

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710085552.7

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 10 月 3 日

[11] 公开号 CN 101045166A

[22] 申请日 2002.5.21

[21] 申请号 200710085552.7

分案原申请号 02810355.6

[30] 优先权

[32] 2001.5.21 [33] US [31] 60/292,423

[71] 申请人 耐科塔医药公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 阿拉巴马耐科塔医药公司

[72] 发明人 约翰·S·巴顿 郭美彰

J·米尔顿·哈里斯 切斯特·利奇

金佰利·佩尔金斯 布莱因·比歇

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 8 页 说明书 60 页 附图 14 页

[54] 发明名称

化学修饰胰岛素的肺部给药

[57] 摘要

本发明提供了具有活性的亲水聚合物修饰的胰岛素衍生物。本发明的胰岛素衍生物，从一方面说，适合于传送到肺部，并且与天然胰岛素相比，表现出显著改进的药代动力学和/或药效特性。

1. 一种用于肺部给药的胰岛素组合物，所述组合物含有胰岛素与一个或多个名义平均分子量为 200 到 10,000 道尔顿的聚乙二醇分子共价结合所形成的结合物，其中所述聚乙二醇与 A-1Gly、B-1Phe 和 B-29Lys 中的至少一个共价结合。

2. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述结合物不含亲脂部分。

3. 权利要求 1 所述的组合物，其特征为肺部绝对生物利用度高于天然胰岛素。

4. 权利要求 1 所述的组合物，其特征为肺部绝对生物利用度为天然胰岛素的至少两倍。

5. 权利要求 1 所述的组合物，其特征为肺部绝对生物利用度大于 15%。

6. 权利要求 1 所述的组合物，其特征为肺部绝对生物利用度大于 30%。

7. 权利要求 1 所述的组合物，当给药到肺部时，其特征为 T_{max} 至少为天然胰岛素的 3 倍。

8. 权利要求 1 所述的组合物，当给药到肺部时，其特征为 T_{max} 至少为天然胰岛素的 5 倍。

9. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇是末端封闭的。

10. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇被烷氧基团末

端封闭。

11. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇选自线性聚乙二醇、分支聚乙二醇、分叉聚乙二醇和哑铃状聚乙二醇。

12. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇含有可生物降解的键。

13. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇含有 2 到 300 个(OCH₂CH₂)亚基。

14. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇是线性的。

15. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量从 200 到 5,000 道尔顿。

16. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量从 200 到 2,000 道尔顿。

17. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量从 200 到 1,000 道尔顿。

18. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述胰岛素是天然胰岛素。

19. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述结合物的纯度大于 90%。

20. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述胰岛素在其一个或多个氨基位点上与聚乙二醇共价结合。

21. 权利要求 1 所述的组合物，其中胰岛素上至少 75%的 B-1 Phe

位点与聚乙二醇共价结合。

22. 权利要求 1 所述的组合物，其中胰岛素上至少 90%的 B-1 Phe 位点与聚乙二醇共价结合。

23. 权利要求 1 所述的组合物，其含有胰岛素单体和二聚体结合物的混合物。

24. 权利要求 23 所述的组合物，其还含有三聚体胰岛素结合物。

25. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述胰岛素通过位于聚乙二醇一端的连接部分与聚乙二醇共价结合。

26. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述聚乙二醇在与胰岛素结合前，在其一端具有适合与胰岛素共价结合的活化的连接部分。

27. 权利要求 26 所述的组合物，其中所述活化的连接部分适合与反应性胰岛素氨基基团结合。

28. 权利要求 27 所述的组合物，其中所述活化的连接部分含有选自 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯、活性碳酸酯、醛和缩醛的反应性官能团。

29. 权利要求 1 所述的组合物，其中胰岛素通过酰胺键与聚乙二醇共价结合。

30. 权利要求 1 所述的组合物，以雾化形式存在。

31. 权利要求 1 所述的组合物，以液体或干燥形式存在。

32. 权利要求 1 所述的组合物，还含有可药用的赋形剂。

33. 权利要求 1 所述的组合物，以喷雾干燥的形式存在。

34. 权利要求 1 所述的组合物在制备用于给哺乳动物受试对象的肺部递送的药物中的应用，其中递送包括通过吸入给药药物，以在所述受试对象的肺部沉积并吸收。

35. 权利要求 34 所述的应用，其中胰岛素水平的升高在给药后维持至少 10 小时。

36. 权利要求 34 所述的应用，其中胰岛素水平的升高在给药后维持至少 12 小时。

37. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药的结果还有所述受试对象中的葡萄糖水平在给药后被抑制至少 10 小时。

38. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药的结果还有所述受试对象中的葡萄糖水平在给药后被抑制至少 12 小时。

39. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药包括以雾化形式给药所述组合物。

40. 权利要求 34 所述的应用，还包括在给药前雾化所述组合物。

41. 权利要求 34 所述的应用，其中所述胰岛素以位点特异的方式与聚乙二醇共价结合。

42. 权利要求 34 所述的应用，其中所述胰岛素以随机的方式与聚乙二醇共价结合。

43. 权利要求 34 所述的应用，其中所述结合物在肺部给药时，其特征还在于肺部绝对生物利用度高于天然胰岛素。

44. 权利要求 34 所述的应用，其中所述胰岛素与一个或多个末端封闭的聚乙二醇分子共价结合。

45. 权利要求 34 所述的应用，其中所述胰岛素与一个或多个选自线性、分支、分叉和哑铃状的聚乙二醇分子共价结合。

46. 权利要求 34 所述的应用，其中所述结合物不含亲脂部分。

47. 权利要求 34 所述的应用，其中所述组合物不含亲脂成分。

48. 权利要求 34 所述的应用，其中所述胰岛素与一个或多个含有可生物降解的键的聚乙二醇分子共价结合。

49. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇含有 2 到 300 个 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ 亚基。

50. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量为 200 到 5,000 道尔顿。

51. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量为 200 到 2,000 道尔顿。

52. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇具有的名义平均分子量为 200 到 1,000 道尔顿。

53. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇结合到胰岛素的一个或多个反应性氨基位点上。

54. 权利要求 53 所述的应用，其中所述聚乙二醇通过选自酰胺、氨基甲酸乙酯和亚甲基氨基的键结合到胰岛素的一个或多个反应性氨基位点上。

55. 权利要求 53 所述的应用，其中所述聚乙二醇结合通过将具有选自 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯、活性碳酸酯、醛和缩醛的末端反应基的聚乙二醇与胰岛素上的一个或多个反应性氨基位点进行反应而结合到胰岛素上。

56. 权利要求 34 所述的应用，其中胰岛素上至少 75% 的 B-1 Phe 位点与聚乙二醇共价结合。

57. 权利要求 34 所述的应用，其中胰岛素上至少 90% 的 B-1 Phe 位点与聚乙二醇共价结合。

58. 权利要求 34 所述的应用，其中所述组合物含有胰岛素单体和二聚体结合物的混合物。

59. 权利要求 58 所述的应用，其中所述组合物还含有胰岛素三聚体结合物。

60. 权利要求 34 所述的应用，其中所述聚乙二醇在一端含有适合与胰岛素共价结合的活化的连接部分。

61. 权利要求 60 所述的应用，其中所述活化的连接部分含有选自 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯、活性碳酸酯、醛和缩醛的反应性官能团。

62. 权利要求 60 所述的应用，其中所述结合部分的长度为 2 到 20 个原子。

63. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药包括通过干粉吸入器给药所述组合物。

64. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药包括通过计量的剂量吸入器给药所述组合物。

65. 权利要求 34 所述的应用，其中所述给药包括通过喷雾器给药所述组合物。

66. 权利要求 34 所述的应用，其中所述组合物还包括可药用的赋形剂。

67. 权利要求 34 所述的应用，其中作为给药所述结合物组合物的结果，在给药后 1 小时内，血清中的胰岛素水平就达到比基础水平高至少 2 倍。

68. 权利要求 1-30 任一项所述的用于肺部给药的干粉组合物。

69. 权利要求 68 所述的组合物，其中所述胰岛素的结合物是单取代的。

70. 权利要求 68 所述的组合物，其中结合物超过 90%是单取代的。

71. 权利要求 68 所述的组合物，包含 2%至 95%重量的 PEG-胰岛素结合物。

72. 权利要求 68 所述的组合物，还包含可药用的赋形剂。

73. 权利要求 72 所述的组合物，其中所述赋形剂选自碳水化合物、

氨基酸、二肽、三肽和缓冲剂。

74. 权利要求 73 所述的组合物，其中所述赋形剂是含有两个或多个亮氨酸残基的二或三肽。

75. 权利要求 68 所述的组合物，具有小于 10 μm 的 MMD。

76. 权利要求 75 所述的组合物，具有小于 4 μm 的 MMD。

77. 权利要求 68 所述的组合物，具有小于 5 μm 的 MMAD。

78. 权利要求 77 所述的组合物，具有小于 3.5 μm 的 MMAD。

79. 权利要求 68 所述的组合物，具有小于 10%重量的水分含量。

80. 权利要求 68 所述的组合物，以剂量容器的形式存在。

化学修饰胰岛素的肺部给药

本申请为国际申请 PCT/US2002/16464 于 2003 年 11 月 21 日进入中国国家阶段、申请号为 02810355.6、发明名称为“化学修饰胰岛素的肺部给药”的分案申请。

发明领域

本发明涉及通过吸入传送到肺部的具有生物活性的、亲水聚合物修饰的胰岛素衍生物。同时还提供了这些衍生物的制备和给药方法。

发明背景

胰岛素是在正常（没有患糖尿病的）受试对象的胰腺 β -细胞中产生的一种多肽激素。人胰岛素是一个 51 个氨基酸的多肽激素，分子量约为 5800 道尔顿。胰岛素分子由两条肽链组成（一条 A 链和一条 B 链），含有一个亚基内和两个亚基间二硫键。A 链由 21 个氨基酸组成，而 B 链由 30 个氨基酸组成。胰岛素的两条链形成了一种高度有序的结构，在 A 链和 B 链中都有几个 α -螺旋区。有趣的是，孤立的胰岛素链是没有活性的。在溶液中，胰岛素可以以单体、二聚体或六聚体的形式存在。在用于皮下治疗的高浓度制剂中胰岛素是六聚体，但是当它在体液中被稀释后就变成单体形式了。胰岛素对于调节碳水化合物代谢、降低血糖水平是必需的；胰岛素的全身性缺陷引起糖尿病。糖尿病病人的生存依赖于频繁地、长期地施用胰岛素，以维持可以接受的血糖水平。

