(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102458371 B
(45)授权公告日 2015.08.05

(21)申请号 201080026117.7
(22)申请日 2010.06.11
(30)优先权数据
61/186,779 2009.06.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.12.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/038287 2010.06.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/144785 EN 2010.12.16
(73)专利权人 曼金德公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 凯利·S·克拉夫特
卡尔拉·萨默维尔
(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
代理人 肖善强
(51)Int.Cl.
A61K 9/16(2006.01)
A61K 35/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2007098500 A2,2007.08.30,
WO 2007098500 A2,2007.08.30,
WO 2009055740 A2,2009.04.30,
WO 9318754 A1,1993.09.30,
WO 2006086107 A2,2006.08.17,
WO 2006105501 A2,2006.10.05,
Navneet Kaur等.A Delineation of Diketopiperazine Self-Assembly Processes: Understanding the Molecular Events Involved in N&#1013
-(Fumaroyl)diketopiperazine of l-Lys (FDKP) Interactions.《molecular pharmaceutics》.2008,第5卷(第2期),
审查员 酒向飞

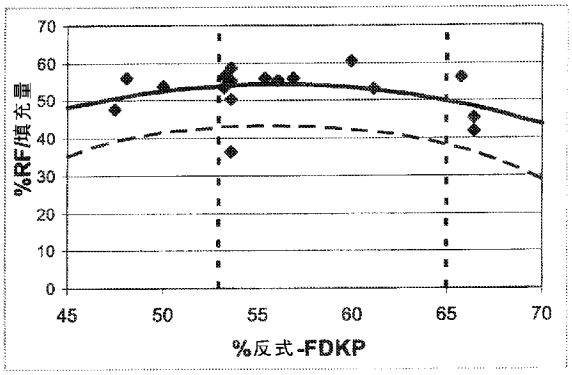
权利要求书2页 说明书16页 附图4页

(54)发明名称

具有确定异构体含量的二酮哌嗪微粒

(57)摘要

本文公开了反式异构体含量为约45%到约65%的富马酰基二酮哌嗪(FDKP)组合物和微粒。FDKP微粒可以包含药物,例如内分泌激素,包括胰岛素、胰高血糖素、甲状旁腺激素等,可用于制备肺部药物输送的粉末制剂。



CN 102458371 B

1. 一种富马酰基二酮哌嗪 (FDKP) 微粒，其 FDKP 反式异构体含量为 45％到 65％，其中与反式异构体含量在 45％到 65％的所述反式异构体含量之外的二酮哌嗪微粒相比，所述微粒的气动性能得到改善。

2. 如权利要求 1 所述的 FDKP 微粒，其中，所述反式异构体含量小于或等于 59％。

3. 如权利要求 1 所述的 FDKP 微粒，其中，所述反式异构体含量为 50％到 65％。

4. 如权利要求 1 所述的 FDKP 微粒，其中，所述反式异构体含量为 53％到 63％。

5. 如权利要求 1 所述的 FDKP 微粒，其进一步包含活性剂。

6. 如权利要求 5 所述的 FDKP 微粒，其中，所述活性剂是肽或蛋白质。

7. 如权利要求 6 所述的 FDKP 微粒，其中，所述肽是内分泌激素。

8. 如权利要求 7 所述的 FDKP 微粒，其中，所述内分泌激素是胰岛素、甲状旁腺激素、降钙素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽 -1、胃泌酸调节素、所述内分泌激素的活性片段。

9. 如权利要求 8 所述的 FDKP 微粒，其中，所述内分泌激素是胰岛素。

10. 如权利要求 5-9 中任意一项所述的微粒，其中，所述药物以高于所述微粒的 0.01 重量％的量存在。

11. 一种包含如权利要求 1 或 5 所述微粒的干粉。

12. 富马酰基二酮哌嗪 (FDKP) 反式异构体含量为 45％到 65％的 FDKP 微粒和适用于治疗内分泌相关的疾病或失调的内分泌激素的组合在制造用于治疗内分泌相关的疾病或失调的干粉制剂中的用途，其中与反式异构体含量在 45％到 65％的所述反式异构体含量之外的二酮哌嗪微粒相比，所述微粒的气动性能得到改善。

13. 如权利要求 12 所述的用途，其中，所述内分泌激素是胰岛素、甲状旁腺激素、降钙素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽 -1、胃泌酸调节素、或所述内分泌激素的活性片段。

14. 如权利要求 12 所述的用途，其中，所述内分泌相关的疾病是糖尿病。

15. 如权利要求 12 所述的用途，其中所述 FDKP 反式异构体含量小于或等于 59％。

16. 一种制备适合作为干粉用于肺部给药的微粒的方法，其包括 ：

a) 合成 FDKP 反式异构体含量为 45％到 65％的 FDKP 化合物 ；

b) 将所述 FDKP 化合物溶解在 pH 呈碱性的溶液中以形成 FDKP 溶液 ；

c) 提供挥发性酸的溶液 ；并且

d) 在高剪切混合器中将所述溶液混合在一起来制备所述微粒的悬浮液，其中与反式异构体含量在 45％到 65％的所述反式异构体含量之外的二酮哌嗪微粒相比，所述微粒的气动性能得到改善。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其进一步包括测定 FDKP 的反式异构体含量。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中，所述测定 FDKP 的反式异构体含量的步骤是使用高压液相色谱进行的。

19. 如权利要求 16 所述的方法，其进一步包括使所述微粒与含有药物的溶液混合。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中，所述药物是内分泌激素。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其中，所述药物是胰岛素、甲状旁腺激素、降钙素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽 -1、或胃泌酸调节素。

22. 如权利要求 16 所述的方法，其包括合成 FDKP 反式异构体含量小于或等于 59％的 FDKP 化合物。

23. 一种用于合成反式异构体含量为45％到65％的富马酰基二酮哌嗪(FDKP)的方法，其包括：

a) 在碱性pH的水:醇之比为1:1到3:1的水与醇的混合物中使所述二酮哌嗪的酯皂化;并且

b) 在0℃到35℃之间的温度下在含有三氟乙酸和冰醋酸的反应混合物中使所述二酮哌嗪重结晶至少4小时，所述三氟乙酸和冰醋酸的比例范围为0.4到0.7。

24. 如权利要求23所述的方法，其中，所述醇为甲醇、乙醇或异丙醇。

25. 如权利要求24所述的方法，其中所述醇为甲醇。

26. 如权利要求23所述的方法，其进一步包括测定所述二酮哌嗪的反式异构体含量的步骤。

27. 如权利要求26所述的方法，其中，所述测定所述二酮哌嗪的反式异构体含量的步骤是使用高压液相色谱进行的。

28. 如权利要求23所述的方法，其中，在所述重结晶步骤中的所述反应混合物保持至少4小时的时间。

29. 如权利要求1所述的FDKP微粒，其进一步包含药物。

30. 如权利要求29所述的FDKP微粒，其中，所述药物是肽或蛋白质。

31. 如权利要求30所述的FDKP微粒，其中，所述肽是内分泌激素。

32. 如权利要求31所述的FDKP微粒，其中，所述内分泌激素是胰岛素、甲状旁腺激素、降钙素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1、胃泌酸调节素、或所述内分泌激素的活性片段。

33. 如权利要求32所述的FDKP微粒，其中，所述内分泌激素是胰岛素。

34. 如权利要求8或32所述的FDKP微粒，其中，所述胰岛素是胰岛素类似物。

35. 如权利要求8或32所述的FDKP微粒，其中，所述胰高血糖素样肽-1是胰高血糖素样肽-1类似物。

36. 如权利要求1所述的FDKP微粒或权利要求12的用途或权利要求16的方法，其中，所述微粒的改善的气动性能包括当从吸入器排出时至少50％的％RF/填充量。

37. 如权利要求36所述的FDKP微粒或用途或方法，其中，所述％RF/填充量为至少60％。

38. 如权利要求37所述的FDKP微粒或用途或方法，其中，所述％RF/填充量为至少70％。

39. 如权利要求1所述的FDKP微粒或权利要求12的用途或权利要求16的方法，其中，所述微粒的改善的气动性能包括小于12.5μm的所述微粒的体积中值几何直径(VMGD)。

40. 如权利要求39所述的FDKP微粒或用途或方法，其中，所述VMGD小于7.0μm。

41. 如权利要求40所述的FDKP微粒或用途或方法，其中，所述VMGD小于4.8μm。

42. 一种吸入系统，其包括呼吸动力推动的吸入器和干粉，所述干粉包含含有2,5-二酮-3,6-二(N-富马酰基-4-氨基-丁基)哌嗪和胰岛素的微粒;其中所述微粒包含约10至15％重量的胰岛素;其中所述微粒中反式FDKP异构体的含量为约53％至63％，并且其中所述干粉以单位剂量药筒提供。

具有确定异构体含量的二酮哌嗪微粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U.S.C. § 119(e) 要求 2009 年 6 月 12 日递交的美国临时专利申请 No.61/186,779 的优先权，通过引用将其全文结合在本文中。

技术领域

[0003] 本文公开了具体反式异构体含量为约 45％到约 65％的富马酰基二酮哌嗪 (FDKP) 组合物和微粒。FDKP 微粒可用作疾病或失调（例如由内分泌引起的那些，包括糖尿病和肥胖症）的治疗中药物或活性剂的输送系统。

