100所述的方法,其还包括在步骤(d)之前在阳离子交换HPLC柱上纯化所述粗制聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物的步骤。

103. 根据权利要求100所述的方法,其中所述缓冲溶液是乙腈和乙酸铵缓冲液的溶液。

104. 根据权利要求100所述的方法,其中PEG含有接头。

105. 根据权利要求104所述的方法,其中所述接头是马来酰亚胺接头。

106. 根据权利要求105所述的方法,其中PEG是式1的化合物



(式 1)

107. 根据权利要求100所述的方法,其中PEG具有约20kDa的分子量。

108. 根据权利要求100所述的方法,其中所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物是式3、4或5的化合物。

109. 根据权利要求100所述的方法,其中所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物是式3的化合物。

110. 一种治疗患有疾病或病症的患者的方法,所述疾病或病症选自肥胖症、代谢疾病、1型或2型糖尿病和选自不适当的葡萄糖代谢、葡萄糖耐量减低和空腹葡萄糖减低的任何其他病症,所述方法包括通过皮下施用向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的有效剂量范围为约10至约150mg/周。

111. 根据权利要求110所述的方法,其中所述制剂每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

112. 根据权利要求110所述的方法, 其中所述制剂每周施用一次。

113. 根据权利要求110所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

114. 一种在有需要的患者中治疗、压制、抑制2型糖尿病、肥胖症或肥胖相关的代谢障碍、体重减轻、葡萄糖耐受不良、高胰岛素血症、胰岛素抗性、高血压、脂肪肝疾病、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、心血管疾病、动脉粥样硬化、脑血管病症、阿尔茨海默氏病和/或中风或降低其发病率的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的根据权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。

115. 权利要求114所述的方法, 其中所述脂肪肝疾病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

116. 根据权利要求114所述的方法, 其中所述制剂每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

117. 根据权利要求114所述的方法, 其中所述制剂每周施用一次。

118. 根据权利要求114所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

119. 根据权利要求50、63、70、78、110和114中任一项所述的方法, 其中所述方法包括采用第一每周一次(QW)剂量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的第一施用周期, 接着是采用第二每周一次(QW)剂量的第二施用周期, 然后施用所述药学上有效量的QW稳定液体剂型制剂, 其中第二QW剂量大于第一QW剂量。

120. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第一QW剂量是约1-20mg QW。

121. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第二QW剂量是约10-50mg QW。

122. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第一施用周期为2周至6周、或2周至5周、或3周至5周。

123. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第一施用周期是4周。

124. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第二施用周期是2周至6周、或2周至5周、或3周至5周。

125. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述第二施用周期是4周。

126. 根据权利要求119-125中任一项所述的方法, 还包括采用每周一次(QW)剂量的第三施用周期。

127. 根据权利要求126所述的方法, 其中第三QW剂量是约50-80mg QW。

128. 根据权利要求126所述的方法, 其中所述第三QW剂量是约70mg QW。

129. 根据权利要求126所述的方法, 其中所述第三施用周期是2周至6周、或2周至5周、或3周至5周。

130. 根据权利要求126所述的方法, 其中所述第三施用周期是4周。

131. 一种降低有需要的患者的血液甘油三酯的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的权利要求1-48中任一项所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。

132. 根据权利要求131所述的方法, 其中所述液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。

133. 根据权利要求131所述的方法, 其中所述液体剂型每周施用一次。

134. 根据权利要求131所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由所

述式3的化合物表示。

135. 根据权利要求131所述的方法, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂以约70mg/mL的浓度在合适的容器或递送装置中。

136. 根据权利要求131-135中任一项所述的方法, 其中所述GLP-2和/或胰高血糖素受体激动剂被施用30周。

137. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述患者的血液甘油三酯与基线相比降低约31.2mg/dL。

胃泌酸调节素肽类似物制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如胃泌酸调节素肽类似物)、其药学上可接受的盐、包含其的制剂、及其用于治疗糖尿病、肥胖症和相关疾病或病症的用途。

背景技术

[0002] 2型糖尿病(T2DM)是进行性疾病,其特征在于胰岛素抗性和 β -细胞功能的损失以及 β -细胞胰岛素分泌的进行性损失。肥胖症是T2DM中胰岛素抗性发展的主要原因。肥胖和胰岛素抗性之间的相关性已在成人和儿童中报道。

[0003] 胃泌酸调节素(OXM)是37个氨基酸的肽激素,其与另外的激素[胰高血糖素样肽1(GLP-1)]一起从小肠的L细胞释放。OXM由于饱腹感增强和能量消耗增加而减轻肥胖患者的体重(Wynne等,Curr Opin Investig Drugs2010;11:1151-1157)。OXM的饱腹感诱导作用被认为是通过GLP-1R拮抗剂毒蜥外泌肽(exendin)的活化介导的(Baggio等,Gastroenterol 2004;127:546-558), (Sowden等Am J Physiol.Reg,Integr comp.Physiol.2007;292:R962-R970)。OXM的其他作用,例如 β -细胞功能的进一步改善和增加的能量消耗归因于胰高血糖素受体途径(Kosinski等,Obesity 2012;20:1566-1571)。

[0004] 胃泌酸调节素(OXM)改善小鼠的葡萄糖耐量并刺激小鼠的胰岛素分泌(Maida等,Endocrinol 2008;149:5670-5678)。该胃泌酸调节素肽类似物,例如聚乙二醇化衍生物,被发现可用于治疗2型糖尿病和相关病症。这些聚乙二醇化衍生物是长效类似物,其结合并活化胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)和胰高血糖素受体(GcgR)两者。出于质量/安全/递送目的和出于保存期限目的,需要此类衍生物在液体制剂中具有稳定的化学和物理性质。

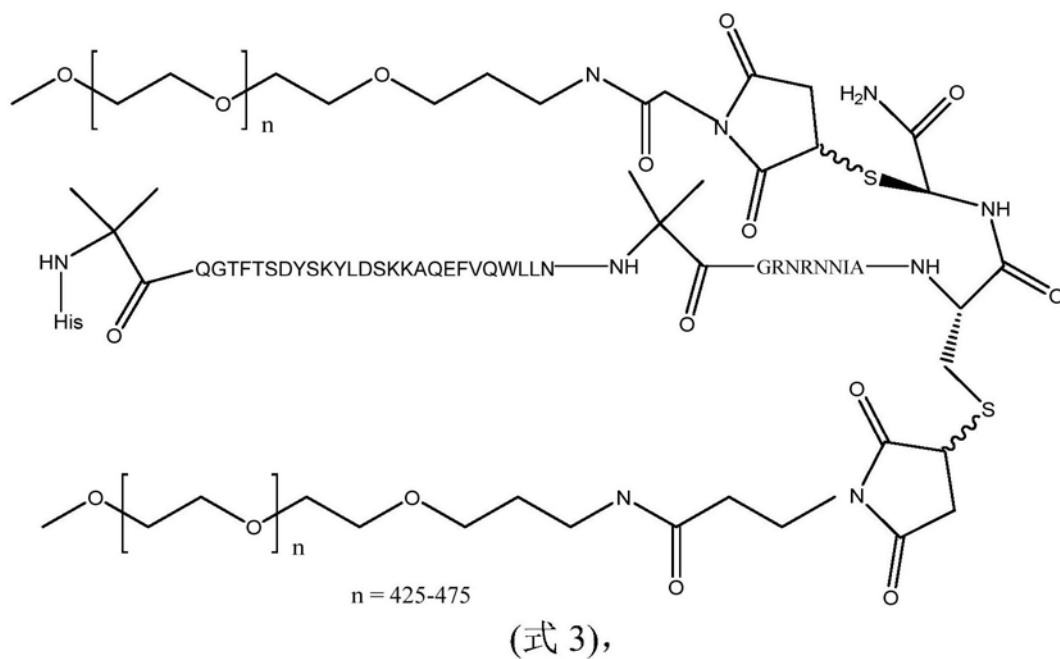
发明内容

[0005] 本发明提供了稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂,其包含药学上有效量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,以及水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH值,并且其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是天然胃泌酸调节素肽、胃泌酸调节素肽类似物或其活性片段。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0006] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3、式4或式5的结构表示,

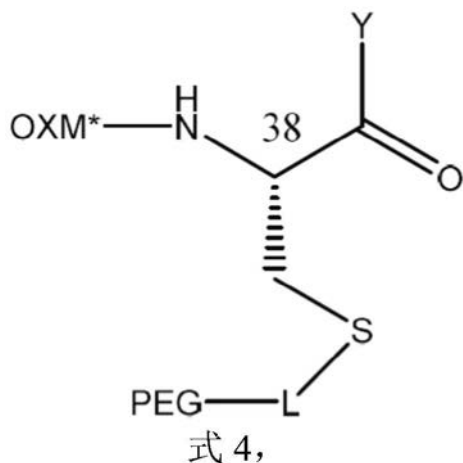
[0007] 其中式3由以下结构表示

[0008]



[0009] 其中式4由以下结构表示

[0010]



[0011] 其中

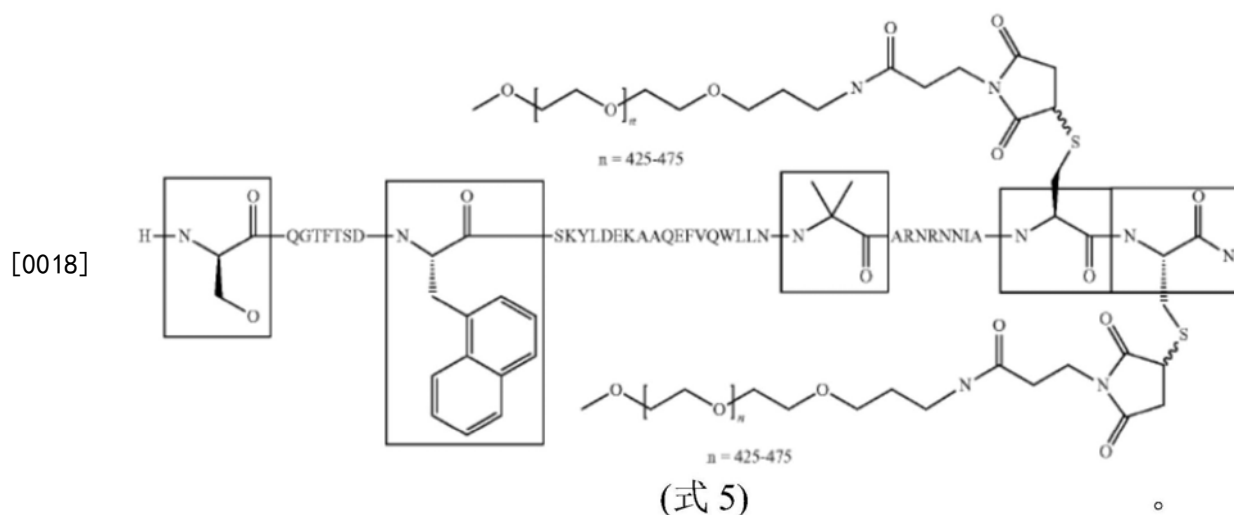
[0012] L是连接基团,

[0013] OXM*是天然OXM、OXM肽类似物、或其活性片段,

[0014] PEG是支链或直链聚乙二醇聚合物,

[0015] Y是-OH、OR、NR₂或氨基酸,其中所述氨基酸任选地被L-PEG取代,并且其中所述氨基酸任选地被酰胺化,并且[0016] R是H或C₁-C₄烷基基团,

[0017] 并且其中式5由以下结构表示



[0019] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0020] His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:1)

[0021] 其中

[0022] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0023] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0024] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

[0025] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0026] His- (D-Ser) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- (1-Nal) -Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:6)

[0027] 其中

[0028] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0029] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0030] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

[0031] 本发明还提供了稳定的聚乙二醇化胃泌酸调节素液体制剂,其包含聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,或其药学上可接受的盐,以及水性缓冲溶液,其中所述制剂基本上不含去稳定物质和具有约3.5至约8.0的pH值,其中所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、式4或式5的结构表示。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,以及选自甲硫氨酸、山梨糖醇和缓冲溶液的药学上可接受的赋形剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示。在一个实施方案中,本发明提供了制剂,其包含在pH值为约4.5的10mM乙酸盐缓冲液中的70mg/mL的式3的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了治疗患有2型糖尿病、肥胖症或任何相关医学病症、疾病或病况的患者的方法,所述疾病或病况由或能够由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂

治疗,所述方法包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。所述疾病和病症包括但不限于患有葡萄糖相关代谢疾病或病症或肥胖相关疾病和病症的患者。疾病诸如脂肪肝疾病或心血管疾病和病症可以通过下文预期的治疗方案减轻或积极影响。

[0034] 在下文中由或能够由本发明的制剂治疗的患者接受包含活性成分的稳定的液体剂型。这样的液体剂型可以以任何合适的给药间隔施用。在优选的方面,每周一次用任何合适剂量或剂量范围的稳定的聚乙二醇化胃泌酸调节素制剂治疗此类患者。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了降低有需要的患者的HbA1c的方法,其包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂配制物的液体剂型。

[0036] 在一个方面,本发明提供了治疗2型糖尿病患者的方法,其包括通过每周一次皮下施用向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的有效周剂量范围为约10至约150mg/周。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了预填充注射器,其具有本发明的稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。

[0038] 在另一方面,本发明提供了多剂量容器,其包含本发明的稳定液体制剂。

[0039] 在另一方面,本发明提供了治疗患有选自肥胖症、代谢疾病、1型或2型糖尿病的疾病或病症和选自不适当的葡萄糖代谢、葡萄糖耐量减低和空腹葡萄糖减低的任何其他病症的患者的方法,其包括通过皮下施用向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的有效周剂量范围为约10至约150mg/周。

[0040] 本发明还提供了在有需要的患者中治疗、压制、抑制II型糖尿病、肥胖症或肥胖相关的代谢障碍、体重减轻、葡萄糖耐受不良、高胰岛素血症、胰岛素抗性、高血压、脂肪肝疾病、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、心血管疾病、动脉粥样硬化、脑血管病症、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)和/或中风或降低其发病率的方法,其包括向所述患者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。

[0041] 在另一个方面,本发明提供了GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的药学上可接受的盐,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示。

[0042] 在一个方面,本发明提供了GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的乙酸盐,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

[0043] 在一个方面,本发明提供了GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的盐酸盐,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、4或5的化合物表示。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

[0044] 在另一个方面,本发明提供了GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其包含如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的乙酸盐以及水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH范围,以及一种或多种另外的药学上可接受的赋形剂。

[0045] 在另一个方面,本发明提供了施用本发明的制剂的方法,其中所述方法包括采用第一每周一次(QW)剂量的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的第一施用周期,接着是采用第二每周一次(QW)剂量的第二施用周期,然后施用药学上有效量的QW稳定液体剂型制剂,其中第二QW剂量大于第一QW剂量。

[0046] 本发明还提供了制备聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的乙酸盐的方法,其包括

[0047] (a) 将胃泌酸调节素(OXM)肽类似物溶解在缓冲溶液中以形成OXM肽类似物溶液,其中所述缓冲溶液具有约6.6至约7.0的pH值;

[0048] (b) 将所述OXM肽类似物溶液加入搅拌的PEG溶液中以产生含有粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物的反应混合物,其中通过将PEG溶解在与溶解步骤(a)的所述OXM肽类似物的缓冲溶液相同的缓冲溶液中来形成PEG溶液;

[0049] (c) 将反应混合物的pH用乙酸调节至约3.95至约4.05;以及

[0050] (d) 在HPLC柱上用一定梯度的乙腈和稀乙酸水溶液纯化所述粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物,随后浓缩并冻干以提供所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的乙酸盐。

附图说明

[0051] 在说明书的结论部分特别指出和明确要求保护被视为本发明的主题。然而,当结合附图阅读时,参考以下详述,就组织和操作方法而言,可以最好地理解本发明,以及它们的目的、特征和优点,其中:

[0052] 图1描绘了制备式3的乙酸盐的流程图。

[0053] 图2描绘了通过LC/MS分析获得的式3的去卷积质谱,其中通过DEMA进行柱后中和。

[0054] 图3描绘了在肽中间体的CID-MS/MS谱中检测到的序列离子($[M+5H]^{5+}_{m/z\ 902.0}$)。

[0055] 图4描绘了在肽中间体的ECD-MS/MS谱中检测到的序列离子($[M+5H]^{5+}_{m/z\ 902.0}$)。

[0056] 图5描绘了式3的热解消化物的LC/MS分析的LC-UV色谱图。

[0057] 图6描绘了F38样品(用25mM半胱氨酸配制)在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4周和在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存数周获得的SEC-HPLC结果。

[0058] 图7描绘了F38样品在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4周和在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存数周的获得的RP-HPLC结果。

[0059] 图8描绘了在不同的甲硫氨酸浓度和pH下后主峰杂质(%)的3D表面图;其中有0mM精氨酸和0mM山梨糖醇。

[0060] 图9描绘了在不同的甲硫氨酸浓度和pH下后主峰杂质(%)的3D表面图;其中有125mM精氨酸和0mM山梨糖醇。

[0061] 图10描绘了在不同的甲硫氨酸浓度和pH下总聚集体杂质(%)的3D表面图;其中有0mM精氨酸和0mM山梨糖醇。

[0062] 图11描绘了在不同的甲硫氨酸浓度和pH下总聚集体杂质(%)的3D表面图;其中有125mM精氨酸和0mM山梨糖醇。

[0063] 将会理解的是,为了图示的简单和清晰起见,图中所示的要素未必按比例绘制。例如,为了清楚起见,一些要素的尺寸可以相对于其他要素而放大。此外,在认为适当的情况下,可以在附图中重复使用参考编号,以表示对应的或类似的要素。

具体实施方式

[0064] 本发明提供了稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂,其包含药学上有效量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐和水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH值。

[0065] 本发明还提供了稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂,其包含药学上有效量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,以及水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH值,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是天然胃泌酸调节素肽、胃泌酸调节素肽类似物或其活性片段。

[0066] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0067] 在一个实施方案中,本文所用的“活性”或“有活性的”意指对GLP-1受体和/或胰高血糖素受体具有激动剂活性。

[0068] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0069] His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:1)

[0070] 其中

[0071] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0072] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0073] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化;并且

[0074] 其中如果Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在,则Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化并且具有任选的接头。

[0075] 如本文所用,“Cys-PEG”是指一个或多个聚(乙二醇)(PEG)分子直接或通过连接基团与半胱氨酸残基的附接。PEG和连接基团如本文所述或本领域已知。

[0076] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0077] His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:1)

[0078] 其中

[0079] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0080] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0081] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

[0082] 在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉不存在。在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys并且Xaa₃₉是Cys-PEG。在另一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys。在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys-PEG。在某些实施方案中,Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在并且Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化。在一个实施方案中,Ala₃₇的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

[0083] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列

[0084] His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-

Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEQ ID NO:2)

[0085] 其中

[0086] 第38位的Cys残基任选地被聚乙二醇化,

[0087] 第39位的Cys残基任选地被聚乙二醇化,并且

[0088] 第39位的Cys的羧基任选地被酰胺化。

[0089] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如, 聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的第38位和/或第39位处被聚乙二醇化, 其中PEG分子直接地或经由附接至PEG分子的连接基团而共价连接至Cys残基的硫醇基团。在一个实施方案中, PEG分子是直链的或支链的。在一个实施方案中, PEG分子具有约20-40kDa的分子量, 例如, 约20kDa, 或约30kDa, 或约40kDa。

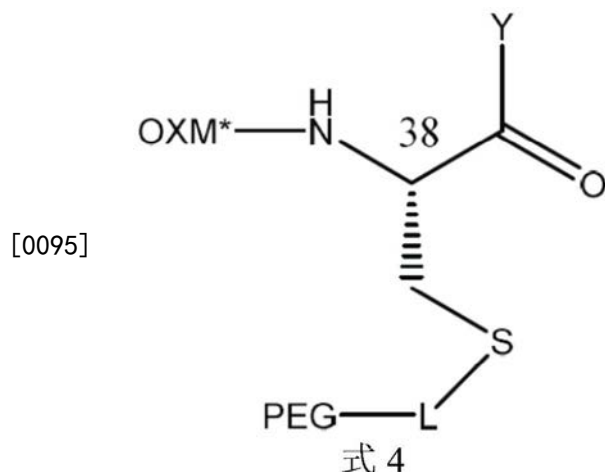
[0090] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0091] His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys (20kDa PEG) -Cys (20kD PEG) (SEQ ID NO:3) ,

[0092] 其中第39位的Cys的羧基任选地被酰胺化。

[0093] 在一个实施方案中, 第39位的聚乙二醇化Cys的羧基被酰胺化。

[0094] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是式4的化合物:



[0096] 其中

[0097] L是连接基团,

[0098] OXM*是天然OXM、OXM肽类似物、或其活性片段,

[0099] PEG是支链或直链聚乙二醇聚合物,

[0100] Y是-OH、OR、NR₂或氨基酸, 其中所述氨基酸任选地被L-PEG取代, 并且其中所述氨基酸任选地被酰胺化, 并且

[0101] R是C₁-C₄烷基基团。

[0102] 在一个实施方案中, 其中氨基酸是被L-PEG基团取代的半胱氨酸, 并且其中连接基团L附接至半胱氨酸上的S原子。

[0103] 在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0104] His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-

Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO:5)。

[0105] 在一个实施方案中,Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化。在一个实施方案中,Ala₃₇的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

[0106] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0107] His- (D-Ser) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- (1-Nal) -Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:6)

[0108] 其中

[0109] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0110] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0111] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化;并且

[0112] 其中如果Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在,则Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化并具有任选的接头。

[0113] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0114] His- (D-Ser) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- (1-Nal) -Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO:6)

[0115] 其中

[0116] Xaa₃₈是Cys、Cys-PEG,或不存在,并且

[0117] Xaa₃₉是Cys、Cys-PEG,或不存在,

[0118] 其中C-末端氨基酸任选地被酰胺化。

[0119] 在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉不存在。在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys并且Xaa₃₉是Cys-PEG。在另一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys。在一个实施方案中,Xaa₃₈是Cys-PEG并且Xaa₃₉是Cys-PEG。在某些实施方案中,Xaa₃₈和Xaa₃₉两者都不存在并且Ala₃₇的NH₂基团被聚乙二醇化。在一个实施方案中,Ala₃₇的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

[0120] 在一个实施方案中,PEG是支链、直链或多臂的聚乙二醇聚合物。在一个实施方案中,胃泌酸调节素肽类似物中的PEG分子具有20-40kDa的分子量,例如,约20kDa,或约30kDa,或约40kDa。

[0121] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0122] His- (D-Ser) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- (1-Nal) -Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn- (Aib) -Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEQ ID NO:7)

[0123] 其中

[0124] 第38位的Cys残基任选地被聚乙二醇化,

[0125] 第39位的Cys残基任选地被聚乙二醇化,并且

[0126] 第39位的Cys的羧基任选地被酰胺化。

[0127] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸

调节素肽类似物)在SEQ ID NO:6或7的第38位和/或第39位处被聚乙二醇化,并且其中PEG分子共价连接至Cys残基的硫醇基团或直接地或经由附接至PEG分子的连接基团连接。在一个实施方案中,PEG是支链、直链或多臂的聚乙二醇聚合物。在一个实施方案中,胃泌酸调节素肽类似物中的PEG分子具有20-40kDa的分子量,例如,约20kDa,或约30kDa,或约40kDa。

[0128] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:6或7的胃泌酸调节素肽类似物在第38位的Cys或第39位的Cys中的任一者或两者上被共价连接至这些位置处的Cys残基的硫醇基团的20kDa PEG分子聚乙二醇化。在一个实施方案中,胃泌酸调节素肽类似物在第38位和第39位两者的Cys残基上被共价连接至这些位置处的Cys残基的每个硫醇基团的20kDa PEG分子聚乙二醇化。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:6或7中可以不存在第39位的Cys残基,从而在第38位留下单个位点用于聚乙二醇化。

[0129] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0130] His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(20kDa PEG)-Cys(20kDa PEG)(SEQ ID NO:8)

[0131] 其中第39位的Cys的羧基任选地被酰胺化。

[0132] 在一个实施方案中,第39位的聚乙二醇化Cys的羧基被酰胺化。

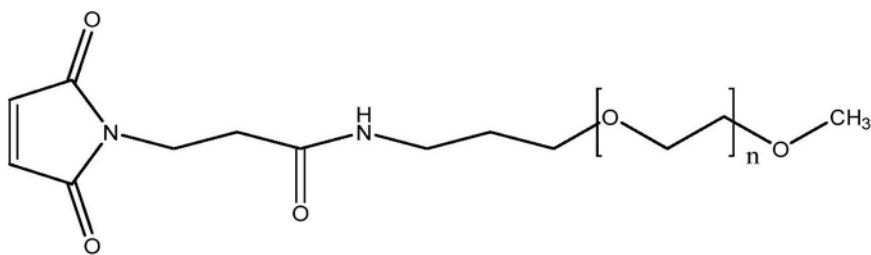
[0133] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含氨基酸序列:

[0134] His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala(SEQ ID NO:9)。

[0135] 在一个实施方案中,Ala37的NH₂基团被聚乙二醇化。在一个实施方案中,Ala37的NH₂基团任选地通过接头被聚乙二醇化。

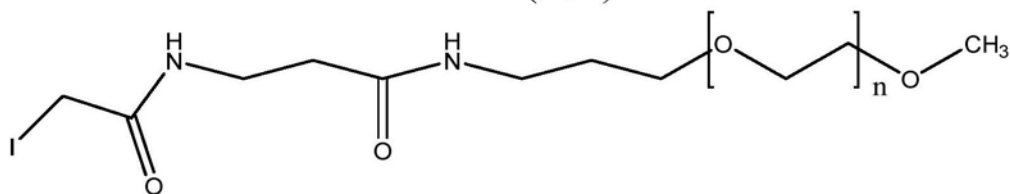
[0136] 在一个实施方案中,如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)在第38位的Cys或第39位的Cys中的任一者或两者上被在这些位置处共价连接至Cys残基的硫醇基团的PEG分子(例如,20kDa PEG、30kDa PEG或40kDa PEG)聚乙二醇化。在一个实施方案中,胃泌酸调节素肽类似物在第38位和第39位两者的Cys残基上被共价连接至这些位置处的Cys残基的每个硫醇基团上的PEG分子(例如20kDa PEG、30kDa PEG或40kDa PEG)聚乙二醇化。在另一个实施方案中,第39位的Cys残基可以不存在,从而在第38位留下单个位点用于聚乙二醇化。

[0137] 在一个实施方案中,如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)中的PEG可以通过本领域已知的连接基团而附接至胃泌酸调节素38和/或39Cys基团。在一个实施方案中,使用mPEG-20kDa马来酰亚胺(式1)或mPEG-20kDa碘乙酰胺(式2)将PEG附接至胃泌酸调节素38和/或39Cys基团,其中n为10至2500,或n为350-600,或n为425-475。



[0138]

(式 1)



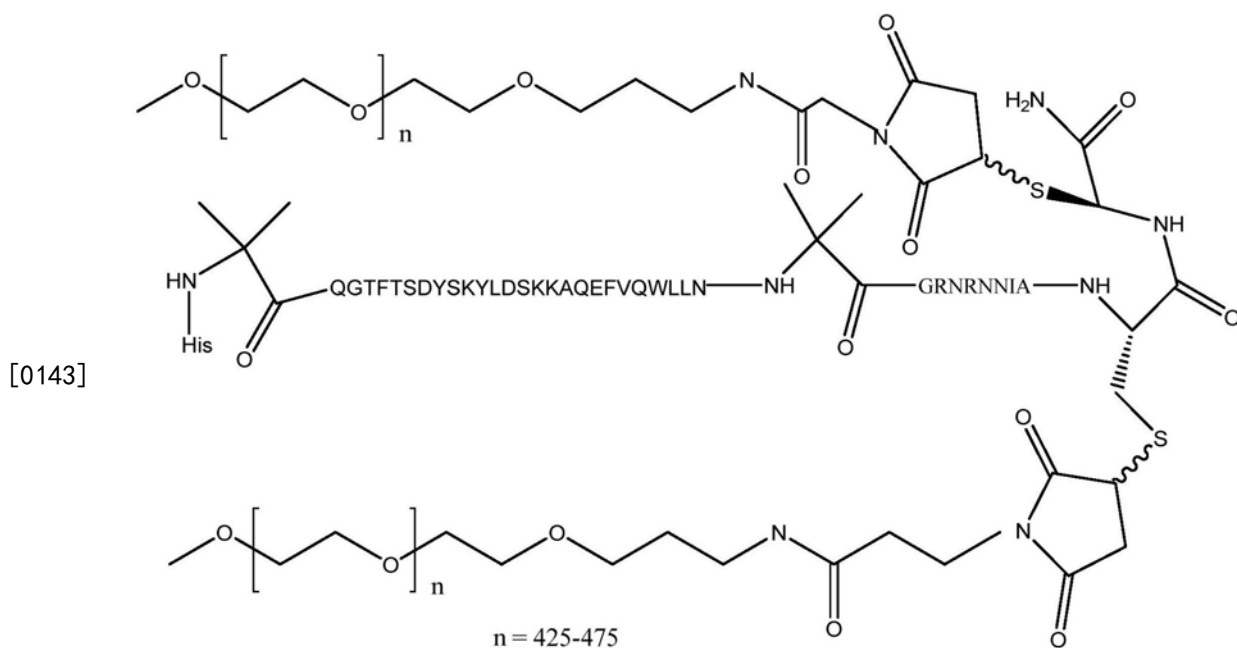
(式 2)

[0139] 其他已知的接头或连接基团也可用于将 OXM 或其类似物共价结合到 PEG 部分。或者,活化的 PEG 分子可直接与在第 38 和/或第 39 位处具有至少一个反应性半胱氨酸的 OXM 类似物反应,形成聚乙二醇化 OXM 类似物,其被用作本发明稳定液体制剂中的活性药物成分 (API)。

[0140] 在一个实施方案中,均使用 mPEG-20kDa 碘乙酰胺将 PEG 附接至胃泌酸调节素 38 和 39Cys 基团,并且其中第 39 位的聚乙二醇化 Cys 的羧基被酰胺化。

[0141] 在一个实施方案中,使用 mPEG-20kDa 马来酰亚胺或 mPEG-20kDa 碘乙酰胺中的任一者将 PEG 附接至胃泌酸调节素 38 和 39Cys 基团,并且其中第 39 位的聚乙二醇化 Cys 的羧基被酰胺化。例如,使用 mPEG-20kDa 马来酰亚胺将 PEG 附接至胃泌酸调节素 38Cys 基团,并且使用 mPEG-20kDa 碘乙酰胺将 PEG 附接至胃泌酸调节素 39Cys 基团。在另一个实施方案中,使用 mPEG-20kDa 碘乙酰胺将 PEG 附接至胃泌酸调节素 38Cys 基团,并且使用 mPEG-20kDa 马来酰亚胺将 PEG 附接至胃泌酸调节素 39Cys 基团。

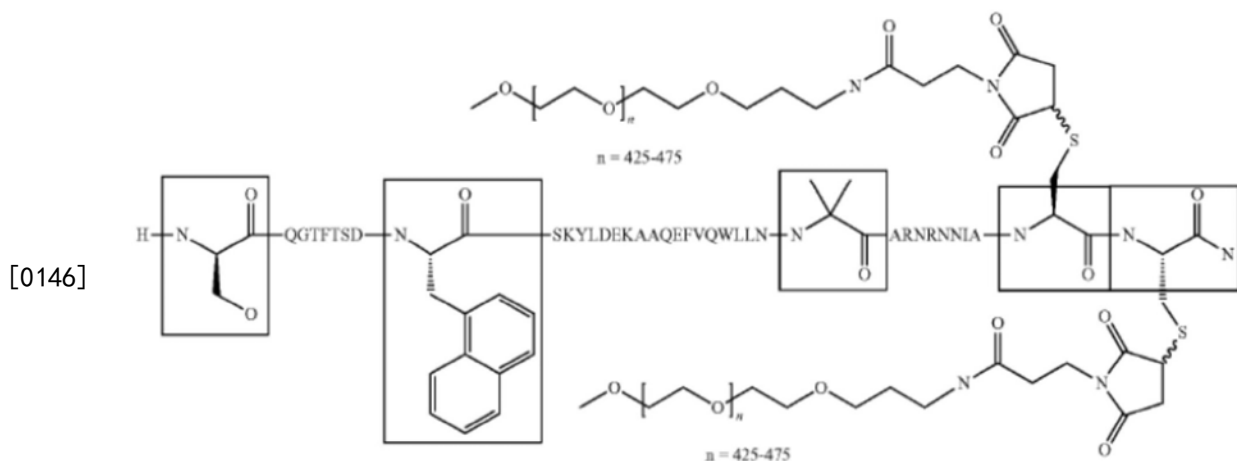
[0142] 在一个实施方案中,均使用 mPEG-20kDa 马来酰亚胺将 PEG 附接至 SEQ ID NO:1 的胃泌酸调节素 38 和 39Cys 基团,并且其中第 39 位的聚乙二醇化 Cys 的羧基被酰胺化 (式 3)。



(式 3)

[0144] 除了嵌入式中或如另外所示的特定化学结构(即His)之外,式3含有标准字母氨基酸代码名称。在一个实施方案中,式3的化合物为药学上可接受的盐的形式。在一个实施方案中,式3的化合物为乙酸盐的形式。

[0145] 在另一个实施方案中,均使用mPEG-20kDa马来酰亚胺将PEG附接至SEQ ID NO:6的胃泌酸调节素38和39Cys基团,并且其中第39位的聚乙二醇化Cys的羧基被酰胺化(式5)。



(式 5)

[0147] 在一个实施方案中,式5的化合物为药学上可接受的盐的形式。在其他实施方案中,式5化合物为乙酸盐的形式。

[0148] 在第38位处具有至少一个半胱氨酸残基的GLP-1受体和胰高血糖素受体两者的其他泌酸调节素变体/类似物和/或活化剂也可用于本发明。具有双重活性的合适类似物描述于Santoprete等人的J.Pept.Sci.2011;17:270-280中。特别地,在N-末端的第2位用D-Ser或Aib或D-Ala进行取代提供了DPP-IV抗性类似物,同时保留了GLP-1R/GcgR双重激动剂特性。第2位的Aib提供了对GLP-1受体的增强的效力和选择性,因此是优选的(Aib是2-氨基异

丁酸)。其他实施方案包括活性 OXM (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA) (SEQ ID NO:4), 其中在第38位或第38位和第39位处具有Cys残基, 并且具有如本文所述的对聚乙二醇化衍生物的另外的修饰。

[0149] 在一个实施方案中, 本发明的制剂具有约4.0至约7.0的pH值。在一个实施方案中, pH值为约4.5至约6.5。在一个实施方案中, pH值为约4.0至约5.5。在一个实施方案中, pH为约4.5。

[0150] 在一个实施方案中, 为了制备本发明的制剂, 将合适的缓冲溶液例如乙酸盐缓冲溶液用所需的赋形剂(即甲硫氨酸(稳定剂)、山梨糖醇(张力调节剂))制备成低于目标范围约0.5pH单位的pH, 例如约4.0-7.0(另选地, 在加入GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂后将pH调节至优选的目标pH范围)。将GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂例如如本文所述的胃泌酸调节素肽类似物加入到配制缓冲液中, 然后用弱酸或弱碱调节以将pH降低或提高到目标范围内。

[0151] 本发明人发现, 在约4.0至约7.0范围内的较低pH实际上改善了液体制剂的稳定性, 优选约4.5的pH。另外, 本发明人发现, 在这类肠胃外制剂中常规使用的某些赋形剂实际上使API(活性药物成分, 例如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂)在预备缓冲溶液中不稳定, 导致杂质(例如半胱氨酸)的形成, 如通过HPLC所测定的。本发明人还发现某些试剂如甲硫氨酸和/或精氨酸提高了液体制剂的稳定性。

[0152] 出乎意料的是, 当在不含氯化钠的缓冲(柠檬酸盐、组氨酸或乙酸盐)水溶液中测试时, 含有100nM氯化钠和柠檬酸盐、组氨酸或乙酸盐缓冲液的预备缓冲液制剂就杂质形成而言不是那么稳定。这一发现导致选择了不含氯化钠或含低浓度(0-50nM)这种盐的稳定制剂。GLP-1/胰高血糖素受体激动剂的稳定制剂可以包括氯化钠, 条件是其不导致API降解。优选的制剂是不含或基本上不含氯化钠或导致API在缓冲水溶液如柠檬酸盐、组氨酸或乙酸盐缓冲溶液中降解的其他张力调节剂的氯化钠。通过HPLC分析的杂质百分比优选小于6.0面积%。这种杂质分布在一定程度上还取决于溶液的pH。在5.3至6.6之间的较高pH范围导致在含有氯化钠的样品中较高百分比的总杂质(对于在室温下储存6天的样品, 与在40摄氏度储存6天的样品相比, 6.1-7.3或7.0-9.3)。

[0153] 较少稳定量的张力剂如氯化钠定义为 $\geq$ 约10-100mM氯化钠。该浓度可根据制剂中的特定赋形剂和溶液的pH而变化。半胱氨酸的去稳定量被定义为 $\geq$ 25mM半胱氨酸。

[0154] 因此, 在另一个实施方案中, 本发明的制剂基本上不含去稳定物质。在一个实施方案中, 去稳定物质是半胱氨酸。在一个实施方案中, 半胱氨酸的量低于25mM。在一个实施方案中, 半胱氨酸的量低于10mM。在一个实施方案中, 制剂基本上不含氯化钠。在一个实施方案中, 氯化钠的量低于100mM。在一个实施方案中, 氯化钠的量低于25mM。