现有的胰岛素制剂具有缺陷，在治疗糖尿病时可导致严重的医疗并发症。例如，糖尿病人最经常使用的标准的锌胰岛素制剂是无活性的六聚体胰岛素的微晶体悬浮液。微晶体的不溶性以及随后六聚体解离为有活性的单体形式，会导致胰岛素吸收到血流中的延迟和受试对

象差异 (F. Liu 等, *Bioconjugate Chem.*, 8, 664-672 (1997); T. Uchio 等, *Adv. Drug Del. Rev.*, 35, 289-306 (1999); K. Hinds 等, *Bioconjugate Chem.*, 11, 195-201 (2000))。胰岛素的制剂还受到物理不稳定性的困扰, 因为胰岛素趋于形成微丝和不溶性沉淀。对于打算在胰岛素泵中使用的制剂来说, 沉淀是特别重要的问题。配制的胰岛素还倾向于化学降解, 例如非酶促的脱氨作用, 并形成高分子量的转化产物如共价结合的胰岛素二聚体 (Brange. J.等, *Pharm. Res.*, 9, 715-726(1992); Brange J. 等, *Pharm. Res.*, 9, 727-734(1992))。已有重要的证据表明, 对胰岛素的免疫应答的发生可能是由于这些胰岛素的共价聚合物的存在 (Robbins, D. C.等, *Diabetes*, 36, 838-841(1987))。此外, 即使是高度纯化的人胰岛素也具有轻微的免疫原性 (Kim, 同上)。

除了上面提到的制剂不稳定问题之外, 从给药的观点来看, 现有的胰岛素疗法也有许多缺点。最常用的胰岛素给药方式是皮下注射, 通常是在腹部或大腿。胰岛素也可以通过静脉内或肌内方式给药。为了将血糖维持在可以接受的水平, 通常需要每天注射一次或两次胰岛素, 此外在需要时还要补充注射胰岛素。糖尿病的积极治疗可能需要更频繁的注射, 这时病人使用一个家庭诊断试剂盒严密地监测血糖水平。出于多种考虑, 以注射方式给药胰岛素是不受欢迎的。首先, 许多病人发现, 根据维持可接受的血糖水平的需要而频繁地给自己注射是相当困难和烦琐的。事实上, 许多 II 型病人由于害怕扎针而不愿长年连续使用胰岛素。这种不情愿可能导致不遵医嘱, 在最严重的情况下可能危及生命。此外, 皮下注射的胰岛素的全身吸收相当慢, 即使是在使用快效胰岛素制剂的情况下, 通常也需要 45 到 90 分钟。因此, 提供一种替代的胰岛素制剂和给药途径从而不需要自我注射, 并能够使胰岛素快速、全身性地发挥效用, 是长期以来一个目标。

已经探索了许多非注射的制剂, 如口服或鼻吸制剂, 但是, 这些努力的结果尚未导致开发出商业可用的基于口服或鼻吸的胰岛素给药系统 (Patton 等, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 1, 35(2-3),

235-247(1999)), 这主要是由于生物有效度非常低并且易变 (Hilsted, J. 等, *Diabetologia*, 38, 680-684(1995))。尽管与吸收增强剂一起使用可以增加生物有效度, 但这些药剂可损伤粘膜。

但是, 可吸入的胰岛素制剂已被开发, 在克服上面提到的许多问题方面表现得相当突出。例如, 美国专利 No. 5,997,848(Patton 等, *Inhale Therapeutic Systems, Inc.* (吸入治疗系统公司)) 描述了胰岛素的干粉制剂, 其 (1) 在室温下是化学和物理学稳定的, 并且 (2) 当吸入时, 能够通过肺泡区的上皮细胞快速吸收到血液循环中。其中描述的这种快效胰岛素制剂和方法不需要烦琐的自我注射, 并且在一项为期三个月的人体功效研究中显示, 在 I 型和 II 型胰岛素依赖型糖尿病患者中, 与皮下注射相比提供了同等的葡萄糖控制能力 (Patton 等, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 1, 35(2-3), 235-247(1999))。Patton 等描述的干粉胰岛素制剂, 在克服了制剂不稳定和病人不遵医嘱的问题的同时, 为了有效地控制葡萄糖水平, 仍然需要频繁地 (例如在就餐时) 吸入胰岛素。此外, 这种基于快效可吸入胰岛素类型的制剂, 对于 I 型和部分 II 型糖尿病患者, 其典型的胰岛素用药方式仍然需要在就寝时注射一次长效胰岛素。因此, 仍然需要一种有活性的、可溶的、稳定的胰岛素类型, 它不需要频繁地用药, 即是长效胰岛素制剂, 最好通过吸入方式给药。

理想的长效胰岛素制剂的特征是起效非常缓慢, 但效力持久、峰值相对平缓。现有的长效可注射胰岛素制剂, 例如 *ultralente* (特慢的锌胰岛素悬浮液) 和鱼精蛋白锌胰岛素悬浮液, 是非常不令人满意的。这些制剂趋于出现高峰而不能提供低的基础的胰岛素浓度, 并且不可预测, 一般作用的持续时间不超过大约一天。*ultralente* 胰岛素具有长的半衰期, 使得很难确定它最适的剂量范围, 而鱼精蛋白锌胰岛素由于它的不可预测性及效力时间过长而很少使用 (Goodman 和 Gilman, “*The Pharmacological Basis of Therapeutics* (治疗学的药理学基础)”, 第 9 版, Hardman 和 Limbird 编辑, 1996, 第 1500 页)。其它已经探索的不成功的长效可注射胰岛素制剂包括白蛋白结合的胰岛素和胰岛素

六聚体钴制剂 (Hoffman, A., Ziv, E., Clin. Pharmacokinet, 33(4):285-301, (1997))。

许多长效肺部用胰岛素制剂也已被探索。其中包括含有相对于胰岛素大大过量的脂质的脂质体 (Liu, F-Y 等, Pharm. Res. 10,228-232,(1983))、多孔的乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 胰岛素颗粒 (Edwards, D. A.等, Science 276(5320), 1868-1871 (1997)), 雾化的 PLGA 纳米球 (Kawashima, Y.等, J. Controlled Release, 62(1-2): 279-287 (1999)) 和磷脂/鱼精蛋白胰岛素制剂 (Vanbever, R.等, Proc. Control Rel. Bioact. Mater., 25, 261-262 (1998))。不幸的是, 所有这些制剂都已被证明是不令人满意的, 或是由于当施用于大鼠时生物有效度低, 或是由于制剂不足。因此, 长期以来仍存在对最适的长效胰岛素制剂的需求, 它们应该是具有生物活性的、物理学和化学稳定的、水溶性的并且最好为单体。在理想情况下, 这样的制剂最好适合于肺部给药。

发明概述

从一方面来说, 本发明建立在胰岛素组合物的基础之上, 该胰岛素组合物可用于通过肺部深处向全身血液循环给药。具体来说, 本发明的组合物包含了一种结合物, 由胰岛素共价结合到一个或多个非天然存在的亲水聚合物分子上而形成。在一个优选实施方案中, 共价结合于胰岛素上的非天然存在的亲水聚合物是一种聚亚烷基二醇, 例如聚乙二醇 (PEG), 尽管在此提出的所有实施方案也可以同等地用于其它的非天然存在的亲水聚合物。

一般来说, 本发明的胰岛素-聚合物结合物与天然胰岛素相比将表现出改进的药代动力学和药效性质, 特别是在肺部给药时。在一个实施方案中, 在此提供的 PEG-胰岛素结合物在通过肺部和肺部深处给药时, 表现出良好的绝对生物有效度。在一个特定的实施方案中, 本发明的 PEG-胰岛素结合物的特征在于其具有高于天然胰岛素的绝对的肺部生物有效度。在优选情况下, 本发明的 PEG-胰岛素结合物的特征

在于其具有高于天然胰岛素至少 1.5-2.0 倍的绝对的肺部生物有效度。在更优选实施方案中，本发明的 PEG-胰岛素结合物的特征在于其绝对的肺部生物有效度高出大约 15%，更优选情况下高出大约 20%，或者在最优选情况下高出大约 30%。

在另一个实施方案中，本发明的 PEG-胰岛素结合物当通过肺部给药时，其 T_{max} 值（达到最大浓度所需的时间）表现出至少 1.5 倍于天然胰岛素，或在更优选情况下至少 2 或 3 倍于天然胰岛素，或更优选情况下至少 5 倍于天然胰岛素。

本发明的结合物中使用的 PEG 可以具有几个不同的特点。在本发明的一个实施方案中，在此描述的 PEG-胰岛素结合物的聚乙二醇部分在末端被一个惰性的或无反应性的末端基团所封闭，例如一个烷氧基、或更具体地说一个甲氧基。

在另一个实施方案中，结合物的聚乙二醇部分将具有一个特别适合于连接到胰岛素上的结构，包括线性的聚乙二醇和多枝化或支链的聚乙二醇。在另一个实施方案中，一个 PEG-胰岛素结合物可以含有两个单官能衍生的胰岛素分子，它们之间由一个双活化的聚乙二醇连接起来（胰岛素-PEG-胰岛素）。此外，在这个“哑铃”结构中的一个胰岛素分子还可以被其它的 PEG 所修饰。

在另一个实施方案中，本发明的一个 PEG-胰岛素结合物含有一个分叉的聚乙二醇，在聚合物链的一端带有一个分支部分，还有两个连接到分支部分上的游离的反应基（或多组两个基团）用于共价结合胰岛素。在本发明的这个实施方案中，聚乙二醇的分支结构使得聚合物链可以连接两个或多个胰岛素分子。