背景技术

[0004] 多年来药物的输送已成为一个重要的问题，特别是当待输送的化合物通过口服给药给予被受试者而在到达其目标位置之前在胃肠道中遇到的条件下不稳定时。例如，在许多情况下优选口服给药，特别是从易于给药、患者依从性和降低的成本方面来考虑。但是，口服给药时很多化合物不起作用或者显示出较低或多变的药效。这可能是因为药物在消化道的条件下不稳定或者因为它们未被有效吸收。

[0005] 由于与口服药物输送有关的这些问题，所以研究了将药物输送至肺部的方案。例如通常输送到肺部的药物被设计为对肺部组织起作用，例如血管扩张剂、表面活性剂、化疗剂、或流感或其他呼吸系统疾病的疫苗。其他药物（包括核苷酸药物）已经被输送到肺部，因为肺部代表特别适合治疗的组织，例如囊肿性纤维化的基因治疗，其中将表达有缺陷的腺苷脱氨酶的逆转录病毒载体给药至肺部。

[0006] 也可以将具有全身效应的试剂药物输送到肺部。将全身性试剂输送到肺部的好处包括大的表面积和易于通过肺部粘膜表面吸收。与肺部药物输送所有这些形式有关的一个问题是：由于使药物通过所有的天然屏障（例如沿气管排列的纤毛）和试图以均匀的体积和重量进行给药都很麻烦，所以难以将药物输送到肺部。

[0007] 因此，药物的肺部输送存在改善的空间。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了使药物向肺部的输送得到改善的系统、微粒和方法。本文中公开的实施方式是通过提供含有确定的异构体含量的二酮哌嗪微粒而实现改善的输送。特别地，所述二酮哌嗪微粒被举例说明为反式异构体的含量为约 45％到约 65％的富马酰基二酮哌嗪 (FDKP) 化合物。反式异构体含量在该范围的 FDKP 微粒显示出有利于将药物输送至肺部的特性，例如改善的气动性能。

[0010] 本文中公开的一个实施方式包括反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 微粒。在 FDKP 微粒的其他实施方式中，反式异构体的含量可以为约 50％到约 65％、约 52％到约 62％、或约 53％到约 65％。在 FDKP 微粒的另一个实施方式中，反式异构体的含量为约 53％到约 63％。

[0011] 在另一个实施方式中，FDKP 微粒包含药物或活性剂。在 FDKP 微粒的各种实施方

式中，药物可以是例如肽，包括胰岛素、胰高血糖素样肽 -1(GLP-1)、胰高血糖素、促胰岛素分泌肽、甲状旁腺激素、降钙素、胃泌酸调节素等。在 FDKP 微粒的另一个实施方式中，肽含量可以根据下游的加工条件而变化。在一个具体的实施例中，FDKP 微粒可以被制成其中的药物 / 肽含量能够根据目标剂量或输送剂量而变化。例如，其中的药物是胰岛素，胰岛素组分在含有微粒的粉末制剂中的含量可以为约 3U/mg 到约 4U/mg。

[0012] 本文中公开的实施方式还包括含有微粒的干粉。在一个实施方式中，干粉包含反式异构体的含量为约 45％到约 65％的 FDKP 微粒。在干粉的其他实施方式中，FDKP 微粒中反式异构体的含量为约 50％到约 65％、约 52％到约 62％、或约 53％到约 65％。在含有 FDKP 微粒的干粉的另一个实施方式中，反式异构体的含量为约 53％到约 63％。

[0013] 在干粉的另一个实施方式中，FDKP 微粒包含药物。在干粉的另一个实施方式中，所述药物是不同分子尺寸或不同质量的肽，包括胰岛素、胰高血糖素样肽 -1、胰高血糖素、促胰岛素分泌肽、甲状旁腺激素、降钙素、胃泌酸调节素等。在干粉的一个实施方式中，其中富马酰基二酮哌嗪的反式异构体含量范围为在 45％到 65％，并且所述药物是胰岛素，FDKP 微粒中胰岛素的含量为约 3U/mg 到约 4U/mg。在某些实施方式中，药物被吸附到微粒的表面。

[0014] 其他实施方式涉及药物输送系统，其包括吸入器、单位剂量的干粉药剂容器（例如药盒）、含有本文所公开的微粒和活性剂的粉末制剂。在一个实施方式中，与干粉一起使用的药物输送系统包括含有高阻力吸入器的吸入系统，所述高阻力吸入器具有空气管道，能够将高阻力赋予经过使粉末制剂解聚和分散的管道的气流。在一个实施方式中，吸入系统的阻力值为例如约 0.065（ √ kPa)/（升 • 分钟）到约 0.200（ √ kPa)/（升 • 分钟）。在某些实施方式中，干粉可以通过吸入系统的吸入有效地输送，其中最大的吸入压差可以在约 2kPa 到约 20kPa 之间，由此可以产生的最大流量为约 7 至 70 升 / 分钟。在某些实施方式中，配置吸入系统从而通过使粉末作为连续流或者作为输送给患者的粉末的一个或更多个脉冲从吸入器排出而提供单次剂量。在本文公开的一些实施方式中，干粉吸入器系统包括吸入器内的预定质量流量平衡。例如，占离开吸入器并进入患者体内的总流量约 10％至 70％的流量是通过一个或更多个分配端输送，其中气流通过含有粉末制剂的区域，并且其中约 30％至 90％的气流是在吸入器的其他管道产生的。此外，旁通流或未进入并离开粉末容器（例如通过药盒）的物料流可以与离开吸入器内分配端的物料流重新组合，从而使流化粉末离开吸入器接口管之前被稀释、加速并最终解聚。在一个实施方式中，吸入器系统的流量范围为约 7-70 升 / 分钟，这导致以 1-30mg 的填充质量填充的容器或药盒内容物中超过 75％被分配。在某些实施方式中，上述吸入系统在单次吸入中可以射出以百分比计高于 40％、高于 50％、高于 60％或高于 70％的可吸收分数 / 填充量的粉剂。

[0015] 在特别的实施方式中，所提供的吸入系统包括干粉吸入器、含有 FDKP 反式异构体含量为 45％到 65％的富马酰基二酮哌嗪微粒和一种或更多种活性剂的干粉制剂。在吸入系统的这个实施方式的一些方面，在单位剂量药盒中提供干粉制剂。或者，干粉制剂可以预加载在吸入器中。在该实施方式中，吸入系统的结构配置考虑了吸入器的解聚机理从而产生高于 50％的可吸收分数；也就是说，多于一半的包含在吸入器（药盒）中的粉末作为小于 5.8μm 的颗粒射出。吸入器在给药期间可以排出容器内所含的高于 85％的粉末药物。在某些实施方式中，吸入器可以排出单次吸入所含的高于 85％的粉末药物。在一个实施方式中，吸入器可以在 2kPa 到 5kPa 的压差下以至多 30mg 的填充质量在小于 3 秒的时间内排

出高于 90％的药盒内容物或容器内容物。

[0016] 本文中公开的实施方式还包括方法。在一个实施方式中，治疗内分泌相关的疾病或失调的方法包括：将包含 FDKP 反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 微粒和适用于治疗所述疾病或失调的药物的干粉制剂给药至需要其的人。一个实施方式包括治疗内分泌相关的疾病或失调的方法，其包括：将包含上述 FDKP 微粒的干粉制剂给药至需要其的人。该方法包括：将含有反式异构体含量的范围为约 45％到 65％的富马酰基二酮哌嗪微粒的干粉制剂给药至受试者。在各种实施方式中，胰岛素相关的失调可以具体包括但不限于下列中的任何一种或所有：糖尿病前期 (pre-diabetes)、1 型糖尿病（蜜月期、后蜜月期或二者）、2 型糖尿病、妊娠期糖尿病、低血糖症、高血糖症、胰岛素抵抗、内分泌功能失调、受损的胰岛素早期释放、胰腺 β－细胞功能的丧失、胰腺 β－细胞的减少和代谢失调。在一个实施方式中，所述干粉包含胰岛素。在其他实施方式中，所述干粉包含胰高血糖素和促胰岛素分泌肽或 GLP-1。

[0017] 本文中公开的另一个实施方式包括制备适合作为干粉用于肺部给药的微粒的方法，该方法包括：a) 合成反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 化合物；b) 测定 FDKP 化合物的反式异构体含量来评估反式异构体含量范围为约 45％到约 65％；c) 将步骤 b) 的 FDKP 化合物溶解在 pH 呈碱性的溶液中以便形成 FDKP 溶液；d) 提供挥发性酸的溶液；并且 e) 在高剪切混合器中将 FDKP 溶液与挥发性酸的溶液混合在一起来制备微粒。在一个实施方式中，测定 FDKP 化合物的反式异构体含量的步骤是通过使用高压液相色谱 (HPLC) 进行的。在可选的实施方式中，在颗粒形成之后测定异构体含量。

[0018] 在另一个实施方式中，公开了一种用于合成反式异构体含量为约 45％到约 65％的二酮哌嗪的方法，该方法包括：提供带有酯基的二酮哌嗪；在 pH 呈碱性的水与水混溶性溶剂的混合物中使二酮哌嗪的酯基皂化；并且在含有三氟乙酸和冰醋酸的反应混合物中使二酮哌嗪重结晶，三氟乙酸和冰醋酸的比例范围分别为约 0.4 到约 0.7。在该实施方式和其他实施方式中，重结晶步骤的反应混合物保持或继续进行约 4 小时或高于 4 小时的时间。