[0155] 本文所用的术语“基本上不含”应理解为是指在本发明的水性缓冲制剂中相对少量的任何物质, 基于在标准测试条件下测量的高效液相色谱(“HPLC”), 其导致活性药物成分降解至大于约百分之五(5%)的百分比。

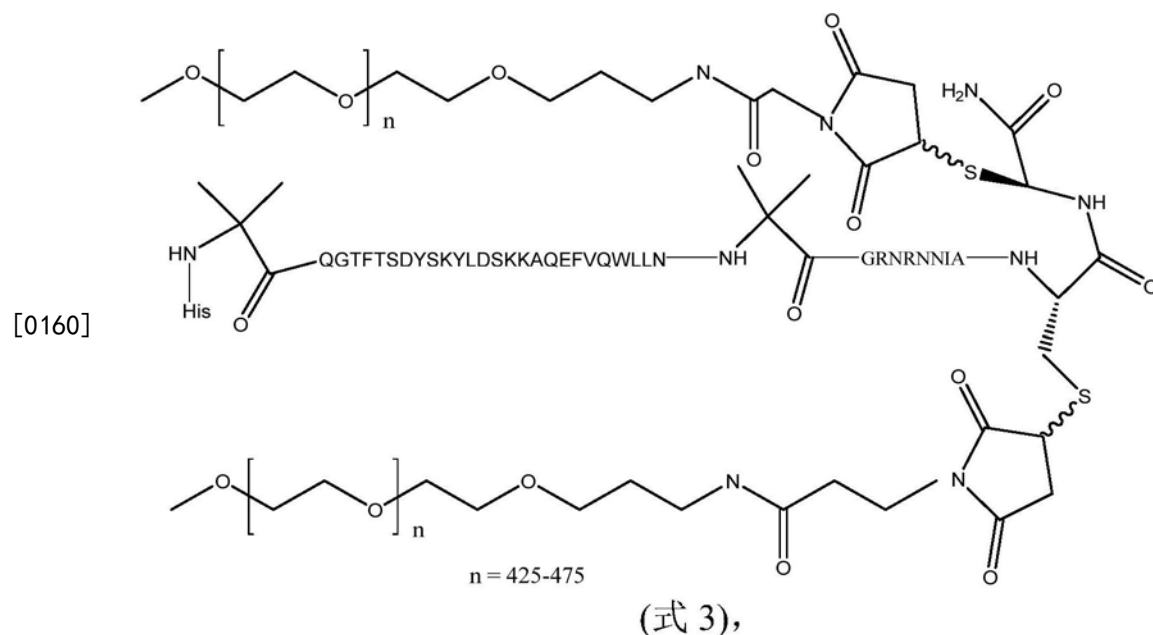
[0156] 本发明还包括具有另外的药学上可接受的(“通常认为是安全试剂”GRAS“)赋形剂如表面活性剂或张力剂或其他药学上可接受的添加剂的制剂。这些可以包括例如甲硫氨酸、精氨酸、山梨糖醇、蔗糖、非离子表面活性剂(泊洛沙姆和聚山梨醇酯)或类似的赋形剂。在一个实施方案中, 制剂是在pH 4.5的10mM乙酸盐缓冲液中的70mg/mL式3的聚乙二醇化胃

泌酸调节素肽 (OPK88003), 其含有甲硫氨酸 (30-35mM) 和山梨糖醇以调节张力。

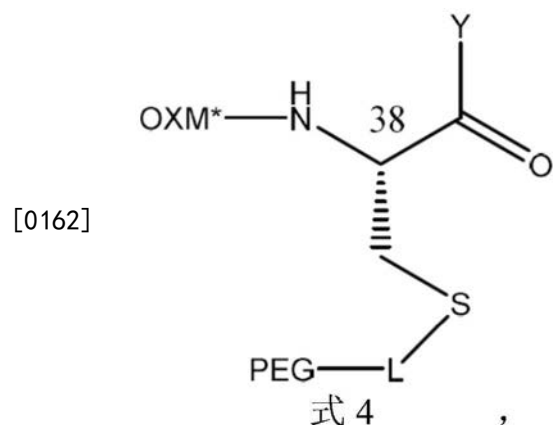
[0157] 本发明提供了稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂, 其包含GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如, 聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)或其药学上可接受的盐和水性缓冲溶液, 其中所述制剂基本上不含去稳定物质并且具有约3.5至约8.0的pH范围。

[0158] 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段, 或由式3、式4或式5的结构表示,

[0159] 其中式3由以下结构表示



[0161] 其中式4由以下结构表示



[0163] 其中

[0164] L是连接基团,

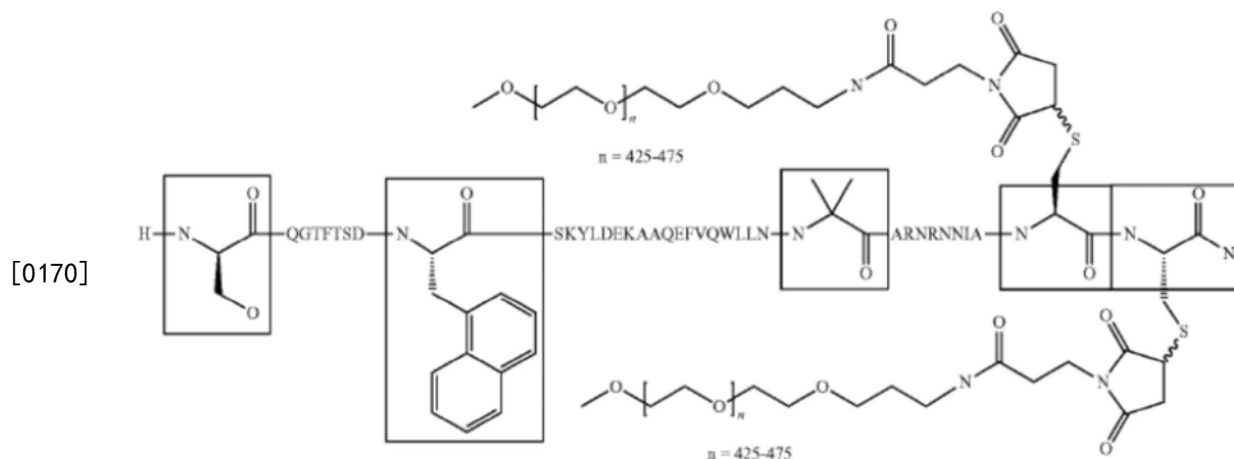
[0165] OXM*是天然OXM、OXM肽类似物、或其活性片段,

[0166] PEG是支链或直链聚乙二醇聚合物,

[0167] Y是-OH、OR、NR₂或氨基酸, 其中所述氨基酸任选地被L-PEG取代, 并且其中所述氨基酸任选地被酰胺化,

[0168] R是H或C₁-C₄烷基基团,

[0169] 并且其中式5由以下结构表示



(式 5)。

[0171] 在一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物由式3、式4或式5的结构表示。在另一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物由式3的结构表示。

[0172] 在一个实施方案中,式4中的Y是被L-PEG基团取代的半胱氨酸,并且其中连接基团L通过半胱氨酸上的S原子附接至半胱氨酸。

[0173] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是药学上可接受的盐的形式。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是乙酸盐的形式。

[0174] 在一个实施方案中,本发明的制剂含有通过RP-HPLC测量的约10.0%或更少的总杂质和小于约5%的任何单一单独杂质。在一个实施方案中,本发明的制剂含有通过尺寸排阻色谱法测量的约10.0%或更少的总杂质和小于约5%的任何单一单独杂质。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的制剂基本上不含去稳定物质。在一个实施方案中,去稳定物质是半胱氨酸。在一个实施方案中,半胱氨酸的量低于25mM。在一个实施方案中,半胱氨酸的量低于10mM。在一个实施方案中,制剂基本上不含氯化钠。在一个实施方案中,氯化钠的量低于100mM。在一个实施方案中,氯化钠的量低于25mM。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含张力剂。在一个实施方案中,张力剂包括山梨糖醇。其他张力剂可包括蔗糖、甘露醇或其他张力调节剂。

[0177] 在一个实施方案中,本发明的制剂还包含基于液体制剂的总体积计约0.001% (w/v) 至约1% (w/v) 的一种或多种防腐剂。在一个实施方案中,防腐剂为约0.001% (w/v) 至约0.5% (w/v),或约0.001% (w/v) 至约0.1% (w/v),或约0.001% (w/v) 至约0.05% (w/v),或约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v)。在一个实施方案中,防腐剂是间甲酚、苯酚和/或苯甲醇。在某些实施方案中,防腐剂是间甲酚。在另一个实施方案中,防腐剂是苯酚或苯甲醇。

[0178] 在一个实施方案中,在本发明的制剂中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)或其药学上可接受的盐以约5mg/mL至约150mg/mL的浓度范围存在于合适的小瓶中。在一个实施方案中,在本发明的制剂中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐以约20mg/mL至约150mg/mL的浓度范围存在于合适的小瓶中。在一个实施方案中,在本发明的制剂中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐以约50mg/mL至约120mg/mL的浓度范围存在于合适的小瓶中。在一个

实施方案中,在本发明的制剂中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐以约70mg/mL的浓度存在于合适的小瓶中。在一个实施方案中,合适的小瓶是一次性使用的小瓶。

[0179] 在一个实施方案中,本发明制剂中的缓冲溶液选自乙酸盐缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液和组氨酸缓冲溶液。在某些实施方案中,缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。在一个实施方案中,缓冲溶液是柠檬酸盐缓冲溶液。在一个实施方案中,缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0180] 在一个实施方案中,本发明制剂的pH范围为约4.0至约7.0,或约4.0至约6.5,或约4.0至约6.0,或约4.0至约5.5,或约4.0至约5.0,或约4.5至约6.5,或约4.5至约6.0,或约4.5至约5.5。在另一个实施方案中,本发明制剂的pH值为约4.5。

[0181] 在一个实施方案中,制剂包含在10mM乙酸盐缓冲溶液中的70mg/mL的式3的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,其中所述制剂具有约4.5的pH值。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的制剂还包含一种或多种本领域已知的另外的药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中,另外的药学上可接受的赋形剂是甲硫氨酸、甲硫氨酸的衍生物、精氨酸或精氨酸的衍生物。

[0183] 在一个实施方案中,本发明的制剂具有不超过500mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。在一个实施方案中,本发明的制剂具有约10至约60cP的粘度。在一个实施方案中,本发明的制剂具有小于10N的松脱力和小于30N的滑动力的可注射性,在一个实施方案中,本发明的制剂不引起或引起很少的注射部位反应,例如刺激。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的制剂至少稳定5次冻/融循环。在另一个实施方案中,本发明的制剂在30℃/65%RH下至少稳定48小时,在5℃下至少稳定12个月。

[0185] 本发明还提供了药物组合物,其包含如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,以及选自甲硫氨酸、山梨糖醇和缓冲液的药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0186] 在一个实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含选自式3、式4和式5的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物或包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物或其药学上可接受的盐,以及选自甲硫氨酸、山梨糖醇和缓冲液的药学上可接受的赋形剂。

[0187] 本发明还提供稳定的液体制剂,其包含在基本上不含氯化钠的缓冲水溶液中的式3化合物,其中所述制剂的pH范围为约4.0至约7.0。制剂任选地包含选自有机碱、张力剂和不将制剂去稳定或对制剂产生不利影响的其他赋形剂。除了甲硫氨酸之外,或作为甲硫氨酸的替代物,精氨酸也可用作稳定氨基酸。在一个实施方案中,本发明的稳定液体制剂具有约4.0至约5.0的pH范围。在另一个实施方案中,本发明的稳定液体制剂具有约4.5的pH值。

[0188] 在一个实施方案中,本发明的稳定液体制剂从合适的容器(小瓶、预填充注射器、药筒等)以20mg至80mg的合适剂量每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用给患者。还考虑了自动注射器。剂量可以根据患者的体重和疾病状况或状态的性质和严重程度而变化,并且剂量可以从较低的初始剂量逐渐增加到较高的剂量。单剂量小瓶通常含有具有70mg/mL的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的溶液。以该浓度施用的不同体积决定了递送至患者的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂

的实际量。还考虑了具有本发明液体制剂的多剂量容器。

[0189] 本发明还提供本发明的稳定液体制剂用于治疗有需要的患者的糖尿病和/或肥胖症或代谢障碍的用途。本发明提供了稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂，其在患有2型糖尿病的患者中有效降低HbA1c。

[0190] 本发明包括稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂的用途，所述制剂在患有2型糖尿病的患者中有效降低HbA1c，并进一步降低体重和/或改变空腹血糖 (FPG)。

[0191] 本发明还提供了通过向有需要的患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体制剂来治疗2型糖尿病、肥胖症或任何相关的医学病症、疾病或病况的方法，所述病症、疾病或病况由或能够由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗。所述疾病和病症包括但不限于患有葡萄糖相关代谢疾病或病症或肥胖相关疾病和病症的患者。疾病诸如脂肪肝疾病或心血管疾病和病症可以通过下文预期的治疗方案减轻或积极影响。在一个实施方案中，疾病或病症包括但不限于脂肪肝疾病或心血管疾病。在某些实施方案中，脂肪肝疾病是非酒精性脂肪肝疾病。在一个实施方案中，液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在一个实施方案中，液体剂型每周施用一次。

[0192] 在另一个方面，本发明提供了治疗患有2型糖尿病的患者方法，其包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。在一个实施方案中，液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在一个实施方案中，液体剂型每周施用一次。在一个实施方案中，在本发明的方法中，制剂的缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。在一个实施方案中，溶液还包含甲硫氨酸。在一个实施方案中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。在一个实施方案中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在另一个实施方案中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式5的化合物表示。在一个实施方案中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是乙酸盐的形式。

[0193] 在一个实施方案中，在本发明的方法中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂以约5mg/mL至约150mg/mL的浓度范围在合适的容器或递送装置中。在一个实施方案中，浓度为约20mg/mL至约150mg/mL。在一个实施方案中，浓度为约20至约120mg/mL。在另一个实施方案中，浓度为约20mg/mL至约100mg/mL。在一个实施方案中，浓度为约30mg/mL至约100mg/mL。在一个实施方案中，浓度为约40mg/mL至约100mg/mL。在另一个实施方案中，浓度为约40mg/mL至约80mg/mL。

[0194] 在一个实施方案中，用于本发明方法的液体剂型基本上不含氯化钠。在一个实施方案中，用于本发明方法的液体剂型基本上不含半胱氨酸。在一个实施方案中，液体剂型的pH在约4.5和约6.5之间。在一个实施方案中，施用给患者的剂量为20至150mg/周、或20至125mg/周、或20至100mg/周、或20至75mg/周、或20至50mg/周、或40至150mg/周、或50至150mg/周、或75至150mg/周、或100至150mg/周。在另一个实施方案中，施用给患者的剂量范围为0.5至1.5mg/kg/周、或0.5至1.0mg/kg/周、或1.0至1.5mg/kg/周。

[0195] 在另一个方面，本发明提供了降低有需要的患者的HbA1c的方法，其包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。在一个实施方案中，液体剂型每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在一个实施方案中，液体剂型每周施用一次。在一个实施方案中，GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3

的化合物表示。在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂在合适容器中的浓度是约70mg/mL。在一个实施方案中, 合适的容器是一次性使用的小瓶。

[0196] 在一个实施方案中, 患者的HbA1c水平在4、8、12、22、24、30或34周后降低。在另一个实施方案中, 患者的HbA1c水平与基线水平相比降低约0.5%-3%。在另一个实施方案中, 患者的HbA1c水平与基线水平相比降低约1.3%之间。在另一个实施方案中, 患者的HbA1c水平的平均绝对降低在约0.01%至0.50%之间。在另一个实施方案中, 患者的HbA1c水平的平均绝对降低为约0.09%。

[0197] 在另一方面, 本发明提供了降低有需要的患者的体重的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中, 制剂每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在一个实施方案中, 制剂每周施用一次。

[0198] 在一个实施方案中, 在4、8、12、22、24、30或34周后降低患者的体重。在另一个实施方案中, 患者的体重与基线水平相比降低约1.8kg至8.8kg。在另一个实施方案中, 患者的体重与基线水平相比降低约4.4kg。在另一个实施方案中, 患者的体重与基线水平相比减少约2%至10%。在另一个实施方案中, 患者的体重与基线水平相比减少约5%之间。

[0199] 在另一方面, 本发明提供了降低有需要的患者的血液甘油三酯的方法, 其包括向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中, 制剂每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在一个实施方案中, 制剂每周施用一次。

[0200] 在一个实施方案中, 在4、8、12、22、24、30或34周后, 患者的血液甘油三酯降低。在另一个实施方案中, 患者的血液甘油三酯与基线水平相比降低约30mg/dL至40mg/dL之间。在另一个实施方案中, 患者的血液甘油三酯与基线水平相比降低约约31.2mg/dL。

[0201] 本发明还提供了治疗2型糖尿病患者的方法, 其包括通过每周一次皮下施用向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂, 其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的每个患者的有效周剂量范围为约10至约150mg/周。在一个实施方案中, GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中, 制剂从预填充注射器、药筒、注射笔、自动注射器或小瓶施用。在另一个实施方案中, 预填充注射器、筒、自动注射器、注射笔或小瓶含有具有70mg/mL GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的溶液。

[0202] 在另一个方面, 本发明提供了预填充注射器, 其具有本发明的稳定的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂。在一个实施方案中, 本发明的预填充注射器中的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中, 本发明的预填充注射器具有pH范围为约3.5-约8.0, 或约4.0-约7.0的溶液。在一个实施方案中, 制剂包含乙酸盐缓冲溶液。

[0203] 在一个实施方案中, 预填充注射器包含药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中, 药学上可接受的赋形剂包括甲硫氨酸。在一个实施方案中, 预填充注射器中的制剂基本上不含氯化钠。在一个实施方案中, 用于本发明方法的液体剂型基本上不含半胱氨酸。在一个实施方案中, 氯化钠的量低于100mM。在一个实施方案中, 半胱氨酸的量低于25mM。

[0204] 本发明还提供了包含本发明的稳定液体制剂的多剂量容器。

[0205] 在另一个方面,本发明提供了治疗患有选自肥胖症、代谢疾病、1型或2型糖尿病的疾病或病症和选自不适当的葡萄糖代谢、葡萄糖耐量减低和空腹葡萄糖减低的任何其他病症的患者的方法,其包括向患者施用药物有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂的液体剂型。在一个实施方案中,制剂每周两次或每周一次或以更长的剂量间隔施用。在另一个实施方案中,制剂每周施用一次。

[0206] 本发明还提供了治疗患有选自肥胖症、代谢疾病、1型或2型糖尿病的疾病或病症和选自不适当的葡萄糖代谢、葡萄糖耐量减低和空腹葡萄糖减低的任何其他病症的患者的方法,其包括通过皮下施用向所述患者施用药学上有效量的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂液体剂型,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的每个患者的有效剂量为约10至约150mg/周。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。

[0207] 如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂和包含其的制剂可用于治疗2型糖尿病、肥胖症或任何相关的医学病症、疾病或病况。所述疾病和病症包括但不限于患有葡萄糖相关代谢疾病或病症或肥胖相关疾病和病症的患者。疾病诸如脂肪肝疾病或心血管疾病和病症可以通过下文预期的治疗方案减轻或积极影响。

[0208] 本发明还提供了治疗、压制、抑制2型糖尿病、肥胖症或肥胖相关代谢障碍、体重减轻、葡萄糖耐受不良、高胰岛素血症、胰岛素抗性、高血压、脂肪肝疾病(例如非酒精性脂肪性肝炎或NASH)、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、心血管疾病、动脉粥样硬化、脑血管病症、阿尔茨海默氏病和/或中风或降低其发病率的方法,其包括向有此需要的患者施用如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。

[0209] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗2型糖尿病的方法,其包括向有此需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。

[0210] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗、压制、抑制肥胖和/或肥胖相关代谢障碍,例如高血压、糖尿病、血压升高、中风或心脏病或降低其发病率的方法,其包括向有需要的患者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,肥胖相关代谢障碍是高血压。在另一个实施方案中,病症是2型糖尿病。在另一个实施方案中,病症是血压升高。在另一个实施方案中,病症是中风。在另一个实施方案中,病症是心脏病。

[0211] 在另一个实施方案中,本发明涉及促进、增加或促进受试者体重减轻的方法,其包括向有需要的患者施用如本文所述的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。

[0212] 2型糖尿病的特征在于胰岛素抵抗,并且在疾病发病的某些阶段,是胰岛素分泌的相对缺乏。大多数患有2型糖尿病的个体表现出腹内(内脏)肥胖症,脂肪肝,其与胰岛素抵抗的存在密切相关。患者的肝脏变得具有胰岛素抗性,糖原分解不受控制,结果增加,并且非生理性葡萄糖递送到血流中。肝脏产生的胆固醇和VLDL颗粒也是不受控制的。此外,这些个体中常常存在高血压、血脂异常(高甘油三酯和低HDL-胆固醇水平;餐后高脂血症)和升高的PAI-1水平。这种异常的聚类被称为“胰岛素抵抗综合征”或“代谢综合征”或肥胖相关

的病症。由于这些异常,2型糖尿病患者发展为大血管并发症如心肌梗塞和中风的风险增加。

[0213] 在本发明的另一个方面,如本文所述的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐可用于治疗、压制或抑制与2型糖尿病相关的疾病或病况或与2型糖尿病相关的疾病或病况。在一个实施方案中,本发明提供了治疗、压制或抑制脂肪肝疾病的方法,其包括向有此需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,脂肪肝疾病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0214] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗葡萄糖耐受不良的方法,其包括向有此需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。葡萄糖耐受不良是糖尿病前期状态,其中血糖高于正常水平但不足以高到保证糖尿病的诊断。

[0215] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗、压制或抑制高胰岛素血症的方法,其包括向有需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。高胰岛素血症是引起胰腺分泌过量胰岛素的潜在问题的征兆。高胰岛素血症最常见的原因是胰岛素抗性,这是一种身体对胰岛素的作用有抗性并且胰腺试图通过制造更多的胰岛素来补偿的病症。高胰岛素血症与2型糖尿病有关。

[0216] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的动脉粥样硬化及其相关疾病,例如心血管病症、脑血管病症、外周血管病症或肠血管病症的方法,其包括向有需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。动脉粥样硬化是指一种缓慢的复杂疾病,其可能以动脉最内层的损伤开始。动脉壁损伤的原因可包括:a) 血液中胆固醇水平升高;b) 高血压;c) 烟草烟雾;或d) 糖尿病。类似地,在另一个实施方案中,本发明的方法可用于治疗具有过早心血管疾病家族史的受试者,其具有增加的动脉粥样硬化风险。

[0217] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗阿尔茨海默病的方法,包括向有此需要的受试者施用本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐。阿尔茨海默病(AD)的特征在于影响记忆和学习能力、日常功能和生活质量的认知不足和行为变化。已知为T2DM病理生理学特征的高胰岛素血症和胰岛素抗性也已被证明对认知损害具有显著影响。据信GLP-1影响神经和认知功能,以及其对葡萄糖代谢的调节作用。

[0218] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗糖尿病性肾病的方法。糖尿病性肾病是糖尿病的并发症,其发展早期,通常在进行糖尿病的临床诊断之前。最早的肾病临床证据是尿中出现低但异常水平(>30mg/天或20μg/分钟)的白蛋白(微量白蛋白尿),随后是在10-15年的时间内产生的白蛋白尿(>300mg/24h或200μg/分钟)。在1型糖尿病患者中,糖尿病性高血压通常在早期表现,即在患者发展为微量蛋白尿时。一旦发生明显的肾病,肾小球滤过率(GFR)随时间的推移而下降,这可能是几年,导致糖尿病个体的晚期肾病(ESRD)。

[0219] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗糖尿病性神经病的方法。糖尿病性神经病

是由糖尿病引起的一系列神经障碍。糖尿病性神经病引起手、臂、足和腿的麻木和有时的疼痛和虚弱。糖尿病性神经病被分类为外周、自主、近端和局灶性神经病。周围神经病变引起脚趾、脚、腿、手和手臂的疼痛或感觉丧失。自主神经病变引起消化、肠和膀胱功能、性反应和排汗的变化,并且还可影响为心脏服务并控制血压的神经。近端神经病变引起大腿、髋部或臀部疼痛,并导致腿部虚弱。局灶性神经病导致一种神经或一组神经突然衰弱,引起肌肉衰弱或疼痛。体内的任何神经都可能受到影响。

[0220] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗糖尿病性视网膜病的方法。糖尿病对眼的作用被称为糖尿病性视网膜病。糖尿病患者更可能发展为眼睛问题,例如白内障和青光眼。糖尿病性视网膜病对视力的影响变化很大,取决于疾病的阶段。糖尿病性视网膜病的一些常见症状是视力模糊(这通常与血糖水平有关)、漂浮物和潮红以及视力突然丧失。

[0221] 本发明还提供了组合治疗,其包括本发明的制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,以及用于如本文所述的适应症的其他药物。本发明方法中的患者可能患有其他疾病和/或病症。本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,可以与用于与本发明的方法中的疾病或病症相同或不同的疾病或病症的一种或多种另外的药剂(例如治疗剂)组合施用。本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,可以在本发明的方法中与另外的一种或多种药剂同时施用、在另外的一种或多种药剂之后施用或在另外的一种或多种药剂之前施用。

[0222] 肥胖患者和/或糖尿病患者可能患有其他疾病和病症。在一个实施方案中,患者可能患有慢性肾病并且在服用肾脏药物。在一个实施方案中,患者可能在使用利尿剂。在一个实施方案中,患者可能是高血压患者并且在服用高血压药物。在一个实施方案中,患者可能在服用未禁忌的糖尿病药物。在一个实施方案中,患者可能患有在用心脏药物治疗的心血管病症。在一个实施方案中,患者可能维生素D不足并且在服用维生素D类似物或补充剂。

[0223] 本发明的另一个方面是本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,可以与另一种或多种治疗剂一起在本发明的方法中施用。

[0224] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,与治疗慢性肾病的药剂组合施用。在一个实施方案中,治疗慢性肾病的药剂为选择性雄激素受体调节剂(SARM)。在一个实施方案中,选择性雄激素受体调节剂为RAYALDEE (25 (OH) D3) (用于治疗3、4期慢性肾病(CKD)患者和其他患者的继发性甲状旁腺功能亢进(SHPT))。

[0225] 在一个实施方案中,治疗慢性肾病的药剂是促红细胞生成素或其类似物(例如,达贝泊汀(darbepoetin) (也称为Aranesp®))。在一个实施方案中,药剂是类固醇。在一个实施方案中,药剂是利尿剂,其包括但不限于有机汞制剂、依他尼酸、呋塞米、布美他尼、吡咯他尼、莫唑胺、氯噻嗪和噻嗪、苯并吡咯酮、氯噻酮、喹唑啉酮、喹乙宗、希帕胺(xipamide)、黄嘌呤、氨茶碱、碳酸酐酶抑制剂、乙酰唑胺甘露醇、保钾化合物、醛固酮拮抗剂、蝶啶、吡嗪、甲酰胺-氨苯蝶啶和/或阿米洛利(amiloride)。

[0226] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文

所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,与治疗心血管病症的药剂组合施用。在一个实施方案中,治疗心血管病症的药剂是治疗充血性心力衰竭。治疗充血性心力衰竭的药剂可以是血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂,例如贝那普利、卡托普利、赖诺普利、莫昔普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利或依那普利拉。在一个实施方案中,治疗充血性心力衰竭的药剂是 β -阻断剂,例如醋丁洛尔、阿替洛尔、盐酸倍他洛尔、富马酸比索洛尔、盐酸卡替洛尔、盐酸盐、盐酸艾司洛尔、盐酸拉贝洛尔、左布诺洛尔、美替洛尔、纳多洛尔、盐酸氧烯洛尔、吲哚洛尔、盐酸普萘洛尔、盐酸索他洛尔或马来酸噻吗洛尔。在一个实施方案中,治疗充血性心力衰竭的药剂是地高辛。

[0227] 在一个实施方案中,治疗心血管病症的药剂是抗心律失常剂。抗心律失常剂可以是钠通道阻断剂、 β -肾上腺素能阻断剂、钙通道阻断剂或延长复极化的药剂。钠通道阻断剂包括但不限于奎尼丁、普鲁卡因胺、丙吡胺、利多卡因、妥卡尼、美西律、恩卡尼或氟卡尼。在一个实施方案中, β -肾上腺素能阻断剂包括但不限于普萘洛尔、醋丁洛尔、艾司洛尔或索他洛尔。延长复极化的药剂包括但不限于索他洛尔或胺碘酮。钙通道阻断剂包括但不限于维拉帕米、地尔硫卓、硝苯地平或美贝弗地尔。在一个实施方案中,抗心律失常剂是腺苷或地高辛。

[0228] 在一个实施方案中,治疗心血管病症的药物可以是血管活性剂或肌力剂(inotrope)。血管活性剂或肌力剂包括但不限于地高辛、多巴胺、多巴酚丁胺、肼屈嗪、哌嗪、卡维地洛、硝普盐、硝酸甘油、卡托普利、赖诺普利、硝苯地平、氨氯地平、地尔硫卓、氢氯噻嗪、呋塞米、螺内酯、AT-1受体拮抗剂(例如氯沙坦、厄贝沙坦、缬沙坦)、ET受体拮抗剂、双重ET/AII拮抗剂、中性内肽酶(NEP)抑制剂、血管肽酶抑制剂(双重NEP-ACE抑制剂)(例如奥马曲拉和格莫曲拉(gemparlopat))或硝酸盐。

[0229] 在一个实施方案中,治疗心血管病症的药剂是抗凝血剂,例如香豆素衍生物(例如华法林)或未分级肝素或低分子量肝素。在一个实施方案中,治疗心血管病症的药剂是纤维蛋白溶解剂,例如链激酶、尿激酶、阿替普酶、阿尼普酶、尿激酶原、瑞替普酶、替奈普酶、拉诺替普酶、葡萄球菌激酶、吸血蝙蝠唾液或阿法普酶(alfimeprase)。在一个实施方案中,治疗心血管病症的药物是高胆固醇血症药物,如烟酸-洛伐他汀、盐酸考来替泊、氟伐他汀钠、阿托伐他汀钙、辛伐他汀、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀钠、考来烯胺轻、非诺贝特、盐酸考来维仑或依泽替米贝。

[0230] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,与利尿剂组合施用。利尿剂包括但不限于有机汞、依他尼酸、呋塞米、布美他尼、吡咯他尼、吗啉、氯噻嗪和噻嗪、苯并吡咯酮、氯噻酮、氯雷索龙、喹唑啉酮、喹乙宗、美托拉宗、苯磺酰胺、美夫西苷、氯苯甲酰胺、氯己胺、水杨酰胺、希帕胺、黄嘌呤、氨茶碱、碳酸酐酶抑制剂、乙酰唑胺甘露醇、保钾化合物、醛固酮拮抗剂、螺内酯和坎利酸酯、蝶啶、吡嗪、甲酰胺-三氮烯或阿米洛利。

[0231] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,与抗糖尿病剂组合施用。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是磺酰脲。磺酰脲类包括,但不限于甲苯磺丁脲、醋磺己脲、甲苯磺脲、氯磺丙脲、格列吡嗪、格列本脲、格列美脲或格列齐特。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是氯茴苯酸类,例如,普瑞丁(prandin)或那格列奈。在一个实施方案中,抗糖尿病

剂是双胍,例如二甲双胍。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是噻唑烷二酮,例如罗格列酮、吡格列酮或曲格列酮。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是 α 葡萄糖苷酶抑制剂,例如米格列醇和阿卡波糖。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是PPAR α/γ 配体、二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂、SGLT (钠依赖性葡萄糖转运蛋白1) 抑制剂、胰高血糖素调节剂、糖皮质激素受体 (GR) 拮抗剂、葡萄糖激酶活化剂 (GK)、糖原磷酸化酶抑制剂 (GP)、肠降血糖素 (GLP-1和GIP) 或模拟物、三酰基甘油脂肪酶抑制剂、胰岛素样生长因子1 (IGF-1) 或类似物、胰岛素受体 (IR) 调节剂、PTP-1B磷酸酶 (或PTPN1) 抑制剂和/或糖原合酶激酶-3 (GSK3 β) 调节剂。

[0232] 在一个实施方案中,抗糖尿病剂是胰岛素,例如速效胰岛素、短效胰岛素和/或中效胰岛素。在一个实施方案中,胰岛素是长效胰岛素。在一个实施方案中,抗糖尿病剂是脂肪酸结合蛋白 (aP2) 抑制剂、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和二肽基肽酶IV (DPP4) 抑制剂。

[0233] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,与一种或多种治疗代谢疾病、障碍或病症的药剂组合施用,所述代谢疾病、障碍或病症在一些实施方案中指代谢综合征。在一个实施方案中,这样的药剂包括但不限于胰脂肪酶抑制剂,例如奥利司他或西替利司,胰岛素敏化剂,例如双胍 (二甲双胍) 或PPAR激动剂,双重作用的PPAR激动剂 (莫格列扎 (muraglitazar)、特沙格列扎 (tesaglitazar)、那格列扎 (naveglitazar)), PPAR- δ 激动剂, DPP-IV抑制剂 (维格列汀、西他列汀), α 葡萄糖苷酶抑制剂 (阿卡波糖), 胰高血糖素样肽-1类似物 (艾塞那肽、利拉鲁肽 (liraglutide), 糊精类似物 (普兰林肽), 他汀类 (阿托伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀), 胆固醇吸收抑制剂 (依泽替米贝), ACE抑制剂 (雷米普利、卡托普利、赖诺普利), AT-II受体拮抗剂 (缬沙坦、替米沙坦), 大麻素受体拮抗剂 (利莫那班), 胆固醇酯转移蛋白, 或其组合。

[0234] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐,与抗高血压药组合施用。抗高血压药是任何降低血压的药物,包括但不限于钙通道阻断剂、血管紧张素转化酶抑制剂 (ACE抑制剂)、血管紧张素II受体拮抗剂 (A-II拮抗剂)、利尿剂、 β -肾上腺素能受体阻断剂 (β -阻断剂)、血管扩张剂和 α -肾上腺素能受体阻断剂 (α -阻断剂)。例如,钙通道阻断剂可以包括氨氯地平、贝普利地尔、氯仑西平、地尔硫卓、芬地林、戈洛帕米、米贝弗拉地尔、普尼替地尔、特罗地林、维拉帕米、阿拉尼地平、巴尼地平、贝尼地平、西尼地平、依福地平、依高地平、非洛地平 and/或伊拉地平。

[0235] 在一个实施方案中,血管紧张素转化酶抑制剂 (ACE-抑制剂) 可以包括但不限于阿拉普利、贝那普利、卡托普利、赖诺普利、喹那普利、替莫普利和/或群多普利。血管紧张素-II受体拮抗剂 (A-II拮抗剂) 包括但不限于坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦和/或缬沙坦。 β -阻断剂可以包括但不限于阿普洛尔、丁呋洛尔、依帕洛尔、茛诺洛尔、奈必洛尔、普萘洛尔、亚磺洛尔、替利洛尔、噻吗洛尔、托利洛尔和/或昔贝洛尔。 α -阻断剂可以包括但不限于氨磺洛尔、阿罗洛尔、达哌唑、芬司匹利、吲哚拉明、拉贝洛尔、哌唑嗪、坦洛新、妥拉唑林和/或育亨宾。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,与治疗代谢疾病的药剂一起施用。在一些实施方案中,治疗代谢疾病的药剂包括但不限于维生素、辅酶Q10、葡萄糖

苷酶 α 、碳酸氢钠、二膦酸盐、生物素、别嘌呤醇、左旋多巴、地西洋、苯巴比妥、氟哌啶醇、叶酸、抗氧化剂、阳离子通道活化剂、触珠蛋白和/或肉碱。

[0237] 在一个实施方案中,治疗代谢疾病的药剂是胰脂肪酶抑制剂如奥利司他或西替利司,胰岛素敏化剂如双胍、PPAR激动剂,双重作用PPAR激动剂如莫格列扎、特沙格列扎或那格列扎,PPAR- δ 激动剂,DPP-IV抑制剂如维格列汀或西他列汀, α 葡糖苷酶抑制剂如阿卡波糖,胰高血糖素样肽-1类似物如艾塞那肽或利拉鲁肽,糊精类似物如普兰林肽,他汀如阿托伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀或匹伐他汀,胆固醇吸收抑制剂如依泽替米贝,ACE抑制剂如雷米普利、卡托普利或赖诺普利,AT-II受体拮抗剂如缬沙坦或替米沙坦,大麻素受体拮抗剂如利莫那班或 β -3肾上腺素能激动剂。

[0238] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐,与维生素一起施用。在一些实施方案中,维生素包括但不限于维生素D、维生素E、维生素K、维生素B、维生素C或其组合。

[0239] 如本文所用,在一些实施方案中,术语“组合施用”和“与.....一起施用”可互换使用。

[0240] 在一个实施方案中,本发明提供了一种施用本发明的稳定液体制剂的方法。本发明的方法包括采用第一每周一次(QW)剂量的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的第一施用周期,接着是采用第二每周一次(QW)剂量的第二施用周期,然后施用药学上有效量的每周一次(QW)稳定液体剂型制剂,其中第二QW剂量大于第一QW剂量。在一个实施方案中,第一QW剂量是约1-20mg QW。在一个实施方案中,第二QW剂量是约10-50mg QW。在一个实施方案中,第一施用周期的第一QW剂量是约20mg QW,接着是提供40mg QW的第二QW剂量的第二施用周期。在一个实施方案中,第一施用周期为2周至6周、或2周至5周、或3周至5周。在其他实施方案中,第一施用周期是4周。在一个实施方案中,第二施用周期为2周至6周、或2周至5周、或3周至5周。在其他实施方案中,第二施用周期是4周。