本发明的胰岛素结合物的聚乙二醇部分可任选含有一个或多个可降解的连接。

一般来说，胰岛素通过位于 PEG 末端的一个连接部分共价结合到 PEG 上。在本发明中使用的优选连接部分包括那些适合于与具有反应性的胰岛素的氨基基团结合的部分，例如 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯、活性碳酸盐、醛和缩醛。

在另一个实施方案中，本发明的结合物中共价结合于胰岛素上的 PEG 将含有从大约两个到大约 300 个 (OCH₂CH₂) 亚基，在优选情况下从大约 4 个到 200 个亚基，在更优选情况下从大约 10 个到 100 个亚基。

在另一个实施方案中，共价结合于胰岛素上的 PEG 将具有名义平均分子量从大约 200 到大约 10,000 道尔顿。在一个优选实施方案中，PEG 将具有名义平均分子量从大约 200 到大约 5000 道尔顿。在一个更加优选的实施方案中，PEG 将具有名义平均分子量从大约 200 到大约 2000 道尔顿或从大约 200 到大约 1000 道尔顿。

在一个特定的实施方案中，结合物的胰岛素部分含有天然的人胰岛素。

在另一个实施方案中，本发明组合物中的结合物具有的纯度大于大约 90% (即在组合物的结合物部分中，有 90%重量或以上为一种或多种 PEG-胰岛素)。也就是说，本发明的组合物其特征为含有高纯度的结合的胰岛素成分，即组合物中不存在可以检测量的游离聚乙二醇物种和其它与 PEG 相关的杂质。

在一个实施方案中，本发明的一种组合物含有一种结合物，其中胰岛素在其一个或多个氨基位点上与 PEG 共价结合。本发明的一种组合物中包含的胰岛素可以是单取代的 (即只有一个 PEG 共价结合到其上)。根据本发明，特定的单取代 PEG-胰岛素结合物含有一个共价结

合到胰岛素分子上的聚乙二醇部分，结合位置选自 PheB1、GlyA1 和 LysB29。

在一个优选实施方案中，PEG 部分共价结合在胰岛素的 PheB1 位点上。在一个实施方案中，胰岛素上至少大约 75% 的 B-1Phe 位点与 PEG 共价结合。在另一个实施方案中，胰岛素上至少大约 90% 的 B-1Phe 位点与 PEG 共价结合。

本发明的组合物也可以含有一种混合物，它由具有上述一个或多个特征的单结合和双结合的 PEG-胰岛素组成。这样的组合物还可以含有三结合的 PEG-胰岛素。

在另一个实施方案中，本发明的一种 PEG-胰岛素结合物的特征在于其相对于非 PEG 化的或天然的胰岛素，蛋白水解速率降低。

本发明的一种组合物还可以含有 PEG-胰岛素结合物与非化学修饰的或天然的胰岛素的混合物。

此外，上述的组合物是雾化形式的。

本发明的组合物可以溶解或悬浮在液体中，或为干燥形式，此外也可以含有可药用的赋形剂。

此外，在此还提供了一种生物活性的聚乙二醇-胰岛素结合物，它适合于通过吸入给药到肺部深处。

在另一方面，本发明提供了一种将 PEG-胰岛素结合物传送到需要它的哺乳动物受试对象中的方法，通过吸入前述的雾化形式的 PEG-胰岛素组合物而给药。

在另一方面，本发明还提供了一种方法，用于提供一种通过肺部给药的基本上非免疫原性的胰岛素组合物。该方法包括下列步骤：如此所述将胰岛素共价结合到一个或多个非天然存在的亲水聚合物结合物的分子上，然后通过吸入将组合物给药到受试对象的肺部，结果胰岛素通过肺部进入到血液循环中。

在另一方面还提供了一种方法，用于提供一种可给药到人类受试对象肺部的长效的胰岛素组合物。该方法包括：将胰岛素共价结合到一个或多个非天然存在的亲水聚合物上从而提供了一种含有胰岛素-亲水聚合物结合物的组合物，然后通过吸入将该组合物给药到受试对象的肺部。在给药步骤中，胰岛素通过肺部进入血液循环，在给药后血液中升高的胰岛素水平可以维持至少 8 小时。

本发明的 PEG-胰岛素结合物，当雾化并通过吸入给药后，可用于治疗糖尿病（DM）。

当阅读了下面的详细描述后，本发明的这些和其它的目的和特点将会变得更加一目了然。

附图简述

图 1 是一个示例的 PEG-胰岛素结合物（“750-2 PEG 胰岛素”）与一个未修饰的胰岛素对照的酶解速率图，在实施例 6 中详细描述；

图 2 是静脉内给药示例的 PEG 化的（5K PEG 胰岛素）与非 PEG 化的胰岛素组合物后，血清中的平均胰岛素浓度图（在实施例 7 中详细描述）；

图 3 是静脉内给药示例性 PEG 化的（5K PEG 胰岛素）与非 PEG 化的胰岛素组合物后的血糖浓度图（在实施例 7 中详细描述）；

图 4 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的（每只动物 150 μ g 5K PEG 胰岛素）与非 PEG 化的人胰岛素（每只动物 40 μ g）后，血清中的平均胰岛素浓度图（实施例 8）；

图 5 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(每只动物 150 μ g 5K PEG 胰岛素)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 40 μ g)后的平均血葡萄糖浓度图(实施例 8);

图 6 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-1 PEG 胰岛素)与非 PEG 化的人胰岛素后,血清中的平均胰岛素浓度图(实施例 9);

图 7 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-1 PEG 胰岛素)与非 PEG 化的人胰岛素后的平均血糖浓度图(实施例 9);

图 8 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-1 PEG 胰岛素,每只动物 80 和 160 μ g)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 80 μ g)后,血清中的平均胰岛素浓度图(实施例 10);

图 9 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-1 PEG 胰岛素,每只动物 80 和 160 μ g)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 80 μ g)后的平均血糖浓度图(实施例 10);

图 10 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-2 PEG 胰岛素,每只动物 80 μ g)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 80 μ g)后,血清中的平均胰岛素浓度图(实施例 11);

图 11 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(750-1 PEG 胰岛素,每只动物 80 μ g)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 80 μ g)后的平均血糖浓度图(实施例 11);

图 12 是在雄性大鼠气管内滴注 PEG 化的(2K PEG 胰岛素,每只动物 300 μ g、600 μ g、900 μ g 和 1200 μ g)与非 PEG 化的人胰岛素(每只动物 80 μ g)后的平均血糖浓度图(实施例 12);

图 13 是静脉内给药示例性 PEG 化的(2K PEG 胰岛素)与非 PEG 化的胰岛素组合物后,血清中的平均胰岛素浓度图(在实施例 13 中详细描述);以及

图 14 是静脉内给药示例性 PEG 化的(2K PEG 胰岛素)与非 PEG 化的胰岛素组合物后的平均血糖浓度图(在实施例 13 中详细描述)。

发明详述

为了通过肺部给药到肺,各种代表性的 PEG-胰岛素结合物的设

计、合成和表征已被最优化。尽管 PEG-胰岛素分子的制备在以前已有描述，但利用与 PEG 的共价结合来提供长效的可吸入的胰岛素制剂，在以前尚未被证实。因此，本申请人所面临的挑战，是提供 PEG-胰岛素结合物，其中共价结合在胰岛素分子上的 PEG 链具有最适的均衡数目、位置、结构和分子量，从而提供适合于给药到全身循环系统中，最好是通过肺部深处给药的胰岛素组合物。从前面的描述可以看到，令人吃惊的是，本发明人发现了某些 PEG-修饰的胰岛素制剂具有下述一个或多个特点：（1）它们是生物活性的，即表现出至少大约 5% 的天然胰岛素活性，或在优选情况下其生物活性与天然胰岛素相比至少或是基本维持或是仅仅略有减少，或者在更优选情况下，其活性比天然胰岛素高；（2）它们从肺部吸收进入血流（与“粘附”在肺部相反）；（3）它们是化学和物理学稳定的；（4）它们在通过肺部给药时，可以在给药后将血液中的胰岛素水平升高到基准值以上至少大约 8 个小时；（5）它们对胰岛素降解酶的酶解攻击具有抗性；并且（6）在通过吸入给药时，它们表现出的半衰期长于非 PEG 化的胰岛素。当阅读了下面的描述后这些特点的详细情况将变得明显。

1、定义

在此所用的下列术语具有指定的意义。

除非在上下文中有清楚的说明，在说明书和附录的权利要求书中，单数形式均包括了复数的概念。

在此所用的“胰岛素”其意义包括了前胰岛素，并包含了任何具有天然胰岛素的部分或全部一级结构构象（也就是说连续的氨基酸残基序列）和至少一种生物学性质的纯化的、分离的多肽。总而言之，术语“胰岛素”其意义包括天然的和合成衍生的胰岛素，包括其糖结合形式，以及其类似物，包括具有一个或多个氨基酸修饰（缺失、插入或替代）的多肽，只要它们基本上保留了全长胰岛素（在用本文所述的亲水的、非天然存在的聚合物进行化学修饰之前）的至少 80% 或

以上的治疗活性。本发明的胰岛素可以通过任何标准的方式生产，包括但不限于胰腺提取、重组表达和体外多肽合成。天然或野生型胰岛素是指其氨基酸序列与自然界中发现的胰岛素的氨基酸序列相对应的胰岛素。天然或野生型胰岛素可以天然地（即从天然来源分离）或合成地生产。

“生理上可裂解的”或“可降解的”键是在生理条件下可以与水反应（即被水解）的弱键。在优选情况下是指在 pH8 和 25℃ 下水解半衰期少于大约 30 分钟的键。一个键在水中水解的趋势不仅依赖于连接两个中心原子的键的一般类型，而且依赖于结合在这些中心原子上的取代基。合适的水解不稳定的或弱的键包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基酯、亚胺、邻位酯、肽和寡核苷酸。