[0019] 在合成方法的一个实施方式中，水混溶性溶剂为醇，包括甲醇、乙醇或异丙醇。也可以使用其他溶剂，诸如四氢呋喃、二氧杂环己烷、丙酮和乙腈。在该实施方式和其他实施方式中，所述方法进一步包括测定二酮哌嗪的反式异构体含量的步骤。

[0020] 在一个具体的实施方式中，制备反式异构体含量为约 45％到约 65％的二酮哌嗪的方法使用了式为 2,5- 二酮 -3,6- 二 (N-X-4- 氨基丁基）哌嗪的二酮哌嗪，其中 X 选自由富马酰基、琥珀酰基、马来酰基和戊二酰基组成的组。在一个示例性实施方式中，二酮哌嗪为式 2,5- 二酮 -3,6- 二 (N- 富马酰基 -4- 氨基丁基）哌嗪。

[0021] 在特别的实施方式中，制备 DKP 反式异构体含量为约 45％到约 65％的 DKP 化合物的方法包括皂化反应和重结晶反应。在一个实施方式中，该方法包括含有酯基保护基（包括烷基酯，例如乙酯或甲酯）的二酮哌嗪化合物的皂化反应。在一个实施方式中，反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 化合物的合成步骤包括：在溶剂（例如水基溶剂）中使 FDKP 的酯皂化，并加入碱。在一个特别的实施方式中，该方法包括：将诸如富马酰基二酮哌嗪乙酯的 DKP 溶解在诸如比例分别为 1 ： 1 到约 3 ： 1 的水：甲醇溶剂中。在其他实施方式中，可以使用其他水混溶性溶剂，包括其他醇、四氢呋喃、二氧杂环己烷、丙酮、乙腈等。在一个实施方式中，溶剂可以只含有水。在该实施方式和其他实施方式中，皂化反应进一步包

括：添加含氢氧化钠的溶液；将反应混合物保持在约 20℃到约 60℃或到回流条件的温度范围内；过滤反应混合物得到滤液；将酸溶液加到滤液中，并通过过滤收集所形成的固体材料，然后洗涤 FDKP 固体材料。然后可以分析固体材料来测定所形成的 FDKP 颗粒的反式异构体含量。

[0022] 在一个特别的实施方式中，所述方法包括使 FDKP 材料重结晶，所述重结晶包括：将 FDKP 在三氟乙酸的悬浮液加热到约 40℃至约 85℃保持约 1 分钟到约 2 小时，然后冷却反应；向溶液添加冰醋酸，使悬浮液在约 20℃下冷却约 1 小时到约 24 小时。在一个实施方式中，所述方法包括：使反应在约 15℃到约 25℃的结晶温度范围内、在含有比例范围分别为约 0.4 到约 0.7 的三氟乙酸：冰醋酸的溶液中进行约 1 小时到约 6.5 小时。在该实施方式中，所述方法进一步包括：用冰醋酸洗涤反应混合物，并以每小时约 7℃到约 10℃的速度来冷却反应温度。可以使用其他冷却速度来得到具有期望异构体比例的 FDKP 材料。

[0023] 本文公开的另一个实施方式包括一种将胰岛素输送至需要其的患者的方法，该方法包括：通过患者对干粉的吸入，将本文中公开的含有二酮哌嗪微粒的干粉给药至肺深部。在该实施方式中，吸入器系统的特征是指定的。

附图说明

[0024] 以下附图构成本说明书的一部分，用于进一步说明本文公开的实施例的某些特定方面。通过参考一个或更多个附图，并结合本文所列的具体实施方式的详细描述，可以更好地理解本发明。

[0025] 图 1 描绘了粉末气动性能，其为％反式异构体含量的函数。

[0026] 图 2 描绘了在合成方案中可以控制以便产生反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 的步骤。

[0027] 图 3 描绘了％反式异构体含量，其为在图 2 所绘方案的皂化步骤期间缓慢加入的 NaOH 量的函数。

[0028] 图 4 描绘了使用快速冷却速率 (ramp) 用三氟乙酸 (TFA) 重结晶之后％反式异构体含量。

[0029] 图 5 描绘了制备由胰岛素加载的反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 微粒的过程的示意图。

[0030] 图 6 描绘了反式异构体用的响应曲面法分析。

[0031] 发明详述

[0032] 如上所述，将药物输送至肺部具有很多优势。但是由于传送药物经过天然的物理屏障，所以难以将药物以相同体积和重量输送至肺部。本文中公开了具有确定反式异构体含量的二酮哌嗪、作为药物递送剂的微粒、所述微粒的制备方法和使用所述微粒治疗的方法。

[0033] 在本文中使用时，术语“微粒”是指直径为约 0.5μm 到约 1000μm 的颗粒，不考虑精确的外部或内部结构。直径为约 0.5μm 到约 10μm 的微粒可以成功穿过大部分天然屏障到达肺部。直径必须小于约 10μm 以便通过喉咙的转角，而直径必须为约 0.5μm 或更大以避免被呼出。为了到达被认为发生最有效吸收的肺深部（或肺泡区），优选使“可吸收分数”(RF) 中所含的颗粒比例最大化，通常可接受的是使用标准技术（例如 Anderson

Cascade Impactor) 测定的空气动力学直径为约 0.5 μm 到约 5.7 μm 的那些颗粒，尽管一些参考文献使用稍微不同的范围。其他冲击器也可以用于测定空气动力学颗粒直径，例如 NEXT GENERATION IMPACTOR™(NGI™, MSP Corporation)，可吸收分数是通过相似的空气动力学粒径（例如＜ 6.4 μm) 定义的。在一些实施方式中，使用激光衍射装置来测定粒径，例如 2010 年 3 月 18 日递交的美国专利申请 No. 12/727,179 中公开的激光衍射装置，其相关教导通过引用全部结合在本文中，其中测定了颗粒的体积中值几何直径 (VMGD) 来评估吸入系统的性能。例如，在各种实施方式中，≥ 80%、85% 或 90% 的药盒排空率和≤ 12.5 μm、≤ 7.0 μm 或≤ 4.8 μm 的射出颗粒的 VMGD 可以表现出越来越好的气动性能。本文中公开的实施方式显示出：反式异构体含量为约 45% 到约 65% 的的 FDKP 微粒表现出有利于将药物输送至肺部的特性（例如改善的气动性能）。

[0034] 基于填充量的可吸收分数 (RF/ 填充量）表示在用作剂量的填充粉末排出之后从吸入器射出的一个剂量中适于吸收的粉末百分比，即从填充剂量中射出且尺寸适于肺部给药的颗粒百分比，其为微粒气动性能的量度。如本文中所述，40% 或大于 40% 的 RF/ 填充量表现出可接受的气动特性。在本文中公开的某些实施方式中，基于填充量的可吸收分数可以大于 50%。在一个示例性实施方式中，基于填充量的可吸收分数可以高达约 80%，其中使用标准技术测定，所射出的填充量中约 80% 的颗粒尺寸＜ 5.8 μm。

[0035] 在本文中使用时，术语“干粉”指的是不悬浮或溶解在推进剂、载体或其他液体中的精细颗粒组合物。并不意味着所有水分子完全不存在。

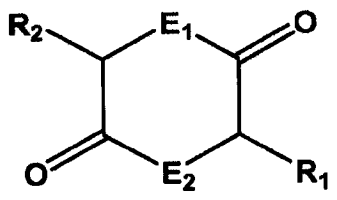
[0036] 应该理解的是特定的 RF/ 填充量值可以取决于用于输送粉末的吸入器。粉末通常易于团聚并结晶成 DKP 微粒形式，特别是粘附性粉末。干粉吸收器的一个功能是使粉末解聚从而使所产生的颗粒包含适于通过吸入输送剂量的可吸收部分。但是，粘附性粉末的解聚通常不彻底，所以当测定通过吸入器输送的可吸收分数时，所看到的颗粒尺寸分布与最初的颗粒尺寸分布不匹配，也就是说，分布曲线向较大的颗粒偏移。吸入器的设计在其解聚效率方面变化，因此使用不同设计观察到的 RF/ 填充量的实际值也将不同。但是，从一个吸入器到另一个吸入器的作为异构体含量的函数的最佳 RF/ 填充量是类似的。

[0037] 在本文中使用时，术语“约”用于表示一个值包括确定该值所用设备或方法的测定标准偏差。

[0038] 二酮哌嗪

[0039] 已经用于克服药学领域中难题（例如药物不稳定性和 / 或较差的吸收）的一类药物递送剂是 2,5- 二酮哌嗪。2,5- 二酮哌嗪是由下面的通式 1 表示的化合物，其中 E_1 和 E_2 独立地为 N 或更具体地为 NH。在其他实施方式中，E_1 和 / 或 E_2 独立地为氧或氮，从而使 E_1 和 E_2 取代基中的一个为氧而另一个为氮，该式得到取代类似物二酮吗啉；或者当 E_1 和 E_2 都是氧时，该式得到取代类似物二酮二氧杂环己烷。

[0040]