[0241] 本发明的制剂基本上不含任何杂质。在一个实施方案中,本发明的制剂具有约10%或更少的总杂质、或约8.0%或更少的总杂质、或约7.0%或更少的总杂质、或约6.0%或更少的总杂质、或约5.0%或更少的总杂质、或约4.0%或更少的总杂质,约3%或更少的总杂质,约2%或更少的总杂质、或约1%或更少的总杂质。在一个实施方案中,本发明的制剂具有约5.0%或更少的任何一种杂质、约4.0%或更少的任何一种杂质、约3.5%或更少的任何一种杂质、约3.0%或更少的任何一种杂质、约2.5%或更少的任何一种杂质、约2.0%或更少的任何一种杂质、约1.5%或更少的任何一种杂质、约1.0%或更少的任何一种杂质、约0.5%或更少的任何一种杂质、约0.25%或更少的任何一种杂质、或约0.1%或更少的任何一种杂质。

[0242] 在一个实施方案中,本发明的制剂是OPK-88003注射液,其以包装在2mL透明火石玻璃小瓶中的1mL(可提取体积)无菌溶液提供。药品(式3)是含有70mg/mL OPK-88003(标示量)和非活性成分L-甲硫氨酸、山梨糖醇和三水合乙酸钠的pH为约4.5的澄清无色溶液。成分和定量制剂的完整列表如下所示。

[0243]	成分	功能	定量(mg/mL)
--------	----	----	-----------

式3 ^a	活性成分	70
L-甲硫氨酸	抗氧化剂	4.48
山梨糖醇	张力剂	38.26
三水合乙酸钠	缓冲液	1.36
氢氧化钠溶液1N ^b	pH调节	qs ^c
盐酸溶液1N ^b	pH调节	qs
注射用水	溶剂	适量至1 mL

[0244] 如果需要,考虑到“照原样”测定,调整式3的量。

[0245] ^b氢氧化钠溶液1N和盐酸溶液1N按照USP-NF级制备

[0246] 注射用水和试剂。

[0247] ^c足以调节pH值的量。

[0248] 本发明还包括稳定的液体制剂,其包含式3、式4或式5的化合物,或包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中任一项的化合物或其活性片段,其中所述制剂具有约3.5至约8.0或约4.0至约7.0的pH范围。在一个实施方案中,制剂基本上不含氯化钠。在一个实施方案中,本发明的制剂基本上不含半胱氨酸。制剂任选地包含选自有机碱、张力剂和不将制剂去稳定或对制剂产生不利影响的其他赋形剂。广义上讲,本发明的组合物或权利要求可包括OXM、本文或文献和专利文献中所述的任何OXM类似物以及相关或类似的GLP-1/胰高血糖素受体激动剂。例如,这些专利公开或专利包括US20150290324;US20110034374、US20150182593、US20150024066、US20150072924、US20150148289、US20090298757、US20140349922;US20150299282;美国专利8,415,926;美国专利8,415,296、美国专利8,367,607、US20110152182;US20140128318、US20170183383;US20140249299;美国专利8,263,084、US20130281374、US20160317623、美国专利8,729,017、W0/2016045400、W02008076933、US20130059780、US20170226175、US20170349642、US20100121032、US20110136737、US2013137631、美国专利9,663,565、US20150111246、美国专利9,301,938、美国专利9,758,562、US20170128589、US20170088598、US20130085104、US20120183617、US20140142023,所有这些专利据此以引用方式并入。

[0249] 术语OXM、“胃泌酸调节素”、“胃泌酸调节素类似物”、“胃泌酸调节素肽类似物”或“胃泌酸调节素衍生物”包括天然胃泌酸调节素和这样的肽的任何衍生物,其是制备的或在胃泌酸调节素(HSQGTGTSKYLDSSRAQDFVQWLMNKRNRNIA) (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列中含有取代、添加、缺失或翻译后修饰(甲基化、酰化、泛素化、分子内共价键),所有这些保留GLP-1和胰高血糖素受体之一或两者的性质和/或在其处具有改善的性质。这样的化合物可以包括具有SEQ ID NO:10-42(对应于来自US20170128589的序列4至36)和在第38位和/或39具有至少一个任选的半胱氨酸残基的那些。氨基酸和/或非典型氨基酸可从商业来源如Sigma-Aldrich等获得。此外,这样的化合物可以包括胃泌酸调节素(OXM)肽的衍生物或通过用官能团或聚合物修饰胃泌酸调节素(OXM)肽的任何氨基酸以及氨基酸的任何侧链或末端、在肽内掺入天然或非天然氨基酸和/或它们的衍生物和/或与其他肽交联获得的肽的变体。

[0250] 本发明还包括本发明的稳定液体制剂,例如具有式3化合物的制剂,在需要治疗的

患者中治疗糖尿病和/或肥胖和/或超重的用途。本发明包括稳定的聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物液体制剂,其在患有2型糖尿病、肥胖症或任何相关的医学病症、疾病或病况的患者中有效地降低HbA1c,所述患者是用GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗或可治疗的。

[0251] 本发明包括本发明的稳定的聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物液体制剂的用途,其在患有由或能够由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗的2型糖尿病、肥胖症或任何相关医学病症、疾病或病况的患者中有效地降低HbA1c,并且进一步降低体重和/或改变空腹血糖(FPG)。

[0252] 本发明包括治疗需要其治疗的患者中的2型糖尿病、肥胖症或任何相关的由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗或可治疗的医学病症、疾病或状况的方法,其包括给患者施用本发明的稳定液体制剂,例如具有式3的聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物的制剂。

[0253] 本文所用的术语“聚乙二醇化”是指将一个或多个本文所述的聚(乙二醇)(PEG)分子与本文所述的OXM类似物附接。PEG基团可直接或通过连接基团共价连接到OXM分子上,而“聚乙二醇化”是指具有PEG取代基附接到其上的OXM类似物。

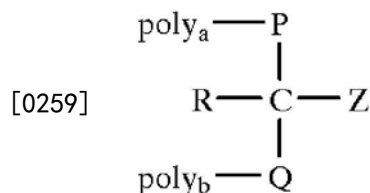
[0254] 胃泌酸调节素(OXM)肽类似物的聚乙二醇化可以通过与可用的氨基或巯基(sulfhydryl)基团反应而进行,所述氨基或巯基基团主要在OXM组分上,与具有反应性官能团的PEG反应,包括但不限于叠氮化物、碳酸酯、酯、醛、丙烯酸酯、羧基、碳二亚胺、羰基咪唑、二氯三嗪、环氧基、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、硝基苯基碳酸酯、邻吡啶基二硫化物、吡啶基氧羰基、琥珀酰亚胺基碳酸酯、琥珀酰亚胺基戊二酸酯、琥珀酰亚胺基甲基丁酸酯、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、琥珀酸、巯基、三氟乙基磺酸酯(tresylate)、乙烯基砜等。

[0255] 术语“PEG”或用于聚乙二醇化的“PEG”是指任何聚乙二醇分子,具有任何大小或修饰的聚乙二醇分子。PEG可以具有直链、支链或多臂结构,并且可以是单、双或多官能形式。PEG可以是取代的或未取代的,只要至少一个反应位点可用于取代或反应。PEG的平均分子量可以为200至100,000。这里使用的PEG是可商购的(NOP Corporation, Kawasaki-Shi, Kanagawa, Japan)或者可以根据本领域普通技术人员已知的方法通过乙二醇的聚合制备。

[0256] 例如,PEG可以是具有式 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ 的末端羟基的线性聚合物,其中n为约5至约4,000。在一个实施方案中,n为约5至约2,500,或约8至约2,500,或约30至约2,000,或约35至约2,000,或约35至约1,500,或约35至约1,000,或约35至约750。末端氢可以用封端基团如烷基部分例如甲基取代,或者它可以是附接到可以通过共价键与胃泌酸调节素反应的接头部分的末端羟基。因此,PEG可以直接或间接地附接至胃泌酸调节素肽类似物。例如,接头部分可以是与胃泌酸调节素肽类似物的胺基(包括但不限于赖氨酸的ε胺或N-末端)连接的酰胺、氨基甲酸酯或脲。另选地,接头部分可以是与巯基基团(包括但不限于半胱氨酸的巯基基团)连接的马来酰亚胺。在一个实施方案中,PEG分子是mPEG-20kDa马来酰亚胺,它与胃泌酸调节素肽类似物上的至少一个半胱氨酸反应,形成用于本发明液体制剂的聚乙二醇化OXM肽类似物。

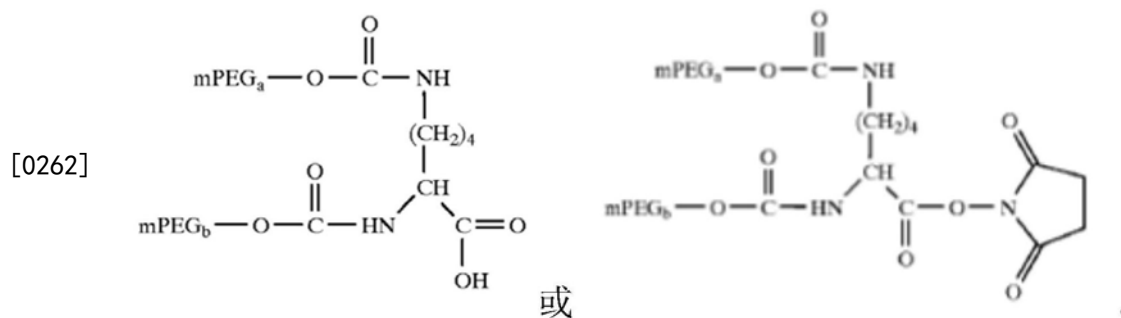
[0257] 在一个实施方案中,如据此以引用方式并入的美国专利5,900,461中所述,在每端具有活性羟基的直链PEG可以在一端或两端用具有类似反应性的乙烯基砜($-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$)或其前体或衍生物(例如 $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X}$,其中X是卤素)活化以变成双官能的。PEG乙烯基砜是稳定的和可分离的,并且对于与分子上的巯基部分偶联以形成巯基选择性的、水解稳定的键是高度选择性的。

[0258] PEG可以是支链的或“多臂的”。例如,如据此以引用方式并入的美国专利5,932,462所述,支链或多臂聚合物可具有以下结构

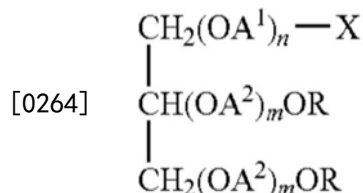


[0260] 其中

[0261] Poly_a和Poly_b各自表示如上所述的HO-CH₂CH₂-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-部分,并且Poly_a和Poly_b中的至少一个被基本上非反应性端基封端,例如CH₃O-CH₂CH₂-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-部分(“mPEG-”);C表示碳;P和Q表示连接片段,它们可以相同或不同,并且通过连接片段中的水解稳定的连接分别将聚合物臂Poly_a和Poly_b连接到C上;R可以是H或基本上非反应性部分,例如烷基;且部分-Z可以是具有对亲核部分有反应性的单一位点的部分,或者可以被转化成对亲核部分有反应性的位点的部分,以及亲核部分和具有对亲核部分有反应性的单一位点的部分的反应产物。这种支链或多臂PEG可以具有以下结构:



[0263] 如美国专利7,851,491中所述,其通过引用结合在此,多臂PEG可以具有以下结构:



[0265] 其中R是具有1-24个碳原子的烃基,OA¹和OA²各自是氧乙烯基,n是0-1000,m是10-1000,和X表示官能团,例如选自Cl、Br和I的卤素原子,其能够与胃泌酸调节素(OXM)肽类似物化学反应。

[0266] 在一个实施方案中,支链聚乙二醇可以 $R[-\text{PEG}(\text{linear})-\text{OH}]_m$ 的一般形式表示,其中R表示核心部分,例如甘油或季戊四醇,m表示臂的数目,如美国专利6,436,386中所述,该专利据此以引用方式并入。

[0267] 在一个实施方案中,PEG可以具有以下结构: $T-L-POLY_a-R(-POLY_b-X)_q$,并且 $POLY_a$ 和 $POLY_b$ 是 $O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-$,并且R是中心核分子,如氨基酸或多元醇(例如,三羟甲基丙烷,二-三羟甲基丙烷,甘油,季戊四醇,山梨糖醇,赖氨酸,和二-赖氨酸);L是接头,T是二磷酸盐,Q是2至约300的整数;X可以是保护或未保护的化学反应性基团。

[0268] 在一个实施方案中,双官能PEG衍生物可以具有Y-PEG-X的结构,其中第一官能团X和第二官能团Y是能够与希望PEG衍生物与之缀合的其他分子反应的反应性部分,例如胃泌

酸调节素或其类似物,如美国专利6,448,369中所述,该专利据此以引用方式并入。官能团X和Y的实例包括但不限于甲磺酸酯;甲苯磺酸酯;三氟乙基磺酸酯; $-O-(CH_2)_n-CO_2H$,其中 $n=1-6$; $-O-(CH_2)_n-CO_2R^3$,其中 $n=1-6$ 并且 R^3 是烷基基团; $-NHR^4$,其中 R^4 是H或烷基或胺保护基如t-Boc和Fmoc; $-O-(CH_2)_n-CH(ZR^5)_2$,其中 n 是1-6的数, Z 是O或S, R^5 是H或烷基; $-O-(CH_2)_n-CHO$;以及 $O_2CCH_2CH_2CO_2R^6$,其中 R^6 是H或NHS,其表示N-琥珀酰亚胺基。

[0269] 在一个实施方案中,PEG可以含有聚合物衍生物,该聚合物衍生物包含水溶性和非肽聚合物主链,该主链具有至少一个键合到以下结构上的末端: $-W-T$,其中W是水解不稳定的酯键,选自 $-O_2C-(CH_2)_n-O-$ 、 $-O-(CH_2)_n-CO_2-(CH_2)_m-$ 、 $-O-(CH_2)_n-CO_2-(CH_2)_m-O-$ 、 $-(CH_2)_n-OPo_3-(CH_2)_m-$ 和 $-O-(CH_2)_n-CO_2-(CHR)_m-$,其中每个R是H或烷基,条件是至少一个R是烷基, n 是约1至约5, m 是约1至约5,T是反应基团,例如 $-COOH$ 、 $-CO_2$ -琥珀酰亚胺基、 $-CO_2$ -磺基琥珀酰亚胺基、 $-CO_2$ -对硝基苯基和吡啶基二硫化物。这种PEG可以在美国专利6,515,100中找到,其通过引用并入本文。这样的PEG的实例可以包括,但不限于

[0270] $CH_3-O-PEG-O-(CH_2)_n-CO_2-(CH_2)_m-COOH$ 、 $HOO-C-(CH_2)_m-O_2C-(CH_2)_n-O-PEG-O-(CH_2)_n-CO_2-(CH_2)_m-COOH$ 、 $NHS-O_2C-(CH_2)_m-O_2C-(CH_2)_n-O-PEG-O-(CH_2)_n-CO_2-(CH_2)_m-CO_2-NHS$ (NHS是琥珀酰亚胺基)。

[0271] 在一个实施方案中,含有醛官能团的PEG (PEG-醛) 自发地与胃泌酸调节素肽类似物中的半胱氨酸残基的胺和硫醇官能团反应,如美国专利公开号2010/0016550A1中所述,其据此以引用方式并入。PEG和胃泌酸调节素肽类似物之间新产生的官能团是1,3-噻唑烷。这样的PEG可以提供胃泌酸调节素肽类似物的位点特异性聚乙二醇化。

[0272] 在一个实施方案中,用于本发明的PEG可以具有不同的分子量(例如,2-40kDa),具有线性、支链和/或多臂结构,并且含有一个或多个官能团。当使用含有两个官能团的PEG时,最终产物将是OXM二聚体,而在它们之间的接头是PEG。具有多个官能团的PEG将产生聚乙二醇化OXM的多聚体。

[0273] 在一个实施方案中,术语“聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物”、“聚乙二醇化胃泌酸调节剂化合物”、“聚乙二醇化胃泌酸调节素”和“聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物”在本文中可互换使用。在一个实施方案中,胃泌酸调节素肽类似物指聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0274] 在一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物是OPK-88003 (式3)。在一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物是式4。在一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物是式5。

[0275] 用于本文制剂中的胃泌酸调节素肽类似物可以如美国专利8,367,607或美国专利8,415,296中所述制备,其据此以引用的方式整体并入。此外,本发明的化合物可以如实施方案1和图1中所述制备。一般而言,将Fmoc-Rink酰胺MBHA树脂脱保护(哌啶/DMF),然后在适当的溶剂中将第一氨基酸(Fmoc-Cys(Trt)-OH)偶联到树脂上。重复脱保护步骤,并使用选择的受保护氨基酸制备所选的多肽类似物。从树脂上裂解并脱保护,得到目标多肽。在优选的实施方案中,酰胺在从树脂上裂解的氨基酸C末端形成。

[0276] 根据SEQ ID NO:1-9和式3、4和5的肽类似物通过在蛋白质技术公司Symphony或应用生物系统433A自动肽合成仪上固相肽合成产生。在Fmoc-Rink酰胺聚苯乙烯树脂(Rapp Polymere Tubigen, Germany)上进行合成,取代度为约0.7mmol/g。该合成使用Fmoc主链保

护基团策略进行。所用氨基酸侧链衍生物是:Arg (Pbf)、Asn (Trt)、Asp (OtBu)、Cys (Trt)、Gln (Trt)、Glu (OtBu)、His (Trt)、Lys (boc)、Ser (OtBu)、Thr (OtBu)、Trp (Boc) 和Tyr (OtBu)。用约10当量的用二异丙基碳二亚胺(DIC)和羟基苯并三唑(HOBT)活化的氨基酸(1:1:1摩尔比)在二甲基甲酰胺(DMF)或N-甲基吡咯烷酮(NMP)中进行偶联。偶联在室温下进行45-90分钟。

[0277] 伴随的从树脂上裂解和侧链保护基团的去除在含有三氟乙酸(TFA)的溶液中进行:三异丙基硅烷:3,6-二氧杂-1,8-辛烷-二硫醇:甲醇:苯甲醚90:4:2:2:2(v/v)在室温下反应1.5-2小时。过滤溶液并浓缩至小于2mL,用冷乙醚沉淀肽,再溶解于30-40mL的10%乙腈中,并在C₁₈反相高效液相色谱柱上以12-15mL/min的流速纯化。

[0278] 用0至25%B的两级线性AB梯度经20分钟洗脱样品,随后用25至75%B经100分钟洗脱,其中A=0.05%TFA/水,B=0.05%TFA/乙腈。产物通常在30-35%乙腈处洗脱。肽纯度和分子量在具有单个四极MS检测器的Agilent 1100系列液相色谱-质谱仪上确认。将肽类似物纯化至>95%纯度。盐可以由裂解的多肽形成,优选羧酸盐(例如三氟乙酸盐)。然后将所得TFA盐用于最后的聚乙二醇化步骤。阳离子清除剂用于防止衍生自裂解树脂的酰胺的烷基化。

[0279] 然后对获得的肽进行聚乙二醇化。通常,根据所需材料的量,称出适当序列的冻干肽类似物或其盐,例如SEQ ID NO:1-9和式3、4和5或如本文或美国专利8,367,607或美国专利8,415,296中另外显示的。小规模合成可以从例如30-50mg开始。称出2.5倍摩尔当量的具有所需分子量和化学结构的mPEG(例如mPEG-20kDa 马来酰亚胺) $(CH_3O(CH_2CH_2)_n-(CH_2)_3NHCOC(CH_2)_2-$ 马来酰亚胺),并与SEQ ID NO:1或2的肽合并。将反应物溶解在50/50(v/v)水/乙腈混合物中,使肽浓度为约20mg/mL。用100mM乙酸铵、10mM乙二胺四乙酸(EDTA),pH7将肽类似物溶液稀释两倍。通过分析型反相HPLC监测所得混合物,反应在大约两小时后完成。然后如上所述(离子交换,反相HPLC)稀释和纯化聚乙二醇化的化合物以形成具有式3的纯化形式或目标聚乙二醇化衍生物。在优选的实施方案中,纯化形式是盐的形式,例如乙酸盐。纯化的化合物可以是结晶或无定形形式。反应基本上按比例放大以获得临床或商业用途所需的足够量。

[0280] 因此,本发明提供了制备聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的药学上可接受的盐的方法。在另一个实施方案中,本发明提供了制备聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的方法。

[0281] 例如,本发明提供制备聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的乙酸盐的方法,其包括

[0282] (a) 将胃泌酸调节素(OXM)肽类似物溶解在缓冲溶液中以形成OXM肽类似物溶液,其中所述缓冲溶液具有约6.6至约7.0的pH值;

[0283] (b) 将所述OXM肽类似物溶液加入搅拌的PEG溶液中以产生含有粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物的反应混合物,其中通过将PEG溶解在与溶解步骤(a)的所述OXM肽类似物的缓冲溶液相同的缓冲溶液中来形成PEG溶液;

[0284] (c) 将反应混合物的pH用乙酸调节至约3.95至约4.05;以及

[0285] (d) 在HPLC柱上用一定梯度的乙腈和稀乙酸水溶液纯化所述粗制的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物,随后浓缩并冻干以提供所述聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物

的乙酸盐。

[0286] 在一个实施方案中,步骤(d)的HPLC柱是反相HPLC柱。在一个实施方案中,本发明的方法还包括在步骤(d)之前在阳离子交换HPLC柱上纯化粗制聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物的步骤。在一个实施方案中,通过本发明的方法制备的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物是式3、4或5的化合物。在其他实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物产物是式3的化合物。

[0287] 在一个实施方案中,本发明方法中的缓冲溶液是乙腈和乙酸铵缓冲液的溶液。在一个实施方案中,本发明方法中的PEG具有本文所述的分子量。在一个实施方案中,本发明方法中的PEG具有约20kDa,或约30kDa,或约40kDa的分子量。在一个实施方案中,PEG含有接头。在一个实施方案中,接头是马来酰亚胺接头。在某些实施方案中,PEG是式1的化合物。

[0288] 在另一个方面,本发明进一步提供如本文所述的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的药学上可接受的盐,例如,包含SEQ ID NO:1-9或其活性片段中的任何一个的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物,或由式3、式4或式5表示的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物。

[0289] 本文所述的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的药学上可接受的盐可以通过使酸与聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的碱性基团例如氨基官能团反应,或使碱与聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的酸性基团例如羧酸官能团反应来形成。在一个实施方案中,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的药学上可接受的盐是聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物中的氨基官能团,例如赖氨酸或其他氨基酸的氨基的酸加成盐。

[0290] 如本文所述的聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物的氨基的合适的药学上可接受的盐可以从无机酸或从有机酸制备。胺的无机盐的实例包括但不限于硫酸氢盐、硼酸盐、溴化物、氯化物、半硫酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、2-羟乙基磺酸盐(羟基乙烷磺酸盐)、碘酸盐、碘化物、异硫氰酸盐、硝酸盐、过硫酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氨基磺酸盐、磺胺酸盐、磺酸(烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、卤素取代的烷基磺酸盐、卤素取代的芳基磺酸盐)、磺酸盐和硫氰酸盐。

[0291] 在一个实施方案中,胺的有机盐的实例包括但不限于:有机酸的脂族、脂环族、芳族、芳脂族、杂环、羧酸和磺酸类别,这些盐的实例是乙酸盐、精氨酸盐、天冬氨酸盐、抗坏血酸盐、己二酸盐、邻氨基苯甲酸盐、藻酸盐、烷烃羧酸盐、取代的烷烃羧酸盐、海藻酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、羧酸盐、柠檬酸盐、樟脑磺酸盐、樟脑磺酸盐、环己基氨基磺酸盐、环戊丙酸盐、乙二胺四乙酸钙、樟脑磺酸盐、碳酸盐、克拉维酸盐、肉桂酸盐、二羧酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基磺酸盐、二盐酸盐、癸酸盐、庚酸盐、乙烷磺酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、硫酸月桂酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、甲酸盐、氟化物、半乳糖醛酸葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、葡庚糖酸盐、羟乙酰氨基苯磺酸盐、戊二酸盐、谷氨酸盐、庚酸盐、己酸盐、羟基马来酸盐、羟基羧酸盐、己基间苯二酸盐、羟基苯甲酸盐、羟基萘甲酸盐、氢氟酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、亚甲基双(β-氧萘甲酸盐)、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲烷磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐甲基磺酸盐、马来酸一钾、粘液酸盐、单羧酸盐、硝酸盐、萘磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、萘甲酸盐、N-甲基葡萄糖胺、草酸盐、辛酸盐、油酸盐、巴莫酸盐、苯基乙酸盐、苦味酸盐、苯基苯甲酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、邻苯二甲酸盐、果胶酸盐、苯基丙酸盐、棕榈酸盐、泛酸盐、聚半乳糖酸盐、丙酮酸盐、奎宁酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硬脂酸盐、磺胺酸盐、碱式乙酸盐、酒石酸盐、茶碱乙酸盐、对甲苯磺酸盐(甲苯磺酸盐)、

三氟乙酸盐、对苯二甲酸盐、单宁酸盐、茶氯酸盐、三卤乙酸盐、三碘季铵、三羧酸盐、十一酸盐和戊酸盐。

[0292] 在一个实施方案中,无机酸包括但不限于二硫化氢、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸,有机酸包括但不限于对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、抗坏血酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、乳酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸,以及相关的无机和有机酸。因此,此类药学上可接受的盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 β -羟基丁酸盐、羟乙酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐和其他盐。

[0293] 在一个实施方案中,羧酸或酚的无机盐的实例可以选自铵盐、碱金属盐(包括锂盐、钠盐、钾盐、铯盐);碱土金属盐(包括钙盐、镁盐、铝盐);锌盐、钡盐、胆碱盐、季铵盐。

[0294] 在另一个实施方案中,羧酸或酚的有机盐的实例可以选自:精氨酸盐、有机胺(包括脂族有机胺、脂环族有机胺、芳族有机胺)、苄乙二胺、叔丁胺、苄乙胺(N-苄基苄乙胺)、二环己胺、二甲胺、二乙醇胺、乙醇胺、乙二胺、海巴明、咪唑、赖氨酸盐、甲胺、麦角胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、N,N'-二苄基乙二胺、烟酰胺、鸟氨酸盐、吡啶、皮考啉、哌嗪、普鲁卡因、三(羟甲基)甲胺、三乙胺、三乙醇胺、三甲胺、氨基丁三醇和脲。

[0295] 通常用于形成如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的药学上可接受的盐的碱包括但不限于碱金属(包括钠、钾和锂)的氢氧化物;碱土金属如钙和镁的氢氧化物;其他金属如铝和锌的氢氧化物;氨,有机胺,例如未取代或羟基取代的单-、二-或三-烷基胺,二环己基胺;三丁胺;吡啶;N-甲基,N-乙胺;二乙胺;三乙胺;单-、双-或三-(2-OH-(C1-C6)-烷基胺),例如N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三-(2-羟乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;吗啉;硫代吗啉;哌啶;吡咯烷;以及氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸等。

[0296] 在一个实施方案中,盐可以通过常规手段,诸如通过使产物的游离碱或游离酸形式与一个或多个当量的合适的酸或碱在盐不溶性溶剂或介质或者在诸如水的溶剂中反应来形成,所述溶剂或介质可以在真空中或通过冷冻干燥或者通过将现有盐的离子交换为另一种离子或者通过合适的离子交换树脂来除去。在一个实施方案中,药学上可接受的盐通过本文所述的方法制备。

[0297] 本发明还提供GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的药学上可接受的盐,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、式4或式5表示。在一个实施方案中,所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中,本发明的药学上可接受的盐是盐酸盐、氢溴酸盐、抗坏血酸盐、马来酸盐或乙酸盐。在一个实施方案中,盐是乙酸盐。在一个实施方案中,盐是盐酸盐。

[0298] 在一个面,本发明提供了结晶或无定形形式的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂

(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的盐酸盐或乙酸盐,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、式4或式5表示。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中,乙酸盐为结晶或无定形形式

[0299] 因此,在另一个方面,本发明提供了如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的乙酸盐。例如,本发明提供式3化合物的乙酸盐。在一个实施方案中,本发明提供式4化合物的乙酸盐。在另一个实施方案中,本发明提供式5化合物的乙酸盐。在一个实施方案中,本发明化合物的乙酸盐为结晶或无定形形式。在一个实施方案中,本发明化合物的乙酸盐为无定形形式。

[0300] 此外,本发明提供本发明化合物的盐酸盐。例如,本发明提供式3化合物的盐酸盐。在一个实施方案中,本发明提供式4化合物的盐酸盐。在另一个实施方案中,本发明提供式5化合物的盐酸盐。在一个实施方案中,本发明化合物的盐酸盐是结晶或无定形形式。在一个实施方案中,本发明化合物的盐酸盐是无定形形式。

[0301] 在另一个方面,本发明提供GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其包含GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的乙酸盐和药学上可接受的赋形剂,其中所述GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂包含SEQ ID NO:1-9中的任一者或其活性片段,或由式3、式4或式5表示。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂由式3的化合物表示。在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂是式3的化合物的乙酸盐。在一个实施方案中,本发明提供了GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂,其包含本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂的乙酸盐和水性缓冲溶液,其中所述制剂具有约3.5至约8.0的pH范围,以及一种或多种额外的药学上可接受的赋形剂。

[0302] 如以引用方式并入的美国专利8,367,607和美国专利8,415,296中所述,本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂诸如聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物可用于治疗2型糖尿病、1型糖尿病、肥胖症或任何相关的医学病症、疾病或病况,所述病症、疾病或病况由或能够由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗。包含GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂(例如,聚乙二醇化胃泌酸调节素肽类似物)的本发明的制剂能够引起需要其治疗的患者的食物摄入减少,并因此可用于治疗体重增加和/或肥胖和/或治疗代谢病症。本发明的制剂导致患有2型糖尿病和/或相关代谢疾病或病症和/或肥胖症或任何相关医学病症、疾病或病况的患者中改善的葡萄糖耐量和脂质分布,所述病症、疾病或病况由或能够由GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗。

[0303] 除了糖尿病和肥胖症患者、具有葡萄糖耐量减低或空腹葡萄糖减低的患者、具有高于受试者的身高和体格的正常体重约25%或更多的体重的患者、患有妊娠糖尿病的患者、具有代谢障碍的患者,也可以用本发明的改进的稳定制剂治疗。其他可用本发明的制剂治疗的疾病包括青春晚期糖尿病(MODY);潜伏性自身免疫性糖尿病、妊娠糖尿病、代谢综合征X、血脂异常、高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症和胰岛素抗性。本发明的制剂还可用于治疗糖皮质激素过量、生长激素过量、嗜铬细胞瘤和药物诱导的糖尿病。

[0304] 本发明的制剂可以肠胃外给药。这包括通过肌内、静脉内、皮下、皮内或腹膜内方式全身给药。如本文所述,聚乙二醇化类似物形式的活性药物部分被施用给需要治疗的受试者。这样的受试者包括哺乳动物,例如人和动物(农场动物、伴侣动物等)。

[0305] 在一个实施方案中,本发明提供了施用如本文所述的本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐的方法。在一个实施方案中,所述方法包括通过缓慢剂量滴定方案向患者施用本发明的稳定液体制剂。例如,所述方法包括采用第一QW剂量的第一每周一次(QW)施用周期,接着是提供剂量递增的本发明化合物的第二每周一次(QW)施用周期,并且第二QW剂量大于第一QW剂量。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少0.25-2.0倍(例如,0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.50、1.75或2.0倍)。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少0.5倍。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少0.75倍。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少1.0倍。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少1.25倍。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少1.5倍。在一个实施方案中,第二QW剂量是第一QW剂量的至少1.75倍。

[0306] 在一个实施方案中,所述方法还包括至少再一个(例如第三个)施用周期,所述施用周期提供本发明化合物的剂量递增至相对于第二QW剂量更高的QW剂量。例如,所述方法还包括在第二个施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少约0.25-2.0(例如,0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.50、1.75或2.0)倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少0.25倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少0.5倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少0.75倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少1倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少1.25倍的QW剂量。在一个实施方案中,所述方法还包括在第二施用周期之后的至少再一个施用周期,提供是第二QW剂量的至少1.5倍的QW剂量。

[0307] 第一QW剂量的施用在至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周的第一施用周期内是连续的。第二QW剂量的施用在至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周的第二施用周期内是连续的。在一个实施方案中,第二QW剂量大于第一QW剂量。当所述方法还包括至少再一个(例如,第三个)施用周期,所述施用周期提供本发明化合物的剂量递增至相对于第二QW剂量更高的QW剂量时,另外的(例如,第三个)施用周期是连续的,持续至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周。

[0308] 一旦受试者已经完成了第一次低周剂量的初始滴定期,就将剂量递增至维持剂量。在一个实施方案中,一旦患者已经完成了具有第一低每周一次(QW)剂量的初始滴定期,就将剂量递增至第二(高于第一)每周一次剂量,任选地递增至第三(高于第二)每周一次剂量,直至将剂量递增至更高的每周一次维持剂量。技术人员能够确定第一、或第二、或任选第三每周一次剂量和随后每周一次维持剂量的合适剂量(关于安全性和功效)。剂量递增允许受试者在逐渐暴露于治疗的同时接受治疗益处。这样的施用方案改善了患者在治疗期间的耐受性,并降低了副作用的发生率。

[0309] 通常,剂量递增是从低剂量的药物,例如,约1-30(例如,1、2、3、5、10、12、15、20、25或30)mg QW到大于低剂量的高剂量,到至少约15-50(例如,15、20、25、30、35、40、45或50)mg

QW,进一步到至少约40-80(例如,40、45、50、55、60、65、70、75或80)mg QW。在一个实施方案中,第一QW剂量例如是从约1mg QW至约20mg QW,接着剂量递增至从约10mg QW至约50mg QW的第二QW剂量,接着是从约40mg QW至约80mg QW的第三QW剂量(或维持剂量)。在一个实施方案中,受试者接受20mg QW剂量4周,接着接受4周的40mg QW剂量,接着接受70mg QW的维持剂量。在一个实施方案中,受试者接受20mg QW剂量4周,接着接受4周的40mg QW剂量,接着接受80mg QW的维持剂量。

[0310] 在一个实施方案中,第一QW剂量是从约1mg QW至约20mg QW,例如,从约3mg QW至约20mg QW,从约5mg QW至约20mg QW,从约8mg QW至约20mg QW,从约10mg QW至约20mg QW,或从约15mg QW至约20mg QW。在一个实施方案中,第二mg QW剂量是从约10mg QW至约50mg QW,从约15mg QW至约50mg QW,从约20mg QW至约50mg QW,从约25mg QW至约50mg QW,从约30mg QW至约50mg QW,从约35mg QW至约50mg QW,或从约40mg QW至约50mg QW。在一个实施方案中,第三mg QW剂量是从约40mg QW至约100mg QW,从约45mg QW至约100mg QW,从约50mg QW至约100mg QW,从约55mg QW至约100mg QW,从约60mg QW至约100mg QW,从约65mg QW至约100mg QW,从约70mg QW至约100mg QW,从约75mg QW至约100mg QW,从约80mg QW至约100mg QW,从约85mg QW至约100mg QW,或从约90mg QW至约100mg QW。在一个实施方案中,第三mg QW剂量是维持mg QW剂量。

[0311] 在一个实施方案中,GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或包含其的制剂的示例性剂量递增包括但不限于施用约10mg QW接着施用约20mg QW;或施用约10mg QW接着施用约30mg QW,或施用约10mg QW接着施用约40mg QW,或施用约10mg QW接着施用约50mg QW,或施用约10mg QW接着施用约60mg QW,或施用约10mg QW接着施用约70mg QW,或施用约10mg QW接着施用约80mg QW,施用约15mg QW接着施用约20mg QW,或施用约15mg QW接着施用约30mg QW,或施用约15mg QW接着施用约40mg QW,或施用约15mg QW接着施用约50mg QW,或施用约15mg QW接着施用约60mg QW,或施用约15mg QW接着施用约70mg QW,或施用约15mg QW接着施用约80mg QW,或施用约20mg QW接着施用约30mg QW,或施用约20mg QW接着施用约40mg QW,或施用约20mg QW接着施用约50mg QW,或施用约20mg QW接着施用约60mg QW,或施用约20mg QW接着施用约70mg QW,或施用约20mg QW接着施用约80mg QW,或施用约40mg QW接着施用约50mg QW,或施用约40mg QW接着施用约60mg QW,或施用约40mg QW接着施用约70mg QW,about 40mg QW接着施用约80mg QW,或施用约50mg QW接着施用约60mg QW,或施用约50mg QW接着施用约70mg QW,或施用约50mg QW接着施用约80mg QW;或施用约60mg QW接着施用约70mg QW,或施用约60mg QW接着施用约80mg QW。

[0312] 或者,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学上可接受的盐可每周两次、或每两天一次、或每天一次施用,代替或替换如上所述的每周一次(QW)剂量施用。在一个实施方案中,本发明的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂制剂或如本文所述的GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂或其药学可接受的盐可以每周一次、每两周一次或以更长的剂量间隔施用。