“水解稳定的”连接或键是指一个化学键，一般来说是共价键，它在水中基本稳定，也就是说在生理条件下，在一段较长的时间内，不会发生任何可以感觉到的水解。水解稳定的键的例子包括但不限于下列的键：碳-碳键（例如在脂族链中）、醚键、酰胺键、氨基甲酸乙酯等。一般来说，水解稳定的键在生理条件下表现出的水解速率小于每天大约 1-2%。代表性的化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

在此所用的“PEG”或聚乙二醇其意义包括任何水溶性的聚环氧烷烃。在最典型的情况下，本发明中所用的 PEG 含有下列结构：“ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ”，其中末端基团或整个 PEG 部分的实际结构可以变化。一种常用的 PEG 是末端封闭的 PEG，其中 PEG 的一个末端被一个相对无活性的基团封闭，一般是烷氧基团如甲氧基（ $-\text{OCH}_3$ ），而另一个末端是一个羟基基团，它易于进行随后的化学修饰。用于制备本发明的胰岛素结合物的特殊的 PEG 形式，如分支的、线性的、分叉的 PEG 等，将在后面更详细地描述。

“PEG-胰岛素结合物”是指一个胰岛素分子（如前所定义），其上共价地连接或结合了至少一个聚乙二醇部分，并具有任何可检测程度的胰岛素活性（例如天然胰岛素大约 2%到大约 100%或以上的生物活性）。

在涉及到本发明亲水的非天然存在的聚合物如 PEG 时，“名义平均分子量”是指聚合物的质量平均分子量，一般由孔径排阻层析、光散射或在 1,2,4-三氯苯中的内禀速度来确定。本发明的聚合物一般是多分散的，具有小于大约 1.05 的低的分散性。

“亲脂部分”是一个基团，当通过一个可降解的或不可降解的键与本发明的亲水聚合物结合时，对于基本上改变聚合物及聚合物-胰岛素结合物的亲水特性是有效的。典型的亲脂基团如脂肪酸可以含有大约 12 到 22 个碳原子。

本发明的“基本非免疫原性的”胰岛素结合物与天然胰岛素相比具有减少的免疫原性。免疫原性可以通过将 PEG-胰岛素结合物相对于未修饰的胰岛素给药小鼠，或最好是兔子后，测定抗体的滴度来进行评估。

“烷基”是指碳氢链，一般长度范围为大约 1 个到 15 个原子。碳氢链最好但不必需是饱和的，可任选含有其它结合在其上的官能团。碳氢链可以是支链的也可以是直链的。烷基的例子包括乙基、丙基、1-甲基丁基、1-乙基丙基和 3-甲基戊基。在本发明的一个优选实施方案中，含有一个烷基化的 PEG，特别是一个线性的烷基化的 PEG 的结合物，是指具有一个不是脂肪酸或其它亲脂部分的烷基部分的结合物。

“低级烷基”是指含有 1 到 5 个碳原子的烷基基团，可以是直链的或是支链的，例如甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基。

“绝对的肺部生物有效度”是传送到哺乳动物肺部的药物剂量(例如本发明 PEG-胰岛素结合物)与天然胰岛素静脉内剂量相比被吸收和进入血液循环的百分数。用于测定绝对的肺部生物有效度的具有代表性的模型系统包括大鼠、狗、兔和猴。从一方面来说,本发明的可吸入的 PEG-胰岛素组合物,其特征为在血浆或血液中绝对的肺部生物有效度为至少大约 20%,通常绝对的肺部生物有效度范围从大约 10%到 30%或更高。总的来说,根据 PEG-胰岛素结合物的特定性质,本发明的结合物具有至少大约下列之一的绝对的肺部生物有效度: 10%、12%、15%、18%、20%、22%、25%、30%、32%、35%或更高。绝对的肺部生物有效度可以通过测量 PEG-胰岛素结合物组合物被直接气管内给药、滴注或吸入后产生的吸收值来进行估计。

在涉及 PEG-胰岛素结合物的半衰期时,“分配阶段”是指胰岛素开始快速从血浆中消失的阶段。末端缓慢或清除阶段半衰期是指胰岛素从身体中被清除的缓慢阶段。

“长效”胰岛素是指效用(即在基准值以上的升高的血液中水平)持续时间至少大约 6 小时,在优选情况下至少大约 8 小时的胰岛素。

“被抑制的葡萄糖水平”是指被抑制在基准值或基本水平以下的血糖水平(例如在施用本发明的 PEG-胰岛素结合物后)。

“可药用的盐”包括但不限于氨基酸盐,用无机酸制备的盐,如氯化物、硫酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、氢溴酸盐和硝酸盐,或用有机酸制备的盐,如苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、反丁烯二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙基琥珀酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、对甲苯磺酸盐、棕榈酸盐、水杨酸盐和硬脂酸盐、以及 estolate、葡庚糖酸盐(glucoseptate)和乳糖酸盐(lactobionate)。同样地,含有可药用的阳离子的盐包括但不限于钠、钾、钙、镁、铝、锂和铵(包括取代的铵)盐。

“氨基酸”是指任何同时含有一个氨基基团和一个羧酸基团的化合物。尽管氨基基团通常出现在与羧基官能团相邻位置上，但它也可以位于分子内任何位置。氨基酸也可以含有其它的官能基团，例如氨基、硫代基、羧基、氨甲酰基、咪唑基等。氨基酸可以被合成或天然形成，可以以消旋体或光学活性（D-或 L-）的形式使用，包括含有各种比例的对映体。

“肽”由两个或多个通过肽键连接起来的氨基酸组成。肽可以是同源的肽或异源的肽（即由相同的或不同的前述氨基酸残基组成），其长度可以在两个氨基酸到几百个氨基酸之间变化。

“干粉”是指一般含有不足大约 10%水分的粉状组合物。

“适合于肺部传送的”组合物是指能够被雾化并被受试对象吸入，从而使雾化微粒的一部分到达肺部并穿入到下呼吸道和肺泡中的组合物。这样的组合物被认为是“可呼吸的”或“可吸入的”。

“雾化”微粒是悬浮于气体中的液体或固体颗粒，一般是通过致动（或启动）一个吸入装置，如干粉吸入器、喷雾器、计量的吸入器或雾化器而产生。

“发射剂量”或“ED”为一个适当的吸入器装置在启动或分散事件后从中传送的药物制剂提供了指示。更具体地说，对于干粉制剂，ED 是从一个单位剂量包中取出的与从吸入装置的喷嘴中喷出的粉末的百分比的度量。ED 被定义为吸入装置传送的剂量与额定剂量（即在启动前放置在适当的吸入装置中的每个单位剂量的粉末质量）的比率。ED 是一个由实验确定的参数，一般使用一个被设计用来模拟病人用药的体外装置来测定。为测定 ED 值，额定剂量的干粉，一般以单位剂量的形式被放置在一个适当的干粉吸入器中（例如在美国专利 No.

5,785,049 中描述的吸入器，命名为吸入治疗系统），然后启动装置发射粉末。接着通过真空将产生的烟雾云从此装置中抽出，并被连接在装置喷嘴上的一个配衡滤器捕捉。到达过滤器的粉末的量组成了发射剂量。例如，对于放置在吸入装置中的含 5mg 干粉的量，如果粉末发射后在上述配衡滤器上回收了 4mg 粉末，那么干粉制剂的发射剂量是： $4\text{mg} (\text{传送的剂量}) / 5\text{mg} (\text{额定剂量}) \times 100\% = 80\%$ 。对于非均质的粉末，ED 值为启动后从一个吸入装置传送药物而不是干粉提供了指示，其基于药物的量而不是总粉末的重量。同样地，对于 MDI 和雾化器传送形式，ED 对应于从传送形式中取出的与从吸入装置的喷嘴中喷出的药物的百分比。

“细小颗粒剂量”或“FPD”被定义为气动粒径在 $3.3\mu\text{m}$ 以下的粉末颗粒的质量百分比，一般通过在 Anderson 阶式碰撞采样器中测量来确定。这个参数为具有最大潜力能够到达病人肺部深处以全身地吸收药物成分的颗粒的百分比提供了一个指示。

“可分散的”或“分散的”粉末是指 ED 值为至少大约 30%，更优选是 40-50%，以及更优选甚至是至少大约 50-60%或更高的粉末。

“质量中值粒径”或“MMD”是平均粒径的度量，这是由于本发明的粉剂一般是多分散的（即由一定范围内的粒径组成）。尽管任何常用的技术都可用于测量平均粒径（例如电子显微镜、光散射、激光衍射），在此报告的 MMD 值是通过离心沉降测定的。

“质量中值气动粒径”或“MMAD”是被发散颗粒的气动粒径的度量。气动粒径用于描述雾化粉末的沉降行为，是在空气中与微粒具有同样的沉降速度的单位密度球体的直径。气动粒径含盖了微粒的形状、密度和微粒的物理大小。在此所用的 MMAD，除非另有指明，是指通过阶式碰撞采样器确定的雾化粉末的气动粒径分布的中点或中值。

“可药用的赋形剂或载体”是指可任选包含在本发明组合物中的赋形剂。用于吸入的组合物中优选的赋形剂是那些能够被带入肺部，并且对受试对象，特别是受试对象的肺部没有明显毒副作用的赋形剂。

“药物有效量”或“生理有效量”是为了在血流中提供预期的胰岛素水平以达到目标血糖水平而需要的，在此描述的治疗组合物中存在的 PEG-胰岛素结合物的量。准确的量依赖于许多因素，例如特定的 PEG-胰岛素、所用的传送装置、治疗组合物的成分和物理性质、预期的病人数量、病人的因素等等，可以由本领域技术人员根据提供的信息容易地确定。

II、亲水的非天然存在的聚合物-胰岛素结合物

根据本发明已经制备了几种示例性的 PEG-胰岛素结合物。尽管在本发明的结合物中聚乙二醇是优选的聚合物，但是其它水溶性的、亲水的、非天然存在的聚合物也可以使用。其它适合于在本发明中使用的聚合物包括聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰基吗啉、聚噁唑啉和聚氧乙基化多元醇如聚氧乙基化甘油、聚氧乙基化山梨醇和聚氧乙基化葡萄糖。也可以使用从上述水溶性聚合物中选择的含有亚基或亚基嵌段的聚合物。此外，聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物也可以使用。在优选情况下，本发明的聚合物基本不含脂肪酸基团或其它亲脂部分。