式1

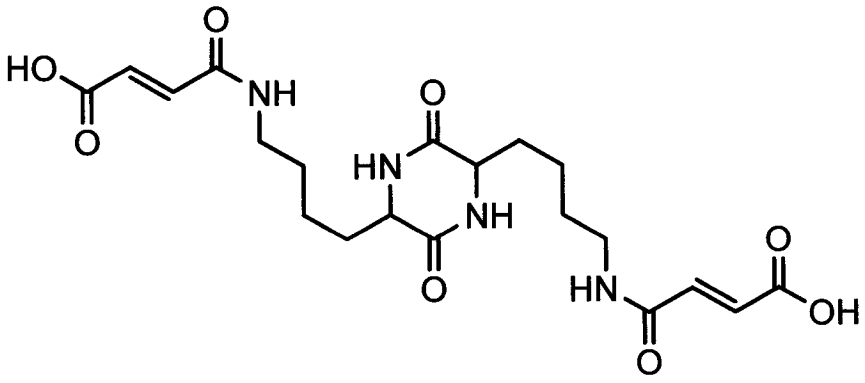
[0041] 已经表明这些2,5-二酮哌嗪可用在药物输送中,特别是那些带有酸性R_1和R_2基团的2,5-二酮哌嗪(参见例如,标题为“Self Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System”的美国专利No.5,352,461,标题为“Method For Making Self-Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System”的美国专利No.5,503,852,标题为“Microparticles For Lung Delivery Comprising Diketopiperazine”的美国专利No.6,071,497和标题为“Carbon-Substituted Diketopiperazine Delivery System”的美国专利No.6,331,318,上述文献通过全文引用,将其关于二酮哌嗪的教导和二酮哌嗪作为媒介的药物输送的教导包含在本文中)。二酮哌嗪可以形成混入药物的微粒和形成药物可以吸附到其上的微粒。药物和二酮哌嗪的组合可以赋予改善的药物稳定性和/或吸收特性。这些微粒可以通过各种给药途径来给药。作为干粉,这些微粒可以通过吸入输送到呼吸系统的特定区域,包括肺部。

[0042] 这些微粒通常是通过下列方法得到:通过游离酸(或碱)的pH沉淀法产生由聚集的结晶板组成的自组装微粒。颗粒的稳定性可以通过从其中沉淀出颗粒的DKP溶液中的少量表面活性剂(例如聚山梨酸酯-80)来增强(参见例如标题为“Method of drug formulation based on increasing the affinity of crystalline microparticle surfaces for active agents”的美国专利申请No.2007/0059373,该文献通过全文引用,将其关于DKP微粒的形成和加载及其关于干粉的教导包含在本文中)。最后可以除去溶剂得到干粉。除去溶剂的适当方法包括冷冻干燥和喷雾干燥(参见例如标题为“A method for improving the pharmaceutic properties of microparticles comprising diketopiperazine and an active agent”的美国专利申请No.2007/0196503和标题为“Purification and stabilization of peptide and protein pharmaceutical agents”的美国专利No.6,444,226,每一篇文献都通过全文引用,将其关于DKP微粒的形成和加载及其关于干粉的教导包含在本文中)。本文中公开的微粒不同于由DKP盐组成的微粒。那些微粒通常通过喷雾干燥形成(而不是通过喷雾干燥来干燥),产生无定形盐(而不是游离酸或碱)的球体和/或塌陷球,所以它们是化学、物理和形态上均不同的实体。本文中提到的FDKP理解为游离酸或溶解的阴离子。

[0043] 合成二酮哌嗪的方法在例如Katchalski等J.Amer.Chem.Soc.68,879-880(1946)和Kopple等J.Org.Chem.33(2),862-864(1968)中有所描述,它们的教导通过引用全部结合在本文中。2,5-二酮-3,6-二(氨基丁基)哌嗪(Katchalski等称之为赖氨酸酸酐)还可以通过N-ε-P-L-赖氨酸在熔融苯酚中的环化二聚来制备(这与Kopple方法类似),随后通过适当的试剂和条件除去保护性的(P)-基团。例如,使用4.3M在乙酸中的HBR可以除去CBz保护基。这种方法是优选的,因为其使用可商购的起始物料,其包括据报道用于保持起始物料在产物中的立体化学性的反应条件并且所有步骤都可以很容易地按比例放大用于生产。合成二酮哌嗪的方法在标题为“Catalysis of Diketopiperazine Synthesis”的美国专利No.7,709,639中也有描述,其就相同方面的教导也通过引用结合在本文中。

[0044] 富马酰基二酮哌嗪(2,5-二酮-3,6-(N-富马酰基-4-氨基丁基)-哌嗪;FDKP)是肺部应用的一种优选的二酮哌嗪。

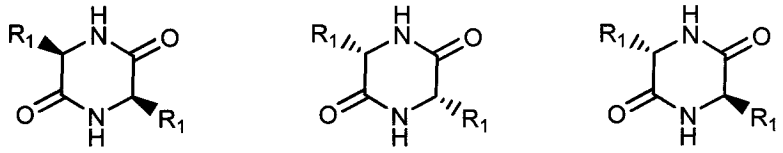
[0045]



[0046] FDKP 提供了一种有利的微粒基质，因为它在酸中的溶解度低但是易于溶解在中性或碱性 pH 中。这些性能允许 FDKP 结晶，并使晶体在酸性条件下自组装成微粒。颗粒在 pH 为中性的生理条件下易于溶解。如前所述，直径在约 0.5 和约 10 微米之间的微粒可以成功穿过大部分天然屏障到达肺部。在该尺寸范围内的颗粒可以很容易地由 FDKP 制备。

[0047] FDKP 在二酮哌嗪环上有两个不对称中心。所制备的 FDKP 是同分异构体的混合物，根据侧链相对于二酮哌嗪中心“环”的排列，同分异构体被记为“顺式 -FDKP”和“反式 -FDKP”。R，R 和 S，S 对映异构体具有从二酮哌嗪环（下面的 A 和 B）的相同平面侧伸出的丙烯基（酰胺基丁基）“侧臂”，因而被称为顺式异构体；而 R，S 化合物具有从二酮哌嗪环（下面的 C）的相反平面侧伸出的“侧臂”，因而被称为反式异构体。

[0048]



A B C

[0049] 已经用反式异构体含量范围为约 45％到约 65％的 FDKP 制备出具有令人满意的气动性能的 FDKP 微粒粉末，所述性能通过中等效率的吸入器（例如标题为“Unit Dose Cartridge and Dry Powder Inhaler”的美国专利 No.7,464,706 中公开的 MEDTONE®吸入器，其就相同方面的教导通过引用结合在本文中）来测试。异构体含量在该范围内的颗粒在高效吸入器（例如在 2009 年 6 月 12 日递交的标题为“A Dry Powder Inhaler and System for Drug Delivery”的美国专利申请 No.12/484,125 和在 2010 年 3 月 4 日递交的标题为“Improved Dry Powder Drug Delivery System”的美国专利申请 No.12/717,884 中公开的那些，这些公开就相同方面的教导通过引用结合在本文中）中的表现也很好。包含含有多于 65％反式 FDKP 的微粒的粉末趋于具有较低且较多变的 RF/ 填充量（图 1）。富含反式异构体的 FDKP 微粒具有易变的形态而且会导致难以处理的粘稠的悬浮液。

[0050] 在与图 1 所报导的那些相当的条件下进行的其他实验中，由约富含 95％反式异构体的 FDKP 和胰岛素制成的微粒产生约 24％的 RF/ 填充量，然而反式异构体含量为约 59％且具有相同胰岛素含量的对照试样给出约为 49-52％的 RF/ 填充量（数据未显示）。因此，反式异构体含量为约 45％到约 65％的 FDKP 微粒粉末提供了具有令人满意的气动性能的微粒。在可选的实施方式中，FDKP 反式异构体的含量范围为约 50％到约 65％，约 52％到约 62％，或者约 53％到约 63％（参见图 1）。

[0051] 基于上述，期望制备出反式异构体含量在约 45％到约 65％范围内的微粒粉末。因

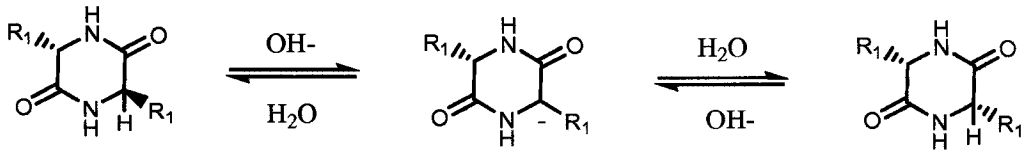
此，本发明确定了反式异构体的含量将影响FDKP微粒的气动性能，这是出人意料的。但是，已发现：通过仔细地控制用于制备FDKP微粒的FDKP异构体含量，可以实现改善的一致性(consistency)。在图1中，实线代表预测的RF/填充量，而短划线代表得到适合的RF/填充量分数的单侧低于95％置信限度。垂直的虚线提供了本文公开的一个示例性实施方式的反式异构体含量的界限。

[0052] FDKP顺/反异构体比例是在图2所示的制备步骤期间确定的。图2描绘了在合成方案中可以控制以便产生反式异构体含量为约45％到约65％的FDKP的步骤。在合成方案中，在FDKP的合成期间存在可以被调节以得到目标或期望的异构体比例的几个参数和/或反应步骤，包括皂化和重结晶。例如，可以控制反应的具体参数（包括温度、反应时间和所用溶剂或共溶剂的种类）以便产生具有目标或期望的异构体比例的产物。