[0313] 在另一个方面,本发明提供胃酸调节素肽类似物和包含胃酸调节素肽类似物的制剂及其在治疗糖尿病和/或肥胖症中的用途。据此以引用方式并入的美国专利8,367,607和美国专利8,415,296要求并公开了本文使用的多种胃酸调节素类似物聚乙二醇化衍生物,并公开了其合成。

[0314] 用于将这些分子递送至患者的一种有效给药方案是每周一次(QD)给药方案。优选的递送途径是通过使用液体制剂的皮下施用。除了有效之外,本文所述的液体制剂中的特定分子需要是无菌的,并且出于质量/安全/递送目的和出于货架期目的,化学和物理上都是稳定的。用于评估化学和物理稳定性的参数包括但不限于外观(颜色、透明度等)、pH、纯度、杂质、分析、单体纯度、%聚集体、颗粒物质、显微镜可见的颗粒、肽图谱分析、效力(体外活性)、重量摩尔渗透压浓度和粘度。对尝试的OXM液体制剂施加各种应力条件以确定提供最佳物理和化学稳定性的制剂。

[0315] 本发明人已经发现,虽然典型的包含氯化钠的等渗溶液通常适合于递送液体或肠胃外制剂中的药物,但是在包含聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物的溶液中存在氯化钠出乎意料地引起不稳定性问题。此外,加入本文所述的聚乙二醇化胃泌酸调节素化合物或类似物令人惊讶地引起pH升高超过优选范围。因此,本发明人发现了符合必需的物理和化学稳定性标准的本发明液体制剂。通过发现本文的稳定液体制剂,本发明人已经避免了使用药物的固体分散体(即冻干的或其他)的需要,所述固体分散体需要在施用至患者之前用水或盐水溶液重构。此外,该制剂作为冷藏液体是稳定的,并且不需要冷冻来保持稳定性,允许在预填充注射器或药筒中而不是小瓶中储存,并且使得患者更容易在家中使用。因此,患者或医疗专业人员可以从预填充注射器、药筒或填充的小瓶“直接施用”剂型,而不采取重构粉末制剂的额外步骤,和/或此类个体不能使用不存在此类稳定液体制剂的预填充注射器(或预填充小瓶)。

[0316] 因此,本发明解决了以合适的剂量向需要治疗的患者有效递送制剂(例如,每周一次的制剂)的需要,并涉及有效降低用于确定GLP-1和/或胰高血糖素受体激动剂治疗或可治疗的2型糖尿病或肥胖或任何相关医学病症、疾病或状况的每个标准,包括将FPG降低至低于126mg/dL和/或将2-h PG降低至低于200mg/dL,以及将A1C降低至低于6.5%(48mmol/mol)和将PG降低至低于200mg/dL。

[0317] 实施例

[0318] 实施例1:本发明化合物的乙酸盐的制备

[0319] 本发明的化合物通过固相肽合成(SPPS)和色谱纯化来制备。

[0320] 固相肽合成(SPPS)

[0321] 化合物的固相肽合成(SPPS)根据世界范围内常规开发和使用的标准方法和规程进行。SPPS是通过重复包括以下步骤的循环来顺序合成锚定在固体支持物上的肽链:除去肽res(或用于第一次脱保护的树脂)中N-末端Fmoc保护基,洗涤,偶联下一个活化的氨基酸,乙酰化封端,并洗涤。重复该循环直到如下所述合成所需肽的序列。

[0322] 为了合成本发明的化合物,用碱敏感性9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)保护每个氨基酸的 α -氨基,同时用酸不稳定性基团保护侧链官能团。所有使用的氨基酸衍生物都是可商购的(图1)。

[0323] 例如,对于式3化合物,三氟乙酸酯关键中间体装配在Fmoc-Rink酰胺树脂上。用DMF中的哌啶除去Rink酰胺树脂的Fmoc基团。用DMF和IPA洗涤后,取出少量树脂样品并进行茚三酮/Kaiser或氯醌过程中对照试验。它是测量残余树脂结合的胺基团的颜色测试。该测试应该是阳性的以证实游离胺基的存在。

[0324] 在DMF中用DIC/HOBt或HBTu/DIPEA/HOBt进行Fmoc保护的氨基酸的偶联,用可变的

氨基酸当量进行活化。

[0325] 在偶联阶段,如果发现茚三酮试验为阴性或略微阳性,表明有少量未反应的胺,则用乙酸酐和DIPEA在DMF中乙酰化肽树脂。如果试验显示偶联不完全(阳性反应),则进行Fmoc-氨基酸的延长或再偶联。

[0326] 在Fmoc裂解阶段,N-末端Fmoc-基团用DMF中的哌啶裂解。过滤溶液,肽树脂用DMF洗涤,然后用乙醚洗涤,真空干燥至恒重。

[0327] 从树脂上裂解肽并脱保护:通过在阳离子清除剂(TIPS,DTE和H₂O)存在下用TFA处理受保护的肽树脂,从树脂上裂解粗肽。这导致肽从树脂上伴随裂解以及从肽上除去侧链保护基团。在浓缩步骤中除去溶剂,在乙醚中沉淀后,干燥残余物,得到粗制的脱保护的肽。

[0328] 关键中间体的纯化

[0329] 粗肽溶液通过制备HPLC纯化,使用反相硅胶,用甲醇洗涤,并用稀TFA水溶液预平衡。通过应用乙腈在稀TFA水溶液(环境温度)中的梯度从柱上洗脱吸附的肽。

[0330] 在中间洗涤后,将获得的合并的纯级分再施加到相同的柱上,并用稀TFA水溶液预平衡。通过应用0.1M高氯酸钠(pH调节至3.1)中的乙腈和乙腈梯度从柱洗脱吸附的肽。

[0331] 使用如前所述的相同柱和预洗涤/平衡顺序将获得的合并的纯馏分纯化最后一次。使用由TFA水溶液和乙腈组成的梯度洗脱肽。合并级分并通过冻干分离。

[0332] 关键中间体的冻干:将纯化步骤的冻干产物的合并物在含5%乙腈的稀TFA水溶液中重构,冻干为最终的式3三氟乙酸盐关键中间体。

[0333] 聚乙二醇化:将式3三氟乙酸盐关键中间体溶解在乙腈和乙酸铵缓冲液的溶液中,其中使用氢氧化铵或乙酸将pH适当地调节至约6.6至7.0。将该溶液加入到含有搅拌的PEG(~20kDa)马来酰亚胺连接物溶液的烧瓶中,所述马来酰亚胺连接物溶解在用于溶解肽的相同缓冲溶液中。反应进程用HPLC监测。反应完成后,用纯化水稀释反应混合物,用乙酸将pH调节至3.95-4.05,并继续进行纯化步骤。

[0334] 纯化并转化式3的原料药为乙酸盐

[0335] 粗制式3原料药的离子交换纯化:将粗制原料药用纯化水稀释,上样于阳离子交换HPLC柱。使用乙腈和稀NH₄OAc水溶液的梯度洗脱原料药。

[0336] 式3原料药的脱盐和乙酸盐转化:将从上述离子交换纯化获得的合并级分用纯化水稀释,并应用于制备型反相HPLC柱。使用乙腈和稀乙酸水溶液的梯度洗脱原料药。合并级分用于浓缩和冻干。

[0337] 原料药式3乙酸盐的冻干:冻干的原料药在乙腈和乙酸的稀水溶液中重构,过滤并最终冻干。

[0338] 实施例2:式3化合物的表征

[0339] 分析程序

[0340] 通过MS进行质谱分析

[0341] 使用ESI离子阱质谱仪获得式3的质谱。

[0342] 通过LC/MS在柱后中和得到的完整质量数

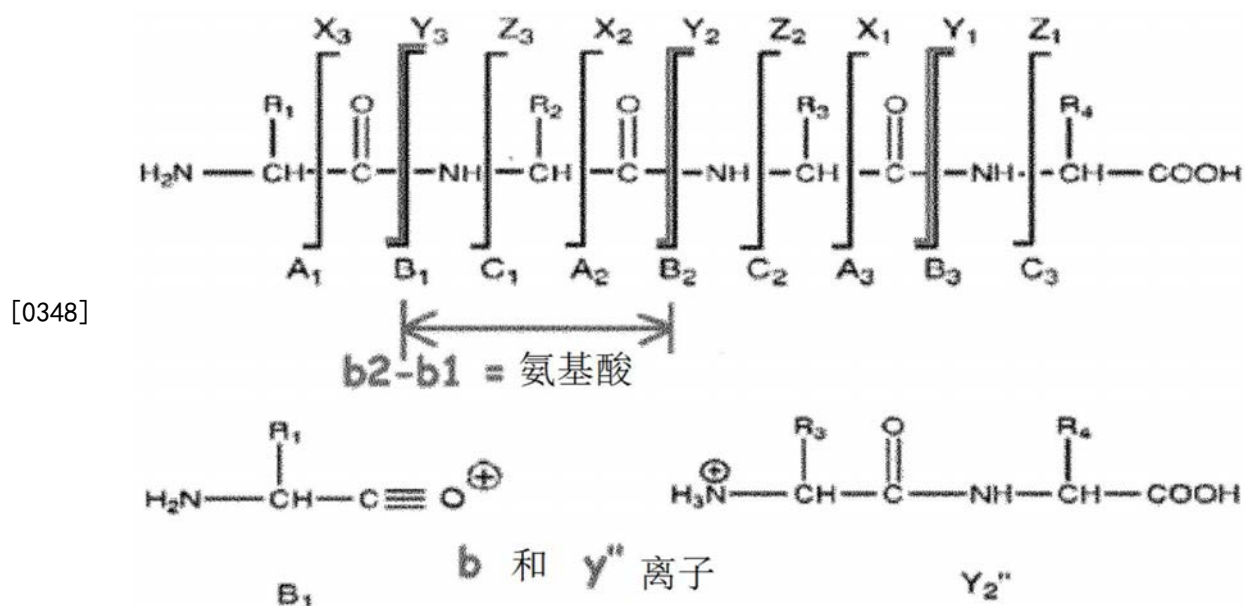
[0343] 式3通过LC-MS分析,用二乙基甲胺(DEMA)进行柱后中,测定完整质量数。当在水/乙腈/TFA体系中从RP-HPLC分离洗脱聚乙二醇化分子时,在进入水SYNAPT G2-S Q-TOF质谱仪之前,将该流与DEMA溶液混合。

[0344] 利用LC/MS进行热解肽图谱分析

[0345] 在20mM tris-HCl缓冲液 (pH8) 中稀释至1mg/mL后,在37℃下用嗜热菌蛋白酶溶液直接处理3-1小时。消化液直接用Waters Acquity UPLC系统与Waters SYNAPT G2-S质谱仪联用分析。

[0346] 通过MS/MS进行质谱分析

[0347] 通过使用CID和ECD进行MS/MS分析,研究了式3的氨基酸序列。将MS/MS谱与原料药的预期碎片离子进行比较。使用Crocker等开发的计算机程序计算预期的多电荷b和y碎片离子(Journal of Biomolecular Techniques,2000,11 (3) ,135-141)。将碎片离子分配在谱上。



[0349] 有三种不同类型的键可以沿着氨基酸主链断裂: NH-CH、CH-CO 和 CO-NH。每个键断裂产生两种物质,一种是中性的,另一种是带电的,并且只有带电的物质被质谱仪监测。电荷可以停留在两个片段中的任一个上,这取决于两个种类的化学性质和相对质子亲和力。因此,每个氨基酸残基有六个可能的碎片离子,这些离子如上图所示进行标记,其中a、b和c⁺离子具有保留在N-末端片段上的电荷,并且x、y⁺和z离子具有保留在C-末端片段上的电荷。对于CID技术,最常见的裂解位点是在产生b和/或y⁺离子的CO-NH键上,由于它们是最强的离子,因此是肽的序列分析中最常用的那些。两个相邻的b离子或y⁺离子之间的质量差异表明了特定的氨基酸残基。较大的b和y⁺碎片通常作为多电荷离子被发现。对于ECD技术,最常见的裂解位点是在NH-CH键处,其产生c和/或z离子,但得到氨基酸序列的原理是相似的。

[0350] 通过AAA的氨基酸分析

[0351] 所述方法通过水解 (USP<1052>的修饰) 肽,然后离子交换分离所得游离氨基酸并通过用茚三酮柱后衍生作用定量来测定氨基酸组成。在分析之前使用经认证的氨基酸混合物校准离子交换系统。结果表示为相对氨基酸比率,其预期符合分子的氨基酸组成;以及作为肽含量(量),其通过取平均氨基酸回收率与样品总量的比率来计算。然后使用肽含量计算量。

[0352] 通过GC-MS进行手性氨基酸分析

[0353] 水解和衍生化

[0354] 该肽在D2O中的6N DC1中水解(补偿水解过程中可能发生的任何外消旋化)。用氮气流除去过量试剂后,用DC1在甲醇中酯化干燥的样品。冷却后,打开小瓶,在氮气流下轻微加热除去过量的试剂。将残余物溶于三氟乙酸酐或五氟丙酸酐中,将小瓶紧密封闭并加热。冷却至环境温度后,通过氮气流除去过量的试剂。将残余物溶于甲苯中,用GC-MS进行分析。

[0355] 气相色谱法

[0356] 在涂有Chirasil-Val的失活玻璃毛细管上分离N(0,S)-氟乙酰氨基酸酯。载气是氢气。通过保留时间和质谱鉴定峰。

[0357] 通过RP-HPLC法进行乙酸盐和三氟乙酸盐测定

[0358] 该步骤是设计用于测定乙酸盐和三氟乙酸盐含量的在210nm具有UV检测的梯度反相HPLC方法。所述方法测定的乙酸盐和三氟乙酸盐含量为重量百分比。

[0359] GLP-1活性

[0360] 式3的GLP-1活性使用基于细胞的报告基因测定来评估。该测定利用用GLP-1受体和cAMP应答元件(CRE)应答性萤光素酶基因稳定转染的HEK293细胞。在该试验中,式3与细胞表面的GLP-1受体结合,其活化cAMP。作为这种活化的结果,CREB(cAMP应答元件结合蛋白)被磷酸化并与细胞核中的CRE结合,这诱导萤光素酶的转录。测量并定量来自萤光素酶反应的发光,其产生GLP-1的剂量依赖性活化曲线。

[0361] 胰高血糖素活性

[0362] 式3的胰高血糖素活性使用基于细胞的报告基因测定来评估。该测定利用HEK293细胞系(与具有GLP-1受体的HEK293分开),其已经被工程化以稳定表达胰高血糖素受体和cAMP应答元件(CRE)应答萤光素酶基因。在该试验中,式3结合并活化胰高血糖素受体,其活化cAMP。作为这种活化的结果,CREB(cAMP应答元件结合蛋白)被磷酸化并与细胞核中的CRE结合,这诱导萤光素酶的转录。测量并定量来自萤光素酶反应的发光,其产生胰高血糖素的剂量依赖性活化曲线。

[0363] 结构和其他特性的说明

[0364] 化学结构证据

[0365] 对肽中间体和式3进行结构说明研究。表1A和表1B列出了进行的研究。所有分析证实了肽中间体和式3的化学结构。

[0366] 通过ES-MS、CID-和ECD-MS/MS、氨基酸分析(AAA)和手性氨基酸分析证实肽中间体的氨基酸序列和氨基酸手性。通过ESI-MS获得的肽中间体的质量离子与预测的一致。串联MS/MS的数据与预期的氨基酸序列匹配。AAA产生的氨基酸组成与理论组成一致,除了Trp和Cys在酸水解过程中几乎完全被破坏。通过手性氨基酸分析,肽中间体的氨基酸手性是纯的(>99%)。

[0367] 式3的氨基酸序列通过氨基酸分析(AAA)、N-末端测序、LC/MS肽图谱分析和完整LC/MS证实。AAA的氨基酸组成与理论组成一致,除了Trp和Cys在酸水解过程中几乎完全被破坏。30个循环的N-末端测序与式3的预期序列一致。通过LC/MS肽图谱分析鉴定的肽占39个氨基酸残基中的35个。通过LC/MS肽图谱分析没有检测到式3的去聚乙二醇化的C-末端Ile-Ala-Cys-Cys肽,这表明游离肽中间体不存在于式3中。从肽图谱中没有检测到显著的肽异构体,表明聚乙二醇化反应和储存没有改变肽的氨基酸手性。此外,LC/MS肽图谱检测

到非常低水平的降解,包括Trp29氧化和Asp脱酰胺。在样品制备期间可能产生部分降解。

[0368] 对于式3,从MALDI-TOF MS和柱后中和二乙基甲胺的LC/MS获得的结果与式3肽骨架和mPEG结构以及mPEG大小一致。

[0369] 表1A:对肽中间体进行的测试

[0370]	试验	分析技术
	分子质量	ESI-MS
	氨基酸序列	CID-和ECD-MS/MS
	单个氨基酸的身份和比例	氨基酸分析(AAA)
	单个氨基酸的身份和手性	手性氨基酸分析

[0371] 表1B:对式3原料药进行的测试

[0372]	试验	分析技术
	分子质量	MALDI-TOF MS, LC/ESI-MS
	N-末端序列	N-末端测序
	氨基酸序列	LC/MS 肽图谱分析
	单个氨基酸的身份和比例	氨基酸分析(AAA)
	单个氨基酸的身份和手性	手性氨基酸分析
	抗衡离子的身份和数量	HPLC

[0373] 通过MS测定的分子量

[0374] 肽中间体

[0375] 电喷雾离子化质谱法(ESI MS)用于测定肽的质量。从多种带电离子中的每一种获得的去卷积质量证实了肽中间体的正确的单一同位素质量。

[0376] 表1C:通过MS确认分子量

[0377]	质量离子	理论质量(Da)	观察到的质量(Da)	去卷积质量(Da)
	$[M+3H]^{3+}$	1502.07	1502.07	4503.21
	$[M+4H]^{4+}$	1126.8	1126.81	4503.24
	$[M+5H]^{5+}$	901.64	901.65	4503.25
	$[M+6H]^{6+}$	751.53	751.54	4503.24

[0378] 式3药品

[0379] 基质辅助激光解吸电离-飞行时间(MALDI-TOF)用于获得式3原料药的分子量。分析实施例1中制备的式3的样品。

[0380] 样品给出正离子MALDI-TOF质谱,其具有观察到的中心大约在m/z48300的宽的单电荷假分子离子簇。

[0381] 使用柱后用二乙基甲胺(DEMA)中和的LC/ESI-MS获得式3的参考标准的精确分子量。式3的去卷积质谱示于图2中。鉴定了两个系列的质量,并且每个系列包含一百个以上的质量,在相邻的两个质量之间具有44-Da的质量差异(=一个氧乙烯)。主要系列的质量与预期的式3结构一致。例如,47102Da的主要质量之一与连接到具有956个氧乙烯单元的两个mPEG链的肽中间体1-39一致(预期质量:47101Da)。数据证实了式3原料药的结构。除了主要系列之外,次要系列的质量(最可能对应于具有一个开放马来酰亚胺环的式3,参见图2中的插入图)比主要系列的质量高18Da。

[0382] N-末端测序

[0383] 式3参考标准

[0384] 式3的N-末端氨基酸序列参考标准通过30个循环的N-末端氨基酸测序(Edman降解)来测定。

[0385] 观察到的序列与预期的式3His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-Aib-Gly的N-末端序列的残基1-30一致。

[0386] 通过MS/MS测定的氨基酸序列

[0387] 肽中间体

[0388] 通过使用碰撞诱导解离(CID)和电子捕获解离(ECD)进行MS/MS分析研究肽中间体的氨基酸序列。利用这些技术,有意使完整的样品分子碎片化,目的是从该过程产生的产物离子谱获得结构信息。肽中间体的+5带电状态($[M+5H]^{5+}$ m/z 902.0)的CID-MS/MS分析和ECD-MS/MS分析的结果汇总在图3和图4中。断裂和通过MS/MS的序列分析证实了该分子的一级序列。

[0389] 通过LC/MS肽图谱分析测定的氨基酸序列

[0390] 原料药

[0391] 式3通过LC/MS肽图谱分析证实了原料药的氨基酸序列。

[0392] 为了回收尽可能多的肽序列(即消化的肽片段),对式3参考标准物进行LC/MS分析,随后进行热分解消化。式3的热解消化物的LC/MS分析的UV色谱图见图5,所得结果示于表1D。

[0393] 如表1D所示,通过用LC/MS进行热分解肽图谱分析,鉴定了式3肽主链的39个氨基酸残基中的35个。在该分析中,50.62分钟洗脱的聚乙二醇化肽片段式3 36-39未通过精确质量鉴定,因为该分析不包括柱后中和。然而,C末端聚乙二醇化肽IACC可以从质谱数据推断。预计在~50分钟的宽峰含有该聚乙二醇化肽。来自该峰的合并质谱显示了一系列以44Da为间隔的质量种类,这表明含有PEG的种类。除了预期的热解肽之外,还鉴定了少数非常少的修饰肽。它们是氧化的式3肽22-25(Trp25氧化)和脱酰胺化的式3 26-35。式3 22-25仅含有一个潜在的氧化位点Trp25,但式3 26-35含有4个Asn残基,并且尚未鉴定到特异性脱酰胺位点。部分降解可能在热解消化过程中产生。没有鉴定出显著的肽异构体,这表明式3不含显著的氨基酸外消旋化,即纯氨基酸手性。

[0394] 表1D:通过式3的LC/MS肽图谱分析获得的数据汇总

[0395]

UV 保留 时 间 (min)	质量实 测值	质量预期 值	误 差 (ppm)	肽序列号	肽序列	修饰
6.08	526.2488	526.2500	-2.3	1-5	HUQGT	无
19.00	1009.439	1009.439	-0.3	6-13	FTSDYSKY	无
9.38	917.4810	917.4819	-1.0	14 -21	LDSKKAQE	无
17.57	1064.548	1064.5500	-1.9	14 -22	LDSKKAQEF	无
27.55	578.2853	578.2853	0.0	22 -25	FVQW	无
23.72	610.2728	610.2751	-3.8	22 25+2[O]	FVQW	Trp 氧化
34.60	691.3672	691.3694	-3.2	22 -26	FVQWL	无
21.54	431.2164	431.2169	-1.2	23 -25	VQW	无
29.91	544.3007	544.301	-0.6	23 -26	VQWL	无
15.78	1154.626	1154.627	-0.9	26 -35	LLNUGRNRNN	无
16.13	1155.609	1155.611	-1.7	26 35+(NH- >O)	LLNUGRNRNN	Asn 脱酰 胺作用
10.89	1041.54	1041.543	-2.4	27 -35	LNUGRNRNN	无

[0396] 通过AAA获得单个氨基酸的身份和比例

[0397] 肽中间体和式3原料药

[0398] 为了确保组成氨基酸的身份和正确比例,对肽中间体以及原料药进行氨基酸分析以显示结果的一致性(参见表1E)。所述方法包括在强酸中水解肽,在离子交换柱上分离氨基酸,最后在茚三酮衍生化后检测洗脱液。

[0399] 氨基酸分析的结果证实了肽中间体和式3原料药中氨基酸的身份和理论相对丰度。除了Trp和Cys外,它们的氨基酸分析回收率低,氨基酸回收率与理论相对发生率有良好的相关性。

[0400] 表IE:氨基酸分析结果

[0401]

氨基酸	理论相对发生率	观察到的相对发生率	
		肽中间体	式3药品
Asx	6	6.1	6.0
Thr	2	1.8	1.9
Ser	3	2.7	2.8
Glx	4	3.9	3.5
Gly	2	1.9	1.9
Ala	2	1.9	1.9
Val	1	1.0	1.0
Ile	1	1.0	1.1
Leu	3	3.0	3.1
Tyr	2	2.1	2.2
Phe	2	2.1	2.0
His	1	0.9	1.0
Lys	3	3.1	3.2
Trp	1	存在	0.3
Arg	2	2.0	2.1
Aib	2	2.1	2.2

[0402] 通过GC-MS获得单个氨基酸的身份和手性

[0403] 肽中间体和原料药

[0404] 该分子的肽部分由天然氨基酸组成,除了该分子中存在的两个2-氨基异丁酸部分。该氨基酸和分子中存在的两个甘氨酸表示仅有的非手性氨基酸。对肽中间体和式3原料药进行手性氨基酸分析,以研究每个组成氨基酸残基的手性身份。将肽在氘化溶剂(DC1/D₂O)中水解,适当地衍生化,并使用气相色谱-质谱(GC-MS)分析以测定每种氨基酸对映体。汇总于表1F中的结果证实了原料药中每种氨基酸的预期手性。

[0405] 表1F:手性氨基酸分析结果(L-AA计算值)

氨基酸	L-氨基酸的含量(%)	
	肽中间体	式3药品
Asx	99.82	>99.90
Thr ¹	>99.70	>99.70
Ser	>99.90	99.89
Glx	>99.90	>99.90
Ala	99.87	99.70
Val	99.85	>99.90
Ile ²	>99.70	>99.70
Leu	99.80	>99.90
Tyr	>99.90	99.90
Phe	99.78	99.86
His	98.98	99.51
Lys	99.90	>99.90
Trp	99.36	>99.90
Arg	99.88	>99.90
Cys	NA ³	99.21

[0408] ¹三种其他异构体也是可能的;检测到这些中的每一种的小于0.1%。

[0409] ²三种其他异构体也是可能的;检测到这些中的每一种的少于0.1%,除了D-别异亮氨酸之外,

[0410] 其定量为0.11%

[0411] ³Cys残基在所用水解条件下不能从接头上裂解下来。

[0412] 通过RP-HPLC获得抗衡离子的身份和数量

[0413] 原料药

[0414] 为了完成式3药物的结构阐明,通过RP-HPLC测定乙酸盐含量以确保抗衡离子的身份和量。

[0415] 证实存在乙酸盐(间接测量为乙酸)。确定乙酸盐含量小于0.6% (wt/wt),这与基于肽中三个碱性残基的过量预测的3当量乙酸盐相一致。

[0416] 物理化学性质

[0417] 物理形式

[0418] 肽中间体和式3原料药

[0419] 为了确保肽中间体和式3原料药的外观,进行目测检查。结果表明肽中间体和原料药的外观都是白色至灰白色粉末。肽中间体和式3都是冻干的物质,没有形成结晶或多晶型

形式。

[0420] 生物学活性

[0421] 胃泌酸调节素 (OXM) 是与营养物摄入成比例地从小肠L细胞与GLP-1一起释放的肽激素。OXM的独特受体还没有被鉴定。OXM可以在体外结合并活化GLP-1受体 (GLP1R) 和胰高血糖素受体 (GcgR)。GLP1R激动剂降低葡萄糖和减轻体重的机制得到了很好的验证。据报道,在Wistar大鼠中,胰高血糖素可以减少食物摄取并增加能量消耗。相比之下,在禁食和再进食实验中,抗胰高血糖素抗体显示增加进餐量和持续时间。在7天的人类研究中,胰高血糖素被证明减少食物摄取。此外,胰高血糖素被证明增加FGF21和降低PCSK9表达。因此, GLP1R和GcgR激动作用的组合可提供较好的体重减轻和脂质分布改善的潜力,只要GLP1R活性足以改善血糖控制。

[0422] 用两种基于细胞的测定 (GLP-1和胰高血糖素) 相对于彼此评价实施例1中制备的式3参考标准品和式3的生物学活性(效力)。结果在生物测定方法的可变性范围内,并且表明在参考标准之间的效力没有差异。因此,它们各自被分配相同的值100%。

[0423] 临床和毒理学批次的杂质分布

[0424] 显示临床和毒理学批次的各杂质分布比较结果的RP-HPLC色谱图汇总在表1G中。临床批次的杂质分布与毒理学批次 (PG1101和PG1201) 相当。

[0425] 表1G:用于毒理学和临床批次的单独杂质分布比较

观察到的杂质 (RRt)	临床和毒理学批次中单独 RP-HPLC 面积%对于纯度为 0.15%						
	PG1101	PG1201	PG1301	PG1302	PG1401	PG1601	PG1701
0.95 - 0.96	0.56	0.91	0.67	0.90	0.78	0.44	0.30
0.98	0.56	0.37	0.15	ND	0.44	0.49	0.32
1.02 - 1.03	1.51	1.22	1.18	1.34	1.28	1.35	1.5

[0427] ND:未检测到

[0428] RRt:相对保留时间

[0429] 由于如实施例1的方法中所述的纯化方法(梯度色谱法),存在有机杂质的可能性非常低。只有性质与肽非常相似的有机杂质才能通过这些色谱步骤除去。由于反应的进程由HPLC监测,并且任何这样的杂质将在纯化期间被除去,因此预期任何单-聚乙二醇化杂质的存在是低的。单-聚乙二醇化的杂质易于通过RP-HPLC在约RRt 0.95/0.96(表1G)洗脱检测,并且也可以是降解产物。由于半胱氨酸残基的分子间交联,可能出现单-聚乙二醇化形式的二聚体(即mPEG-肽-mPEG),并且已经初步鉴定为高分子量的聚合物(可能在色谱图上API的右侧)。预期在纯化步骤中完全除去潜在的无机杂质,主要在纯化过程中使用的无机盐。所用的酸(乙酸和三氟乙酸)可以形成肽的盐,其包括在原料药的分析中。在制造过程中不使用金属催化试剂。当使用不锈钢色谱柱时,仅有少量的金属离子可以保留。也可以产生单-聚乙二醇化。

[0430] 因此,药品中的总杂质/降解物的限度为10%,单一最大杂质为5%。因此,当样品在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存2年时,本发明的制剂保持在限度内。

[0431] 实施例3:本发明制剂的制备

[0432] 本发明的制剂最初在含有约50-85mg/mL活性成分式3的水溶液中制备。式3的活性成分聚乙二醇化胃泌酸调节素的优选浓度为约70mg/mL。在4.0至7.0的不同pH水平下制备包含活性成分和选自乙酸盐、柠檬酸盐和组氨酸的缓冲剂的各种组合物。将聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物(式3)的溶液在三种储存条件下储存六天： $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，然后分别通过DLS和RP-HPLC分析粒度分析和纯度/杂质。在制备的所有制剂缓冲液(乙酸盐、柠檬酸盐和组氨酸)中以70mg/mL加入聚乙二醇化胃泌酸调节素活性成分后，发现由于聚乙二醇化胃泌酸调节素的加入，缓冲液pH增加到高于靶标。因此，制备了另外两种制剂，其中用弱酸将pH调节至目标值。这些样品在 $5\pm 3^{\circ}$ 下储存，也通过RP-HPLC测试纯度/杂质。对于任何样品，本发明的组合物在最初测量的pH和在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存6天后测量的pH之间的pH值没有显著变化。

[0433] 溶液中的颗粒分布也通过DLS测试，并且显示出具有高多分散性和低颗粒浓度的多峰尺寸分布。因此，本发明包括具有这种特性的聚乙二醇化胃泌酸调节素制剂。

[0434] 还在各种条件下通过RP-HPLC测试了本发明制剂的相关杂质，并通过SEC-HPLC测试了可溶性聚集体。就杂质的最少增加而言，最稳定的条件是在约4.5至约5.9的pH范围内和/或在100mM的测试浓度下使用不含氯化钠的溶液。选择pH 4.5的乙酸盐缓冲液作为含有聚乙二醇化胃泌酸调节素肽及其类似物的液体制剂提供最大的稳定性。

[0435] 实施例4：预制剂开发

[0436] 已经评价了OPK-88003液体药品的各种制剂，以便开发适用于3期的预填充注射器形式的稳定液体制剂，并且最终与自动注射器组合商业施用。制剂开发在三期中进行：

[0437] 1期：预制剂开发以缩小1) pH、2) 缓冲液、3) 表面活性剂和4) 赋形剂的选择范围；

[0438] 2期：DOE研究，以利用统计设计评估所选组合的稳定性；

[0439] 3期：所选先导制剂的长期稳定性。

[0440] 1期预制剂活性的汇总

[0441] 预制剂开发包括评价作为pH、缓冲剂类型和各种赋形剂的加入的函数的稳定性以及表面活性剂的作用。稳定性分析测试包括RP-HPLC和SEC-HPLC、DLS的颗粒、HIAC和MFI以及pH、重量摩尔渗透压浓度、粘度等。

[0442] 初始筛选：OPK-88003(式3)稳定性研究评价了相对pH和缓冲液类型(乙酸盐、柠檬酸盐和组氨酸)。通过RP-HPLC检测样品中的肽杂质，并通过DLS检测可溶性聚集体的存在。基于初始筛选数据：

[0443] • 确定pH 4.5-5.0为最佳pH范围，和

[0444] • 乙酸盐或柠檬酸盐被鉴定为该范围内的合适缓冲液。

[0445] 赋形剂筛选：在乙酸盐缓冲液(pH 4.5和5.0)或柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)中评价或实验评价各种赋形剂：蛋氨酸、精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、氯化钠、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖。注意到含有甲硫氨酸和精氨酸的制剂的改进，并选择其在DOE测试中进一步评估。山梨糖醇和蔗糖表现为惰性，并且任一种都适合作为张力调节剂。由于对粘度的作用较小，选择山梨糖醇用于DOE试验。

[0446] 表面活性剂筛选：在表面活性剂筛选研究中评估各种表面活性剂对颗粒和聚集体制剂的作用。下列表面活性剂的作用：在经受搅拌和连续的冷冻/解冻循环的样品中评价聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80和泊洛沙姆188。通过SEC-HPLC、DLS、MFI和HIAC分析样品的可溶

性和不溶性聚集体。相对于对照样品,在含有任何表面活性剂的样品中未观察到化学降解或聚集,因此决定从制剂中排除任何表面活性剂用于进一步测试。

[0447] 2期OPK-88003制剂开发的结果DOE研究和选择先导制剂的基本原理

[0448] 计划并执行实验设计(DOE)研究。将39个制剂置于加速稳定性条件下(40℃4周),并用RP-HPLC、SEC-HPLC分析。DOE测试和统计建模的结果以及选择用于在预填充注射器中进一步稳定性测试的先导制剂的基本原理概述如下。

[0449] 缓冲液选择:在预制剂研究期间,当在低pH范围中测试时,乙酸盐缓冲溶液被鉴定为与柠檬酸盐缓冲溶液相似。由于乙酸盐是pH 4.5-5.0范围内的较好缓冲液,因此选择乙酸盐缓冲液用于DOE研究和先导制剂。另外,在乙酸盐缓冲液中制备的样品中观察到较低的粘度,然而这需要证实。

[0450] pH选择:在OPK-88003稳定性的预制剂研究期间,将pH 4.5-4.9鉴定为最佳pH范围,并且选择该范围用于DOE研究中的测试。DOE研究结果的建模证明,通过SEC-HPLC或RP-HPLC,总聚集体和/或杂质的稳定性有统计学上显著的改善。由于在较低pH的样品中始终观察到统计学改善,因此推荐选择优选制剂的最低测试pH。

[0451] 甲硫氨酸:在DOE研究结果的模拟过程中,在加速稳定性后,通过SEC(总聚集体)和RP-HPLC(总后峰杂质)鉴定甲硫氨酸水平对杂质水平具有统计学显著的作用。具体地,基于DOE稳定性结果,甲硫氨酸似乎起到抗去聚乙二醇化的保护剂的作用。DOE结果的统计学模拟表明~30mM的效力是最佳的甲硫氨酸浓度。

[0452] 精氨酸:尽管精氨酸似乎在某些情况下(即在低水平甲硫氨酸存在下)改善了稳定性,但差异不被认为是统计学显著的。在某些条件下,含有精氨酸的样品可能有一些改进,但在我们的最佳pH范围内没有。此外,作为张力调节剂,山梨糖醇在商业规模上比精氨酸作为药品赋形剂成本更低。

[0453] 山梨糖醇:选择山梨糖醇作为张力调节剂,因为它相对于氨基酸如精氨酸更惰性且更便宜。山梨糖醇对FDA的非活性成分数据库的用于皮下注射的最大效力是4.7%,并且在优选制剂中达到目标重量摩尔渗透压浓度需要4.0%,其在该范围内。

[0454] 重量摩尔渗透压浓度:推荐大约300mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度以维持等渗性。由于重量摩尔渗透压浓度可用山梨糖醇调节,同时保持在山梨糖醇效力的前代批准药物内,我们将靶向300mOsm/kg。

[0455] 表2A:本发明制剂的概述

[0456]

参数	选 择 (式 1)	前代(批准的药物)
缓冲液	10 mM 乙酸盐	乙酸钠: 0.35%效力 ¹
pH	4.5 或 4.7	Cimzia (聚乙二醇化): pH 4.7 1.0 mL 剂量体积 Neulasta (聚乙二醇化): pH 4.0 0.6 mL 剂量体积 Neupogen: pH 4.0 0.6-1.0 mL 剂量体积 Imitrex: pH 4.2-5.3 0.5 mL 剂量体积 Lantus (胰岛素类似物): pH 4.0 1.0 mL 剂量体积 胰高血糖素: pH 2.0-2.8 1.0 mL 剂量
甲硫氨酸	30 mM (0.45%)	0.3%效力 ¹
山梨糖醇	230 mM (4.0%)	4.7%效力 ¹
重量摩尔渗透压浓度	300 mOsm/kg	推荐为等渗的

[0457] ¹FDA非活性成分数据库

[0458] 外推稳定性: 通过从DOE测试的初步加速稳定性数据外推, 液体制剂在2-8°C下储存时应当稳定(API的降解<5%) 2年。

[0459] 制剂: 优选的制剂列于表2B中

[0460] 制剂2: 与制剂1相同的制剂, 但pH为4.7。

[0461] 制剂3: 在制剂1中用山梨糖醇(230mM)代替精氨酸(100mM)。所得到的重量摩尔渗透压浓度将略微更低(290mOsm/kg)。该制剂证明了制剂中存在精氨酸时是否有任何长期稳定性改善。