下文阐述了通过仔细地选择一种或多种 PEG 部分、PEG 化试剂、胰岛素 PEG 化位点、PEG 化条件及后续的结合物纯化，可以获得具有预期临床性质（改进的药代动力学和/或药效性质）的 PEG-胰岛素组合物。现在将提供本发明的 PEG-胰岛素结合物的特殊特征。

A、聚合物和产生的结合物的结构特征

本发明的 PEG-胰岛素结合物一般含有一个或多个 PEG 链，每个链的分子量从大约 200 到大约 40,000 道尔顿，在优选情况下从大约 200

到大约 10,000 道尔顿。在优选情况下，本发明中使用的 PEG 所具有的平均分子量将位于下列范围之一：从大约 200 到 10,000 道尔顿，从大约 200 到大约 7,500 道尔顿，从大约 200 到大约 6,000 道尔顿，从大约 200 到大约 5,000 道尔顿，从大约 200 到大约 3000 道尔顿，从大约 200 到大约 2000 道尔顿，以及从大约 200 到大约 1000 道尔顿。在实施例 1-4 中提供了用具有分子量为 5,000 道尔顿、2,000 道尔顿和 750 道尔顿的 PEG 制备的结合物的例子。

优选的给药到肺部的 PEG-胰岛素将具有分子量小于大约 5000 道尔顿、优选小于大约 2000 道尔顿、以及甚至小于大约 1000 道尔顿的 PEG 部分。在本发明的一个特定的实施方案中，PEG-胰岛素结合物中的 PEG 部分具有下列平均分子量之一：200、300、400、500、600、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000 或 5000。在某些情况下，不倾向使用较高分子量的 PEG，这是由于它们具有使胰岛素分子失去活性或在肺部用药时通过肺的有效性降低（实施例 8）的潜在可能性。

由于较高的生物有效度倾向于选择较低分子量的 PEG，但高分子量的 PEG 链，例如平均分子量为 5,000、10,000、15,000、20,000、25,000、30,000 或 40,000 道尔顿或更高的 PEG 链，尽管一般认为减少了天然胰岛素的生物有效度，但倾向于增加半衰期，特别是在可注射的制剂中。也就是说对于一个高分子量的 PEG-胰岛素（相对于天然胰岛素而言），药代动力学参数如曲线下的面积（AUC）的显著提高，可以补偿它活性的损失。

至于亚基的数量，本发明使用的 PEG 一般含有的（OCH₂CH₂）亚基的数量在下列一个或多个范围之内：2 到大约 900 个亚基、从大约 4 个到大约 200 个亚基、从大约 4 个到大约 170 个亚基、从大约 4 个到大约 140 个亚基、从大约 4 个到大约 100 个亚基、从大约 10 个到大约 100 个亚基、从大约 4 个到大约 70 个亚基、从大约 4 个到大约 45 个亚基和从大约 4 个到大约 25 个亚基。

本发明的 PEG-胰岛素结合物可以是单取代的（也就是说，一个 PEG 结合到一个单一的具有反应性的胰岛素位点上）、双取代的（具有结合到两个反应活性位点上的 PEG 部分）、三取代的或者，甚至有聚合物结合到胰岛素分子上的三个以上的位点上。在此单取代、双取代和三取代胰岛素也分别指 PEG 单体、二聚体和三聚体。多取代的胰岛素（指具有共价结合于两个或多个胰岛素位点上的 PEG 部分的胰岛素）一般来说在每个反应活性位点上结合的 PEG 部分是相同的，尽管并不是必需这样。也就是说，具有超过一种以上类型的结合到胰岛素上的 PEG 部分的 PEG-胰岛素组合物是可以预期的。就本发明而言，优选的组合物是那些主要含有单体和/或二聚体胰岛素结合物的组合物。令人吃惊的是，已经发现非位点特异的 PEG-胰岛素组合物（包括具有共价结合到一个以上的反应活性位点上的 PEG 的 PEG-胰岛素物种的混合物）具有高于天然胰岛素的药代动力学和药效性质，特别是当在肺部给药时（实施例 11）。

就 PEG 取代的位置而言，胰岛素分子具有几个位点适合于 PEG 化，一般来说更优选氨基位点，但这不是必需的。适合于 PEG 化的特定的胰岛素氨基基团包括两个 N-末端 GlyA1 和 PheB1，以及 LysB29。胰岛素分子上的这些位点在本文中也分别被称为 A1、B1 和 B29。用于连接到胰岛素上的反应性氨基基团上的亲电活化的 PEG 包括 mPEG2-ALD、mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸、mPEG-琥珀酰亚胺基丁酸、mPEG-CM-HBA-NHA、mPEG-苯并三唑碳酸、mPEG-乙醛二乙缩醛等（Shearwater Corporation, Huntsville, Alabama）。

在一个实施方案中，本发明的一种组合物可以主要含有（超过 90%）单取代的胰岛素，例如单 A1 胰岛素、单 B1 胰岛素或单 B29 胰岛素。这样的组合物可以含有：1）单 A1 胰岛素，2）单 A1 胰岛素和单 B1 胰岛素的混合物，或 3）单 A1 胰岛素、单 B1 胰岛素和单 B29 胰岛素的混合物。此外，本发明的组合物可以主要含有双取代的胰岛

素,例如双-A1,B1-胰岛素或双-A1,B29-胰岛素或双-B1,B29-胰岛素或其任何不同的组合。

此外,本发明的组合物可以含有不同 PEG-胰岛素结合物的混合物(即 PEG 结合在可能的结合位点的任何一种组合上)。以胰岛素上的氨基位点为例,本发明的组合物可以含有下列 PEG-胰岛素结合物中的任何一种或多种:单 A1-PEG 胰岛素、单 B1-PEG 胰岛素、单 B29-PEG 胰岛素、双-A1,B1-胰岛素、双-A1,B29-胰岛素、双-B1,B29-胰岛素或三-A1,B1,B29-胰岛素。在一个实施方案中,优选主要含有单体和二聚体的组合物。代表性的组合物可以包括含有至少大约 75%组合的单体和二聚体、至少大约 80%组合的单体和二聚体或至少大约 85-90%组合的单体和二聚体的 PEG-胰岛素结合物混合物(如实施例 5 和 6)。

PheB1 是结合 PEG 进行化学修饰的特别优选的位点。特别是在一个实施方案中,用于本发明的 PEG-胰岛素结合物组合物,具有这样的特征:不论在组合物中 PEG-胰岛素物种的总数如何,其中胰岛素上至少大约 70%的 B-1 位点被 PEG 共价结合(例如,表 3A,实施例 5)。其它的实施方案包括下列组合物,其中胰岛素上至少大约 75%的 B-1 位点被 PEG 共价结合或其中胰岛素上至少大约 80%的 B-1 位点被 PEG 共价结合或其中胰岛素上至少大约 90%的 B-1 位点被 PEG 共价结合。

令人吃惊的是,本发明人已经发现 PEG-胰岛素的随机混合物(通过随机而不是定点的 PEG 化而制备),当给药到肺部时,使血液中升高的胰岛素水平可以维持至少 6 小时,更典型的情况下为给药后维持至少 8 小时或更长时间。这样的混合物具有优势,不仅因为它们更好的药代动力学和药效性质,而且因为它们的合成比相应的位点特异的方法更加简单(不需要多个合成步骤,不需要使用保护基团,不需要多步纯化等)。

在天然胰岛素分子上可以通过共价结合 PEG 而进行化学修饰的其

它位点包括 2 个 C-末端、Arg22B、His10B、His5A、Glu4A、Glu17A、Glu13B 和 Glu21B。

除了天然胰岛素，具有一个或多个氨基酸替代、插入或缺失的非天然胰岛素也可以加以使用，以便其他位点可用于连接一个或多个 PEG 部分进行化学修饰。本发明的这个实施方案对于在胰岛素分子内引入其他定制的 PEG 化位点尤其有用，例如，用于形成对酶解有更高抗性的 PEG-胰岛素。这样的方法提供了更高的灵活性，可用于设计具有所需均衡的活性、稳定性、溶解性和药物学性质的最适化的胰岛素结合物。尽管在胰岛素分子内任何数量的位点上都可以进行突变，即位点特异的诱变，但最优选的胰岛素突变体是 B 链上的前 4 个氨基酸中的任何一个被一个半胱氨酸残基取代。这样的半胱氨酸残基然后可以与一个和巯基基团特异性反应的活化的 PEG 进行反应，例如在美国专利 No. 5,739,208 和国际申请公开 No. WO 01/62827 中描述的 N-顺丁烯二酰亚胺基聚合物或其它衍生物。用在本发明的这个特定的实施方案中的巯基选择性 PEG 包括 mPEG-分支的顺丁烯二酰亚胺 (mPEG(MAL)₂)、mPEG2-分支的顺丁烯二酰亚胺 (mPEG2(MAL)₂)、mPEG-顺丁烯二酰亚胺 (mPEG-MAL) 和 mPEG2-顺丁烯二酰亚胺 (mPEG2-MAL) (Shearwater Corporation)。这些活化的 PEG 的结构分别如下：mPEG-CONHCH[CH₂CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-MAL]、mPEG2-赖氨酸-NH-CH[CH₂CONH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-MAL]₂、mPEG-MAL 和 mPEG2-赖氨酸-NH-CH₂CH₂NHC(O)CH₂CH₂MAL。

如果需要，也可以使用天然胰岛素序列的其它突变，以提高其生物学活性在 PEG 化后有所损失的 PEG-胰岛素结合物的生物活性。一个这样的突变是 8 位的苏氨酸变为组氨酸。其它的突变可以在例如 Diabetes Care, 13(9), 1990 中找到，其内容在此引为参考。