[0053] FDKP反式异构体含量范围的下限的控制

[0054] 反式异构体含量的下限通过将DKP环暴露在强碱中来控制。在一个制备步骤中，通过用氢氧化钠皂化来除去乙基保护基。这些碱性条件还可以促进如下所示的异构体之间的差向异构化，而不考虑哪种异构体是过量的。例如，将碱加入包含例如由95％反式异构体组成的起始化合物的反应物中可以产生由顺式和反式异构体含量为约50/50的混合物组成的FDKP材料（图3）。除了碱性pH，其他也有助于调节反式异构体含量的组成的因素包括：溶剂和共溶剂的浓度、暴露时间和反应的温度。

[0055]



反式 顺式

[0056] FDKP反式异构体含量范围的上限的控制

[0057] 异构体之间溶解度的差异影响FDKP异构体含量。例如，FDKP可以从三氟乙酸(TFA)和冰醋酸(GAA)中重结晶。反式FDKP与顺式FDKP相比不易溶于该溶剂体系。因此，可以使用有助于不易溶的反式异构体选择性沉淀的条件来增大最终产品中反式异构体的含量。这些条件包括：降低的重结晶时间、在较低的温度下加入反溶剂和/或三氟乙酸-冰醋酸(TFA-GAA)混合物的快速冷却（图4）。还要理解的是：通过这种方法升高反式异构体含量可以提供富含顺式异构体的FDKP残留溶液。

[0058] 表1. 示例性制备范围

[0059]

参数	操作范围
TFA/GAA*比例	0.67±0.05
结晶时间（小时）	6±0.5
结晶温度（℃）	15-25

加入 GAA 后的冷却速度 (℃ /hr)	7-10

[0060] *表示三氟乙酸：冰醋酸

[0061] 异构体含量在约 45％到约 65％范围内的微粒将提供具有有利的气动特性的微粒。

[0062] 活性剂的选择和引入

[0063] 只要本文所述的微粒保持所需的异构体含量，它们便能采用有利于输送至肺部和 / 或药物吸收的其他附加特性。标题为“Method for Drug Delivery to the Pulmonary System”的美国专利 No.6,428,771 描述了将 DKP 颗粒输送至肺部，其就相同方面的教导通过引用结合在本文中。标题为“Purification and Stabilization of Peptide and Protein Pharmaceutical Agents”的美国专利 No.6,444,226 描述了有利于使药物吸附到微粒表面的方法，其就相同方面的教导也通过引用结合在本文中。可以利用微粒表面性能来实现如标题为“Method of Drug Formulation based on Increasing the Affinity of Crystalline Microparticle Surface for Active Agents”的美国专利申请 No.11/532,063（其就相同方面的教导通过引用结合在本文中）中所述的期望特性。标题为“Method of Drug Formulation based on Increasing the Affinity of Active Agents for Crystalline Microparticle Surfaces”的美国专利申请 No.11/532,065 描述了促进活性剂吸附到微粒上的方法。美国专利申请 No.11/532,065 也就相同方面的教导通过引用结合在本文中。

[0064] 本文所述的微粒可以包含一种或更多种活性剂。在本文中使用时，可与“药物”互换使用的“活性剂”指的是医药物质，包括小分子药物、生物制剂和生物活性剂。活性剂可以是天然存在的、重组的或合成来源的，包括蛋白质、多肽、肽、核酸、有机大分子、合成有机化合物、多糖和其他糖、脂肪酸和脂质，以及抗体及其片段，所述抗体及其片段包括但不限于人源化抗体或嵌合抗体、F(ab)、$F(ab)_2$、单独的单链抗体或与其他多肽混合的单链抗体、或对抗癌抗原的治疗性或诊断性单株抗体。活性剂可以包括多种生物活性和种类，例如血管活性剂、神经活性剂、激素、抗凝血剂、免疫调节剂、细胞毒性剂、抗菌素、抗病毒剂、抗原、传染物、炎症介质、激素和细胞表面抗原。更具体地，活性剂以非限制性方式包括细胞因子、脂质因子 (lipokine)、脑啡肽、炔、环孢菌素、抗 -1L-8 抗体、包括 ABX-1L-8 的 1L-8 拮抗剂；包括 PG-12 的前列腺素，包含 LY29311、BIIL284 和 CP105696 的 LTB 受体阻滞剂；诸如舒马普坦 (sumatriptan) 的曲普坦类 (triptan) 和棕榈油酸酯、胰岛素及其类似物、生长激素及其类似物、甲状旁腺激素 (PTH) 及其类似物、甲状旁腺激素相关肽 (PTHrP)、生长激素释放肽 (ghrelin)、肥胖抑制素 (obestatin)、肠抑素 (enterostatin)、粒细胞集落刺激生物因子 (GM-CSF)、糊精、糊精类似物、胰高血糖素样肽 -1(GLP-1)、德克萨斯红 (Texas Red)、氯吡格雷 (clopidogrel)、PPACK(D- 苯基丙氨酰 -L- 丙基 -L- 精氨酸氯甲基酮）、胃泌酸调节素 (OXM)、肽 YY(3-36)(PYY)、脂联素 (adiponectin)、胆囊收缩素 (CCK)、胰泌素 (secretin)、促胃液素 (gastrin)、胰高血糖素、胃动素 (motilin)、生长抑制素 (somatostatin)、脑钠肽 (BNP)、心钠肽 (ANP)、IGF-1、生长激素释放因子 (GHRF)、整合素 β-4 前体 (ITB4) 受体拮抗剂、孤啡肽 (nociceptin)、痛稳素 (nocistatin)、孤啡肽 FQ2(orphanin FQ2)、降钙素、CGRP、血管紧张素 (angiotensin)、P 物质、神经激肽 A(neurokinin A)、胰多肽、神经肽 Y、

δ-促睡眠肽和血管活性肠肽。

[0065] 在由反式异构体含量为45%到65%的FDKP形成的微粒上输送的药物含量通常高于0.01%。在一个实施方式中，要用具有上述反式异构体含量的微粒输送的药物含量可以在约0.01%到约20%的范围内，这通常是对于肽（例如胰岛素）来说的。例如，如果药物是胰岛素，本发明的微粒通常含有3-4U/mg（约10-15%）的胰岛素。在某些实施方式中，颗粒的药物含量可以根据待输送的药物形式和尺寸来变化。

[0066] 微粒的制备

[0067] 在一个实施方式中公开一种可用于制备含有约45%到约65%的反式异构体含量和胰岛素的FDKP微粒的方法。

[0068] 图5描绘了一种用于制备含有胰岛素的本发明的FDKP微粒的方法的示意图。概括地说，使用双重进料(dual-feed)的高剪切混合器（例如在2009年11月2日递交的美国专利申请No.61/257,311中公开的，其内容通过引用全部结合在本文中），在约16℃ ± 约2℃的温度和2000psi的压力下使等质量的约10.5重量%的乙酸和约2.5重量%的FDKP溶液（表2和表3）通过0.001-in^2的喷嘴进料。可以在质量和温度大约相等的去离子水(DI)贮水池中收集沉淀。所得到的悬浮液包含约0.8%的固体。通过切向流过滤技术可以浓缩并洗涤沉淀。沉淀可以首先浓缩至约4%固体，然后用去离子水洗涤。悬浮液最终可以基于FDKP的初始质量浓缩至约10%固体。通过烘干法可以测定被浓缩的悬浮液的固含量。

[0069] 浓缩的胰岛素储存溶液可以用1份胰岛素和9份约2重量%的乙酸来制备。胰岛素储存溶液可以通过称重法添加到悬浮液中从而得到约11.4重量%的负载量。含胰岛素的悬浮液可以混合至少约15分钟，随后用约14到约15重量%的氨水将约为3.5的初始pH滴定至约为4.5的pH。使用低温造粒机（例如在2009年11月2日递交的美国专利申请No.61/257,385中公开的，其内容通过引用全部结合在本文中）可以使悬浮液在液氮中速冻以形成颗粒，并且冷冻干燥从而产生松散的载有胰岛素的、反式异构体含量在约45%和约65%之间的FDKP微粒。可以按相同方法制备空白的FDKP微粒，但是没有加载胰岛素和pH调节步骤。

[0070] 表2.10.5%的乙酸溶液

[0071]

组分	重量%
DI水	89.00
GAA	10.50
10%的聚山梨酸酯80	0.50

[0072] 0.2μm过滤

[0073] 表3.2.5%的FDKP溶液

[0074]

组分	重量%

DI 水	95.40
FDKP	2.50
NH_4OH	1.60
10%的聚山梨酸酯 80	0.50

[0075] 0.2μm 过滤

[0076] 在本文中使用时,“溶剂”指的是活性剂和微粒沉浸于其中的液体介质。不应该理解为所有组分都在溶液中。实际上,在许多情况下,“溶剂”可用于指代使微粒悬浮的液体介质。

[0077] 从前面的内容中明显看出:本文公开的微粒的实施方式可以具有多种不同形式并且可以引入多种不同的药物或活性剂。但是其中每一个实施方式的共有特征是所形成微粒的反式异构体含量为约 45%到约 65%。

实施例

[0078] 以下实施例用于说明所公开的微粒的实施方式。本领域技术人员应当理解,实施例中与本发明人发现的代表性技术一起公开的技术可以有效地用于实施本发明,因此这些技术被认为构成了实施本发明的优选方式。然而,根据本说明书,本领域技术人员应当认识到,在不脱离本发明的范围下,还可以对具体实施方式进行许多改变,同时获得相同或类似的效果。