[0462] 表2B: 本发明的制剂

[0463]

参数	制剂 1	制剂 2	制剂 3
缓冲液	乙酸盐	乙酸盐	乙酸盐
pH	4.5	4.7	4.5
甲硫氨酸	30 mM	30 mM	30 mM
精氨酸	-	-	100 mM
山梨糖醇	230 mM	230 mM	-
重量摩尔渗透压浓度	300 mOsm/kg	300 mOsm/kg	290 mOsm/kg

[0464] 实施例5: 聚乙二醇化OXM肽类似物的物理和化学稳定性

[0465] 使用一组分析技术来评价OPK-88003肽(式3)的物理和化学稳定性, 包括: 外观、pH、SEC-HPLC、RP-HPLC、DLS、HIAC、MFI、重量摩尔渗透压浓度和粘度。基于获得的结果, 对于70mg/mL的OPK-88003(式3)来说, 下列配制条件是最佳的: 10mM乙酸盐缓冲液, 含有30-35mM甲硫氨酸, pH 4.5。在山梨糖醇的存在下没有观察到对OPK-88003稳定性的作用, 因此, 推荐将其用作张力剂。

[0466] 进行预制剂开发研究以建立制剂组合物, 其将提供物理和化学稳定性, 无刺激性, 不吸附到玻璃上, 并且具有用于预填充注射器或自动注射器中的合适的粘度, 以用于具有式3的OPK-88003聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物。在所有测试的制剂中OPK-88003肽的浓度为70mg/mL。

[0467] 缩写和定义

[0468]	缩写/术语	定义
	B	缓冲液
	DLS	动态光散射
	DOE	实验设计
	F	制剂
	F/T	冻融
	HPLC	高效液相色谱法
	MFI	微流成像
	PDI	多分散性指数
	PS-20	聚山梨醇酯20
	PS-80	聚山梨醇酯80
	P/N	物品编号
	PVDF	聚偏二氟乙烯
	RH	相对湿度
	RP	反相
	SEC	尺寸排阻色谱法
	TFA	三氟乙酸

[0469] 材料和设备

[0470] 材料

- [0471] • 0PK-88003聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物。
- [0472] • 0.45μm Millex-HV PVDF滤膜, Millipore, P/N SLGV013SL
- [0473] • 3mL Norm-Ject无硅油注射器, Fisher P/N 14-817-27
- [0474] • 10mL Norm-Ject无硅油注射器, Fisher P/N 14-817-30
- [0475] • 乙酸, 冰, Fisher, P/N A491-212
- [0476] • 无水柠檬酸, J.T.Baker, P/N 0127-05
- [0477] • 滤膜, 0.2μm PES膜, Thermo Scientific, P/N 597-4520
- [0478] • L-组氨酸, Sigma, P/N H6034-100G
- [0479] • 盐酸、6N溶液、J.T.Baker, P/N 5619-02
- [0480] • L-精氨酸盐酸盐, J.T.Baker, P/N 2067-06
- [0481] • L-半胱氨酸盐, Thermo Scientific, P/N 44889
- [0482] • L-甲硫氨酸, Sigma, P/N M9625-100G
- [0483] • Malvern Zetasizer纳米ZS
- [0484] • 泊洛沙姆188, Spectrum Chemical, P/N P1169
- [0485] • PS-20, Sigma, P/N P7949-100 ML
- [0486] • PS-80, J.T.Baker, P/N 4500-04
- [0487] • 无水乙酸钠, Sigma, P/N S1429-1 KG
- [0488] • 氯化钠, Fisher, P/N S271-500
- [0489] • 氯化钠, J.T.Baker, P/N 3627-05

- [0490] • 氢氧化钠,6N溶液,J.T.Baker,P/N 5672-02
- [0491] • 山梨糖醇,Sigma,P/N 85529-1KG
- [0492] • 蔗糖,J.T.Baker,P/N 4005-05
- [0493] • 柠檬酸三钠,二水合物,Sigma,P/N S1804-500G
- [0494] 设备
- [0495] • Agilent 1100或1200HPLC系统
- [0496] • Brookfield DV-III Ultra可编程流变仪
- [0497] • ProteinSimple微流成像显微镜DPA 5200和Bot1
- [0498] • Environmental Specialist ES 2000Reach-In室
- [0499] • 液体粒子计数器,HIAC型号9703
- [0500] • Malvern Zetasizer纳米ZS
- [0501] • Mettler Toledo SevenMulti pH计
- [0502] • 5600型真空蒸汽压渗透计
- [0503] 方法
- [0504] pH
- [0505] 使用校准的SevenMulti pH计,根据GTM-0015“测定pH”来测试pH。
- [0506] 外观
- [0507] 外观试验按照GTM-0033“Appearance by Visual Evaluation(对外观的视觉评价)”进行。
- [0508] 动态光散射
- [0509] 在光学质量塑料比色杯中使用至少80μL未稀释样品进行动态光散射。在25℃下对每个样品进行五次连续测量,每次扫描开始时平衡至少3分钟。蛋白质分析算法(Malvern Zetasizer软件)用作数据处理的模型。Z-平均流体动力学直径由累积量分析和斯托克斯-本色方程计算,使用水在25℃下的粘度(0.8872mPa·s),多分散性指数由相同累积量分析获得。基于尺寸分布对强度的图评价拟合的模式,并且模式可以描述为单峰(即一个峰)或多峰(即两个或更多个峰)。
- [0510] HIAC
- [0511] 颗粒浓度通过HIAC Model 9703/9703+液体颗粒计数系统,按照USP<788>中列出的测试参数,测试注射剂中的颗粒物质。用1mL注射器和小样品尺寸的探针进行0.2mL注射。颗粒(2-25μm大小)的数目以每1mL蛋白质溶液的值(累积计数/mL)报告。
- [0512] 反相色谱法
- [0513] 根据方法PRD-P80101-LNCM,利用反相色谱法测量OPK-88003的纯度和相关物质。该步骤是梯度反相HPLC方法,在214nm处进行UV检测,设计用于确定药品中OPK-88003的特性、数量和相关物质。它使用Zorbax 300 Å SB-C18柱。流动相由0.1%体积/体积的三氟乙酸水溶液(流动相A)和0.1%体积/体积的三氟乙酸乙腈溶液(流动相B)组成。所述方法通过主峰的保留时间匹配或与参考标准的共洗脱来确定身份,通过OPK-88003主峰面积相对于参考标准的比较确定数量,以及纯度和杂质/相关物质作为总面积百分比。所述方法是稳定性指示,如通过其从OPK-88003中解析已知杂质的能力来判断,并且通过受应力样品的分析来证明。

[0514] 尺寸排阻色谱法

[0515] 单体纯度和相关物质通过SEC (方法PRD-P80102-LNCM) 测量。

[0516] 该程序是设计用于测定药品中OPK-88003单体纯度和相关物质的在214nm处具有UV检测的尺寸排阻HPLC方法。它采用Sepax Zenix SEC-300柱,流动相由pH7.0的60mM磷酸钾、250mM氯化钠、20%ACN组成。所述方法测定单体纯度和杂质/有关物质作为总面积百分比。所述方法是稳定性指示,如通过其从OPK-88003中解析已知杂质的能力来判断和通过受应力样品的分析来证明。

[0517] MFI

[0518] 使用MFI 5200和自动化移液系统进行微流成像实验,以表征OPK-88003样品中存在的颗粒的尺寸、浓度和形态。在层流罩中制备样品,用三次冲洗的隔离吸管尖端以使污染最小化。根据可获得的样品量,使用700或1000μL纯样品进行单次测量的分析。MFI测试的操作和相应液体列于下表3A中:

[0519] 表3A

步骤 #	操作	液体	孔	体积 (mL)	流速 (mL/min)
1	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
2	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
3	冲洗	5% PCC	4:A1	0.9	0.5
4	冲洗	5% PCC	4:A1	0.9	6
5	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
6	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
7	干燥系统	-	-	-	-
8	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
9	优化照明	1 x PBS	6:A1	0.22	-
10	基线	1 x PBS	6:A1	0.9	-
11	搅拌(3 个循环, 速度 2)	样品 1	5:A1	0.7	-
12	冲洗	1 x PBS	6:A1	0.9	6
13	优化照明	样品 1	5:A1	0.22	-
14	分析	样品 1	5:A1	0.7	-

[0521] 所述方法 (步骤#14) 中使用的分析操作参数如表3B所示:

[0522] 表3B

方法参数	设置
孔中样品体积 (mL)	1.0
总有效体积 (mL)	0.7
清洗体积 (mL)	0.1
分析体积 (mL)	0.51
边缘粒子排除	是
当量圆直径 (μm)	1-100

[0524] 从收集的1-100μm尺寸颗粒的原始数据处理 $\geq 2\mu\text{m}$ 、 $\geq 5\mu\text{m}$ 、 $\geq 10\mu\text{m}$ 和 $\geq 25\mu\text{m}$ 尺寸颗粒的每mL累积计数。另外,在MFI软件 (MVAS) 中使用形态分类参数处理 $\geq 5\mu\text{m}$ 尺寸的纵横比

(AR) ≥ 0.85 的颗粒。这些形态学分类的数据表示高度圆形的颗粒,其被认为是非蛋白质的,通常是气泡或硅油滴。蛋白质颗粒通常是非圆形的、无定形的,因此根据MFI软件具有低的纵横比。这些形态分类的圆形和非圆形数据组用于确定圆形分数。计算的圆形分数由以下等式确定:

$$[0525] \quad \text{循环馏分} = \frac{\text{累积计数 /mL} \geq 5\mu\text{m, AR} \geq 0.85}{\text{累积计数 /mL} \geq 5\mu\text{m}}$$

[0526] 因此,计算的圆形分数提供了在每个测试样品中发现的非蛋白质颗粒与蛋白质颗粒的比率。低的圆形分数值表明测试制品主要由非圆形的、可能的蛋白质性质的颗粒组成。

[0527] 重量摩尔渗透压浓度

[0528] 通过Vapro蒸汽压渗透压测定仪根据露点温度抑制方法 (GTM-0614) 测量OPK-88003制剂的重量摩尔渗透压浓度。注意,由于样品的粘度较高,通过露点温度降低法而不是冰点降低法测量重量摩尔渗透压浓度。在样品测量之前使用一系列标准溶液校准渗透压力计。每次测量使用10 μ L样品一式三份分析样品,并记录平均值。

[0529] 粘度

[0530] OPK-88003样品的粘度通过Brookfield DV-III Ultra可编程流变仪按照方法GTM-0614测量。在样品测量之前,使用经认证的粘度标准来验证粘度计性能。在标准测量之后,将600 μ L OPK-88003样品装载到粘度计中。粘度测量在多个百分比扭矩值下进行以评价牛顿或非牛顿特性。

[0531] 用于缓冲液和pH筛选、F14/F15另外的研究、赋形剂筛选和表面活性剂筛选研究的制剂的汇总提供于表4中。

[0532] 表4:用于缓冲液和pH筛选、F14/F15另外的研究、赋形剂筛选和表面活性剂筛选研究的制剂的汇总

制剂代码	制剂组合物	研究
F1	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.0 (测量的 pH 是 4.9)	缓冲液和 pH 筛选研究
F2	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.5 (测量的 pH 是 5.2)	
F3	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 5.0 (测量的 pH 是 5.9)	
F4	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.0 (测量的 pH 是 5.8)	
F5	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.5 (测量的 pH 是 6.3)	
F6	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 6.0 (测量的 pH 是 6.9)	
F7	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, pH 6.0 (测量的 pH 是 6.2)	
F8	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, pH 6.5 (测量的 pH 是 6.7)	
F9	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 100 mM NaCl, pH 4.5 (测量的 pH 是 5.3)	
F10	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 100 mM NaCl, pH 5.5 (测量的 pH 是 6.6)	
F11	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, 100 mM NaCl, pH 6.5 (测量的 pH 是 6.6)	
F12	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.7	
F13	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.5	
F14	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 100 mM NaCl, pH 4.7	
F15	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 20 mg/mL 甘露醇, 5 mg/mL 蔗糖, pH 5.5	
F16	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.5	赋形剂筛选研究 ¹
F17	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 150 mM 精氨酸, pH 4.5	
F18	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 甲硫氨酸, pH 4.5	
F19	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 山梨糖醇, pH 4.5	
F20	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 蔗糖, pH 4.5	
F21	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 5.0	
F22	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 150 mM 精氨酸, pH 5.0	
F23	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 甲硫氨酸, pH 5.0	
F24	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 山梨糖醇, pH 5.0	
F25	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 蔗糖, pH 5.0	
F26	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.5	
F27	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 150 mM 精氨酸, pH 5.5	
F28	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 250 mM 甲硫氨酸, pH 5.5	
F29	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 250 mM 山梨糖醇, pH 5.5	
F30	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 250 mM 蔗糖, pH 5.5	
F31	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1% PS-80, pH 5.0	表面活性剂筛选研究
F32	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1% PS-20, pH 5.0	
F33	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1% 泊洛沙姆 188, pH 5.0	
F34	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1% PS-80, pH 5.5	
F35	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1% PS-20, pH 5.5	
F36	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1% 泊洛沙姆 188, pH 5.5	
F37	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 山梨糖醇, 0.1% PS-80, pH 5.0	

[0534] ¹在表面活性剂筛选研究中也使用了F21、F24和F26。

[0535] 实施例5A:缓冲液和pH筛选研究

[0536] 评估了十三种缓冲液类型 (F1-F13) 以评估在约4.0至6.5的范围内的pH和缓冲液类型 (比较乙酸盐、柠檬酸盐和组氨酸) 对OPK-88003 (式3) 的化学稳定性的作用 (表5)。同

样,在制剂F9、F10和F11中评价100mM NaCl的作用。此外,制备制剂F14和F15,并作为pH和缓冲液类型的预制剂开发研究的一部分进行测试(表5)。

[0537] 表5

制剂代码	制剂组合物
F1	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.0 (测量的 pH 是 4.9)
F2	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.5 (测量的 pH 是 5.2)
F3	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 5.0 (测量的 pH 是 5.9)
F4	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.0 (测量的 pH 是 5.8)
F5	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.5 (测量的 pH 是 6.3)
F6	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 6.0 (测量的 pH 是 6.9)
F7	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, pH 6.0 (测量的 pH 是 6.2)
F8	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, pH 6.5 (测量的 pH 是 6.7)
[0538] F9	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 100 mM NaCl, pH 4.5 (测量的 pH 是 5.3)
F10	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 100 mM NaCl, pH 5.5 (测量的 pH 是 6.6)
F11	70 mg/mL API, 10 mM 组氨酸, 100 mM NaCl, pH 6.5 (测量的 pH 是 6.6)
F12	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.7
F13	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 4.5
F14	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 100 mM NaCl, pH 4.7
F15	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 20 mg/mL 甘露醇, 5 mg/mL 蔗糖, pH 5.5

[0539] 在配制溶液制备完成后,测定初始pH。制备后观察到以70mg/mL的浓度溶解于制剂缓冲液中的OPK-88003API增加了溶液的pH。对于具有乙酸盐和柠檬酸盐缓冲液的制剂,其中与目标pH相比pH增加了 ≈ 0.7 -0.9单位,该作用尤其明显(表6)。因此,制备了另外两种制剂(F12和F13),其中用乙酸将pH调节至目标值。基于观察到的增加的pH效果,通过将OPK-88003(式3)API溶解在pH比目标pH低0.5个单位的制剂缓冲液中来制备所有随后的制剂。如果测量的pH值在目标值之外,则还用适当的碱或酸将pH值调节到目标pH值。

[0540] 在测试前,将每种制备的制剂(F1至F13)的两等份在以下条件下储存6天: $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温育后,从每种制剂的一个 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 等分试样测量pH。通过DLS和RP-HPLC分析来自 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件的每个的一个等分试样。此外,通过RP-HPLC测试在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存的制剂F12和F13。

[0541] 对于任何样品,在最初测量的pH和在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存6天后测量的样品pH之间,pH值没有显著变化(表6)。

[0542] 表6:在缓冲液和pH和赋形剂筛选研究中获得的pH结果的汇总

[0543]

制剂代码	目标 pH	测量的 pH (初始)	测量的 pH (第 6 天, 5°C)
F1	4.0	4.90	4.88
F2	4.5	5.23	5.23
F3	5.0	5.89	5.91
F4	5.0	5.77	5.78
F5	5.5	6.31	6.30
F6	6.0	6.88	6.89
F7	6.0	6.21	6.23
F8	6.5	6.72	6.76
F9	4.5	5.32	5.33
F10	5.5	6.62	6.63
F11	6.5	6.61	6.62
F12	4.7	4.70	4.76
F13	4.5	4.52	4.46
制剂代码	目标 pH	pH (初始)	测量的 pH (第 23 天) ¹
F14	4.7	4.74	4.81
F15	5.5	5.52	5.55
制剂代码	目标 pH	pH (初始)	测量的 pH (2 周, 5°C)
F16	4.5	4.57	4.22
F17	4.5	4.47	4.42
F18	4.5	4.45	4.41
F19	4.5	4.50	4.56
F20	4.5	4.49	4.44
F21	5.0	5.06	5.01
F22	5.0	5.02	4.94
F23	5.0	5.06	5.04
F24	5.0	5.05	4.94
F25	5.0	4.97	4.93
F26	5.5	5.56	5.54
F27	5.5	5.42	5.39
F28	5.5	5.52	5.47
F29	5.5	5.46	5.37
F30	5.5	5.48	5.40

[0544] ¹在 -75±10°C 下储存6天和在5±3°C 下储存17天后测试样品

[0545] 通过DLS研究OPK-88003溶液的颗粒分布。在DLS试验中,比较了制剂的Z-平均直径和PDI。DLS结果表明对于所有测试的OPK-88003样品具有高多分散性的多峰尺寸分布(表7)。

[0546] 表7:在缓冲液和pH研究中获得的DLS结果的汇总

[0547]

制剂代码	条件	结果				
		峰 1 尺寸 (nm)	峰 1 宽度 (nm)	Z- 平 均 值 (d.nm)	PDI	模态
F1	25°C	5.0	0.6	61.71	0.50	多峰
F2	25°C	5.2	0.6	42.69	0.41	多峰
F3	25°C	5.4	0.7	48.65	0.43	多峰
F4	25°C	5.6	0.8	48.57	0.33	多峰
F5	25°C	5.8	0.7	86.73	0.44	多峰
F6	25°C	5.8	0.8	93.94	0.40	多峰
F7	25°C	5.5	0.7	109.50	0.52	多峰
F8	25 °C	5.3	0.7	43.14	0.38	多峰
F9	25°C	5.7	0.8	18.58	0.25	多峰
F10	25°C	5.9	0.9	29.52	0.28	多峰
F11	25°C	6.0	0.6	77.55	0.43	多峰
F12	25°C	5.0	0.4	99.73	0.64	多峰
F13	25°C	4.9	0.7	28.82	0.43	多峰
F1	40°C	5.1	0.4	52.81	0.51	多峰
F2	40°C	5.3	0.4	55.45	0.44	多峰
F3	40°C	5.4	0.4	43.73	0.42	多峰
F4	40°C	5.5	0.7	22.85	0.28	多峰
F5	40°C	5.6	0.5	32.90	0.30	多峰
F6	40°C	5.7	0.6	55.88	0.37	多峰
F7	40°C	5.4	0.5	26.67	0.35	多峰
F8	40°C	5.4	0.6	42.96	0.37	多峰
F9	40°C	5.9	0.5	50.95	0.37	多峰
F10	40°C	5.9	0.6	50.68	0.36	多峰
F11	40°C	5.7	0.6	42.13	0.35	多峰
F12	40°C	4.9	0.6	41.19	0.42	多峰
F13	40°C	5.0	0.5	44.13	0.47	多峰

[0548] 没有观察到测试浓度之间PDI的相关性。所有测试样品的高衰减指数显示低强度散射光,表明测试样品中颗粒的低浓度。

[0549] 在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (仅为F12和F13样品)、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 下温育6天后,通过RP-HPLC测试样品,结果汇总于表8中。

[0550] 表8:缓冲液和pH研究的RP-HPLC结果

[0551]

制剂代码	条件	%前峰杂质	%主峰	%后峰杂质	%总杂质
F1	25°C	2.6	94.1	3.3	5.9
F2	25°C	2.6	94.2	3.2	5.8
F3	25°C	2.6	94.1	3.2	5.9
F4	25°C	2.8	94.1	3.1	5.9
F5	25°C	3.0	93.6	3.4	6.4

[0552]	F6	25°C	3.4	92.9	3.6	7.1
	F7	25°C	3.0	93.6	3.4	6.4
	F8	25°C	3.0	93.4	3.6	6.6
	F9	25°C	2.8	93.9	3.3	6.1
	F10	25°C	3.3	93.2	3.5	6.8
	F11	25°C	3.6	92.7	3.7	7.3
	F1	40°C	2.7	93.8	3.4	6.2
	F2	40°C	2.9	93.7	3.4	6.3
	F3	40°C	3.1	93.3	3.6	6.7
	F4	40°C	3.0	93.6	3.4	6.4
	F5	40°C	3.7	92.3	4.0	7.7
	F6	40°C	4.6	90.9	4.5	9.1
	F7	40°C	4.1	92.3	3.7	7.7
	F8	40°C	4.3	92.0	3.7	8.0
	F9	40°C	3.4	93.0	3.6	7.0
	F10	40°C	4.0	92.1	3.9	7.9
	F11	40°C	4.9	90.7	4.4	9.3
	F12	5°C	2.2	94.2	3.6	5.8
	F13	5°C	2.2	94.4	3.4	5.6
	F12	25°C	2.3	94.1	3.6	5.9
	F13	25°C	2.3	94.2	3.5	5.8
	F12	40°C	2.5	93.5	4.0	6.5
	F13	40°C	2.7	93.3	4.0	6.7

[0553] 随着样品pH的增加,观察到轻微但逐渐的杂质增加趋势。对于在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 温度下储存的样品,观察到杂质的累积。在具有相似pH的不同缓冲液类型之间没有观察到杂质浓度的显著差异。与没有NaCl的那些制剂相比,NaCl的存在增加了所有测试制剂中的杂质水平,因此,显示对OPK-88003稳定性的负面作用。基于RP-HPLC结果,在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 储存的制剂F12和F13之间没有观察到杂质浓度的显著差异,在 $\text{pH} \approx 4.5-5.9$ 的范围内观察到OPK-88003的最佳稳定性。

[0554] 对缓冲液中的两种制剂(F14和F15)和pH筛选进行了另外的研究。使用以下方法测试初始对照(在 $-75 \pm 10^\circ\text{C}$ 下储存2周)、 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 对照(2周)、冻融(3个循环)和 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ (在测试前有1次冻融的2周)样品:pH、RP-HPLC、DLS、HIAC和MFI。

[0555] 在 -75°C 下储存6天和在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下储存17天的对照样品(F14和F15)中测量pH。对于两种制剂,在初始和老化样品之间没有观察到pH值的显著变化(表6)。

[0556] 通过RP-HPLC测试样品的上述条件和时间点的结果汇总在下表9中。与 $-75^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 和 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 对照和冻融压力样品相比,在 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 下储存的样品观察到总杂质浓度的最显著变化。在制剂F14中,在 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 下储存的样品中总杂质的累积稍微更高。该结果与制剂F9、F10和F11(均含有100mM NaCl)获得的结果非常一致,其中观察到总杂质水平升高。

[0557] 通过DLS研究了制剂F14和F15中的颗粒分布。类似地,与制剂F1-F13获得的结果类似,检测到的散射光的低强度表明测试样品中颗粒的浓度低。DLS结果表明对于所有测试的OPK-88003样品具有高多分散性的多峰尺寸分布(表10)。

[0558] 通过HIAC和MFI测量次可见颗粒的数量和尺寸。对于贮存于 $-75^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 和 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 对照样品的F14和F15制剂,没有观察到颗粒计数的显著差异(表11)。

[0559] 对于经受冻融压力的两种制剂,观察到颗粒数的轻微增加。对于在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下储存的样品,观察到最高的颗粒数增加,对于制剂F15,在所有粒度下观察到增加。与HIAC相反,通过MFI对F14和F15制剂均未观察到增加颗粒的明显趋势(表12)。基于RP-HPLC结果,pH范围为4.5-5.9,但尤其是pH约4.5的缓冲液对0PK-88003稳定性显示最积极的作用。测试制剂中NaCl的存在增加了总杂质的积累,因此在预制剂开发研究中没有进行任何进一步测试。

[0560] 表9:F14和F15的RP-HPLC结果(另外的研究)

制剂代码	时间点/条件	%前峰杂质	%主峰	%后峰杂质	%总杂质
F14	T=0	2.7	94.0	3.3	6.0
	3X F/T	2.7	94.1	3.3	5.9
	2周/ 5°C	2.5	94.1	3.4	5.9
	2周/ 40°C	3.5	91.9	4.6	8.1
F15	T=0	2.7	94.1	3.2	5.9
	3X F/T	2.3	94.6	3.1	5.4
	2周/ 5°C	2.4	94.3	3.2	5.7
	2周/ 40°C	3.5	92.5	4.1	7.5

[0562] 表10.在F14和F15研究(其他研究)中获得的DLS结果汇总

制剂代码	条件	结果				
		峰 1 尺寸 (nm)	峰 1 宽度 (nm)	Z-平均值 (d.nm)	PDI	模态
F14	对照	5.8	0.8	40.1	0.33	多峰
	5°C , 2周	5.8	0.8	81.7	0.41	多峰
	F/T, 3个循环	5.7	0.7	36.8	0.32	多峰
	40°C , 2周	5.7	0.6	102.7	0.59	多峰
F15	对照	6.1	0.8	124.4	0.57	多峰
	5°C , 2周	6.0	1.0	108.9	0.49	多峰
	F/T, 3个循环	6.1	0.9	189.7	0.59	多峰
	40°C , 2周	5.9	0.9	72.6	0.50	多峰

[0564] 表11.F14、F15和F39制剂的HIAC结果

制剂代码	时间点/条件	结果(计数/mL)				
		$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	2-10 μm
F14	-75°C	418	48	10	0	417
	3X F/T	610	88	23	0	588
	40°C	1258	138	10	0	1248
	5°C	740	80	10	0	730
F15	-75°C	468	48	8	3	460
	3X F/T	585	90	13	0	573
	40°C	1013	153	23	15	990
	5°C	470	65	13	0	458
F39	初始	368	50	3	0	365
	4周/ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$	1583	258	63	21	1520

[0566] 表12.F14、F15和F39制剂的MFI结果

[0567]

制剂代码	时间点/条件	结果(计数/mL)					
		≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	AR 0.85, ≥ 5 μm	循环馏分
F14	-75℃	713	202	74	8	29	0.15
	3X F/T	3268	423	75	8	146	0.34
	40℃	4998	743	110	16	239	0.32
	5℃	5524	957	164	14	219	0.23
F15	-75℃	1338	103	18	3	40	0.39
	3X F/T	3188	343	61	16	228	0.67
	40℃	7704	1442	442	93	390	0.27
	5℃	5400	1663	625	120	125	0.08
F39	T=0	2099	471	121	19	34	0.07
	4周/25±2℃	3403	569	191	34	90	0.16

[0568] 上述结果表明,优选的pH范围为4.5-5.9,最优选约4.5,并且氯化钠的存在对总杂质的积累具有负面作用。

[0569] 实施例5B:赋形剂筛选研究

[0570] 基于缓冲液和pH筛选研究的结果,评价15种制剂(F16-F30)以评估两种缓冲液(乙酸盐和柠檬酸盐)中的四种不同赋形剂(精氨酸、甲硫氨酸、山梨糖醇或蔗糖)对OPK-88003稳定性的作用(表13)。

[0571] 表13

[0572]

制剂	组合物
F16	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, pH 4.5
F17	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 150mM精氨酸, pH 4.5
F18	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM甲硫氨酸, pH 4.5
F19	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM山梨糖醇, pH 4.5
F20	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM蔗糖, pH 4.5
F21	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, pH 5.0
F22	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 150mM精氨酸, pH 5.0
F23	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM甲硫氨酸, pH 5.0
F24	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM山梨糖醇, pH 5.0
F25	70mg/mL API, 10mM乙酸盐, 250mM蔗糖, pH 5.0
F26	70mg/mL API, 10mM柠檬酸盐, pH 5.5
F27	70mg/mL API, 10mM柠檬酸盐, 150mM精氨酸, pH 5.5
F28	70mg/mL API, 10mM柠檬酸盐, 250mM甲硫氨酸, pH 5.5
F29	70mg/mL API, 10mM柠檬酸盐, 250mM山梨糖醇, pH 5.5
F30	70mg/mL API, 10mM柠檬酸盐, 250mM蔗糖, pH 5.5

[0573] 所有四种赋形剂在pH 4.5和5.0的乙酸盐缓冲液和pH 5.5的柠檬酸盐缓冲液中测试。测试了三种不含赋形剂的制剂(F16、F21和F26)作为对照。将根据方案TD06315制备的所有制剂分成3个等分试样,并在下列温度下温育:5±3℃, 40±2℃, 50℃温育2周后,从每种

制剂的 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 等分试样测量pH。通过RP-HPLC和DLS测试在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 50°C 下储存的样品。粘度仅对含有山梨糖醇或蔗糖 (F19、F20、F24、F25、F29和F30) 的 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 样品进行。

[0574] 在初始样品之间没有观察到pH的显著变化,并在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存2周。唯一的例外是制剂F16,其pH从4.57变为pH 4.22 (约0.4单位) (表6)。类似的制剂 (F1),测量pH为4.90,在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存6天,所有其他赋形剂筛选制剂没有显示类似的变化,因此,观察到的差异是由于方法的可变性而不是pH的真实变化。

[0575] 通过RP-HPLC色谱法测定OPK-88003的稳定性。测试样品的上述条件和时间点,结果汇总于表14中。与在相同温度下储存的相应对照制剂相比,在pH 4.5和经受 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以及在pH 4.5和经受 50°C 的5.0下在含有甲硫氨酸或精氨酸的乙酸盐缓冲液中观察到OPK-88003杂质的最低积累。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存的所有制剂中也观察到甲硫氨酸的存在对OPK-88003稳定性的轻微有益作用。在经受 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 50°C 的任何测试制剂中,山梨糖醇或蔗糖的存在对OPK-88003稳定性没有表现出明显的保护作用。观察到OPK-88003降解物积累的轻微差异与pH或缓冲液类型有关。通常,与pH 5.5的柠檬酸盐缓冲液相比,pH 4.5和5.0并经受 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的乙酸盐缓冲液中的总杂质浓度较低,然而,对于在 50°C 下储存的样品没有观察到这种趋势。

[0576] 通过DLS研究颗粒分布。类似地,对于缓冲液和pH筛选研究中获得的结果,检测到的散射光的低强度表明测试样品中颗粒的低浓度。DLS结果表明对于所有测试的OPK-88003样品具有高多分散性的多峰尺寸分布 (表15)。

[0577] 在 22°C 的恒定温度下以可变的剪切速率收集粘度测量值,然后取平均值 (表16)。在pH 4.5和5.0下,测量含有山梨糖醇或蔗糖 (F19、F20、F24和F25) 的乙酸盐缓冲液的相当的粘度 (范围为20.1-22.6cP)。对于含有山梨糖醇或蔗糖 (F29和F30) 的柠檬酸盐缓冲液,在pH 5.5时观察到明显更高的粘度,分别为30.9和29.1cP。这表明在测试制剂中的粘度是pH依赖性的,或者更可能是缓冲剂类型依赖性的。表14-16显示了各种赋形剂对制剂的研究结果,基于该数据,选择甲硫氨酸作为优选的赋形剂以及山梨糖醇,优选的缓冲液是pH为约4.5的乙酸盐缓冲液。

[0578] 表14. 赋形剂筛选研究的RP-HPLC结果

[0579]

制剂代码	条件	%前峰杂质	%主峰	%后峰杂质	%总杂质
F16	5°C	2.0	94.8	3.2	5.2
F17	5°C	2.1	94.8	3.1	5.2
F18	5°C	1.9	95.1	2.9	4.9
F19	5°C	2.6	94.1	3.3	5.9
F20	5°C	2.5	94.1	3.3	5.9
F21	5°C	2.4	94.2	3.4	5.8
F22	5°C	2.5	94.3	3.2	5.7
F23	5°C	2.2	94.6	3.1	5.4
F24	5°C	2.4	94.3	3.3	5.7
F25	5°C	2.3	94.5	3.2	5.5
F26	5°C	2.4	94.2	3.4	5.8
F27	5°C	2.4	94.4	3.2	5.6
F28	5°C	2.2	94.5	3.3	5.5
F29	5°C	2.4	94.4	3.2	5.6
F30	5°C	2.6	94.1	3.4	5.9
F16	40°C	3.3	93.0	3.7	7.0
F17	40°C	3.2	93.5	3.4	6.5
F18	40°C	2.7	94.1	3.2	5.9
F19	40°C	3.0	92.9	4.1	7.1
F20	40°C	3.2	92.9	4.0	7.1
F21	40°C	2.7	93.3	4.0	6.7
F22	40°C	3.0	93.6	3.5	6.4
F23	40°C	3.1	93.3	3.6	6.7
F24	40°C	3.0	92.9	4.1	7.1
F25	40°C	2.9	93.1	4.0	6.9
F26	40°C	3.5	92.5	4.1	7.5
F27	40°C	3.6	92.7	3.6	7.3
F28	40°C	3.6	92.6	3.8	7.4
F29	40°C	2.9	93.0	4.1	7.0
F30	40°C	3.1	92.8	4.1	7.2

[0580]

F16	50°C	6.5	88.5	5.1	11.6
F17	50°C	5.8	89.6	4.6	10.4
F18	50°C	4.8	91.4	3.8	8.6
F19	50°C	5.8	88.0	6.2	12.0
F20	50°C	6.5	87.7	5.8	12.3
F21	50°C	5.7	87.9	6.5	12.1
F22	50°C	5.7	89.0	5.2	11.0
F23	50°C	6.5	88.9	4.5	11.1
F24	50°C	5.5	87.8	6.7	12.2
F25	50°C	5.0	88.7	6.2	11.3
F26	50°C	4.7	88.9	6.4	11.1
F27	50°C	6.1	89.0	4.8	11.0
F28	50°C	6.4	88.5	5.1	11.5
F29	50°C	4.6	89.0	6.4	11.0
F30	50°C	4.7	88.9	6.3	11.1

[0581] 表15. 在赋形剂筛选研究中获得的DLS结果的汇总

[0582]

制剂代码	条件	结果				
		峰 1 尺寸 (nm)	峰 1 宽度 (nm)	Z- 平均值 (d.nm)	PDI	模态
F16	5±3°C	5.0	0.6	61.76	0.51	多峰
F17	5±3°C	6.0	0.8	35.64	0.33	多峰
F18	5±3°C	5.9	0.9	84.35	0.64	多峰
F19	5±3°C	6.2	0.8	45.60	0.48	多峰
F20	5±3°C	6.8	1.0	57.36	0.48	多峰
F21	5±3°C	5.6	0.4	179.60	0.70	多峰
F22	5±3°C	6.1	0.8	300.30	0.53	多峰
F23	5±3°C	6.1	0.8	60.09	0.51	多峰
F24	5±3°C	6.3	0.9	47.39	0.44	多峰
F25	5±3°C	7.1	1.1	58.77	0.46	多峰
F26	5±3°C	5.7	0.7	55.98	0.36	多峰
F27	5±3°C	6.2	1.3	18.36	0.26	多峰
F28	5±3°C	6.5	1.1	31.52	0.29	多峰
F29	5±3°C	6.6	0.9	43.84	0.30	多峰
F30	5±3°C	7.6	1.1	48.64	0.33	多峰
F16	40±2°C	5.1	0.4	49.06	0.47	多峰
F17	40±2°C	5.9	0.9	35.58	0.36	多峰
F18	40±2°C	1738.0	191.9	836.00	0.98	多峰
F19	40±2°C	6.3	0.8	150.40	0.70	多峰
F20	40±2°C	6.9	0.8	308.70	0.74	多峰
F21	40±2°C	5.6	0.4	147.10	0.68	多峰
F22	40±2°C	6.3	0.6	102.10	0.56	多峰
F23	40±2°C	5.9	0.8	62.63	0.53	多峰
F24	40±2 °C	6.1	0.9	50.93	0.47	多峰
F25	40±2°C	7.2	1.0	81.18	0.51	多峰
F26	40±2°C	5.8	0.4	84.92	0.45	多峰

[0583]

F27	40±2°C	6.9	0.7	214.10	0.61	多峰
F28	40±2°C	6.4	1.0	77.74	0.49	多峰
F29	40±2°C	6.5	1.0	63.84	0.38	多峰
F30	40±2°C	7.5	1.2	55.70	0.34	多峰
F16	50°C	4.9	0.7	34.17	0.40	多峰
F17	50°C	5.8	0.7	59.79	0.42	多峰
F18	50°C	5.4	0.2	617.80	0.97	多峰
F19	50°C	6.0	0.7	75.99	0.52	多峰
F20	50°C	6.6	1.0	67.19	0.53	多峰
F21	50°C	5.0	0.7	45.05	0.42	多峰
F22	50°C	6.1	0.6	115.00	0.57	多峰
F23	50°C	5.8	0.8	158.70	0.56	多峰
F24	50°C	2379.0	372.9	1211.00	1.00	多峰
F25	50°C	6.9	1.2	74.15	0.52	多峰
F26	50°C	5.3	0.8	39.03	0.32	多峰
F27	50°C	6.0	1.1	35.68	0.33	多峰
F28	50°C	6.4	0.9	112.40	0.54	多峰
F29	50°C	6.5	0.9	93.28	0.43	多峰
F30	50°C	7.8	1.0	134.20	0.52	多峰