在本发明中使用的 PEG 可以具有不同的结构：线性的、分叉的、分支的、哑铃状的等等。一般来说，PEG 用一个适当的活化基团进行

活化，以适合于结合在胰岛素分子的一个或多个预期位点上。活化的 PEG 在一端具有一个反应基以与胰岛素反应。在此所用的术语“接头”，其意义包括位于 PEG 末端与胰岛素反应的活化基团，还可以进一步包括位于聚合物的 PEG 部分与末端的活化基团之间的其它（一般为惰性）原子，以使活化的 PEG 的制备简便。接头可以含有多种原子中的任何一种，但是，优选的接头含有介于 PEG 骨架和末端活化基团之间的亚甲基，例如在 mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸和 mPEG-丁酸中那样。代表性的活化的 PEG 衍生物和将这些试剂与药物如胰岛素结合的方法在本领域内是广为人知的，进一步的描述可以参见 Zalipsky, S. 等在 “Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications (聚乙二醇化学：生物技术与生物医学应用)” 中的 “Use of Functionalized Poly (Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides (使用功能化的聚乙二醇进行多肽修饰)”，J. M. Harris 编，Plenus 出版社，New York (1992)，以及 Advanced Drug Reviews, 16:157-182 (1995)。

在本发明的一个特定的实施方案中，结合物的 PEG 部分缺少对显著修饰聚合物或聚合物-胰岛素结合物的水溶性性质有效的一个或多个亲脂基团。也就是说，本发明的结合物的聚合物或非胰岛素部分可以含有一组原子，与亲水原子相比它们被认为是更亲脂的（例如具有从大约 2 个到 8-12 个碳原子的碳链），但是，如果这样的—个或多个基团的存在对显著改变聚合物或结合物的亲水性质无效，那么这样的部分可以包含在本发明的结合物中。也就是说，本发明的胰岛素结合物本身的特征是亲水的，而不是亲脂的或两亲的。一般来说，一个胰岛素结合物的聚合物部分在结合到胰岛素之前，不论是否含有亲脂基团，总具有高的亲水/亲脂差额（HLB）数。HLB 数是基于分子中每种类型基团（亲水的或亲脂的）的重量百分数，其值的范围一般在大约 1-40。用于本发明结合物的聚合物，总得来说其特征为亲水的，不管是否存在一个或多个亲脂取代基。在本发明的一个实施方案中，聚合物-胰岛素结合物的聚合物部分，其特征为 HLB 数大于 25，更优选情况下大于

30, 或更优选情况下甚至大于 35。在本发明的某些实施方案中, 亲脂部分可以存在, 但在优选情况下此部分不位于 PEG 链的一个末端。

用于本发明的结合物中的分支的 PEG 包括在国际专利公开 WO 96/21469 中描述的那些, 以其全文内容在此专门引为参考。一般来说, 分支的 PEG 可以用通式 $R(\text{PEG-OH})_n$ 来表示, 其中 R 代表中央的“核心”分子, n 代表臂的数目。分支的 PEG 具有一个中央的核心, 从其上伸出两个或多个 PEG 臂。在分支构型中, 分支的聚合物核心具有一个单一的反应活性部位以与胰岛素结合。用于本发明的分支的 PEG 一般含有少于 4 个 PEG 臂, 在更优选情况下含有少于 3 个 PEG 臂。分支的 PEG 提供了一些优点: 具有单一的反应活性部位, 与它们的线性 PEG 对应物相比与更大的更浓密的聚合物云结合。一种特殊类型的分支 PEG 可以用 $(\text{MeO-PEG-})_p\text{R-X}$ 表示, 其中 p 等于 2 或 3, R 是其上连接有 2 或 3 个 PEG 臂的中央核心结构如赖氨酸或甘油, 以及 X 代表任何适当的被活化的或能够被活化的以连接胰岛素的官能团。一个特别优选的分支 PEG 是 mPEG2-NHS(Shearwater Corporation, Alabama), 它具有 mPEG-赖氨酸-琥珀酰亚胺的结构。

在另一个分支结构中, “悬垂 PEG”的反应基可以将蛋白沿着 PEG 骨架定位结合, 而不是象在前面的例子中那样结合在 PEG 链的末端。从 PEG 骨架延伸出来用于结合胰岛素的反应基可以是相同的, 也可以是不同的。悬垂 PEG 结构可能是有用的, 但一般不倾向使用, 特别是对于吸入组合物。

此外, PEG-胰岛素结合物的 PEG 部分可以含有一个分叉的结构, 在聚合物链的一端带有一个分支部分, 还有两个连接到分支部分上的游离的反应基(或任意 2 的倍数)用于结合胰岛素。分叉的 PEG 的例子在国际专利公开 No. WO 99/45964 中有描述, 其内容在此专门引为参考。分叉的聚乙二醇还可任选在聚合物链的相反末端包含一个烷基或“R”基团。更具体来说, 本发明的分叉的 PEG-胰岛素结合物的通式

为： $R-PEG-L(Y-胰岛素)_n$ ，其中 R 是烷基， L 是一个水解稳定的分支点，以及 Y 是一个连接基团，其为分叉的聚合物与胰岛素之间提供了化学连接， n 是 2 的倍数。 L 可以代表一个单个的“核心”基团，例如“-CH-”，也可以含有更长的原子链。 L 基团的例子包括赖氨酸、甘油、季戊四醇或山梨醇。一般来说，分支部分中特定的分支原子是碳。

在本发明的一个特定的实施方案中，分叉的 PEG 与胰岛素分子之间的连接 (Y) 是水解稳定的。在一个优选实施方案中， n 是 2。在与胰岛素上的反应活性部位结合以前，适当的 Y 部分包括但不限于活性酯、活性碳酸、醛、异氰酸、异硫氰酸、环氧化物、醇、顺丁烯二酰亚胺、乙烯砜 (vinylsulfone)、酰肼、二硫吡啶和碘乙酰胺。适当的活化基团的选择依赖于结合在胰岛素分子上的目的位点，可以被本领域专业技术人员容易地确定。在产生的 PEG-胰岛素结合物中相应的 Y 基团，来自于活化的分叉聚合物与胰岛素上的适当反应活性部位的反应。对于本领域专业技术人员来说，这样的最终连接的特定身份是明显的。例如，如果反应的分叉 PEG 含有活化的酯，如琥珀酰亚胺或顺丁烯二酰亚胺酯，通过胰岛素上的一个氨基位点的连接将产生相应的酰胺键。这些特别的分叉聚合物是特别有吸引力的，因为它们提供了胰岛素与 PEG 的摩尔比为 2:1 或更高的结合物。这样的结合物不可能阻断胰岛素受体位点，同时仍然提供了设计上的灵活性，以保护胰岛素免受例如胰岛素降解酶的酶促降解。

在一个相关的实施方案中，本发明的分叉的 PEG-胰岛素结合物由通式 $R-[PEG-L(Y-胰岛素)_2]_n$ 表示。在这种情况下， R 代表其上至少结合了一个 PEG-双-胰岛素结合物的中央核心结构。具体而言，根据本发明这一方面，优选那些分叉聚合物，其中 n 选自 1、2、3、4、5 和 6。核心 R 结构的例子也可以从赖氨酸、甘油、季戊四醇或山梨醇衍生而来。

在另一个实施方案中，在任何本文提供的代表性的结构中，胰岛

素与聚合物分支点之间的化学键可以是可降解的（即水解不稳定的）。此外，在聚合物骨架中可以含有一个或多个可降解的键，以便在体内产生具有比开始给药的结合物更短的 PEG 链的 PEG-胰岛素结合物。聚合物结合物的这种可选择的特点，可以对结合物给药后其最终的预期药物学性质提供附加的控制。例如，可以给药一种大的和相对惰性的结合物（即结合物上连接有一个或多个高分子量的 PEG 链，例如一个或多个分子量大于大约 10,000 的 PEG 链，其中结合物基本不具有生物活性），然后它或是在肺中或是在血流中被水解，产生了一种含有一部分最初存在的 PEG 链的生物活性的结合物。采用这种方式，可以在一定程度上更为有效地适合 PEG-胰岛素结合物的性质。例如，起始的聚合物结合物，当最初通过最好是但不必需是吸入给药时，它的吸收可能是慢的。当水解可降解的键在体内裂解后，游离的胰岛素（依赖于可降解的键的位置）或其上带有一个小的聚乙烯标记的胰岛素就被释放，它们更容易通过肺部吸收和/或在血液中循环。

本发明的这个实施方案的一个特征是，水解前的完整的聚合物结合物，在给药后降解很慢，以便可裂解的键的水解能够有效地控制活性胰岛素慢速地释放到血流中，这与胰岛素在其释放到全身性循环中之前先酶促降解相反。

适合的在生理条件下可裂解的键包括但不限于酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫酸酯、磷酸酯、酰氧基烷基酯、缩醛和缩酮。这样的结合物应该具有生理条件下可裂解的键，其在储存和给药时是稳定的。例如，PEG-可裂解的键-胰岛素结合物，在产生最后的药物成分之时，如果使用了适当的给药媒介物在溶解在其中之时，以及不管途径如何在给药之时，都应该维持它的完整性。

如前面的一般性描述，更具体地说，用于本发明的具有可生物降解的键的 PEG-胰岛素结合物由下列结构表示：PEG1-W-PEG2-胰岛素（其中 PEG1 和 PEG2 可以是相同的也可以是不同的）或 PEG-W-胰岛

素，其中 W 代表一个弱的可生物降解的键。这些结合物含有可以在体内除去的（即可裂解的）PEG 臂或 PEG 臂的部分。这些特殊修饰的胰岛素在完整时一般基本上无生物活性，这或是由于分子完整的 PEG 部分的大小或是由于 PEG 链对胰岛素分子上的活性位点的空间位阻。但是，这样的结合物在生理条件下被裂解，释放出胰岛素或能够通过例如肺部吸收进入全身循环的具有生物活性的 PEG-胰岛素。在第一种示例结构中，PEG1 部分可以具有本文讨论的多种不同结构中的任何一种，一般分子量为至少大约 10,000，以便结合物在给药后不被快速吸收。分子的 PEG2 部分优选分子量小于大约 5000 道尔顿，在更优选情况下小于 2000 道尔顿，以及在更优选情况下甚至小于 1000 道尔顿。引用第二个示例结构 PEG-W-胰岛素，其 PEG 部分的分子量一般至少大约 10,000 道尔顿或更高。