[0079] 实施例 1

[0080] I. 反式异构体含量与 RF/ 填充量之间的关系

[0081] 微粒由 FDKP 和胰岛素制成。将 FDKP 溶解在氨水 (NH4OH 水溶液) 中形成溶液。该溶液的进料流与 HOAc 水溶液的进料流在高剪切混合器中合并以形成微粒的水性悬浮液。

[0082] FDKP 进料流由约 2.5 重量%的 FDKP、约 1.6 重量%的浓缩氨水 (约 28- 约 30 重量%的 NH_3) 和约 0.05 重量%的聚山梨酸酯 80 制成。乙酸进料流由约 10.5 重量%的冰醋酸和约 0.05 重量%的聚山梨酸酯 80 制成。两种进料流在使用之前都通过约 0.2μm 的膜过滤。

[0083] 使等量 (由质量计) 的各种进料流通过装有 #5 喷嘴 (0.0011 平方英寸) 的 DUAL-FEED SONOLATOR™泵入。为了使每一个进料流的流速相等,最小泵被设为 50%,进料压力为约 2000psi。接收容器含有与每一种进料流质量相等的 DI 水 (例如 :4kg FDKP 进料流和 4kg HOAc 进料流将通过 SONOLATOR™泵入含有 4kg DI 水的接收器中)。

[0084] 所产生的悬浮液通过使用 0.2m^2PES(聚醚砜) 膜的切向流过滤方式浓缩并洗涤。悬浮液首先被浓缩至 4%固体,然后用 DI 水渗滤,最终浓缩至约 16%名义固体含量。洗涤过的悬浮液的实际固体百分比是通过“干燥失重法”测定的。

[0085] 制备胰岛素储存溶液,其含有约 10 重量%的胰岛素 (按收到的原样使用),溶剂为在 DI 水中含有约 2 重量%的 HOAc,然后将胰岛素储存溶液无菌过滤。基于悬浮液的固含量,向混合的悬浮液中添加适量的储存溶液。随后调整所产生的微粒 / 胰岛素悬浮液,通过

使用氨水将悬浮液的 pH 从约 3.6 的 pH 调节至约 4.5 的 pH。

[0086] 随后，微粒 / 胰岛素的悬浮液通过液氮速冻来造粒（低温造粒）。冰粒被冷冻干燥来生产干粉。

[0087] 粉料的可吸收分数 (RF/ 填充量）是气动性能和微粒尺寸分布的量度，并且可以用 Anderson 级联撞击式采样器通过测试来确定。为了得到 RF/ 填充量值，将药盒用粉料填满并通过 MEDTONE ®吸入器以约 30L/min 的速度排出。将在每一个吸附器的台上收集到的粉末称重，而所有收集到的粉末相对于药盒填充的总量进行标准化。因此，RF/ 填充量是在撞击器的那些台上收集到的代表可吸收部分的粉末质量除以加载在药盒中的粉末质量。

[0088] 如图 1 所示，具有如 RF/ 填充量所测定的可接受气动性能的 FDKP 粉末已经由反式异构体含量低达 45％（图 1）的 FDKP 制成。含有超过 65％反式 -FDKP 的粉末趋于具有较低且更多变的 RF/ 填充量。

[0089] 研究确定了具有有利的气动性能的反式异构体含量的范围。下面部分描述了用于评估可以产生指定异构体含量的工艺条件而进行的实验。

[0090] II. 皂化溶剂

[0091] 进行实验来确定皂化条件对 FDKP 反式异构体含量（图 2）的影响（如果有的话）。FDKP 二乙酯（化合物 004）与 590mL 反应溶剂（参见表 5）的混合物被加热至约 57℃。反应温度稳定之后，通过滴管在约 60 分钟的时间内滴加约 50％的 NaOH 溶液。NaOH 的加入完成之后，使反应物保持约 30 分钟，然后过滤除去未反应的固体。用乙酸使滤液酸化至 pH 约为 5，所产生的固体通过过滤分离，用水和丙酮洗涤，在真空烘箱中干燥，通过 HPLC 分析来测定顺式和反式异构体含量。

[0092] 于是，评估了范围为水性（表 4，A）到有机（表 4，E）的五种不同溶剂体系。总的来说，表 4 的数据表明：实验 A、B 和 C 所用的溶剂体系产生具有可接受的反式异构体含量的 FDKP。

[0093] 表 4. 步骤 5 中水：甲醇的溶剂比例对 FDKP 异构体含量的影响

[0094]

样品编号	水：甲醇之比 (v ： v)	％反式 FDKP
A	4 ： 0	51
B	3 ： 1	53
C	2 ： 2	55
D	1 ： 3	78
E	0 ： 4	33

[0095] III. 重结晶的条件

[0096] FDKP 可以从 TFA（溶剂）/GAA（反溶剂）的混合物（图 2；步骤 6）中重结晶。评估受控的过程参数来表征重结晶过程以及它对 FDKP 异构体含量的影响。总的来说，高产率的重结晶反应也给出具有期望反式异构体含量的 FDKP。低产率的重结晶反应导致反式异构体

含量升高，因为顺式异构体在重结晶溶剂体系的溶解度更高。

[0097] 将粗制的FDKP（约75g）和TFA（约250mL）加入反应器并开始搅拌。使悬浮液加热至回流（约80℃到约85℃）并保持约10分钟或直到所有固体均溶解。混合物被冷却至低于约60℃。将冰醋酸（约375mL）加入溶液中。混合物被冷却并在约10℃至约20℃下保持最少约6小时。沉淀出的产物被过滤并用GAA（每次约100mL，三次）、丙酮（每次约100mL，三次）和水（约100mL，一次）洗涤。产物在真空下（约22至约25毫米汞柱）在55℃下干燥约12到约18小时。

[0098] 最初，测试了4个参数，包括溶剂量、反溶剂量、结晶时间和结晶温度。约2.68mL/g FDKP或约3.34mL/g FDKP的溶剂量提供了可接受的％反式FDKP异构体。在约6.68mL溶剂/g FDKP下，产生不能接受的高反式异构体含量。在高达5.0mL/g FDKP下，反溶剂的量不会显著地影响％反式FDKP异构体含量。在控制量中减少反溶剂的量基本上产生在上述期望范围内的％反式FDKP。

[0099] 在产品收率高的实验中，多达6或24小时的结晶时间不会显著地影响％反式FDKP异构体含量。在高（35℃）和低（0℃）结晶温度所测的异构体含量（％反式FDKP异构体）落在约45％到约65％的范围之外。

[0100] 随后的实验支持这些发现。图6显示了FDKP异构体含量的曲面描绘，测定为％反式FDKP，是溶剂：反溶剂比例（TFA：GAA）和结晶温度的函数。在这些实验所测的范围内，％反式FDKP的值在59-75％的范围内变化。这些数据表明：在低溶剂比（0.43）和高结晶温度（25℃）下，反式FDKP异构体在期望的范围内。相应曲面的该区域中％反式FDKP异构体的预测值为58-60％。这些观察结果表明：使用25℃的结晶温度是有利的。

[0101] 实施例2

[0102] 测定FDKP的反式异构体

[0103] 使用HPLC来确定FDKP顺式/反式异构体比率。在0.1M甲酸铵缓冲液中制备浓度约为0.15mg/mL的FDKP样品。使样品声波降解并转移到HPLC瓶中用于分析。所用的注射体积为20μL。使用下列HPLC参数观察到31.7和33.3分钟的保留时间（分别为顺式和反式FDKP）：

[0104] 柱：Phenomenex LUNA 苯基-己基

[0105] 粒径：3mm

[0106] 柱长：15cm

[0107] 柱的内径：3.0mm

[0108] 流动相A：水/三氟乙酸，1000：1(v：v)

[0109] 流动相B：甲醇/四氢呋喃/三氟乙酸，900：100：1(v：v：v)

[0110] 注射体积：20μL

[0111] 流量：0.3mL/分

[0112] 运行时间：90min.

[0113] 柱温：30±3℃

[0114] 样品温度：8±3℃

[0115] 检测器：UV 254nm

[0116] 表5.FDKP样品的梯度洗脱：

[0117]

时间 (min)	% A	% B	流量 (mL/min)	注释
0	95	5	0.3	起始条件
75	53.5	46.5	0.3	线性梯度
76	20	80	0.3	等梯度保持
77	95	5	0.3	回到初始
90	95	5	0.3	再平衡

[0118] 实施例 3

[0119] 通过体积中值几何尺寸 (VMGD) 表征对射出制剂进行的颗粒几何尺寸分析

[0120] 干粉吸入器射出的干粉制剂的激光衍射是用于表征粉末所进行的解聚程度的常用方法。该方法是对几何尺寸的测量，而不是在目前的工业标准冲击方法中对空气动力学粒径的测量。通常，射出粉末的几何尺寸包括由中值颗粒尺寸 VMGD 表征的体积分布。重要地，射出颗粒的几何尺寸与通过冲击法提供的空气动力学粒径相比具有较高的分辨率。较小的尺寸是优选的，能产生单独颗粒被输送到肺气管的更大可能性。因此，吸入器解聚和最终性能的差异更易于通过衍射来解决。在这些实施方式中，在与病人深吸气量类似的压力下，用激光衍射来测试吸入器从而确定吸入系统使粉末制剂解聚的效率。特别地，所述制剂包含加载了和未加载活性胰岛素组分的粘着性二酮哌嗪粉末。这些粉末制剂具有特有的表面积、异构体比率和 Carr 指数。表 6 报导了 VMGD 和测试期间容器的排空效率。FDKP 粉末的 Carr 指数约为 50，而 TI 粉末的 Carr 指数约为 40。