[0584] 表16. 赋形剂筛选研究和F39制剂的粘度结果

[0585]

制剂代码	RPM	剪 切 率 (s ⁻¹)	扭 矩 (%)	粘 度 (cP)	剪切应力 (s ⁻¹)	粘 度 平 均 值 (cP)
F19	5	37.5	34.6	21.2	8.0	21.4
	10	75.0	69.6	21.3	16.0	
	12	90.0	84.1	21.5	19.3	
	14	105.0	98.0	21.5	22.5	
F20	5	37.5	32.8	20.0	7.5	20.1
	10	75.0	65.5	20.0	15.0	
	12	90.0	78.5	20.1	18.0	
	14	105.0	92.0	20.1	21.1	
F24	5	37.5	35.6	21.8	8.2	21.8
	10	75.0	71.0	21.8	16.3	
	12	90.0	85.2	21.8	19.6	
	14	105.0	99.5	21.8	22.9	
F25	5	37.5	36.7	22.5	8.4	22.6
	10	75.0	73.5	22.6	16.9	
	12	90.0	88.3	22.6	20.3	
	13	97.5	96.7	22.8	22.2	

[0586]	F29	4	30.0	40.3	30.9	9.3	30.9
		5	37.5	51.5	31.3	11.7	
		7	52.5	71.2	30.9	16.1	
		9	67.5	89.9	30.5	20.7	
	F30	4	30.0	37.6	28.8	8.6	29.1
		5	37.5	48.8	30.3	11.4	
		7	52.5	65.4	28.6	15.0	
		9	67.5	83.9	28.6	19.3	
	F _{DOE39}	5	37.5	30.9	18.9	7.1	18.8
		10	75.0	61.3	18.8	14.1	
		12	90.0	73.5	18.7	16.9	
		14	105.0	85.7	18.8	19.7	

[0587] 实施例5C:表面活性剂筛选研究

[0588] 在温度应力、冻融和搅拌研究中,评价了非离子表面活性剂对OPK-88003稳定性的保护作用,用于PS-20、PS-80和泊洛沙姆188。测试了两种缓冲液,pH 5.0的乙酸盐和pH 5.5的柠檬酸盐,每种表面活性剂为0.1%。使用两种不含表面活性剂的相应缓冲液(F21和F26)作为对照。另外,制备两种制剂(F24和F37)以评价0.1%PS-80对pH 5.0含有250mM山梨糖醇的乙酸盐缓冲液中OPK-88003稳定性的作用。在表面活性剂筛选研究中总共筛选了十种制剂(F21-F37)(表17)。

[0589] 表17

[0590]	制剂代码	制剂组合物
	F21	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, pH 5.0
	F24	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 山梨糖醇, pH 5.0
	F26	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, pH 5.5
	F31	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1% PS-80, pH 5.0
	F32	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1% PS-20, pH 5.0
	F33	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 0.1%泊洛沙姆 188, pH 5.0
	F34	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1% PS-80, pH 5.5
	F35	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1% PS-20, pH 5.5
	F36	70 mg/mL API, 10 mM 柠檬酸盐, 0.1%泊洛沙姆 188, pH 5.5
	F37	70 mg/mL API, 10 mM 乙酸盐, 250 mM 山梨糖醇, 0.1% PS-80, pH 5.0

[0591] 通过混合各种赋形剂制备样品(F21、F24、F26和F31-F37)。在温度应力研究中,将样品在50℃下储存一周。相应的对照在5±3℃储存相同的时间。在搅拌研究中,将样品搅拌≈50小时(50rpm,室温)。将没有搅拌的相应对照物在室温下储存。在冻融研究中,样品经历三个快速冻融循环。将小瓶在75±10℃冷冻至少过夜,通过将小瓶置于实验室工作台上在室温下解冻至少两小时。将小瓶再次冷冻,并重复冷冻程序总共三次。通过视觉检查(外观)、SEC-HPLC和DLS方法分析受应力的样品和对照样品。仅对50℃保存的样品进行RP-HPLC分析。

[0592] 在进行的的研究中,与对照样品相比,所有受应力的样品在颜色、透明度和颗粒含量

方面保持不变。

[0593] 与相应的对照组相比,对于冻融和搅拌的样品,通过SEC-HPLC没有检测到总杂质%的显著变化。类似地,与没有表面活性剂的相应对照相比,对于受应力样品,没有观察到任何测试的表面活性剂对OPK-88003稳定性的有益效果。所有测试样品的总杂质的百分比面积几乎相同(表18和19)。

[0594] 在DLS研究中,对所有测试样品检测到低强度散射光,这表明颗粒浓度低。DLS结果表明对于所有测试的OPK-88003样品具有高多分散性的多峰尺寸分布(表20)。

[0595] 在50℃下保存的样品所得RP-HPLC结果汇总于表21中。对于乙酸盐和柠檬酸盐缓冲液,与不含表面活性剂的相应对照(即F21、F24、F26)相比,受应力样品未观察到任何测试表面活性剂的有益效果。所测定的总杂质%对于所有测试样品是相当的(7.2至8.2%)。

[0596] 总之,在进行的温度应力、冻融和搅拌研究中,没有观察到任何测试的表面活性剂对OPK-88003稳定性的有益效果。

[0597] 表18. 表面活性剂筛选研究的SEC结果-温度应力

[0598] 表19. 表面活性剂筛选研究的SEC结果-搅拌

[0599]

制剂代码	条件	%聚集 体 2	%聚集 体 1	%聚 集体 杂质	%主峰	单体后杂 质的百分 比	% 总杂质	%搅拌引 起的杂质 增加
F21	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.2	1.4	5.8	N/A
F24	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	N/A
F26	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.4	1.2	5.6	N/A
F31	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.4	1.2	5.6	N/A
F32	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	N/A
F33	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.2	1.4	5.8	N/A
F34	Ag. 对照	2.5	1.8	4.4	94.4	1.3	5.6	N/A
F35	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.3	1.3	5.7	N/A
F36	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.3	1.3	5.7	N/A
F37	Ag. 对照	2.5	1.9	4.4	94.2	1.4	5.8	N/A
F21	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	0.1
F24	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	0.0
F26	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.3	1.4	5.7	0.2
F31	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	0.3
F32	搅拌 50 h	2.4	1.9	4.4	94.0	1.6	6.0	0.0
F33	搅拌 50 h	2.4	1.9	4.4	94.2	1.4	5.8	0.0
F34	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.4	1.3	5.6	0.0
F35	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.2	1.5	5.8	0.1
F36	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.3	1.3	5.7	0.0
F37 ¹	搅拌 50 h	2.5	1.9	4.4	94.1	1.5	5.9	0.1

[0600] ¹由于一个制备结果的基线升高,仅报道了一个重复结果。

[0601] 表20. 用于表面活性剂筛选研究的DLS结果

[0602]

制剂代码	条件	峰 1 尺寸 (nm)	峰 1 宽度 (nm)	Z-平均值 (nm)	PDI	模态
F21	5℃对照	5.5	0.5	113.80	0.60	多峰
F24	5℃对照	6.3	0.9	91.28	0.49	多峰
F26	5℃对照	5.6	0.5	47.08	0.32	多峰
F31	5℃对照	5.3	0.5	41.96	0.34	多峰
F32	5℃对照	5.8	0.5	56.26	0.31	多峰
F33	5℃对照	5.4	0.4	86.31	0.55	多峰
F34	5℃对照	5.9	0.5	70.28	0.32	多峰
F35	5℃对照	5.4	0.7	47.99	0.23	多峰

[0603]

F36	5℃对照	5.6	0.5	79.70	0.32	多峰
F37	5℃对照	6.2	1.0	15.90	0.30	多峰
F21	F/T 3 个循环	5.1	0.4	50.56	0.40	多峰
F24	F/T 3 个循环	6.2	1.0	39.74	0.37	多峰
F26	F/T 3 个循环	5.4	0.7	17.88	0.21	多峰
F31	F/T 3 个循环	5.0	0.6	9.87	0.30	多峰
F32	F/T 3 个循环	5.0	0.4	239.90	0.41	多峰
F33	F/T 3 个循环	5.3	0.4	73.78	0.47	多峰
F34	F/T 3 个循环	6.4	0.6	53.62	0.32	多峰
F35	F/T 3 个循环	5.4	0.7	97.21	0.22	多峰
F36	F/T 3 个循环	5.6	0.6	37.28	0.27	多峰
F37	F/T 3 个循环	6.4	0.8	66.70	0.35	多峰
F21	搅拌	5.0	0.7	78.79	0.50	多峰
F24	搅拌	6.3	0.8	73.58	0.52	多峰
F26	搅拌	5.7	0.6	95.71	0.41	多峰
F31	搅拌	5.2	0.4	149.80	0.36	多峰
F32	搅拌	5.1	0.8	23.57	0.19	多峰
F33	搅拌	5.1	0.6	117.10	0.53	多峰
F34	搅拌	5.5	0.7	8.27	0.30	多峰
F35	搅拌	5.9	0.7	37.77	0.16	多峰
F36	搅拌	5.7	0.6	102.80	0.43	多峰
F37	搅拌	6.8	0.7	119.20	0.46	多峰
F21	搅拌 50 h	5.2	0.4	356.20	0.75	多峰
F24	搅拌 50 h	6.3	0.9	58.54	0.40	多峰
F26	搅拌 50 h	5.5	1.0	12.69	0.18	多峰
F31	搅拌 50 h	5.1	0.8	11.98	0.29	多峰
F32	搅拌 50 h	5.4	1.0	28.11	0.19	多峰
F33	搅拌 50 h	5.1	0.7	30.29	0.30	多峰
F34	搅拌 50 h	5.6	0.9	7.72	0.37	多峰
F35	搅拌 50 h	5.6	1.1	5.85	0.23	多峰
F36	搅拌 50 h	6.4	0.5	66.39	0.34	多峰
F37	搅拌 50 h	6.3	1.0	11.52	0.30	多峰
F21	50℃	5.1	0.4	81.43	0.49	多峰

[0604]

F24	50°C	6.2	0.8	101.90	0.66	多峰
F26	50°C	5.2	0.6	21.85	0.24	多峰
F31	50°C	5.6	0.5	34.28	0.32	多峰
F32	50°C	6.6	0.6	45.67	0.24	多峰
F33	50°C	5.1	0.4	78.75	0.46	多峰
F34	50°C	5.7	0.5	48.95	0.28	多峰
F35	50°C	5.9	1.3	17.93	0.20	多峰
F36	50°C	5.3	0.9	10.73	0.17	多峰
F37	50°C	6.3	1.1	9.78	0.35	多峰

[0605] 表21:用于表面活性剂筛选研究的RP-HPLC结果

[0606]

制剂代码	条件	%前峰杂质	%主峰	%后峰杂质	%总杂质
F21	50°C	3.5	92.2	4.3	7.8
F24	50°C	3.3	92.5	4.2	7.5
F26	50°C	3.5	92.1	4.5	7.9
F31	50°C	3.5	92.0	4.5	8.0
F32	50°C	3.3	92.5	4.3	7.5
F33	50°C	3.1	92.8	4.1	7.2
F34	50°C	3.8	91.8	4.4	8.2
F35	50°C	3.5	92.2	4.3	7.8
F36	50°C	3.4	92.4	4.2	7.6
F37	50°C	3.4	92.1	4.5	7.9

[0607] 实施例5D:实验设计研究和另外的制剂测试

[0608] 基于从缓冲液和pH、赋形剂和表面活性剂筛选研究获得的结果,选择设计组分以在DOE研究中进行评价。在OPK-88003浓度为70mg/mL的乙酸盐缓冲液中评价设计组分,包括pH、甲硫氨酸、精氨酸和山梨糖醇。评价总共36种制剂(F_{DOE}1-F_{DOE}36)(表22)。另外,制备三种制剂(F_{DOE}37、F_{DOE}38和F_{DOE}39)以评价半胱氨酸、20mM浓度乙酸盐缓冲液和与选择用于DOE研究的那些不同浓度的甲硫氨酸和精氨酸的作用。这些制剂获得的结果不包括在统计分析中。制备设计的中心点制剂(F_{DOE}20:70mg/mL OPK-88003,25mM甲硫氨酸,65mM精氨酸,95mM山梨糖醇,pH 4.7)并一式三份进行测试。

[0609] 表22:用于实验设计研究的制剂的汇总

[0610]

制剂代码	API 浓度 (mg/mL)	甲硫氨酸 (mM)	精氨酸 (mM)	山梨糖醇 (mM)	pH
F _{DOE} 1	70	0	0	250	4.5
F _{DOE} 2	70	0	65	120	4.5

[0611]

F _{DOE3}	70	0	125	0	4.5
F _{DOE4}	70	12.5	0	237.5	4.5
F _{DOE5}	70	12.5	65	107.5	4.5
F _{DOE6}	70	12.5	125	0	4.5
F _{DOE7}	70	25	0	225	4.5
F _{DOE8}	70	25	65	95	4.5
F _{DOE9}	70	25	125	0	4.5
F _{DOE10}	70	50	0	200	4.5
F _{DOE11}	70	50	65	70	4.5
F _{DOE12}	70	50	125	0	4.5
F _{DOE13}	70	0	0	250	4.7
F _{DOE14}	70	0	65	120	4.7
F _{DOE15}	70	0	125	0	4.7
F _{DOE16}	70	12.5	0	237.5	4.7
F _{DOE17}	70	12.5	65	107.5	4.7
F _{DOE18}	70	12.5	125	0	4.7
F _{DOE19}	70	25	0	225	4.7
F _{DOE20} ¹	70	25	65	95	4.7
F _{DOE21}	70	25	125	0	4.7
F _{DOE22}	70	50	0	200	4.7
F _{DOE23}	70	50	65	70	4.7
F _{DOE24}	70	50	125	0	4.7
F _{DOE25}	70	0	0	250	4.9
F _{DOE26}	70	0	65	120	4.9
F _{DOE27}	70	0	125	0	4.9
F _{DOE28}	70	12.5	0	237.5	4.9
F _{DOE29}	70	12.5	65	107.5	4.9
F _{DOE30}	70	12.5	125	0	4.9
F _{DOE31}	70	25	0	225	4.9
F _{DOE32}	70	25	65	95	4.9
F _{DOE33}	70	25	125	0	4.9
F _{DOE34}	70	50	0	200	4.9
F _{DOE35}	70	50	65	70	4.9
F _{DOE36}	70	50	125	0	4.9
F _{DOE37} ²	70	25	75	75	4.7
F _{DOE38} ³	70	0	0	225	4.7
F _{DOE39}	70	30	100	0	4.7

[0612] ¹中心点,一式三份制备[0613] ²用20mM乙酸盐缓冲液配制[0614] ³与25mM半胱氨酸配制

[0615] 在分析前,DOE样品置于非应力($5 \pm 3^\circ\text{C}$)和应力($40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\text{RH}$)条件下四周。进行统计学优化,导致选择OPK-88003产品的候选制剂。除了DOE制剂之外,还制备了另外三种制剂(F_{DOE37}、F_{DOE38}和F_{DOE39}),并与DOE样品同时进行测试。这些制剂获得的结果不包括在统计分析中。

[0616] 所有初始样品等分试样通过pH、RP-HPLC和SE-HPLC进行测试。将每种制剂的等分

试样在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下温育4周,然后通过pH、RP-HPLC和SE-HPLC方法进行测试。仅测量初始 $F_{\text{DOE}}20$ (中心点)样品的重量摩尔渗透压浓度(表26)。另外,对于制剂F39,在起始时间点测量粘度),和HIAC),和在起始时间点和在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下样品储存4周之后,进行MFI分析

[0617] 与初始样品相比,在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下储存4周后, F_{DOE} 制剂样品(包括F37和F38样品)的pH值没有观察到显著变化(表23)。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下储存4周后,与初始样品相比,F39样品没有观察到pH值的显著变化(表23)。当在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4周时,在初始F38样品之间观察到0.15单位的最高差异。

[0618] 通过SEC分析评价 $F_{\text{DOE}}37$ 、 $F_{\text{DOE}}38$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品中温度应力对OPK-88003稳定性的影响。起始和4周时间点的结果汇总在表24A和表24B中。在起始时间点和在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ($F_{\text{DOE}}39$)储存4周后分析的 $F_{\text{DOE}}37$ 、 $F_{\text{DOE}}38$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品之间未观察到杂质%量的显著变化。与起始时间点相比,在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下储存4周的 $F_{\text{DOE}}37$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品观察到杂质百分比略微增加(1.2-1.3%)。在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存的F38样品(用25mM半胱氨酸配制)与起始时间点相比显著影响总杂质%增加47.7%(图6)。

[0619] 针对 $F_{\text{DOE}}37$ 、 $F_{\text{DOE}}38$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品获得的RP-HPLC结果与SEC数据一致。起始和4周时间点的结果汇总在表25A和表25B中。在起始时间点和在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4周后分析的 $F_{\text{DOE}}37$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品之间未观察到杂质百分含量的显著变化。在起始时间点和在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ($F_{\text{DOE}}39$)和 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存4周后分析的 $F_{\text{DOE}}37$ 和 $F_{\text{DOE}}39$ 样品之间观察到了%总杂质的显著差异。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4周的F38样品观察到杂质百分数的%显著增加(增加8.5%)。在 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存4周的样品F38高度降解,与起始时间点相比总杂质%高51.7%。F38样品(用25mM半胱氨酸配制)的覆盖色谱图示于图7中。

[0620] 对于中心点样品($F_{\text{DOE}}20$),三次测量的平均重量摩尔渗透压浓度为290mOsm/kg)(表26)。

[0621] $F_{\text{DOE}}39$ 的HIAC结果显示,当与起始时间点样品相比时,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存的样品在所有粒度下均增加(表11)。

[0622] $F_{\text{DOE}}39$ 的MFI结果显示,当与起始时间点样品相比时,在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存的样品在所有粒度下均有轻微增加(表12)。

[0623] $F_{\text{DOE}}39$ 测得的粘度为18.8cP,与用乙酸盐缓冲液的其他制剂获得的值相当(表16)。

[0624] 表23:DOE研究的pH结果

[0625]

制剂代码	组合物	理论缓冲液 pH	pH (初始)	pH (5℃下 4 周)	pH (40℃下 4 周)	pH (25℃下 4 周)
F _{DOE1}	70 mg/mL API, 250 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.42	4.44	4.44	NA
F _{DOE2}	70 mg/mL API, 65 mM 精氨酸, 120 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.57	4.45	4.46	
F _{DOE3}	70 mg/mL API, 125 mM 精氨酸, pH 4.5	4.50	4.54	4.48	4.48	
F _{DOE4}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 237.5 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.54	4.47	4.47	
F _{DOE5}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 107.5 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.48	4.46	4.46	
F _{DOE6}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.5	4.50	4.47	4.48	4.49	
F _{DOE7}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 225 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.45	4.46	4.47	
F _{DOE8}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.46	4.47	4.49	
F _{DOE9}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.5	4.50	4.43	4.46	4.47	
F _{DOE10}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 200 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.49	4.52	4.50	
F _{DOE11}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 70 mM 山梨糖醇, pH 4.5	4.50	4.46	4.48	4.47	
F _{DOE12}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.5	4.50	4.50	4.48	4.49	

[0626]

制剂代码	组合物	理论缓冲液 pH	pH (初始)	pH (5℃ 下 4 周)	pH (40℃ 下 4 周)	pH (25℃ 下 4 周)
F _{DOE13}	70 mg/mL API, 250 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.75	4.75	4.73	
F _{DOE14}	70 mg/mL API, 65 mM 精氨酸, 120 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.72	4.70	4.69	
F _{DOE15}	70 mg/mL API, 125 mM 精氨酸, pH 4.7	4.70	4.68	4.69	4.68	
F _{DOE16}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 237.5 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.73	4.76	4.73	
F _{DOE17}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 107.5 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.73	4.73	4.73	
F _{DOE18}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.7	4.70	4.70	4.72	4.71	
F _{DOE19}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 225 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.73	4.74	4.74	
F _{DOE20} 制备物 1	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.71	4.67	4.69	
F _{DOE20} 制备物 2	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.72	4.70	4.72	
F _{DOE20} 制备物 3	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.71	4.72	4.71	
F _{DOE21}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.7	4.70	4.69	4.70	4.70	
F _{DOE22}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 200 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.74	4.76	4.70	

[0627]

制剂代码	组合物	理论缓冲液 pH	pH (初始)	pH (5℃下 4 周)	pH (40℃下 4 周)	pH (25℃下 4 周)
F _{DOE23}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 70 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.70	4.70	4.69	
F _{DOE24}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.7	4.70	4.69	4.69	4.69	
F _{DOE25}	70 mg/mL API, 250 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.92	4.90	4.90	
F _{DOE26}	70 mg/mL API, 65 mM 精氨酸, 120 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.88	4.89	4.86	
F _{DOE27}	70 mg/mL API, 125 mM 精氨酸, pH 4.9	4.90	4.88	4.89	4.87	
F _{DOE28}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 237.5 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.93	4.96	4.91	
F _{DOE29}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 107.5 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.90	4.90	4.86	
F _{DOE30}	70 mg/mL API, 12.5 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.9	4.90	4.86	4.88	4.88	
F _{DOE31}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 225 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.94	4.95	4.91	
F _{DOE32}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.89	4.90	4.87	
F _{DOE33}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.9	4.90	4.89	4.89	4.87	
F _{DOE34}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 200 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.94	4.96	4.94	

[0628]

制剂代码	组合物	理论缓冲液 pH	pH (初始)	pH (5℃下 4 周)	pH (40℃下 4 周)	pH (25℃下 4 周)
F _{DOE35}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 70 mM 山梨糖醇, pH 4.9	4.90	4.90	4.92	4.90	
F _{DOE36}	70 mg/mL API, 50 mM 甲硫氨酸, 125 mM 精氨酸, pH 4.9	4.90	4.87	4.86	4.86	
F _{DOE37}	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 75 mM 精氨酸, 75 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.75	4.77	4.75	
F _{DOE38}	70 mg/mL API, 25 mM Cys, 225 mM 山梨糖醇, pH 4.7	4.70	4.72	4.87	4.68	
F _{DOE39}	70 mg/mL API, 30 mM 甲硫氨酸, 100 mM 精氨酸, pH 4.7	4.70	4.73	4.73	4.72	4.74

[0629] 表24A.DOE研究的SEC-HPLC结果-初始时间点

[0630]

制剂代码	%聚集体 2	%聚集体 1	%聚集体 杂质	%主峰	单体后杂质的百分比	%总杂质
F _{DOE1}	2.5	1.9	4.4	94.4	1.2	5.6
F _{DOE2}	2.5	1.8	4.3	94.4	1.3	5.6
F _{DOE3}	2.5	1.8	4.3	94.4	1.3	5.6
F _{DOE4}	2.5	1.8	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE5}	2.4	1.8	4.3	94.5	1.3	5.5
F _{DOE6}	2.5	1.8	4.3	94.4	1.3	5.6
F _{DOE7}	2.5	1.8	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE8}	2.5	1.8	4.3	94.6	1.2	5.4
F _{DOE9}	2.4	1.8	4.2	94.5	1.2	5.5
F _{DOE10}	2.5	1.8	4.2	94.7	1.1	5.3
F _{DOE11}	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE12}	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE13}	2.5	1.9	4.4	94.4	1.1	5.6
F _{DOE14}	2.4	1.8	4.2	94.7	1.1	5.3
F _{DOE15}	2.5	1.8	4.3	94.6	1.2	5.4
F _{DOE16}	2.5	1.8	4.3	94.4	1.3	5.6
F _{DOE17}	2.4	1.8	4.3	94.6	1.2	5.4

[0631]

F _{DOE} 18	2.4	1.9	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE} 19	2.4	1.8	4.3	94.6	1.1	5.4
F _{DOE} 20 制备物 1	2.4	1.8	4.3	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 20 制备物 2	2.5	1.8	4.3	94.6	1.1	5.4
F _{DOE} 20 制备物 3	2.5	1.8	4.3	94.6	1.1	5.4
F _{DOE} 21	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 22	2.4	1.8	4.2	94.8	1.1	5.2
F _{DOE} 23	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 24	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 25	2.5	1.9	4.4	94.3	1.3	5.7
F _{DOE} 26	2.5	1.8	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE} 27	2.5	1.8	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE} 28	2.4	1.7	4.1	94.9	0.9	5.1
F _{DOE} 29	2.4	1.8	4.3	94.5	1.2	5.5
F _{DOE} 30	2.4	1.8	4.2	94.5	1.3	5.5
F _{DOE} 31	2.4	1.8	4.3	94.6	1.1	5.4
F _{DOE} 32	2.4	1.8	4.3	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 33	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 34	2.4	1.8	4.2	94.7	1.1	5.3
F _{DOE} 35	2.4	1.8	4.2	94.7	1.1	5.3
F _{DOE} 36	2.4	1.8	4.2	94.6	1.2	5.4
F _{DOE} 37	2.4	1.8	4.2	94.5	1.3	5.5
F _{DOE} 38	2.3	1.8	4.1	93.9	2.0	6.1
F _{DOE} 39	2.4	1.8	4.2	94.5	1.2	5.5

[0632] 表24B.DOE研究的SEC-HPLC结果-4周时间点

[0633]

制剂代码	条件	%聚集 体 2	%聚集 体 1	%聚集 体杂质	%主 峰	单体后 杂质的 百分比	%总杂 质
F _{DOE} 1	5°C	2.5	1.7	4.2	95.0	0.8	5.0
	40°C	2.5	2.9	5.4	92.3	2.2	7.7
F _{DOE} 2	5°C	2.5	1.7	4.2	95.0	0.8	5.0
	40°C	2.5	2.5	4.9	93.4	1.6	6.6
F _{DOE} 3	5°C	2.4	1.7	4.1	95.2	0.7	4.8
	40°C	2.5	2.5	5.0	93.4	1.6	6.6
F _{DOE} 4	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.2	2.0	6.8
F _{DOE} 5	5°C	2.4	1.7	4.1	95.2	0.8	4.8
	40°C	2.4	2.4	4.7	93.6	1.7	6.4
F _{DOE} 6	5°C	2.4	1.7	4.1	95.1	0.8	4.9
	40°C	2.3	2.3	4.7	93.6	1.8	6.4
F _{DOE} 7	5°C	2.4	1.6	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.3	2.3	4.6	93.5	1.9	6.5

[0634]

制剂代码	条件	%聚集 体 2	%聚集 体 1	%聚集 体杂质	%主 峰	单体后 杂质的 百分比	%总杂 质
F _{DOE} 8	5°C	2.4	1.6	4.1	95.1	0.8	4.9
	40°C	2.3	2.3	4.7	93.6	1.7	6.4
F _{DOE} 9	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.3	2.3	4.6	93.6	1.8	6.4
F _{DOE} 10	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.3	2.2	4.5	93.7	1.8	6.3
F _{DOE} 11	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.3	2.3	4.6	93.6	1.8	6.4
F _{DOE} 12	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.3	2.3	4.6	93.7	1.8	6.3
F _{DOE} 13	5°C	2.5	1.7	4.2	94.5	1.3	5.5
	40°C	2.6	2.9	5.5	92.3	2.2	7.7
F _{DOE} 14	5°C	2.4	1.7	4.1	95.0	0.8	5.0
	40°C	2.5	2.6	5.2	93.2	1.6	6.8
F _{DOE} 15	5°C	2.5	1.7	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.6	2.6	5.1	93.2	1.6	6.8
F _{DOE} 16	5°C	2.5	1.6	4.1	94.8	1.1	5.2
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.3	1.9	6.7
F _{DOE} 17	5°C	2.4	1.6	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.3	1.8	6.7
F _{DOE} 18	5°C	2.4	1.6	4.1	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.3	1.9	6.7
F _{DOE} 19	5°C	2.4	1.6	4.1	95.0	1.0	5.0
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.3	1.9	6.7
F _{DOE} 20 制备物 1	5°C	2.4	1.6	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.5	2.5	5.0	93.2	1.8	6.8
F _{DOE} 20 制备物 2	5°C	2.4	1.6	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.3	2.4	4.8	93.4	1.8	6.6
F _{DOE} 20 制备物 3	5°C	2.5	1.6	4.1	95.0	1.0	5.0
	40°C	2.3	2.5	4.8	93.4	1.8	6.6
F _{DOE} 21	5°C	2.4	1.6	4.0	95.0	1.0	5.0
	40°C	2.4	2.4	4.7	93.4	1.9	6.6
F _{DOE} 22	5°C	2.4	1.6	4.0	95.0	1.0	5.0
	40°C	2.3	2.3	4.6	93.6	1.8	6.4
F _{DOE} 23	5°C	2.4	1.6	4.0	95.1	0.9	4.9
	40°C	2.4	2.4	4.7	93.4	1.8	6.6
F _{DOE} 24	5°C	2.4	1.6	4.0	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.3	2.3	4.7	93.5	1.9	6.5
F _{DOE} 25	5°C	2.5	1.7	4.3	94.4	1.4	5.6
	40°C	2.7	2.9	5.6	92.4	2.0	7.6

[0635]

制剂代码	条件	%聚集 体 2	%聚集 体 1	%聚集 体杂质	%主 峰	单体后 杂质的 百分比	%总杂 质
F _{DOE26}	5°C	2.5	1.6	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.5	2.7	5.2	93.2	1.6	6.8
F _{DOE27}	5°C	2.5	1.6	4.1	94.9	0.9	5.1
	40°C	2.5	2.6	5.2	93.1	1.7	6.9
F _{DOE28}	5°C	2.5	1.7	4.1	94.7	1.2	5.3
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.1	2.0	6.9
F _{DOE29}	5°C	2.5	1.7	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.2	1.9	6.8
F _{DOE30}	5°C	2.5	1.7	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.2	1.9	6.8
F _{DOE31}	5°C	2.5	1.7	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.1	2.0	6.9
F _{DOE32}	5°C	2.4	1.7	4.1	95.0	0.9	5.0
	40°C	2.4	2.5	4.9	93.2	1.9	6.8
F _{DOE33}	5°C	2.4	1.6	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.2	2.0	6.8
F _{DOE34}	5°C	2.4	1.6	4.1	94.8	1.1	5.2
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.2	2.0	6.8
F _{DOE35}	5°C	2.4	1.7	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.3	2.5	4.8	93.2	2.0	6.8
F _{DOE36}	5°C	2.4	1.6	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.3	2.4	4.7	93.2	2.0	6.8
F _{DOE37}	5°C	2.4	1.7	4.1	94.9	1.0	5.1
	40°C	2.4	2.4	4.8	93.2	2.0	6.8
F _{DOE38}	5°C	2.0	1.6	3.6	94.0	2.4	6.0
	40°C	1.2	2.5	3.7	46.2	50.1	53.8
F _{DOE39}	5°C	2.4	1.6	4.1	94.9	1.0	5.1
	25±2°C	2.4	1.7	4.1	94.6	1.3	5.4
	40°C	2.3	2.4	4.8	93.4	1.9	6.6

[0636] 表25A:DOE研究的RP-HPLC结果-初始时间点

[0637]

制剂代码	%前峰杂质	%主峰	%后峰杂质	%总杂质
F _{DOE1}	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE2}	1.9	95.2	2.9	4.8
F _{DOE3}	2.1	95	2.9	5
F _{DOE4}	1.9	95.2	2.9	4.8
F _{DOE5}	2	95.1	2.9	4.9
F _{DOE6}	2.1	95	2.9	5
F _{DOE7}	1.9	95.2	3	4.8

[0638]

F _{DOE} 8	2	95	3	5
F _{DOE} 9	2	95.1	2.9	4.9
F _{DOE} 10	1.9	95.2	2.9	4.8
F _{DOE} 11	1.9	95.1	3	4.9
F _{DOE} 12	2.1	95	3	5
F _{DOE} 13	2.1	94.8	3.1	5.2
F _{DOE} 14	2.2	94.9	3	5.1
F _{DOE} 15	2.1	95	3	5
F _{DOE} 16	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 17	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 18	2	95.1	2.9	4.9
F _{DOE} 19	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 20 制备物 1	2.2	94.8	3	5.2
F _{DOE} 20 制备物 2	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 20 制备物 3	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 21	2.1	95	2.9	5
F _{DOE} 22	2.2	94.9	2.9	5.1
F _{DOE} 23	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 24	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 25	2.2	94.7	3.1	5.3
F _{DOE} 26	2	95.1	2.9	4.9
F _{DOE} 27	2.2	94.8	3	5.2
F _{DOE} 28	2	95	3	5
F _{DOE} 29	2.1	95	2.9	5
F _{DOE} 30	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 31	2	95	3	5
F _{DOE} 32	1.9	95.1	3	4.9
F _{DOE} 33	2	95	3	5
F _{DOE} 34	2.2	94.9	2.9	5.1
F _{DOE} 35	2	95.1	2.9	4.9
F _{DOE} 36	2.1	94.9	3	5.1
F _{DOE} 37	2.1	95	2.9	5
F _{DOE} 38	3.5	93.6	2.9	6.4
F _{DOE} 39	2	95.1	2.9	4.9

[0639] 表25B:DOE研究的RP-HPLC结果-4周时间点

[0640]

制剂代码	条件	%前峰 杂质	%主 峰	%后峰 杂质	%总杂 质
F _{DOE} 1	5°C	2.4	94.4	3.3	5.6
	40°C	3.7	91.8	4.5	8.2
F _{DOE} 2	5°C	2.4	94.4	3.2	5.6
	40°C	3.6	92.5	3.8	7.5

[0641]

制剂代码	条件	%前峰 杂质	%主 峰	%后峰 杂质	%总杂 质
F _{DOE3}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.7	92.4	3.9	7.6
F _{DOE4}	5°C	1.9	95	3.1	5
	40°C	3.3	92.9	3.8	7.1
F _{DOE5}	5°C	2.2	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.3	93	3.6	7
F _{DOE6}	5°C	2.1	94.8	3.1	5.2
	40°C	3.5	92.8	3.7	7.2
F _{DOE7}	5°C	1.9	94.9	3.1	5.1
	40°C	3.2	93.2	3.6	6.8
F _{DOE8}	5°C	2.2	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.5	92.8	3.7	7.2
F _{DOE9}	5°C	2.2	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.6	92.9	3.6	7.1
F _{DOE10}	5°C	2	94.9	3	5.1
	40°C	3.5	93	3.5	7
F _{DOE11}	5°C	2.1	94.9	3.1	5.1
	40°C	3.3	93.2	3.5	6.8
F _{DOE12}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.4	93.1	3.5	6.9
F _{DOE13}	5°C	2.3	94.4	3.3	5.6
	40°C	3.7	91.7	4.6	8.3
F _{DOE14}	5°C	2.3	94.6	3.1	5.4
	40°C	3.5	92.4	4.1	7.6
F _{DOE15}	5°C	2.3	94.6	3.2	5.4
	40°C	4.1	91.8	4.1	8.2
F _{DOE16}	5°C	2	94.9	3.1	5.1
	40°C	2.5	94.3	3.2	5.7
F _{DOE17}	5°C	2.5	94.4	3.2	5.6
	40°C	3.4	92.6	4	7.4
F _{DOE18}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.6	92.6	3.9	7.5
F _{DOE19}	5°C	2.1	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.3	92.9	3.8	7.1
F _{DOE20} 制备物 1	5°C	2.1	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.3	92.8	3.9	7.2
F _{DOE20} 制备物 2	5°C	2.2	94.7	3.1	5.3
	40°C	N/A	N/A	N/A	N/A
F _{DOE20} 制备物 3	5°C	2.2	94.7	3.1	5.3
	40°C	3.2	92.9	3.9	7.1

[0642]

制剂代码	条件	%前峰 杂质	%主 峰	%后峰 杂质	%总杂 质
F _{DOE21}	5°C	2.5	94.4	3.1	5.6
	40°C	3.8	92.4	3.8	7.6
F _{DOE22}	5°C	2.6	94.3	3.1	5.7
	40°C	3.3	93	3.7	7
F _{DOE23}	5°C	2.7	94.2	3.1	5.8
	40°C	3.4	92.8	3.9	7.2
F _{DOE24}	5°C	2.1	94.8	3.1	5.2
	40°C	3.5	92.8	3.7	7.2
F _{DOE25}	5°C	2.5	94.3	3.2	5.7
	40°C	3.6	91.6	4.7	8.4
F _{DOE26}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.6	92.1	4.3	7.9
F _{DOE27}	5°C	2.3	94.5	3.2	5.5
	40°C	4.2	91.5	4.2	8.5
F _{DOE28}	5°C	2.4	94.4	3.2	5.6
	40°C	3.3	92.6	4.1	7.4
F _{DOE29}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.6	92.3	4	7.7
F _{DOE30}	5°C	2.3	94.6	3.1	5.4
	40°C	3.5	92.5	4	7.5
F _{DOE31}	5°C	2.5	94.4	3.1	5.6
	40°C	3.3	92.6	4.1	7.4
F _{DOE32}	5°C	2.3	94.5	3.2	5.5
	40°C	3.6	92.4	4	7.6
F _{DOE33}	5°C	2.5	94.4	3.1	5.6
	40°C	3.5	92.6	3.9	7.4
F _{DOE34}	5°C	2.4	94.5	3.1	5.5
	40°C	3.5	92.6	3.9	7.4
F _{DOE35}	5°C	2.4	94.4	3.1	5.6
	40°C	3.7	92.3	4	7.7
F _{DOE36}	5°C	2.3	94.6	3.1	5.4
	40°C	3.5	92.7	3.8	7.3
F _{DOE37}	5°C	2.3	94.6	3.1	5.4
	40°C	3.4	92.7	3.9	7.3
F _{DOE38}	5°C	12.3	85.1	2.6	14.9
	40°C	56	41.9	2.1	58.1
F _{DOE39}	5°C	2.5	94.4	3.1	5.6
	25±2°C	2.9	93.9	3.2	6.1
	40°C	3.4	92.7	3.9	7.3