在本发明的另一个特定实施方案中，PEG-胰岛素结合物具有一种哑铃状的结构，其中两个胰岛素部分被一个中央的 PEG 相互连接起来。具体而言，这样的结合物可以用“胰岛素-Y-PEG-Z-胰岛素”结构来表示，其中 Y 和 Z 是水解稳定的连接基团，用于将胰岛素与 PEG 部分连接起来。在一个特定的实施方案中，Z 在结合之前是一个活化的砒，适合于与胰岛素上的巯基基团（例如半胱氨酸）反应。此外，Y 和 Z 可以是任何适合于与胰岛素共价结合的基团。其它的例子参见美国专利 No. 5,900,461，其内容在此专门引为参考。

其它代表性的具有线性或分支结构的用于制备本发明结合物的单或双官能的 PEG 可以从 Shearwater Corporation (Alabama) 购买。图例的结构在 Shearwater 的 2001 年目录中有描述，标题为“用于生物医学应用的聚乙二醇及衍生物”，其内容在此专门引为参考。

B、制备

将 PEG 连接到胰岛素上的反应条件依赖于所用的特定 PEG 衍生物、结合到胰岛素上的位点和反应基的具体类型（即赖氨酸与半胱氨酸

酸)、所需的 PEG 化程度等而变化, 本领域技术人员可以容易地确定。

在后面更详细的例子中, 本发明的结合物的合成可以是定点的(实施例 1、2 和 4), 也可以是随机的(实施例 3)。适合与胰岛素氨基基团(例如 GlyA1、PheB1、Lys29B)反应的 PEG 活化基团是 tresylate、醛、环氧化物、羰基咪唑、活性碳酸酯(例如琥珀酰亚胺碳酸酯)、缩醛和活性酯例如 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 NHS-衍生的 PEG。其中反应性最强的是 PEG 羧甲基-NHS、正亮氨酸-NHS 和琥珀酰亚胺基碳酸酯。其它用于结合胰岛素的 PEG 试剂包括 PEG-琥珀酰亚胺基琥珀酸和丙酸。适用于本发明的 PEG 活性酯, 例如具有单个丙酸或丁酸部分的 PEG 活性酯, 在美国专利 No. 5,672,662 中有描述, 在此以其全部内容引为参考。用于制备本发明的结合物的特定的活性酯包括 mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸和 mPEG-琥珀酰亚胺基丁酸(实施例 1-4)。

对于一个特定结合物的最适实验条件, 一般来说可以通过常规的实验, 由本领域技术人员容易地确定。

为了结合到胰岛素的巯基基团上, 适合于活化 PEG-聚合物的反应基包括乙烯砜、碘乙酰胺、顺丁烯二酰亚胺和二巯基-邻吡啶。特别优选的试剂包括 PEG 乙烯砜和 PEG-顺丁烯二酰亚胺。其它用于本发明的代表性乙烯砜在美国专利 No. 5,739,208 中有描述, 其内容在此专门引为参考。

在某些情况下, 本发明的组合物选择性含有 PEG 化的胰岛素, 即产生的结合物在位置和 PEG 化程度方面基本上是均质的。也就是说, 氨基基团的位点选择性或定点 PEG 化可以产生一个胰岛素结合物组合物, 其中主要在预期靶位点, 例如 PheB1 上结合了一个 PEG 部分。依赖于预期的 PEG 化位点, 可能需要一种保护/去保护合成策略以防止胰岛素分子内非靶反应活性部位的 PEG 化, 例如通过使用一个保护基团例如 t-BOC(叔丁氧基羰基)或二-BOC(二丁氧基羰基)。其它适合的

氨基保护基团包括苄氧羰基 (CBZ)、三苯甲基衍生物例如三苯甲基 (Tr)、二甲氧基三苯甲基 (DMTr) 等。其它的保护基团, 例如环二酰基基团或硝基苯基亚磺酰 (Nps) 也证实可用于保护氨基官能团。实施例 1 和 2 中提供了定点合成一种 5K-PEG-胰岛素组合物的例子。

这种用于提供本发明的胰岛素结合物的定点结合化学可以产生在胰岛素分子的特定反应活性部位上高度取代的组合物。然后, 如果需要, 这些组合物可以被进一步纯化以提供基本上是纯的单或双官能的 PEG-胰岛素的组合物。

基本上纯的 PEG-胰岛素组合物是指根据下列任何一种分析方法检测到其中含有至少大约 90%纯度, 在优选情况下至少大约 95%纯度的 PEG-胰岛素结合物。就这点而言, 纯度是指 PEG-胰岛素结合物的含量。也就是说, 至少大约 90%纯度的 PEG-胰岛素结合物含有至少大约 90%重量的 PEG-胰岛素结合物物种, 而其余近 10%代表不是 PEG-胰岛素结合物的杂质。本发明的 PEG-胰岛素结合物一般使用一种或多种纯化技术进行纯化, 例如离子交换层析、孔径排阻层析、亲和层析、疏水相互作用层析和反相色谱。得到的 PEG-胰岛素的总体均一性 (存在的胰岛素-PEG 形式的数量) 可以通过使用一种或多种下列方法进行评估: 层析、电泳、质谱以及特别是 MALDI-MS 和核磁共振光谱 (NMR)。一种特别有用的识别胰岛素修饰位点的方法是反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 肽作图, 偶联有一个使用内切蛋白酶 Glu-C 的人胰岛素 USP 身份检验 (实施例 6)。

C、PEG-胰岛素结合物的特性

按照本发明的一个方面, 提供了适合于肺部给药的 PEG-胰岛素结合物组合物。通过实施例 7-11 的体内数据可以看出, 本发明的 PEG-胰岛素结合物, 当给药到肺部时, 具有比天然胰岛素更高的药代动力学和药效性质。已经表明, 可以用分子量高达 5,000K 到 10,000K 或更高的 PEG 来修饰胰岛素, 同时仍然可以维持活性。一个代表性的 PEG-

胰岛素结合物 5K-PEG-胰岛素的活性在实施例 7 中描述。此外，从本文提供的实施例可以看出，具有平均分子量范围从 750 道尔顿到 2000 道尔顿、到 5000 道尔顿的 PEG 链的示例性 PEG-胰岛素结合物，当通过静脉和肺部给药时，都具有生物活性，并且当肺部给药时基本上不滞留在肺中，正如由可检测到的血清胰岛素水平所表明的那样，并且能够有效地产生对葡萄糖水平有大幅度的抑制（实施例 7 到 11），在某些情况下，这种抑制的持续时间明显长于使用天然胰岛素所观察到的持续时间。此外，在此提供的 PEG-胰岛素结合物，当在肺部给药时，生效很快（在给药后 1 小时内）。表 13 提供了本发明的示例 PEG-胰岛素组合物的药代动力学和药效参数的概要。

一般来说，本发明的 PEG-胰岛素结合物将具有一种或多种下列的特性。本发明的 PEG-胰岛素结合物至少维持了可测量程度的比活性。也就是说，本发明的 PEG-胰岛素结合物将具有天然胰岛素从大约 2% 到大约 100% 或更多的比活性。在本发明的一个优选实施方案中，PEG-胰岛素结合物将具有未修饰的天然胰岛素至少 10% 或更多的生物学活性，并且基本上非免疫原性。在优选情况下，本发明结合物的生物活性为天然胰岛素生物活性的大约 5% 到至少大约 20% 或更高。本发明结合物的生物活性的表征可以间接地例如通过监测血液中的葡萄糖和胰岛素水平来产生相应的药代动力学和/或药效数据，或通过 RIA（放射免疫测定法）来进行。

至于在将 PEG-胰岛素结合物给药到例如肺部后血清中的胰岛素浓度，在此描述的结合物一般出峰（即达到最大浓度（C_{max}）或浓度曲线的最高点）在给药后大约 2 到 8 小时，更普遍的是在大约 3 到 6 小时左右。此外，本发明化学修饰的胰岛素，特别是在此提供的长效胰岛素制剂，与天然胰岛素相比，在提供可测量到的葡萄糖降低效应和在较长的时期内维持胰岛素浓度两个方面，都是有效的。更具体来说，通过肺部给药时，PEG-胰岛素结合物在给药后将表现出升高的胰岛素水平（高于基础或基线水平）至少大约 6 小时，在优选情况下至

少 8 小时。在优选情况下，通过肺部给药时，PEG-胰岛素结合物在给药后将产生升高的血液胰岛素水平超过至少 9 小时、10 小时、12 小时或至少 14 小时的延长期，其中在给药后这样的延长期内在血流中可以检测到高于基线水平的胰岛素结合物。在实施例中提供了能够表现这些特征的代表性组合物。

如前所述，本发明的胰岛素结合物对于降低血糖水平是有效的。现在看看本发明的组合物抑制血糖的能力，通过例如肺部给药时，本发明的 PEG-胰岛素结合物在给药后能够将血糖水平有效抑制在基础水平以下至少 6 小时。在更特定的情况下，本发明的 PEG-胰岛素组合物在给药后能够将血糖水平有效抑制在基础水平以下至少 8 小时，优选情况下至少 10 小时，或更优选情况下至少 12 小时或更长时间。

此外，本发明的 PEG-胰岛素制剂表现出高于天然胰岛素的绝对的肺部生物有效度。具体而言，在此提供的 PEG-胰岛素制剂具有天然胰岛素至少约 1.2 倍的绝对的肺部生物有效度，在优选情况下至少大约 1.5 倍于天然胰岛素，更优选情况下至少比天然胰岛素高出约 2 倍，或者在更优选情况下至少高出约 2.5 倍或 3 倍。（表 13 提供了说明性的结果）。

III、制剂

本发明的聚合物-胰岛素结合物组合物可以单独给药，也可以以含有其它赋形剂、溶剂、稳定剂等的治疗/药物组合物的形式给药，这依赖于给药的特殊方式和剂量形式。本结合物可以肠胃外或非肠胃外给药。具体的给药途径包括口服、直肠、含服、局部、鼻、眼、皮下、肌内、静脉内、经皮和肺部。更优选的是肠胃外和肺部途径。