[0121] 表 6

[0122]

吸入器系统	粉末	% 反式	SSA	压力降 (kPa)	样品尺寸	%CE	VMGD (微米)
DPI 2	FDKP	56	55	4	15	92.5	6.800
MedTone®	FDKP	56	55	4	30	89.5	21.200
DPI 2	FDKP + 活性剂	56	45	4	30	98.0	4.020
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	4	20	97.0	3.700
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	4	20	98.4	3.935
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	4	20	97.8	4.400
MedTone®	FDKP +活性剂	56	45	4	10	86.1	9.280
MedTone®	FDKP +活性剂	56	45	4	10	92.3	10.676
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	2	7	92.9	4.364
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	2	7	95.1	4.680
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	4	7	97.0	3.973
DPI 2	FDKP +活性剂	56	45	4	7	95.5	4.250
DPI 2	FDKP +活性剂	56	56	4	10	99.6	6.254
DPI 2	FDKP +活性剂	56	14	4	10	85.5	4.037
MedTone®	FDKP +活性剂	56	56	4	20	89.7	12.045
MedTone®	FDKP +活性剂	56	14	4	20	37.9	10.776
DPI 2	FDKP +活性剂	54	50	4	10	97.1	4.417
DPI 2	FDKP +活性剂	54	44	4	10	96.0	4.189
DPI 2	FDKP +活性剂	56	35	4	10	92.0	3.235
DPI 2	FDKP +活性剂	50	34	4	10	93.2	5.611
DPI 2	FDKP +活性剂	66	33	4	10	79.0	4.678
DPI 2	FDKP +活性剂	45	42	4	10	93.2	5.610
DPI 2	FDKP +活性剂	56	9	4	10	78.9	5.860

[0123] 表 6 的数据表明 :在定义为 DPI 2 的吸入器中的粉末解聚相对于 MEDTONE ®吸入器系统有所改善。已证明 :比表面积范围为 14-56m^2/g 的二酮哌嗪制剂的排空率高于 85％且 VMGD 小于 7 微米。同样地,已证明 :异构体比率范围为 45-66％反式的制剂与对比产品相比具有改善的性能。但是,值得指出的是 :即使用更高效的吸入器,在 66％反式异构体含量下,药盒排空率会降低,表明气动性能下降 (减小),因为反式异构体含量脱离本文公开的期望范围。最后,数据表明 :用特征为 Carr 指数为 40-50 的制剂的吸入器系统的性能与现有设备相比也得到改善。在所有的情况下,所报道的 VMGD 值都低于 7 微米。

[0124] 除非另有指明,本说明书和权利要求书中使用的表示成分数量、以及分子量、反应条件等性质的所有数字都应当被理解为 :在所有情况下,用术语“约”加以了修饰。因此,除非有相反含义的说明,本说明书和所附权利要求书中示出的数量参数都是约数,它们可以根据本发明想要获得的性质而变动。至少,并且并非对权利要求书范围等同原则的应用加以限制,每个数量参数至少应按照报道的有效数字的数,以及应用普通的凑整技术来解释。虽然示出本发明宽广范围的数字范围和参数是约数,但是具体实施例中所示的数值却被尽可能地精确报道。但是,任何数值,必然含有一定误差,这是它们各自的检验测量方法中发现的标准偏差必然导致的。

[0125] 除非本文另有指明,或与上下文明显矛盾,在描述本发明 (特别是在下列权利要求书的上下文中) 的上下文中使用的术语“一个”、“一种”和“这个”以及类似提法应当被理解为既包括单数又包括复数。本文中数值范围的叙述仅仅用作该范围内每个单独的值的

速记方法。除非本文另有指明，每个单独的值被包括进说明书，这与在本文进行个别叙述一样。本文所述的所有方法都可以以任何合适的顺序来进行，除非本文另有指明，或与上下文明显矛盾。除非另有指明，本文提供的任何及所有例子，或者示例性的语言（例如，“例如”）仅用来更好地阐述本发明，而非对发明范围加以限制。说明书中任何语句都不应被解释为：表示对本发明的实施来说必要的、不要求保护的要素。

[0126] 除非明确指出某个可选方式或可选方式之间互相排斥，尽管说明书支持某个可选方式和“和／或”的表述，但是权利要求中所用术语“或”是指“和／或”。

[0127] 本文公开的本发明的替换性要素或实施方式的分组不应被理解为限制。每个组成员可被个别采用和被个别要求保护，或可以与该组其它成员或本文中找到的其它要素的任意组合和被要求保护。可以预见到，为了方便和／或可专利性的理由，组中的一个或多个成员可被包括进一组或从中删除。当任何此类包括或删除发生时，说明书在此被看作为含有经过改动的组，因此满足对所附权利要求书中所用的任何和全部马库什组的支持。

[0128] 本文中描述了本发明的优选实施方式，其包括发明人已知用来实施本发明的最佳方式。当然，在阅读前述说明书的基础上，对这些优选实施方式中的改动对于本领域普通技术人员来说将是明显的。本发明的发明人预见了本领域技术人员合适地采用此类改动，发明人预期本发明可以以除了本文具体描述的方式之外的方式被实现。因此，只要适用法律允许，本发明包括对所附权利要求中提到的主题进行的所有改动和等同物。此外，所有可能的变化中，上面提到的要素的任何组合都被包括进本发明，除非本文另有指明，或与上下文明显矛盾。

[0129] 本文公开的具体实施方式可以进一步使用“由…组成”或者“基本由…组成”的语言表达而被限制在权利要求书中。当用在权利要求书中时，不管是递交的或根据修改增加的，术语“由…组成”排除了未在权利要求中指定的任何要素、步骤或者成分。术语“基本由…组成”将权利要求的范围限制到特定材料或步骤以及实质上不会影响基本特性和新颖特性的那些材料和步骤。要求保护的本发明的实施例在此处固有地或者清楚地描述和应用。

[0130] 此外，本说明书中提到了大量参考文献，包括专利和印刷公开物。上述参考文献和印刷公开物中的每种在此都通过引用被分别地整体包括进本文。

[0131] 此外，应当理解本文公开的本发明实施方式是为了阐述本发明的原理。可以进行的其它改动也落在本发明的范围内。因此，举例而言，而非限制，可按照本文的教导来使用本发明的替代性构造。因此，本发明不被限制为仅仅是本文所示和所述的。