[0643] 表26.D0E中心点样品的重量摩尔渗透压浓度结果

[0644]

制剂	组合物	重量摩尔 渗透压浓 度 (mOsm/kg)	Av 重量摩 尔渗透压浓 度 (mOsm/kg)
F _{DOE} 20 制备物 1	70 mg/mL API, 25 mM 甲硫氨酸, 65 mM 精氨酸, 95 mM 山梨糖醇, pH 4.7	290	290
F _{DOE} 20 制备物 2		290	
F _{DOE} 20 制备物 3		290	

[0645] 表27.DOE研究中使用的因子和反应-40℃,4周时间点

[0646]

制剂代码	因子 1 A: pH	因子 2 B: 甲硫氨酸 mM	因子 3 C: 精氨酸 mM	因子 4 D: 山梨糖 醇 mM	响应 1 (RP-HPLC) %后峰杂质	响应 1 (SEC) 聚集体%
F _{DOE} 1	4.44	0	0	250	1.278	1.215
F _{DOE} 2	4.46	0	65	120	0.605	0.767
F _{DOE} 3	4.48	0	125	0	0.757	0.922
F _{DOE} 4	4.47	12.5	0	237.5	0.676	0.758
F _{DOE} 5	4.46	12.5	65	107.5	0.516	0.657
F _{DOE} 6	4.49	12.5	125	0	0.614	0.590
F _{DOE} 7	4.47	25	0	225	0.476	0.519
F _{DOE} 8	4.49	25	65	95	0.577	0.588
F _{DOE} 9	4.47	25	125	0	0.488	0.579
F _{DOE} 10	4.50	50	0	200	0.465	0.504
F _{DOE} 11	4.47	50	65	70	0.422	0.618
F _{DOE} 12	4.49	50	125	0	0.458	0.555
F _{DOE} 13	4.73	0	0	250	1.260	1.235
F _{DOE} 14	4.69	0	65	120	1.014	1.046
F _{DOE} 15	4.68	0	125	0	0.914	1.025
F _{DOE} 16	4.73	12.5	0	237.5	0.053	0.737
F _{DOE} 17	4.73	12.5	65	107.5	0.819	0.796
F _{DOE} 18	4.71	12.5	125	0	0.781	0.705
F _{DOE} 19	4.74	25	0	225	0.703	0.717
F _{DOE} 20-1	4.69	25	65	95	0.791	0.914
F _{DOE} 20-2	4.72	25	65	95	NA [†]	0.718
F _{DOE} 20-3	4.71	25	65	95	0.777	0.707
F _{DOE} 21	4.70	25	125	0	0.727	0.702
F _{DOE} 22	4.70	50	0	200	0.652	0.616
F _{DOE} 23	4.69	50	65	70	0.761	0.699
F _{DOE} 24	4.69	50	125	0	0.545	0.619
F _{DOE} 25	4.90	0	0	250	1.509	1.304

[0647]

F _{DOE} 26	4.86	0	65	120	1.172	1.104
F _{DOE} 27	4.87	0	125	0	1.048	1.045
F _{DOE} 28	4.91	12.5	0	237.5	0.937	0.808
F _{DOE} 29	4.86	12.5	65	107.5	0.885	0.768
F _{DOE} 30	4.88	12.5	125	0	0.911	0.747
F _{DOE} 31	4.91	25	0	225	0.953	0.772
F _{DOE} 32	4.87	25	65	95	0.878	0.853
F _{DOE} 33	4.87	25	125	0	0.766	0.717
F _{DOE} 34	4.94	50	0	200	0.821	0.745
F _{DOE} 35	4.90	50	65	70	0.844	0.734
F _{DOE} 36	4.86	50	125	0	0.692	0.665

[0648] ¹由于不可接受的色谱分布,样品被排除在DOE分析之外

[0649] 统计分析对于四周样品的SEC (表24B) 和RP-HPLC (表25B) 获得的DOE结果,以设计OPK-88003的优化制剂。使用Stat-Ease, Inc. **Design-Expert**® Version 9.0.1产生实验设计。使用ANOVA技术以95%置信区间评价反应的显著性(p值低于0.05表示统计学显著性相关性)。如表27所示,通过简化二次模型(设计模型)中的软件分析满足该显著性阈值的响应(表28)。

[0650] 表28:响应面约简二次模型的ANOVA (方差分析)

[0651]

来源	平方和	df	均方值	F值	p值 (prob>F)
区组	3.124E-005	1	3.124E-005		
模型	1.68	9	0.19	4.72	0.0009
A-pH	0.67	1	0.67	16.90	0.0003
B-Met	0.76	1	0.76	19.16	0.0002
C-Arg	0.012	1	0.012	0.29	0.5930
AB	2.803E-004	1	2.803E-004	7.083E-003	0.9336
AC	4.635E-003	1	4.653E-003	0.12	0.7349
BC	0.037	1	0.037	0.95	0.3398
A ²	0.033	1	0.033	0.83	0.3717
B ²	0.29	1	0.29	7.27	0.0121
C ²	2.329E-003	1	2.329E-003	0.059	0.8102
残差	1.03	26	0.040		
总变异	2.71	36			

[0652] 模型F值为4.72意味着该模型是有意义的。由于噪声,这种大的F值仅有0.09%的机会出现。

[0653] DOE计算使用四个因子进行:pH、甲硫氨酸浓度、精氨酸浓度和山梨糖醇浓度以及两种反应:%后主峰杂质的积累(RP-HPLC),%总聚集体杂质的积累(SE-HPLC)。用在40±2℃下储存4周的样品所获得的pH值进行计算。

[0654] 在RP-HPLC分析中检测的产生的用于%后主峰杂质累积的DOE模型(在5±3℃和40±2℃下储存4周的样品获得的%后主峰杂质之间的差异)显示了作为pH函数的杂质的渐进的、增加的趋势(图8和图9)。在pH 4.5测定%返回主峰杂质的最低累积。而且,%后主峰杂质的累积依赖于甲硫氨酸浓度,最低确定为≈30-35mM。精氨酸和山梨糖醇的存在对测试制剂中的%后杂质没有表现出显著作用。通过SEC分析检测,对于总聚集体杂质%的累积获得了类似的结果(对于在5±3℃和40±2℃下储存4周的样品获得的总聚集体杂质%之间的差异)。DOE模型显示杂质随pH值逐渐增加的趋势,在pH值为4.5,甲硫氨酸浓度≈30-35mM时,总聚集体杂质百分比的累积最低(图10和图11)。精氨酸和山梨糖醇的存在对测试制剂中的总聚集体杂质%没有表现出显著作用。

[0655] DOE的结果显示OPK-88003的制剂的最高稳定性,该制剂的pH为4.5并含有≈30-35mM甲硫氨酸。

[0656] 获得了OPK-88003可溶于其中并且物理和化学降解最小化的最佳液体制剂。作为这些制剂筛选和加速稳定性研究的一部分,评价了几种缓冲液类型、pH条件、赋形剂和表面

活性剂的存在/不存在。然后使用各种生物物理和分析工具来检测和鉴定API在应力条件下的化学和物理变化。对于最优化的浓度为70mg/mL的OPK-88003的制剂推荐以下制剂条件：10mM乙酸盐缓冲液，含有30-35mM甲硫氨酸，pH 4.5。在山梨糖醇的存在下，没有观察到对OPK-88003稳定性的作用，因此，推荐使用山梨糖醇作为等渗剂。也可使用其他张力剂，只要它们不负面影响制剂的稳定性。

[0657] 实施例6：每周一次的皮下给药研究

[0658] OPK-88003在402名患有T2DM的受试者中在1期和2期试验中进行测试，每周一次(QW)皮下(SC)剂量。在两部分、1期双盲、随机、安慰剂对照的临床药理学试验中，测试了高达60mg QW的单次和多次递增剂量。在24周双盲(前12周)、随机、安慰剂和活性比较物(2mg艾塞那肽ER)对照的2期试验中测试10mg至50mg/周的剂量。在双盲、安慰剂对照的临床药理学研究中，还测试了七天每天一次40mg的超治疗多SC剂量和六天内15至60mg的滴定剂量。

[0659] 来自1期试验的临床数据表明QW SC施用OPK-88003产生HbA1c和空腹葡萄糖的改善，并导致体重的进行性降低。在T2DM患者和肥胖非糖尿病患者中给药5周后体重从基线的变化为-1.55kg至-2.23kg，与安慰剂组中-0.81kg相比，剂量水平为25mg至60mg。在T2DM患者中葡萄糖耐量和空腹血浆葡萄糖(FPG)显著改善。

[0660] 在2期试验中，施用OPK-88003，以10、15、30和50mg剂量QW给T2DM受试者六个月，导致了对血糖和体重减少的剂量依赖性作用。在12和24周的所有剂量中观察到平均HbA1c统计学显著降低(高达1.43%)。OPK-88003与安慰剂相比显著地降低了HbA1c水平，并且在30mg和50mg剂量处不劣于2mg艾塞那肽ER(分别 $p=0.994$ 和 0.628)。与用艾塞那肽ER处理相比，用OPK-88003的FBG的更大降低导致类似的7点自我监测血糖(SMBG)分布值，并且与安慰剂相比导致更低的值。本研究使用的药品的组成是玻璃小瓶中的冻干制剂形式的式3(现在称为OPK-88003)，其除了活性成分外，还含有二水合柠檬酸钠(缓冲剂)、柠檬酸(缓冲剂)、蔗糖(稳定剂)和甘露醇(填充剂)，最后在注射前还含有无菌水。小瓶含有25mg pH约5.5的式3。向小瓶提供固体冻干制剂，用1.1mL注射用无菌水将其重新配制用于注射。

[0661] OPK-88003还在第24周产生了高达3.3kg的剂量依赖性体重减轻。与安慰剂和艾塞那肽ER相比，OPK-88003 50mg导致在12周($p<0.001$, $p=0.011$)和24周($p=0.007$, $p=0.05$)体重相对于基线的统计学显著变化百分比。到第24周，与安慰剂(11.8%)($p=0.004$)和艾塞那肽ER(18.3%)($p=0.025$)相比，至少两倍的OPK-88003-50mg(35.5%)的受试者减轻 $\geq 5\%$ 的体重。

[0662] 实施例7：剂量递增研究

[0663] 在约110名单独用饮食和运动或用稳定剂量的二甲双胍控制的患有2型糖尿病的受试者中进行随机双盲剂量递增安慰剂对照研究。该研究的目的在于治疗2型糖尿病和肥胖症。剂量递增方案被设计成改善葡萄糖控制并增加体重减轻。研究具有四期，由筛选/基线期(在第一次给药前至多两周)；30周治疗期，由剂量递增期(8周)和目标剂量期(22周)组成，以及随访期(4周)。受试者随机分配OPK-88003(式3的缓冲溶液)或施用QW的安慰剂(每周1x)。该研究评价了OPK88003的剂量递增方案对HbA1c、体重减轻的作用，以及在用二甲双胍和/或饮食和锻炼的葡萄糖控制不足的成年2型糖尿病患者中超过30周的安全性。

[0664] 剂量递增2期研究

[0665] OPK-88003或安慰剂用于每周一次SC注射。OPK-88003或安慰剂最初以20mg QW施

用4周,接着以40mg QW施用4周。一旦完成八周的剂量递增,受试者接受70mg QW的目标剂量达22周。对照组接受匹配的安慰剂SC注射QW 30周。

[0666] 总共113名受试者以与OPK-88003和安慰剂的1.75:1的比例随机分配。

[0667] HbA1c从基线到30周终点变化的主要功效结果在mITT分析集上进行。使用来自协方差分析(ANCOVA)模型的线性构造分析主要功效结果,其中治疗臂和BMI层作为因子,基线HbA1c值作为协变量。对主要功效结果的另外支持性分析是混合模型重复测量(MMRM)。模型中的因子是BMI层、治疗组、基线值、访问、以及治疗组与访问的交互。可以添加额外的协变量。使用与初步分析类似的剂量反应模型分析在30周终点时与基线的平均重量百分比变化。对治疗和HbA1c和BMI层作为固定效应而体重减轻5%或更大的受试者的百分比进行逻辑回归分析,基线体重作为协变量。基于逻辑回归模型,用BMI阶层的治疗组的因子和HbA1c基线作为协变量,对用LOCF治疗30周后的反应进行治疗组之间HbA1c小于或等于6.5%的受试者的数量和百分比的比较。

[0668] 本文所用术语的缩写和定义的列表包括:

[0669]	• ANCOVA	协方差分析
[0670]	• AUC	曲线下面积
[0671]	• BIW	每周两次
[0672]	• BMI	体重指数
[0673]	• C _{max}	最大浓度
[0674]	• CNS	中枢神经系统
[0675]	• CV	心血管
[0676]	• FGF-21	成纤维细胞生长因子21
[0677]	• FPG	空腹血浆葡萄糖
[0678]	• GI	胃肠
[0679]	• HR	心律
[0680]	• HbA1c	糖基化血红蛋白
[0681]	• HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇
[0682]	• LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇
[0683]	• LOCF	最后一次观察结转
[0684]	• LSM	最小二乘均值
[0685]	• MMRM	混合模型重复测量
[0686]	• NOAEL	没有观察到的副作用水平
[0687]	• PD	药效动力学
[0688]	• PK	药代动力学
[0689]	• QT _c	心率校正的QT间期
[0690]	• QW	每周一次
[0691]	• SC	皮下
[0692]	• SD	标准偏差
[0693]	• T2DM	2型糖尿病
[0694]	• ULN	正常值上限

[0695] 本研究的主要目的是评价在仅用饮食和运动不充分控制或用稳定剂量的二甲双胍治疗的2型糖尿病 (T2DM) 受试者中,从基线到30周治疗后,QW SC OPK-88003的剂量递增与安慰剂注射相比对HbA1c绝对变化的作用。基于美国糖尿病协会的疾病诊断标准2,糖尿病的分类和诊断(Classification and diagnosis of diabetes):糖尿病医疗标准-2018指南(Standards of Medical Care in Diabetes-2018guidelines) (Diabetes Care 2018:41 (补充1):S13-S27,本研究中包括的患者具有T2DM持续至少6个月。

[0696] 次要端点包括:在整个治疗期(30周)后从基线的平均体重变化百分比;30周治疗后具有5%或更大的体重减轻的受试者的百分比;FPG从基线到30周治疗后的变化;以及达到小于或等于6.5%HbA1c的受试者的数目和百分比(注意7.6%HbA1c为60mmol/mol,7.2%HbA1c为55mmol/mol)。

[0697] 其他目的包括:HDL-C、总胆固醇、甘油三酯和LDL-C从基线变化到30周治疗后;禁食FGF-21、脂连蛋白、 β -羟基丁酸酯、葡糖醛酸苷和胰岛素水平;GI和CV事件的发生率和比率;OPK-88003的免疫原性和评估OPK-88003的PK;以及PD终点,其包括但不限于功效(葡萄糖、HbA1c、体重)、耐受性(例如恶心和呕吐)、安全性(例如QTc、HR)和生物标志物(例如胰岛素、胰高血糖素)。

[0698] 本研究中包括的患者是男性或女性,年龄为18至80岁,并且在筛选时HbA1c值大于或等于7.0%且小于或等于10.5%,在筛选时BMI大于或等于27且小于或等于45kg/m²。如本文所述,在直接施用给需要治疗的T2DM患者稳定制剂中足够的剂量使HbA1c降低的量低于患者在方案前(基线)状态。

[0699] 药品/制剂是注射用无菌溶液(在2mL玻璃小瓶中1mL可提取体积)。小瓶含有70mg/mL的OPK-88003和选自L-甲硫氨酸(抗氧化剂)、山梨糖醇(张力剂)和三水合乙酸钠(缓冲剂)的非活性成分,pH为约4.5。用酸或碱调节pH。在一个实施方案中,制剂包含:

	• OPK-88003	70 mg/mL
[0700]	• L-甲硫氨酸	4.48 mg/mL
	• 山梨糖醇	38.26 mg/mL
	• 三水合乙酸钠	1.36 mg/mL
[0701]	• 水	适量至 1 mL

[0702] 安慰剂产品组合物与OPK-88003药品相同,没有OPK-88003活性成分。

[0703] 先前的研究结果

[0704] 与先前的2期试验研究中的艾塞那肽ER相比,观察到OPK-88003对HbA1c的等效作用和更大的体重减轻作用。这些发现与这样的假设一致,即与OPK-88003相关的额外胰高血糖素活性提供了与单独的GLP-1调节相比相当的血糖控制和优越的体重减轻。因为已经证明增加GLP-1激动剂的剂量可以获得额外的体重减轻(Davies等,JAMA,2015,314:687-699),所以增加OPK-88003的剂量将证明额外的体重减轻益处。先前的2期试验研究调查了OPK-88003相对于安慰剂和阳性对照艾塞那肽ER的剂量-反应关系,并确定了24周的QW注射可以使HbA1c降低高达1.43%并且使重量降低高达3.3kg。迄今为止观察到的OPK-88003AE分布的严重性,包括在2期试验中测试的50mg QW剂量,没有超过预期的对葡萄糖和体重的有益处。因此,OPK-88003的利益风险平衡支持OPK-88003的在高于50mg QW剂量下的额外临床测试。

[0705] 在先前的人类研究中,OPK-88003的较高剂量也有剂量依赖性的GI副作用增加,然而,这些作用本质上是短暂的。在优化OPK-88003用于葡萄糖控制和体重减轻的努力中,剂量递增可能是通过剂量逐渐递增滴定至目标剂量水平来减少GI副作用的关键。其他GLP-1激动剂,例如利拉鲁肽QD(每天一次)和塞马鲁肽(semaglutide)QW,显示当实施缓慢剂量增加时,达到更高的剂量,并且患者报告GI病症的速率可以显著降低。在糖尿病患者DP0-101的1期试验的多递增剂量部分中,OPK-88003的GI耐受性通过使用60mg QW的滴定方案得到改善。因此,预期较慢的剂量递增方案在高于先前2期试验研究中所施用的50mg剂量的剂量水平下将展现对恶心和呕吐的改善的耐受性是合理的。因此,对于该试验,将采用8周内的缓慢剂量滴定方案来帮助减轻胃肠AE。

[0706] 剂量选择

[0707] 该研究包括每周施用70mg的OPK-88003目标剂量。基于来自在先前的2期研究中具有T2DM的受试者的数据,预期70mg QW剂量产生空腹葡萄糖和HbA1c的最大降低,并产生比来自剂量范围寻找2期试验的50mg QW剂量更大的体重减轻。使用固定剂量递增方案在8周内施用70mg QW剂量水平。OPK-88003的血浆水平在5周内达到稳态,C_{max}的累积比率和曲线下面积(AUC)高达2.6倍。因此,应用每4周剂量递增的缓慢剂量滴定是合理的。在剂量递增的前4周,受试者接受20mg,接着4周40mg施用的QW。

[0708] 来自前2期试验的安全性和耐受性支持对8周剂量递增期计划的剂量水平的评价。

[0709] 使用具有一级吸收和一级消除的群体PK模型,连同所有PK参数的个体间变异性,来模拟建议的70mg QW剂量。当与在24周内具有可接受的安全性和耐受性的50mg剂量相比时,该剂量高33%(对于C_{max}和AUC)。由先前2期试验模型与1期临床药理学试验结合得到的模拟PK暴露,用超治疗暴露和非临床安全边界支持在靶向群体中施用70mg多剂量QW。

[0710] 由于OPK-88003的长终末半衰期,在临床药理学试验研究中的超量治疗暴露在最后剂量后持续约三周。每天一次施用方案导致高比例的中度严重恶心和呕吐,其需要伴随药物治疗,然而大多数事件在最后一次给药后一周内解决。在当前研究中,预期这些事件的强度和/或持续时间通过缓慢剂量滴定而减少。在以前的OPK-88003试验中,没有基于临床实验室评估和ECG报道的安全性问题,并且在超治疗暴露中没有严重或严重的AE(SAE)。

[0711] 来自人类研究的安全性数据证实了与GI耐受性相关的剂量相关的、可监测的AE。大多数事件是单次发作、严重程度温和、短暂和自限的。这些事件最常发生在第一剂量之后,然后通过第四剂量将发病率降低至接近对照水平,与GLP-1R激动剂作用一致。

[0712] 此外,对具有类似机制的分子的研究证实了用缓慢剂量滴定和较长给药持续时间改善的耐受性,并且没有证实具有较长给药持续时间的新的、出乎意料的毒性。

[0713] OPK-88003的毒理学程序用BIW施用方案提供了大鼠和猴中的连续血浆暴露,并支持所提出的施用方案。基于来源于人中群体PK模型的暴露(AUC)和在大鼠(3mg/kg)和猴(1.5mg/kg)中确定的器官毒性NOAELs,在长期给药后,70mg剂量的安全限度分别相当于0.7倍和10倍的暴露倍数。考虑到临床功效和耐受性,预期70mg QW剂量以缓慢剂量递增耐受,并产生血糖控制和体重减轻益处。来自该试验的数据与来自先前2期试验的数据一起将使得能够在T2DM中进行稳健的利益-风险表征,并将形成评价剂量递增对OPK-88003功效、安全性和耐受性的作用的基础,并支持在3期试验中包括的剂量和施用方案的选择。

[0714] 研究设计

[0715] 受试者接着进行固定剂量递增,包括在8周内的剂量递增。在接受20mg QW4周,然后接受4周40mg QW后,达到70mg QW的目标剂量。个体受试者的研究持续时间长达36周。在整个研究中将保持失明。

[0716] 设计该研究以确定剂量递增方案对相对于安慰剂的患有T2DM的受试者中70mg QW OPK-88003的安全性、耐受性和功效的作用。研究持续时间、目标群体和功效终点是2期试验的典型结果,并且与FDA指导一致。治疗期后四周的随访将确保有足够的时间来评估任何临床或实验室异常的可逆性。在随访时发展ADA的受试者在最后一次给药后大约四个月将进行一次额外的随访评估。该临床研究基于HbA1c值范围为7.0%-10.5% (包括端值) 招募血糖控制不足的受试者。类似范围的筛选HbA1c已用于T2DM治疗的许多研究。接受单独或与稳定二甲双胍单一疗法($\geq 1000\text{mg}/\text{天}$)联合的饮食和运动治疗的受试者。如果在访问1之前3个月或更长时间停止第二次口服抗高血糖药物(OAM),则接受第二次口服OAM的受试者也是合格的。在进入研究之前,需要稳定的二甲双胍治疗至少3个月以使基线葡萄糖漂移最小化。

[0717] 个体受试者的研究持续时间长达36周,由四期组成:筛选(第一次给药前至多2周)、剂量递增(8周)、靶向剂量/维持(22周)和随访(4周)。

[0718] 结果

[0719] 使用混合模型重复测量(MMRM)分析数据以得到治疗患者群体的改进意图(mITT; 113位患者中的108位)。mITT群体包括接受至少一剂药物并具有一次基线后评价的所有患者。

[0720] 研究结果的顶线分析证明OPK88003满足主要目标,与安慰剂相比在治疗30周后血红蛋白A1c(HbA1c)统计上显著降低,以及与安慰剂相比具有重要的次要终点,统计上显著的体重减轻。

[0721] OPK88003显示了30周HbA1c的强烈的、临床上有意义的降低(-1.30%,相对于安慰剂,-0.09%平均绝对降低为, $p < 0.0001$)。另外,50%的OPK88003治疗的患者实现HbA1c $\leq 6.5\%$,而安慰剂治疗的受试者为13.8% ($p = 0.0008$)。

[0722] 表29至33显示MMRM mITT群体中HbA1c从基线到第4、8、12、22和30周/LOCFh的变化分析。表34显示ANCOVA mITT群体中从基线到第30周/LOCFa11 HbA1c变化的分析。

[0723] 用OPK88003治疗的患者在30周实现了显著的体重减轻(-4.4kg,相较于安慰剂,-1.8kg, $p = 0.01$)。与13%的安慰剂治疗的患者相比,约38%的治疗的患者实现了5%或更大的体重减轻($p = 0.008$)。

[0724] 表35显示MMRM mITT群体从基线到第30周的重重量变化分析。表36显示了在mITT群体中实现 $\geq 5\%$ 体重减轻的受试者的分析。

[0725] OPK88003治疗的患者显示了从基线显著的血液甘油三酯降低。OPK88003治疗组中甘油三酯的降低是-31.2mg/dL ($p = 0.005$),相比之下安慰剂的甘油三酯的降低是-11.6mg/dL ($p = 0.44$)。OPK88003治疗显示了GLP-1受体激动剂类预期的安全性和耐受性分布。最常见的不良事件是恶心、呕吐和腹泻。这些大部分是温和的,并且主要在滴定期间发生,并且随着时间的推移而消除。没有观察到严重的不良事件。

[0726] 表37显示MMRM mITT群体中从基线到第30周的甘油三酯变化的分析。

[0727] 表29:HbA1c从基线到第4周的变化分析:MMRM mITT群体

[0728]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	69	39	
基线[2]	均值(SD)	8.05 (0.834)	7.97 (0.906)	
第 4 周	均值(SD)	7.39 (0.768)	7.88 (1.080)	
---从基线到第 4 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-0.67 (0.063)	-0.10 (0.078)	
	95%置信区间	(-0.79, -0.54)	(-0.26, 0.05)	
	p 值	<0.0001	0.1907	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-0.57 (0.091)		
	95%置信区间	(-0.75, -0.39)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.2192
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 以从基线 的变化作为因变量, 并通过访问交互作用影响 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治 疗组、基线 值、访问和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。 [4]第 30 周/LOCFh: 如果第 30 周测量缺失, 则应用最后一次观察结转以仅针对早期称为 高血糖的受试者输入缺失的第 30 周值。否则, 不进行归算。				

[0729] 表30:HbA1c从基线到第8周的变化分析:MMRM mITT群体

[0730]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	62	33	
基线[2]	均值(SD)	8.07 (0.861)	7.89 (0.753)	
第 8 周	均值(SD)	6.99 (0.760)	7.76 (0.976)	
---从基线到第 8 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-1.10 (0.092)	-0.08 (0.120)	
	95%置信区间	(-1.28, -0.92)	(-0.31, 0.16)	
	p 值	<0.0001	0.5275	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.02 (0.145)		
	95%置信区间	(-1.31, -0.74)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.4504
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少，则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM)，以从基线 的变化作为因变量，并通过访问交互作用影响 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治 疗组、基线 值、访问和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。 [4]第 30 周/LOCFh: 如果第 30 周测量缺失，则应用最后一次观察结转以仅针对早期称为 高血糖的受试者输入缺失的第 30 周值。否则，不进行归算。				

[0731] 表31:HbA1c从基线到第12周的变化分析:MMRM mITT群体

[0732]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	60	30	
基线[2]	均值(SD)	8.01 (0.795)	7.78 (0.657)	
第 12 周	均值(SD)	6.66 (0.680)	7.48 (0.867)	
---从基线到第 12 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-1.38 (0.105)	-0.20 (0.138)	
	95%置信区间	(-1.58, -1.17)	(-0.48, 0.07)	
	p 值	<0.0001	0.1430	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.17 (0.168)		
	95%置信区间	(-1.51, -0.84)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.1846
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 以从基线 的变化作为因变量, 并通过访问交互作用影响 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治 疗组、基线 值、访问和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。 [4]第 30 周/LOCFh: 如果第 30 周测量缺失, 则应用最后一次观察结转以仅针对早期称为 高血糖的受试者输入缺失的第 30 周值。否则, 不进行归算。				

[0733] 表32:HbA1c从基线到第22周的变化分析:MMRM mITT群体

[0734]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	54	25	
基线[2]	均值(SD)	8.07 (0.814)	7.78 (0.697)	
第 22 周	均值(SD)	6.64 (0.832)	7.17 (0.753)	
---从基线到第 22 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-1.39 (0.123)	-0.31 (0.164)	
	95%置信区间	(-1.64, -1.15)	(-0.64, 0.01)	
	p 值	<0.0001	0.0606	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.08 (0.201)		
	95%置信区间	(-1.48, -0.68)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.0164
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 以从基线 的变化作为因变量, 并通过访问交互作用影响 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治 疗组、基线 值、访问和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。 [4]第 30 周/LOCFh: 如果第 30 周测量缺失, 则应用最后一次观察结转以仅针对早期称为 高血糖的受试者输入缺失的第 30 周值。否则, 不进行归算。				

[0735] 表33:HbA1c从基线到第30周/LOCFh的变化的分析:MMRM mITT群体

[0736]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	50	29	
基线[2]	均值(SD)	8.10 (0.836)	8.01 (0.974)	
第 30 周/LOCFh [4]	均值(SD)	6.74 (0.960)	7.74 (1.365)	
---从基线到第 30 周/LOCFh [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.30 (0.137)	-0.09 (0.181)	
	95%置信区间	(-1.57, -1.02)	(-0.45, 0.27)	
	p 值	<0.0001	0.6049	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.20 (0.224)		
	95%置信区间	(-1.65, -0.76)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.0005
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 以从基线 的变化作为因变量, 并通过访问交互作用影响 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治 疗组、基线 值、访问和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。 [4]第 30 周/LOCFh: 如果第 30 周测量缺失, 则应用最后一次观察结转以仅针对早期称为 高血糖的受试者输入缺失的第 30 周值。否则, 不进行归算。				

[0737] 表34:HbA1c从基线到第30周/LOCFall的变化分析:ANCOVA mITT群体

[0738]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
血红蛋白 A1C (%)				
受试者数[1]	n	69	39	
基线[2]	均值(SD)	8.05 (0.834)	7.97 (0.906)	
第 30 周/LOCFall [3]	均值(SD)	6.82 (0.925)	7.85 (1.240)	
---从基线到第 30 周/LOCFall [4]---				
	LS 均值(SE)	-1.18 (0.131)	-0.11 (0.159)	
	95%置信区间	(-1.44, -0.92)	(-0.43, 0.20)	
	p 值	<0.0001	0.4773	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-1.07 (0.185)		
	95%置信区间	(-1.43, -0.70)		
	p 值	<0.0001		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.0002
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少，则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]第 30 周/LOCFall: 如果缺少第 30 周的测量，则应用最后一次观察结转来输入所有受试者的缺少的第 30 周的值。 [4]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自 ANCOVA 模型，以基线的变化作为因变量，以处理和 BMI 分层组(<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)作为因子，基线值作为协变量。				

[0739] 表35:从基线到第30周的重量变化分析:MMRM mITT群体

[0740]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
体重(kg)				
受试者数[1]	n	51	25	
基线[2]	均值(SD)	97.15 (14.058)	99.11 (18.507)	
第 30 周	均值(SD)	93.16 (14.514)	97.14 (19.283)	
---从基线到第 30 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-4.39 (0.633)	-1.76 (0.890)	
	95%置信区间	(-5.64, -3.13)	(-3.52, 0.01)	
	p 值	<0.0001	0.0507	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-2.63 (1.076)		
	95%置信区间	(-4.76, -0.50)		
	p 值	0.0163		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			0.1573
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 在分析之前, 对每次访问的重复权重进行平均。				
[1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。				
[2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。				
[3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 其中从基线的变化作为因变量, 并且通过访视相互作用在 HbA1c 分层组(<8.5%, ≥8.5%)、BMI 分层组 (<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治疗组、基线值、访视和治疗组的模型中的因子。使用非结构化协方差矩阵。不进行归算。				

[0741] 表36:对达到≥5%重量减轻的受试者的分析:mITT群体

[0742]

类别 统计	OPK-88003 (N=69)		安慰剂 (N=39)	
在第 4 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	69		39	
n (%)	2 (2.9)		0 (0.0)	
在第 8 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	62		33	
n (%)	10 (16.1)		1 (3.0)	
优势比		8.408		
95%置信区间		(0.919, 76.919)		
p 值		0.0594		
在第 12 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	60		30	
n (%)	21 (35.0)		1 (3.3)	
优势比		19.976		
95%置信区间		(2.439, 163.604)		
p 值		0.0053		
在第 16 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	58		28	
n (%)	24 (41.4)		2 (7.1)	
优势比		10.009		
95%置信区间		(2.129, 47.056)		
p 值		0.0035		
在第 22 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	55		25	
n (%)	26 (47.3)		6 (24.0)	
优势比		2.910		
95%置信区间		(0.995, 8.510)		
p 值		0.0511		
在第 26 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	54		25	
n (%)	24 (44.4)		6 (24.0)	
优势比		2.510		
95%置信区间		(0.856, 7.358)		

[0743]

类别 统计	OPK-88003 (N=69)		安慰剂 (N=39)	
p 值		0.0934		
在第 30 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数				
N'	51		25	
n (%)	21 (41.2)		5 (20.0)	
优势比		3.061		
95%置信区间		(0.972, 9.646)		
p 值		0.0560		
在第 30 周体重减轻 $\geq 5\%$ 的受试者数/LOCFall [1]				
N'	69		39	
n (%)	26 (37.7)		5 (12.8)	
优势比		4.204		
95%置信区间		(1.450, 12.189)		
p 值		0.0082		
在分析之前，对每次访问的重复权重进行平均。$\% = 100 * n / N'$，其中，N=在指定访问时的响应者的数量，并且 N'=在指定访问时具有非缺失值的受试者的数量。优势比、置信区间和 p 值来自以治疗组、HbA1c 层和 BMI 层作为因子并且以基线重量作为协变量的逻辑回归模型。 仅当每组中存在至少一个应答者时进行逻辑回归 [1]第 30 周/LOCFall: 如果缺少第 30 周的测量，则应用最后一次观察结转来输入所有受试者的缺少的第 30 周的值。				

[0744]

表37:从基线到第30周的甘油三酯变化的分析:MMRM mITT群体

[0745]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
甘油三酯(mg/dL)				
受试者数[1]	n	50	25	
基线[2]	均值(SD)	193.0 (119.52)	171.9 (134.72)	
第 30 周	均值(SD)	159.2 (101.66)	168.7 (85.11)	
---从基线到第 30 周的变化[3]---				
	LS 均值(SE)	-31.2 (11.02)	-11.6 (15.23)	

[0746]

参数(单元) 类别	统计数据	OPK-88003 (N=69)	安慰剂 (N=39)	
	95%置信区间	(-53.1, -9.4)	(-41.8, 18.7)	
	p 值	0.0055	0.4499	
---治疗比较(OPK-88003-安慰剂) [3]---				
	LS 均值(SE)	-19.7 (18.03)		
	95%置信区间	(-55.4, 16.1)		
	p 值	0.2774		
	残差 p 值的 Shapiro-Wilk 正态 检验			<0.0001
SD=标准偏差 LS=最小二乘方 SE=标准误差 [1]仅包括具有未缺失基线和指定访问的受试者。 [2]基线定义为第 0 周的测量值。如果缺少, 则第一剂量之前的最后一个值被用作基线。 [3]LS 均值、SE、置信区间和 p 值来自混合模型重复测量(MMRM), 其中从基线 的变化作为因变量, 并且通过访视相互作用在 HbA1c 分层组(<8.5%, ≥8.5%)、BMI 分 层组 (<30 kg/m ² , ≥30 kg/m ²)、治疗组、基线值、访视和治疗组的模型中的因子。使用非结 构化协方差矩阵。不进行归算。				

[0747] 实施例8:溶解度、粘度、可注射性、温度偏移和稳定性

[0748] 对在10mM柠檬酸盐缓冲液pH 5.5中配制为60、70和80mg/mL的OPK-88003肽进行了初始配制研究。下列方法用于测试OPK-88003样品:MFI、HIAC、DLS、粘度和可注射性。此外, 对在10mM柠檬酸盐缓冲液pH 5.5中配制为40、60和80mg/mL的OPK-88003样品进行溶解度研究。

[0749] 溶解度研究:冻干的OPK-88003干粉在室温下在所有测试浓度(40、60和80mg/mL)的乙酸盐缓冲液中完全可溶。溶解时间为:40mg/mL约1-2分钟,60mg/mL约2-3分钟,80mg/mL样品约3-4分钟。所有溶液都是澄清无色的。在室温、5℃和-5℃下储存样品18小时后,评价OPK-88003溶液的溶解度。在所有测试条件下都没有观察到相分离或肽沉淀。

[0750] 表29:溶解时间

[0751]

样品	溶解时间(分 钟)	相分离	颜色	澄清度
40 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓 冲液, pH 5.5	1 至 2	无相分离	无色	澄清
60 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓 冲液, pH 5.5	2 至 3	无相分离	无色	澄清
80 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓 冲液, pH 5.5	3 至 4	无相分离	无色	澄清

[0752] 在溶解期间和溶解后对材料进行的外观测定

[0753] 表30:在不同温度下储存后的溶解度

浓度	储存条件	相分离	颜色	澄清度
40 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	在-5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在 5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在室温下 18 小时	无相分离	无色	澄清
60 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	在-5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在 5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在室温下 18 小时	无相分离	无色	澄清
80 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	在-5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在 5℃下 18 小时	无相分离	无色	澄清
	在室温下 18 小时	无相分离	无色	澄清

[0755] 条件曝光后对材料进行的外观测定

[0756] 粘度:如预期的,测试制剂的粘度随OPK-88003浓度的增加而增加。对于所有的制剂,粘度随着剪切速率的增加而保持不变,显示出牛顿行为。

[0757] 表31:粘度

浓度	温度表 (°C)	RPM	剪切速率 (s ⁻¹)	扭矩 (%)	粘度 (cP)	剪切应力 (s ⁻¹)	粘度平均值 (cP)
60 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	22.04	5	37.5	26.7	16.4	6.1	16.5
	21.99	10	75.0	53.8	16.5	12.4	
	21.99	12	90.0	64.5	16.5	14.8	
	22.03	15	113.0	80.9	16.6	18.6	
	21.98	18	135.0	97.4	16.6	22.4	
70 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	22.03	5	37.5	33.9	20.8	7.8	21.1
	22.01	10	75.0	68.5	21.0	15.7	
	22.04	12	90.0	82.4	21.0	18.9	
	22.02	13	97.5	90.2	21.2	20.7	
	22.04	14	105.0	97.5	21.3	22.4	
80 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	22.00	5	37.5	43.6	26.7	10.0	26.9
	21.99	7	52.5	62.0	27.1	14.3	
	22.01	9	67.5	79.2	26.9	18.2	
	21.99	10	75.0	87.4	26.8	20.1	
	22.04	11	82.5	96.9	27.0	22.3	

[0759] 可注射性:使用六种不同类型的针测量三种OPK-88003方案的松脱力和滑动力。在测试的OPK-88003溶液和针的类型之间没有观察到松脱力的显著差异。基于针型和OPK-88003浓度观察到滑动力的明显趋势。

[0760] 表32:可注射性

样品	针头	BF Max [N]	GF Max [N]
60 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	25G 5/8 TW	1.72	3.44
	25G 5/8	1.24	4.06
	26G 1/2	1.77	5.11
	26G 5/8	1.67	5.61
	27G 1/2	1.51	10.88
	30G 1/2	1.77	30.43
70 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	25G 5/8 TW	1.74	3.33
	25G 5/8	1.61	4.28
	26G 1/2	1.65	4.88
	26G 5/8	1.92	5.56
	27G 1/2	1.47	9.55
	30G 1/2	1.95	24.74
80 mg/mL, 10 mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5	25G 5/8 TW	1.98	5.91
	25G 5/8	1.48	6.40
	26G 1/2	1.59	7.44
	26G 5/8	1.67	8.85
	27G 1/2	1.79	18.69
	30G 1/2	N/A	N/A

[0763] 注射器:BD, 1mL

[0764] 表33:温度偏移研究 (研究条件:5F/T循环)

[0765]

属性	方法	T=O 月(07/05/17)	5 FIT 循环(01/08/18)
物理外观	SOP-0363, Ajinomoto Althea	澄清无色溶液	澄清无色溶液
pH	SOP-0187, Ajinomoto Althea	4.6	4.6
反相HPLC (RP-HPLC)	cSOP-0735, Ajinomoto Althea	纯度: 95.2% 量: 99.8% 总相关物质: 4.80% 最大相关物质: 2.06%	量: 96.6% LC 纯度: 95.4% RRT 0.95: 0.21% RRT 0.99: 1.21% RRT 1.02: 0.75% RRT 1.03: 1.93% RRT 1.03: 0.45% 总相关物质: 4.6% 最大相关物质: 1.9%
尺寸排阻 HPLC	cSOP-0748, Ajinomoto Althea	单体: 95.4% 聚集体1: 1.8% 聚集体2: 2.4% 单体后峰: 0.5 总杂质: 4.7	单体: 95.4% 聚集体1: 1.9% 聚集体2: 2.1 % 聚集体3: 0.3% 单体后峰2: 0.4% 总杂质: 4.6%

[0766] 表34:温度偏移研究(研究条件:48小时@30℃/65%RH)

[0767]

属性	方法	T=0 月 (07/05/17)	30℃/65% RH下48小时 (12/11/17)
物理外观	SOP-0363, Ajinomoto Althea	澄清无色溶液	澄清无色溶液
pH	SOP-0187, Ajinomoto Althea	4.6	4.6
反相HPLC (RP-HPLC)	cSOP-0735, Ajinomoto Althea	量: 99.8% 纯度: 95.2% 总相关 物质: 4.80% 最大相关物 质: 2.06%	量: 99 % 纯度: 94.2 RRTO.94: 1.76% RRT 0.99: 0.77% RRT 1.03: 1.15% RRT 1.03: 1.59% RRT 1.04: 0.51% 总相关物质: 5.8 最大相关物质: 1.8%
尺寸排阻 HPLC	cSOP-0748, Ajinomoto Althea	单体: 95.4% 聚集体1: 1.8% 聚集体2: 2.4% 单体后峰: 0.5 总杂质: 4.7	单体: 95.2% 聚集体1: 1.9% 聚集体2: 2.1 % 聚集体3: 0.3% 单体后峰: 0.6% 总杂质: 4.8%

[0768] 稳定性研究: 对70mg/mL pH 4.5的含有甲硫氨酸的乙酸盐缓冲液和1mL长BD Neopak™预可填充注射器进行另外的稳定性研究。

[0769] 表35: 另外的稳定性研究

[0770]	试验 (分析程序)	时间=0	1个月 25 ± 2℃ / 60 ± 5 %RH	在5±3℃下12个月
	溶液颜色(目视)	无色液体	无色液体	无色液体
	外观/颗粒(目视)	无可见微粒	无可见微粒	无可见微粒
	pH	4.53	4.50	4.55
	纯度(RP-HPLC)	95.5%	95.0%	94.4%
	总相关物质(RP-HPLC)	4.5%	5.0%	5.6%
	个体相关物质(RP-HPLC)	前=1.7% 后=2.8%	前=1.8% 后=3.1%	前=2.3% 后=3.3%
	纯度(SEC-HPLC)	94.8%	94.9%	94.6%
	总相关物质(SEC-HPLC)	5.2%	5.1%	5.4%

[0771] 实施例9:本发明制剂的局部耐受性的评价

[0772] 设计该研究是为了评估在两种不同浓度和两种不同媒介物制剂的OPK-88003单次皮下剂量后的局部耐受性,以及当施用给新西兰白兔时它们各自的媒介物对照。

[0773] 将兔分配到四个处理组(两个雌性/组),并且每只动物接受两次单次皮下注射,一次含有媒介物对照,并且另一次含有OPK-88003试验品制剂:兔皮下注射1mL基于乙酸盐缓冲液的媒介物对照1和25或75mg/mL配制在基于乙酸盐缓冲液的媒介物中的OPK-88003,或基于柠檬酸盐缓冲液的媒介物对照2和25或75mg/mL配制在基于柠檬酸盐缓冲液的媒介物中的OPK-88003,如下所述。

[0774] • 媒介物(对照)1=10mM乙酸盐缓冲液,30mM甲硫氨酸,230mM山梨糖醇,pH 4.5

[0775] • 媒介物(对照)2=30mM柠檬酸盐,20mg/mL甘露醇,5mg/mL蔗糖,pH 5.5

[0776] • 注射部位1与注射部位2在不同的位置

[0777] • 每一者的体积为1mL

[0778] 结果

[0779] 所有动物存活,直到研究结束时预定安乐死。除了下面提到的局部注射部位反应,没有注意到媒介物对照或试验品制剂相关的临床观察。单独的Draize评分结果在表36中给出。平均Draize水肿评分的汇总在表37中给出。

[0780] 红斑:在研究期间,在以25或75mg/mL施用两种媒介物对照或试验品制剂中的任一种后,没有动物在注射部位表现出红斑。

[0781] 与媒介物对照相关的水肿:在给予基于乙酸盐缓冲液的媒介物(媒介物对照1)的注射部位直至给药后30分钟的一只动物(#002)中和在给予柠檬酸盐缓冲液的媒介物(媒介物对照2)的注射部位直至给药后77分钟的两只动物(#006、#007)(评分1)中观察到非常轻微的水肿(评分1)。基于乙酸盐缓冲液的媒介物注射部位处的平均水肿评分分别为给药后15分钟和最后评分时间点(分别为研究开始和结束)时的0.25和0。在基于柠檬酸盐缓冲液

的媒介物注射部位的平均水肿评分在研究开始和结束时分别为0.5和0.5。

[0782] 与25和70mg/mL OPK-88003相关的水肿:在OPK-88003试验品制剂施用的注射部位,在给药后早至15分钟,在所有动物中观察到非常轻微(1分)至轻微(2分)的水肿,并且在研究结束时保持相同或严重程度降低。组1和组3中的动物(分别以25mg/动物施用在基于乙酸盐和柠檬酸盐缓冲的媒介物中配制的试验品)在研究开始和结束时分别类似地显示2和1.5的平均水肿评分。

[0783] 组2中的动物(以70mg/动物施用在基于乙酸盐缓冲的媒介物中配制的试验品)在研究开始和结束时分别表现出2和1的平均水肿评分。组4中的动物(以70mg/动物施用在基于柠檬酸盐缓冲液的媒介物中配制的试验品)在研究开始和结束时分别显示1和0.5的平均水肿评分。与媒介物对照相比与OPK-88003制剂相关的略微更大程度的水肿可能部分地归因于这些溶液的高粘度(~22cP),其在OPK-88003的存在下出现,但不是仅与媒介物对照一起出现。由于OPK-88003制剂的高粘度引起的水肿可能是由于在尸体剖检时注射部位处没有任何可见的炎症。

[0784] 总之,与媒介物对照相比,施用OPK-88003后注射部位的局部水肿的程度稍微大一些,而不管用于制剂的媒介物。与25mg/mL OPK-88003相关的注射部位水肿是类似的,无论是配制在基于乙酸盐或柠檬酸盐缓冲液的媒介物中。与基于柠檬酸盐缓冲液的媒介物相比,与70mg/mL OPK-88003相关的注射部位水肿在乙酸盐中稍大。然而,注射部位水肿的程度和在治疗组之间观察到的任何差异是最小的,因此不被认为是不利的或显著的。

[0785] 表36:个体Draize分数

[0786]

序列组	动物ID	时间 (相对于 给药时间)	注射部位			
			1 (左)		2 (右)	
			红斑	水肿	红斑	水肿
治疗	基于乙酸盐缓冲液的…		媒介物对照		OPK-88003 制剂 (25 mg/mL)	
1	001	15 min	0	0	0	2
		30 min	0	0	0	2
		60 min	0	0	0	1
	002	15 min	0	1	0	2
		30 min	0	1	0	2
		60 min	0	0	0	2
治疗	基于乙酸盐缓冲液的…		媒介物对照		OPK-88003 制剂 (75 mg/mL)	
2	003	15 min	0	0	0	2
		30 min	0	0	0	1
		60 min	0	0	0	0
	004	15 min	0	0	0	2
		30 min	0	0	0	2
		60 min	0	0	0	2
		90 min ¹	0	0	0	2
治疗	基于柠檬酸盐缓冲液的…		媒介物对照		OPK-88003 制剂 (25 mg/mL)	
3	005	15 min	0	0	0	2
		30 min	0	0	0	1
		60 min	0	0	0	1
		80 min ¹	0	0	0	1
	006	15 min	0	1	0	2

[0787]

		30 min	0	1	0	2
		60 min	0	1	0	2
		77 min ¹	0	1	0	2
治疗	基于柠檬酸盐缓冲液的…		媒介物对照		OPK-88003 制剂 (75 mg/mL)	
4	007	15 min	0	1	0	1
		30 min	0	0	0	1
		60 min	0	1	0	1
		69 min ¹	0	1	0	1
	008	15 min	0	0	0	1
		30 min	0	0	0	1
		60 min	0	0	0	0

[0788] ¹由于在60分钟观察到水肿,在另外的时间点对动物#004-007进行Draize评分。

[0789] 表37:平均Draize水肿评分汇总

[0790]	媒介物 对照1 (基于乙酸盐 缓冲液的)	媒介物 对照 2 (基于柠檬酸 盐 缓冲液的)	OPK- 88003, 25 mg/mL 在媒介物1 中	OPK- 88003, 70 mg/mL 在媒介物1 中	OPK- 88003, 25 mg/mL 在媒介物 2中	OPK- 88003, 70 mg/mL 在媒介物2 中	
	均值 t,15min ¹	0.25	0.5	2	2	1	
	均值 t, 最后 ²	0	0.5	1.5	1	1.5	0.5
	N	4	4	2	2	2	2

[0791] ¹给药后15分钟时水肿的平均Draize评分

[0792] ²给药后最后评分时间点水肿的平均Draize评分

[0793] 总体病理学:在注射部位没有注意到媒介物对照或OPK-88003试验品制剂相关的肉眼观察。在肉眼尸检期间在以下动物中观察到标记的注射部位区域外部的瘀伤:

[0794] • #001 (组1):左侧显示在标记的注射部位区域外部的瘀伤。

[0795] • #006 (组3):左侧显示在标记的注射部位区域外部的瘀伤。

[0796] • #007 (组4):右侧显示在标记的注射部位区域外部的瘀伤。

[0797] • #008 (组4):左侧和右侧在标记的注射部位区域的外部显示瘀伤。

[0798] 然而,确定该瘀伤是皮下注射程序的结果,而不是与媒介物对照或试验品相关。

[0799] 总之,在雌性新西兰白兔中,以25或70mg/动物的剂量水平单次皮下注射在基于乙酸盐或柠檬酸盐缓冲液的媒介物中配制的OPK-880033是良好耐受的,并且仅与定位于注射部位的非常轻微的水肿有关。尽管与OPK-88003制剂相关的水肿可能是由于高粘度而稍大于单独的赋形剂对照所观察到的,因为水肿不是剂量依赖性的、最小的并且不被认为是

利的,但是得出结论,在两种赋形剂对照之间的局部注射部位水肿或者OPK-88003制剂的剂量水平没有显著的差异。

[0800] 本发明发现,虽然典型的包含氯化钠的等渗溶液通常适合于递送液体或肠胃外制剂中的药物,但是在包含聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物的溶液中存在氯化钠出乎意料地引起不稳定性问题。此外,加入本文所述的聚乙二醇化胃泌酸调节素化合物或类似物令人惊讶地引起pH升高超过优选范围。因此,本发明发现符合必需的物理和化学稳定性标准的本发明液体制剂。通过发现本文的稳定液体制剂,本发明人已经避免了使用药物的固体分散体(即冻干的或其他)的需要,所述固体分散体需要在施用至患者之前用水或盐水溶液重构。此外,该制剂作为冷藏液体是稳定的,并且不需要冷冻来保持稳定性,允许在预填充注射器或药筒中而不是小瓶中储存,并且使得患者更容易在家中使用。因此,患者或医疗专业人员可以从预填充注射器、药筒或填充的小瓶“直接施用”剂型,而不采取重构粉末制剂的额外步骤,和/或此类个体不能使用不存在此类稳定液体制剂的预填充注射器(或预填充小瓶)。

[0801] 上述实例在性质上是非限制性的,并且此类制剂可以包括任何聚乙二醇化胃泌酸调节素类似物 and 任何合适的缓冲剂和/或张力剂和/或稳定剂,条件是由其制备的此类液体制剂基本上不含杂质、适于无菌制造、稳定并且满足必需的递送特性和物理特性,包括流动、粘度和对于递送方法的适用性,所述递送方法包括用于单次和多次使用的预填充注射器、自动注射器等。

[0802] 本文(包括任何所附权利要求、说明书摘要和附图)所述的所有特征,和/或如此公开的任何方法或过程的所有步骤,可以以任何组合与上述方面中的任一者组合,除了这些特征和/或步骤中的至少一些是互斥的组合之外。虽然本文已经详细描绘和描述了优选的实施方案,但是对于相关领域的技术人员来说显而易见的是,在不脱离本发明的精神的情况下,可以进行各种修改、增加、替换等等,所以这些均被考虑在以下权利要求所限定的本发明的范围内。

序列表

<110> 欧普科爱尔兰环球控股有限公司(OPKO Ireland Global Holdings, Ltd.)

<120> 胃酸调节素肽类似物制剂

<130> P-581901-PC

<150> 62/773,651

<151> 2018-11-30

<150> 62/821,382

<151> 2019-03-20

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (29)

<223> Aib

<220>

<221> misc_feature

<222> (38) .. (39)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 1

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Gly Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (29)

<223> Aib

<400> 2

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Gly Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala Cys Cys

35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (29)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38) .. (38)

<223> Cys (20kD PEG)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39) .. (39)

<223> Cys (20kD PEG)

<400> 3

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Gly Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa

35

<210> 4

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 活性OXM

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (29)

<223> Aib

<400> 5

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Gly Arg Asn

20	25	30
Arg Asn Asn Ile Ala		
35		
<210> 6		
<211> 39		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 胃酸调节素肽类似物		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (2) .. (2)		
<223> D-丝氨酸		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (10) .. (10)		
<223> 1-Nal		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (29) .. (29)		
<223> Aib		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (38) .. (39)		
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸		
<400> 6		
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Lys Tyr Leu Asp Glu		
1 5 10 15		
Lys Ala Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Ala Arg Asn		
20 25 30		
Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa		
35		
<210> 7		
<211> 39		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 胃酸调节素肽类似物		
<220>		

$$\langle 222 \rangle \quad (38) \dots (38)$$

<223> Cys (20 kDa PEG)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39) .. (39)

<223> Cys (20 kDa PEG)

<400> 8

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Ala Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Ala Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa

35

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> D-丝氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> 1-Nal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (29)

<223> Aib

<400> 9

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Ala Ala Gln Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Xaa Ala Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 10

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 11

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 12

Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 13

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 13

Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 14

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 14

Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr

20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp

35 40

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 15

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 16

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 16

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys

20 25

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> α -甲基-谷氨酸

<400> 17

Xaa	Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Xaa	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Lys	Arg	Asn
			20					25					30		
Arg	Asn	Asn	Ile	Ala											
			35												

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 18

Xaa	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Met	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Lys								
			35				40								

<210> 19

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 19

Xaa	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Ala	Ala	His	Ser	Gln	Gly	Thr
			20					25						30	
Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Lys					
			35					40							

<210> 20

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 20

Xaa	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Gly
1				5					10					15	
Gly	Gly	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met
			20					25					30		
Glu	Glu	Glu	Ala	Val	Lys										
			35												

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (16)

<223> α -甲基-谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> α -甲基-谷氨酸

<400> 21

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 22

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> α -甲基-谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> α -甲基-谷氨酸

<400> 22

Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 23

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> α -甲基-谷氨酸

<400> 23

Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 24

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 24

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu

20 25 30

Glu Lys

<210> 25

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 25

Xaa	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Ile	Arg	Asn	Thr	Lys	Arg	Asn
			20					25					30		
Arg	Asn	Asn	Ile	Ala											
			35												

<210> 26

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 26

Xaa	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Ile	Arg	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Lys								
			35				40								

<210> 27

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 27

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 28

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

<210> 29

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 29

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 脱氨基-组氨酰基

<400> 30

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 31

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 32

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 33

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 34

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 35

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 36

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 37

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> d-丝氨酸

<400> 37

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 38

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<400> 38

Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 39

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> d-丝氨酸

<400> 39

Xaa	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Lys	Arg	Asn
			20					25					30		
Arg	Asn	Asn	Ile	Ala											
			35												

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 4-咪唑并乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 40

Xaa	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	
Lys	Arg	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Cys		
			20					25					30		

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 41

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 42

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 氨基异丁酸

<400> 42

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30



图1

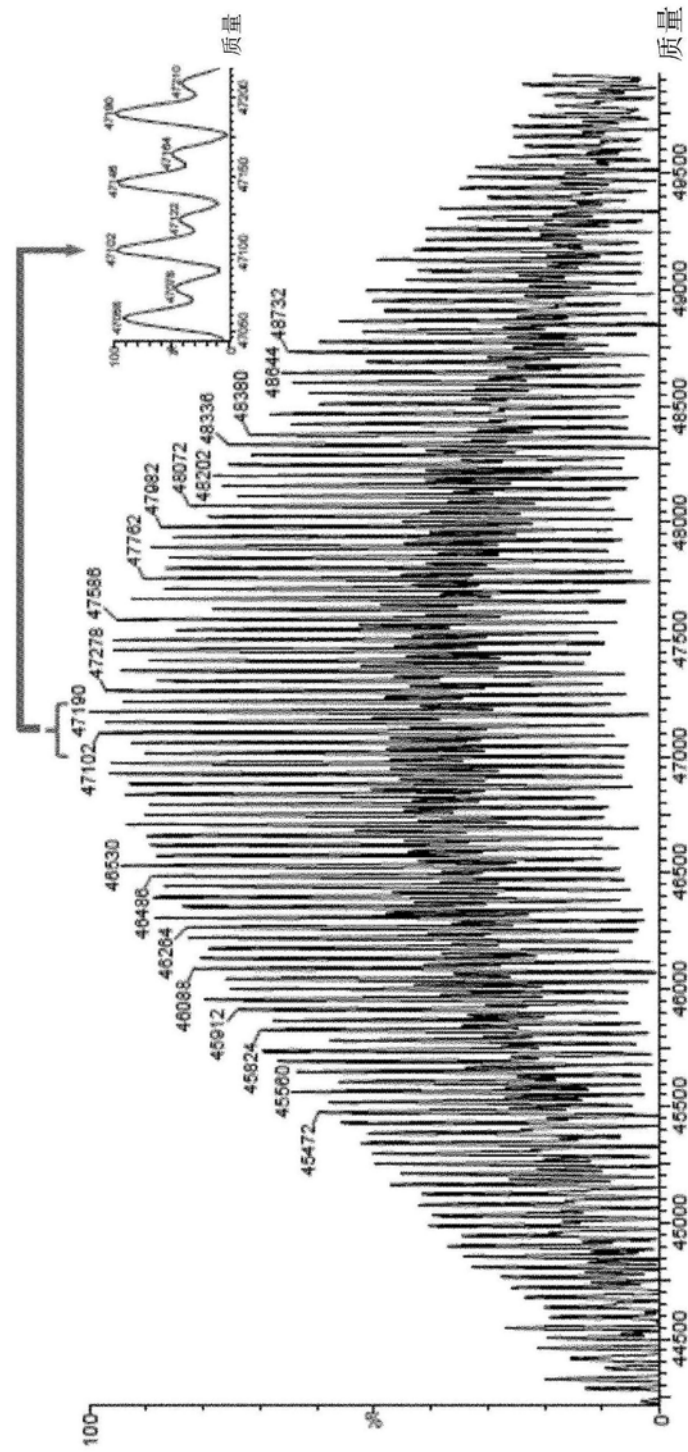


图2

位置	b*	N 末端离子系列				y*	C 末端离子系列			
		b ²⁺	b ³⁺	b ⁴⁺	b ⁵⁺		y ²⁺	y ³⁺	y ⁴⁺	y ⁵⁺
0										901.7*
1									1092.5	
2									1071.2	
3	351.2							1385.3	1039.2	
4								1366.2	1025.0	
5	509.3							1332.6	999.7	
6	656.3							1283.5		
7	757.4							1249.9	937.7	
8	844.4							1220.9		
9	959.4								887.2	
10	1122.4							1128.1		
11	1209.5							1099.1	824.6	
12	1337.5						1584.2	1056.5	792.6	
13		750.8					1502.7	1002.1		
14		807.3					1446.1	964.5		
15		864.8					1388.6	926.1		
16							1345.2			
17		972.4					1281.1	854.4		
18			691.3				1217.0			
19			715.0				1181.5			
20			757.7				1117.5			
21			800.7				1053.0			
22			849.7				979.5			
23			882.8				929.9			
24										
25			987.5				772.9			
26							716.3			
27							659.8			
28										
29										
30										
31										
32										
33										
34										
35										
36										
37										
38										
39										

所有离子序列都从 N 末端编号。

*观察为母离子。

图3

N 末端离子系列					C 末端离子系列			
位置	c*	c ²⁺	c ³⁺	c ⁴⁺	z*	z ²⁺	z ³⁺	z ⁴⁺
0							1497.1'	1123.1'
1	155.1'						1451.4'	
2	240.1'						1423.0'	
3	368.2'						1380.3'	
4	425.2'						1361.3'	
5	525.3'					1991.0'	1327.7'	
6	673.3'					1917.4'	1278.6'	
7	774.4'					1866.9'		
8	861.4'					1823.4'		
9	976.4'					1765.9'		
10	1139.5'					1684.4'		
11	1226.5'					1640.8'		
12	1354.6'					1576.8'	1051.2	
13	1517.7'					1495.3'	996.8	
14	1630.8'					1438.7'		
15	1745.8'					1381.2'		
16	1832.9'	916.4				1337.7'		
17	1961.0'	981.0'						
18		1045.0'				1209.1		
19								
20		1144.6'						
21		1209.1'						
22								
23					1843.9'			
24		1396.2'			1715.9'	857.9		
25						764.9		
26		1545.8'				708.4		
27		1602.3'			1303.6'	651.8		
28		1659.3'			1189.6'			
29		1701.9'						
30		1730.4'			1047.5'			
31		1808.4'	1205.6		890.4			
32		1865.4'	1244.0'		776.3			
33		1943.5'	1296.0'					
34			1334.0'					
35			1372.0'					
36			1409.7'	1057.5'				
37			1433.7''	1075.3'				
38			1468.1''					
39								

所有离子序列都从 N 末端编号。

‘观察为单撇号的(+1H)离子。

“观察为双撇号的(+2H)离子。

图4

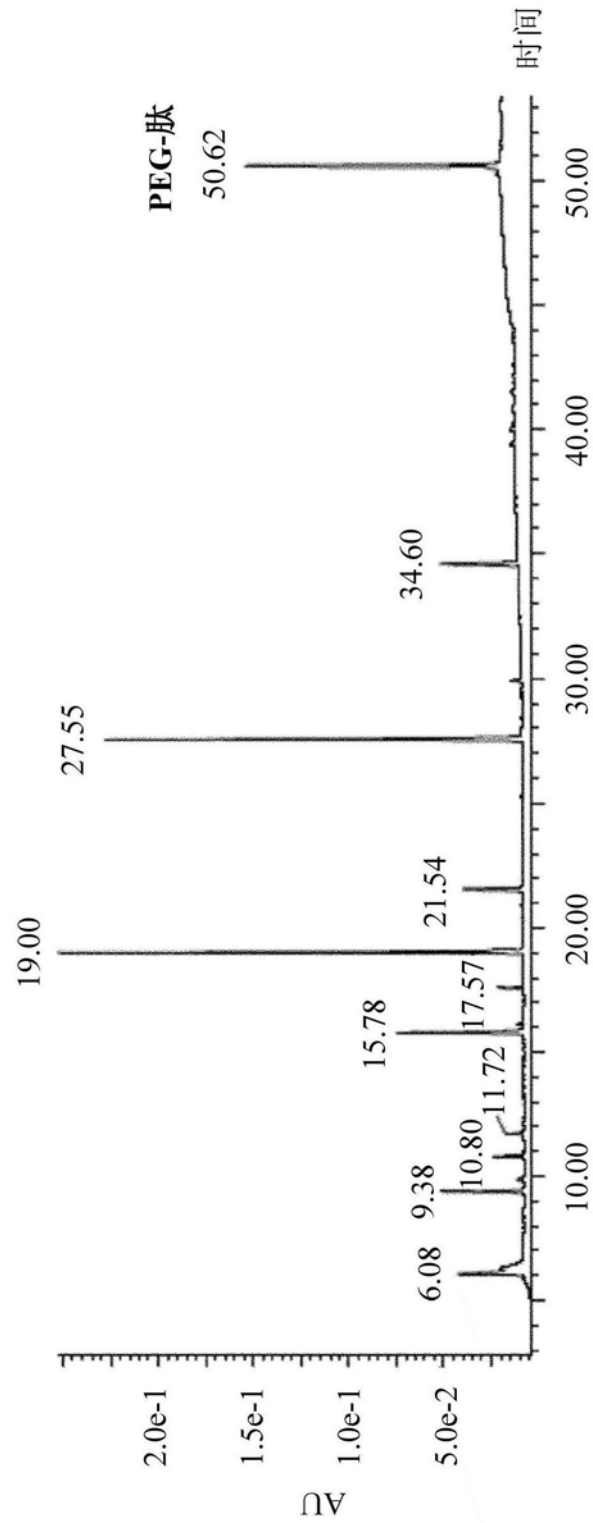


图5

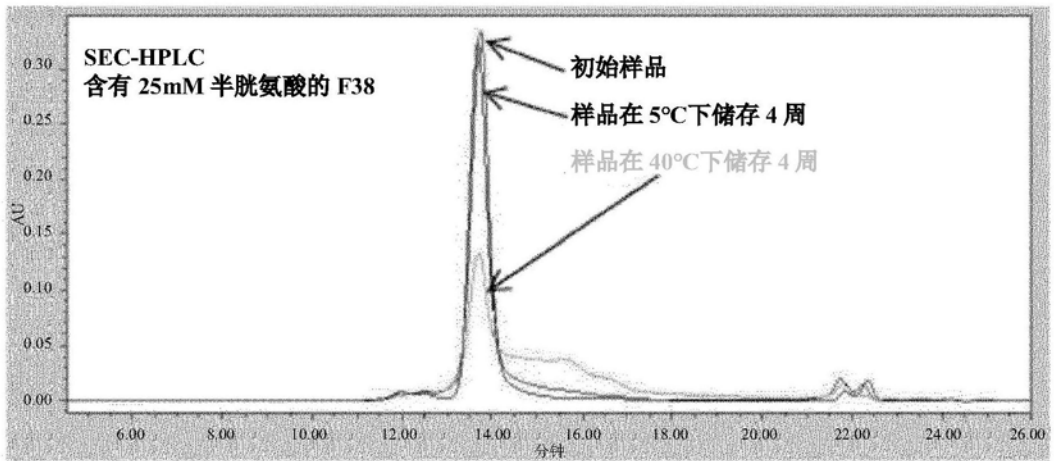


图6

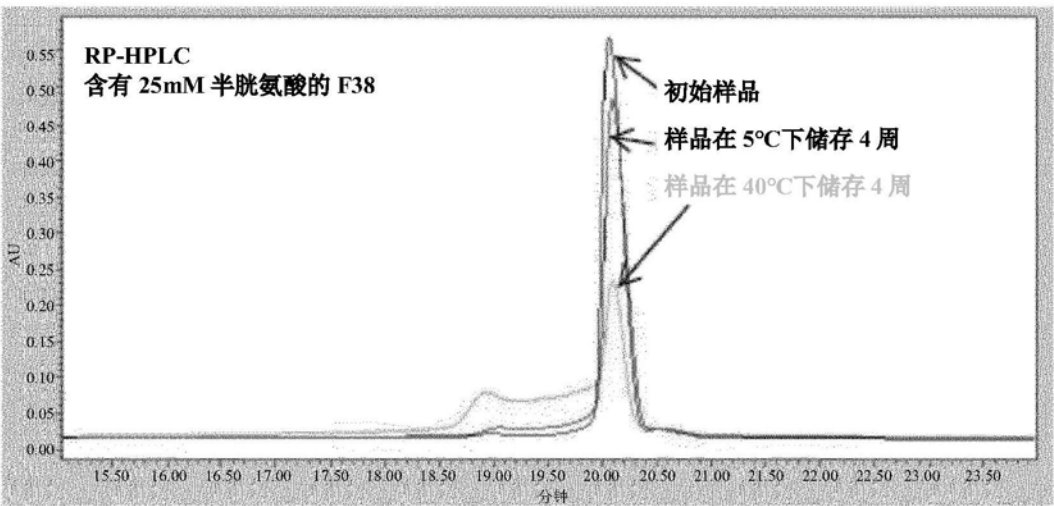


图7

Design-Expert® 软件

因子编码：实际

RP 后杂质(%)



X1 = A: pH

X2 = B: Met

实际因子

C: Arg = 0.00

D: 山梨糖醇 = 0.00

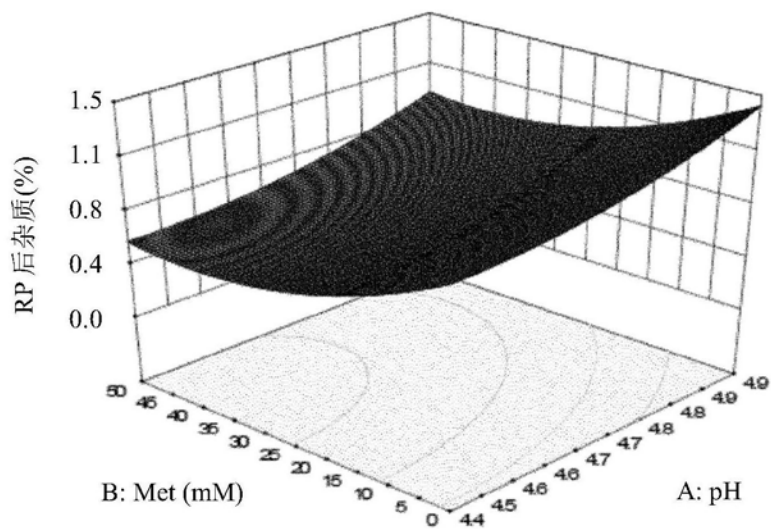


图8

Design-Expert® 软件

因子编码：实际

RP 后杂质(%)

● 设计点高于预测值

● 设计点低于预测值



X1 = A: pH

X2 = B: Met

实际因子

C: Arg = 125.00

D: 山梨糖醇 = 0.00

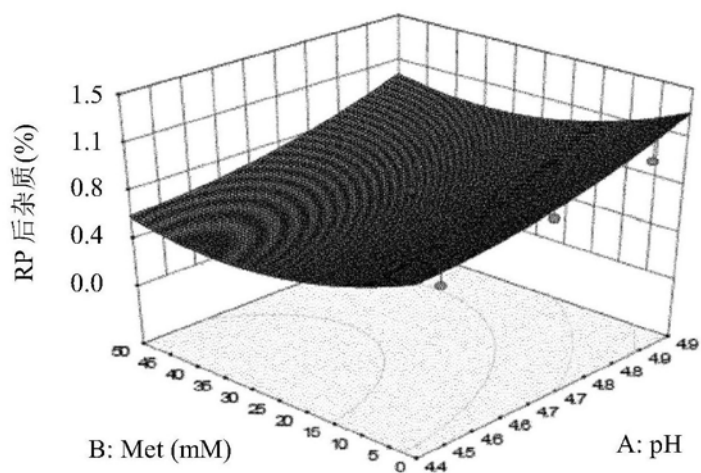


图9

Design-Expert® 软件
因子编码: 实际
聚集体(%)
1.3
0.5
X1 = A: pH
X2 = B: Met
实际因子
C: Arg = 0.00
D: 山梨糖醇 = 0.00

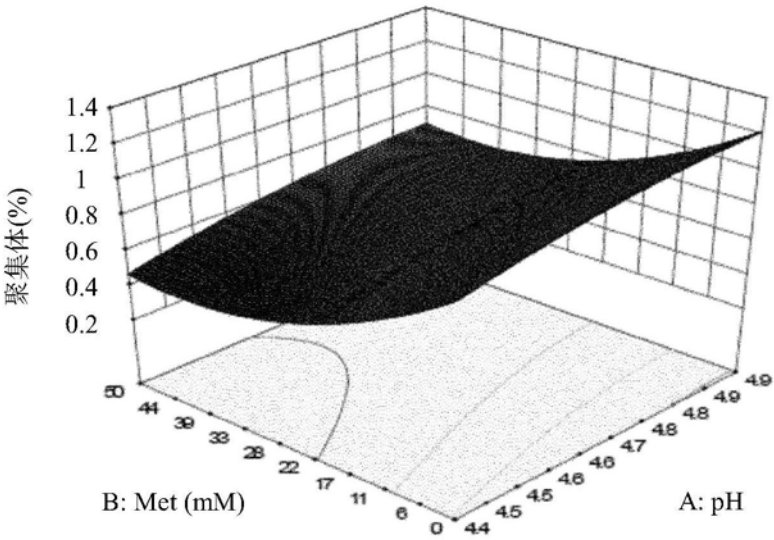


图10

Design-Expert® 软件
因子编码: 实际
聚集体(%)
● 设计点高于预测值
● 设计点低于预测值
1.3
0.5
X1 = A: pH
X2 = B: Met
实际因子
C: Arg = 125.00
D: 山梨糖醇 = 0.00

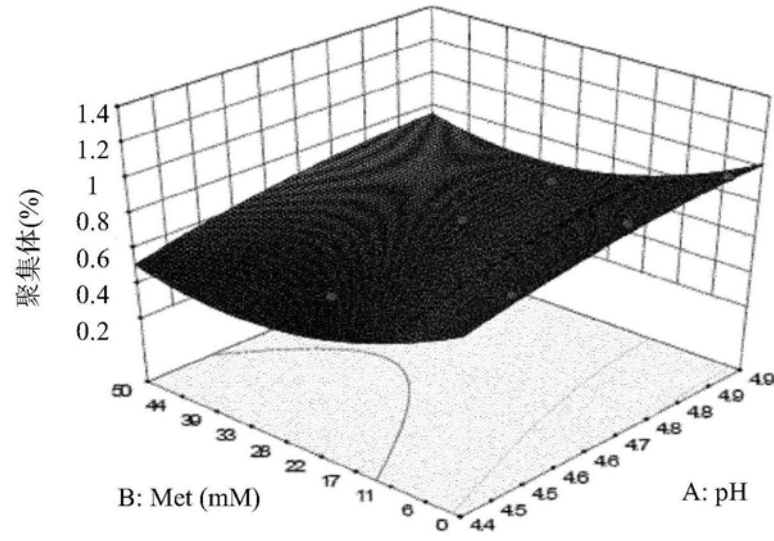


图11