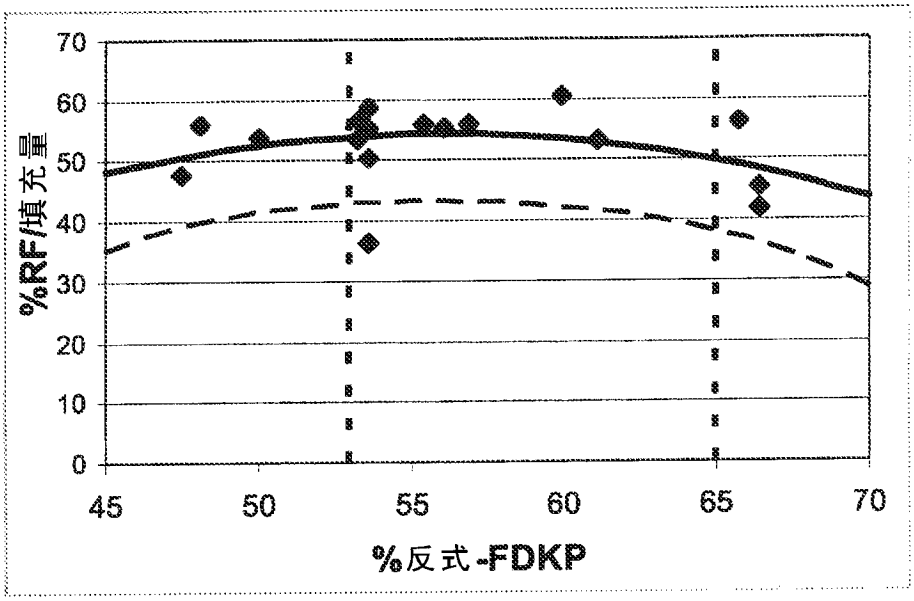


图 1

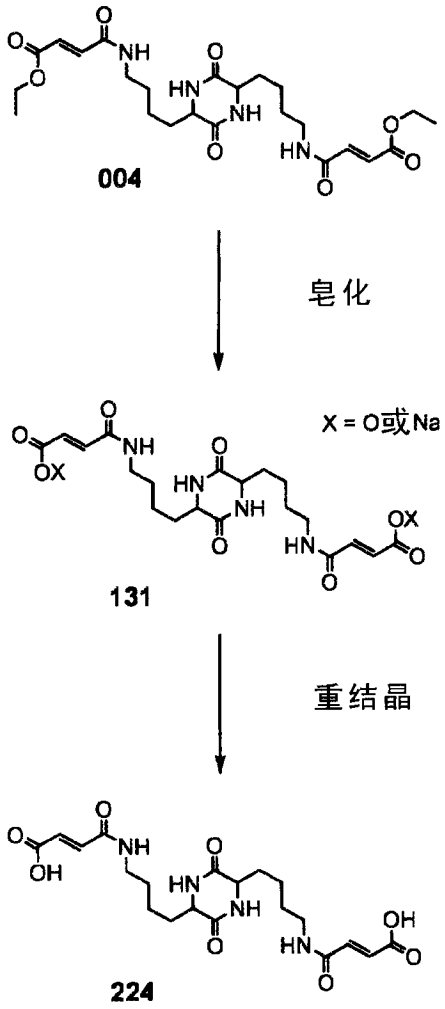


图 2

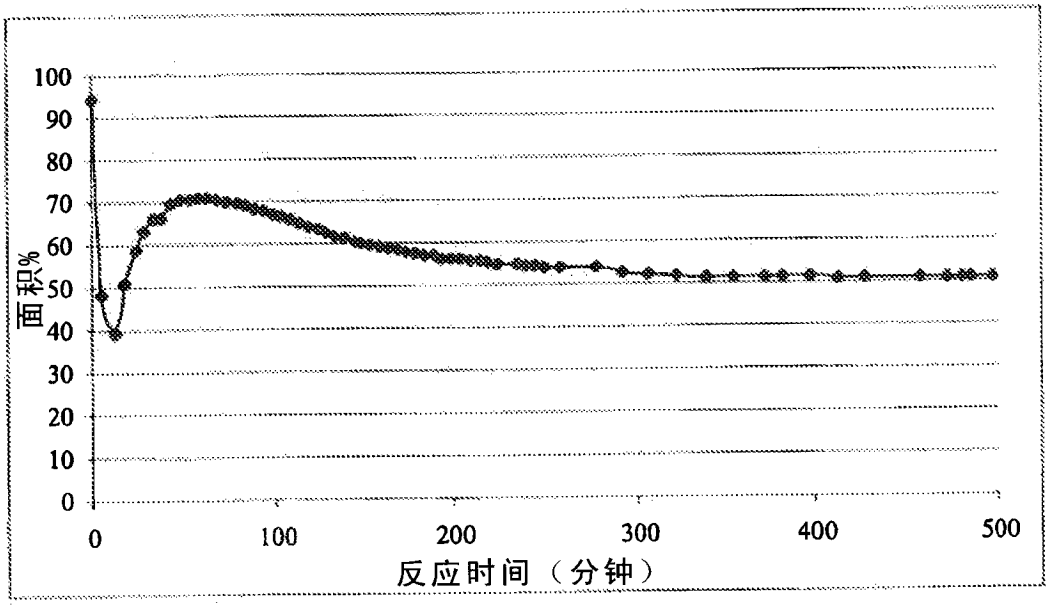

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
面积%
0
100
200
300
400
500
反应时间（分钟）

图 3

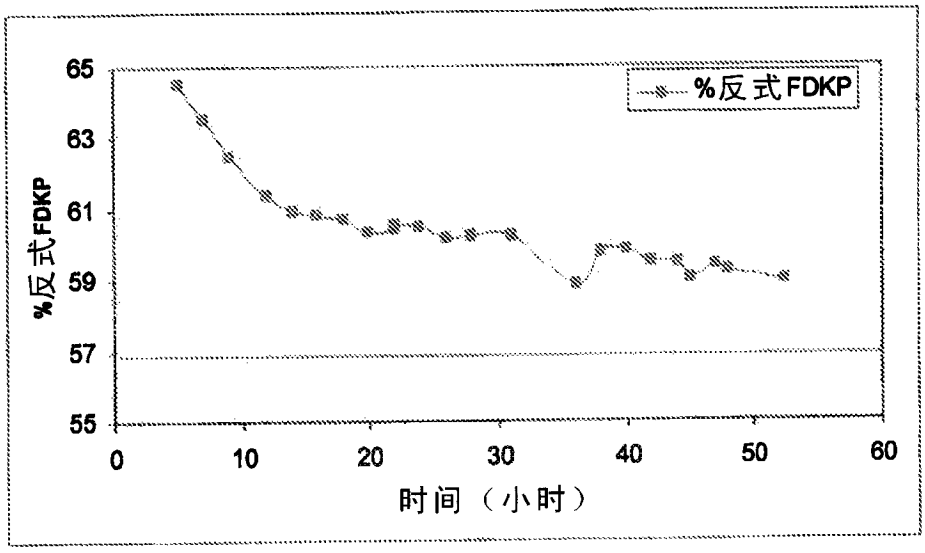

65
63
61
59
57
55
%反式FDKP
0
10
20
30
40
50
60
时间（小时）
%反式FDKP

图 4

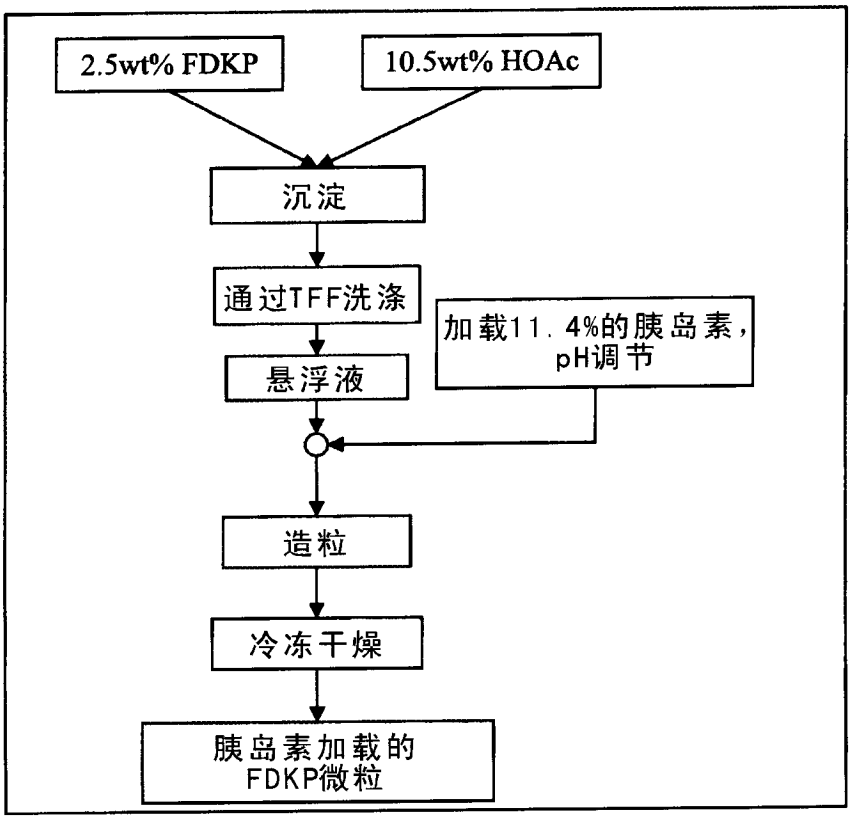

2.5wt% FDKP
10.5wt% HOAc
沉淀
通过TFF洗涤
加载11.4%的胰岛素，pH调节
悬浮液
造粒
冷冻干燥
胰岛素加载的FDKP微粒

图 5

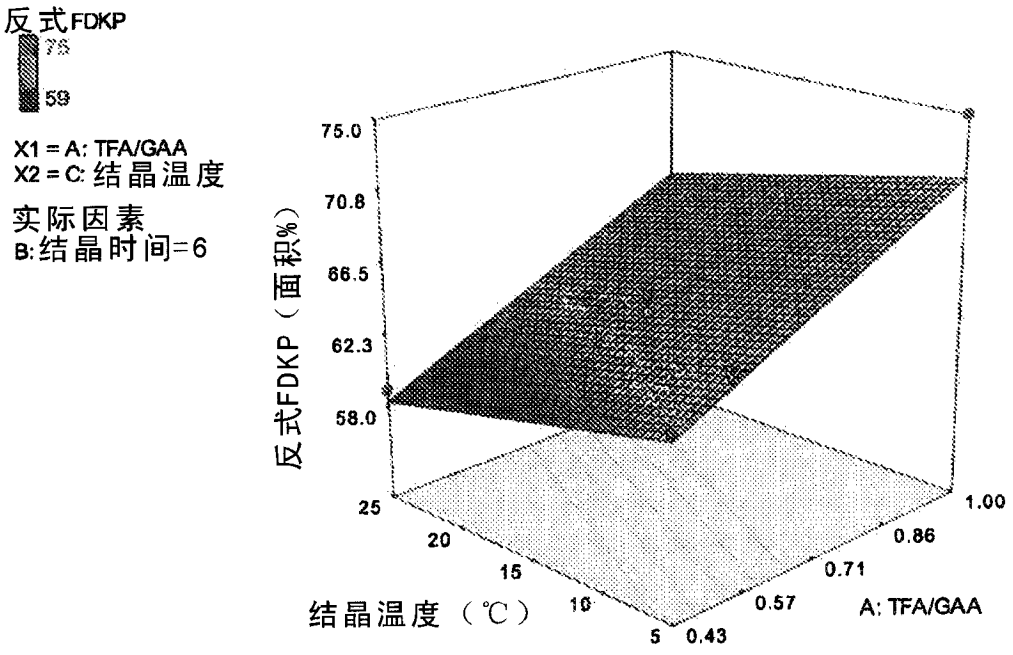

反式FDKP
78
59
X1 = A: TFA/GAA
X2 = C: 结晶温度
实际因素
B: 结晶时间=6
反式FDKP（面积%）
75.0
70.8
66.5
62.3
58.0
25
20
15
10
5
结晶温度（℃）
0.43
0.57
0.71
0.86
1.00
A: TFA/GAA

图 6