对于哺乳动物以及优选是人的给药来说，药物制剂一般含有至少一种本发明的 PEG-胰岛素结合物及一种或多种可药用的载体，特别是对肺部组合物而言，这将在后面更详细描述。例如用于肠胃外给药的

本发明制剂，最普通的是液体溶液或悬浮液，而用于肺部给药的可吸入制剂一般为液体或粉末，其中优选情况下一般为粉剂。其它较少采用的本发明的化学修饰的胰岛素组合物包括糖浆、乳膏、软膏、片剂等。

胰岛素的制剂和相应的剂量将随着使用的胰岛素的生物活性浓度而变化。可注射的胰岛素以 USP 胰岛素单位和 USP 胰岛素人类单位(U)来计量；一个单位的胰岛素等于在禁食的兔子中将血糖水平减少到 45mg/dl (2.5mM)所需的胰岛素量。典型的注射用胰岛素制剂的浓度范围为 30 到 100 单位/mL，大约为每毫升 3.6mg 胰岛素。在病人中要达到预期生理效应所需的胰岛素量不仅随着病人及其疾病（例如 I 型与 II 型糖尿病）的具体情形而变化，而且随着所用胰岛素的强度和特殊类型而变化。例如，普通胰岛素（快效型）的剂量范围为每天每公斤体重使用从大约 2 到 0.3U 胰岛素。从一方面说，本发明的组合物在经历治疗的病人中，能够有效地使禁食血糖水平达到大约 90 到 140mg/dl 之间，饭后的值低于大约 250mg/dl。对于本领域技术人员来说，结合对特定的给药途径所用的确切胰岛素结合物的药代动力学和药效学，可以确定精确的用药剂量，并且可以根据周期性葡萄糖监测的结果容易地进行调整。

可吸入胰岛素结合物制剂的单剂量（在每吸入一次的基础上）的范围一般是从大约 0.5mg 到 15mg 胰岛素结合物，其中一般在大约 1 到 10 次呼吸内达到所需的总剂量，优选情况下在大约 1 到 4 次呼吸内。平均来说，每次用药期通过吸入给药的 PEG 胰岛素总剂量为大约 10U 到大约 400U，每个单剂量或单位剂量形式（对应于单次吸入）含有大约 5U 到 400U。

A、化学修饰胰岛素的吸入制剂

如上所述，本发明胰岛素结合物的一种优选给药途径是吸入到肺部。现在将更充分地描述具体的制剂成分、性质和给药装置。

制剂中胰岛素结合物的量，是传送每单位剂量的治疗有效量的胰岛素以达到至少一种天然胰岛素的治疗效果，即将血糖水平控制在接近正常血糖量的能力所必需的量。在实践中，这将依赖于具体的胰岛素结合物、它的活性、将要治疗的糖尿病症状的严重程度、病人的种群、制剂的稳定性等而广泛变化。组合物一般含有从大约 1%重量到大约 99%重量的 PEG-胰岛素，典型的是含有从大约 2%到大约 95%重量的结合物，更典型的是含有从大约 5%到 85%重量的结合物，同时也依赖于组合物中包含的赋形剂/添加剂的相对量。更具体来说，组合物一般含有至少下面一种百分比的 PEG-胰岛素：10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%重量或更高。在优选情况下，粉末组合物将含有至少大约 60%，例如从大约 60%到 100%重量的 PEG-胰岛素。应该明白，在此描述的制剂中可以掺入一种以上的胰岛素，术语“药剂”或“胰岛素”的使用决非排除使用两种或多种胰岛素或胰岛素与其它活性剂的组合。（例如，一种说明性的 PEG-胰岛素制剂还可以含有天然胰岛素）。

A.1、赋形剂

在大多数情况下，本发明的组合物将包括一种或多种赋形剂。优选的是碳水化合物赋形剂，可以单独使用也可以与其它赋形剂或添加剂结合使用。用于本发明组合物中的代表性碳水化合物包括糖、衍生糖例如糖醇、醛糖糖酸、酯化的糖和糖聚合物。适用于本发明的碳水化合物赋形剂的例子包括例如，单糖如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等；以及糖醇如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇（葡萄糖醇）、吡喃糖基山梨糖醇、肌醇等。优选的是非还原糖，与胰岛素结合物混合时能形成基本上是无定形或玻璃相的糖，以及具有相对高的 T_{gs} 的糖（例如 T_{gs} 高于 40℃，在优选情况下高于 50℃，更优选情况下高于 60℃，以及更优选情况下高于 70℃，最优选情况下 T_{gs} 为 80℃或更

高)。

其它的赋形剂包括氨基酸、肽和特殊的含有 2-9 个氨基酸的寡聚体, 优选为 2-5 聚体, 以及多肽, 它们都可以是同种或异种的。代表性的氨基酸包括甘氨酸(gly)、丙氨酸(ala)、缬氨酸(val)、亮氨酸(leu)、异亮氨酸(ile)、甲硫氨酸(met)、脯氨酸(pro)、苯丙氨酸(phe)、色氨酸(trp)、丝氨酸(ser)、苏氨酸(thr)、半胱氨酸(cys)、酪氨酸(tyr)、天冬氨酸(asp)、谷氨酸(glu)、赖氨酸(lys)、精氨酸(arg)、组氨酸(his)、正亮氨酸(nor), 以及它们的修饰形式。一个特别优选的氨基酸是亮氨酸。

其它在可吸入组合物中优选用作赋形剂的是含有两个或多个亮氨酸残基的二肽和三肽, 这在 Inhale Therapeutic System (吸入治疗系统公司) 的国际专利申请 PCT/US00/09785 中进行了描述, 在此以其全文引为参考。

具有玻璃转相温度高于大约 40℃、更优选情况下高于 50℃、更优选情况下甚至高于 60℃以及最优选情况下高于 70℃的二肽和三肽也是优选的。

其它用于本发明的能够增强稳定性和气雾剂性能的肽是含有上述氨基酸的任何组合的 4 聚体和 5 聚体, 尽管由于它们在水中的溶解度有限而较少使用。在更优选情况下, 该 4 聚体或 5 聚体含有两个或多个亮氨酸残基。亮氨酸残基可以占据肽中的任何位置, 同时其它的(即非亮氨酸的)氨基酸位置被上述任何氨基酸占据, 只要产生的 4 聚体或 5 聚体在水中的溶解度至少大约 1mg/ml。在优选情况下, 4 聚体或 5 聚体中的非亮氨酸氨基酸是亲水氨基酸, 例如赖氨酸, 从而增加了肽在水中的溶解度。

多聚氨基酸, 特别是含有任何在此描述的氨基酸的那些多聚氨基

酸，也适合于用作稳定剂。优选的多聚氨基酸是例如多聚赖氨酸、多聚谷氨酸和多聚（赖氨酸，丙氨酸）。

其它可用于本组合物和方法的赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白、非生物聚合物和生物聚合物，它们可以以单独或组合的形式出现。适合的赋形剂在 Inhale Therapeutic Systems 的国际专利公开 No. WO 96/32096 和 No. WO 98/16205 中提供。优选的赋形剂具有玻璃转相温度（T_g）高于大约 35℃，优选情况下高于大约 40℃，更优选情况下高于大约 45℃，最优选情况下高于大约 55℃。

蛋白赋形剂的例子包括白蛋白例如人血清白蛋白（HAS）、重组人白蛋白（rHA）、明胶、酪蛋白、血红蛋白等。组合物也可以含有缓冲液或 pH 调节剂，一般但不必需是有机酸或碱的盐。代表性的缓冲液包括有机酸柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐。其它适合的缓冲液包括 Tris、氨基丁三醇盐酸（tromethamine hydrochloride）、硼酸、甘油磷酸和磷酸。氨基酸如甘氨酸也适用。

本发明的组合物还可以包含其它的聚合物赋形剂/添加剂，例如聚乙烯基吡咯烷酮、衍生的纤维素如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素，Ficoll（一种多聚体糖）、羟乙基淀粉（HES）、dextrate（例如环糊精如 2-羟基丙基-β-环糊精和磺基丁基醚-β-环糊精），聚乙二醇和果胶。

组合物还可以包括增味剂、掩味剂、无机盐（如氯化钠）、抗菌剂（如苯扎氯铵（benzalkonium chloride））、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（如聚山梨酸酯如吐温 20 和吐温 80，以及得自 BASF 的非离子型表面活性剂普卢兰尼克（Pluronic）如 F68 和 F88）、山梨聚糖醇酯、脂类（例如，磷脂如卵磷脂和其它的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺，尽管在优选情况下不以脂质体的形式）、脂肪酸和脂肪酯、甾

体（如胆固醇）和螯合剂（如 EDTA、锌和其它这样的适合的阳离子）。后面更详细地描述了使用某些双取代的磷脂酰胆碱来生产有孔的微型结构（即中空有孔的微球）。其它适用于本发明的组合物的药物赋形剂和/或添加剂在 Remington 的 “The Science & Practice of Pharmacy（药物科学与实践）” 第 19 版，Williams & Williams 出版社，1995 年和 “Physician's Desk Reference（医生桌面参考）” 第 52 版，Medical Economics 出版社，Montvale, NJ（1998）中列出。

在一个实施方案中，本发明的组合物可以不含增透剂，它可能引起刺激，并且在高浓度时是有毒的，而这种高浓度通常是提供大幅度的吸收增强所必需的。可以不包含在本发明组合物中的具体的增强剂是去污剂类的增强剂如脱氧胆酸、月桂醇聚氧乙烯醚-9（Laureth-9）、DDPC、甘氨酸胆酸盐和梭链孢酸（fusidate）。但是，某些增强剂，例如那些保护胰岛素免受酶降解的增强剂，如蛋白酶和肽酶抑制剂如 α -1 抗蛋白酶剂、卡托普利（captopril）、thiorphan 及 HIV 蛋白酶抑制剂，在本发明的某些实施方案中，可以包含在本发明的 PEG-胰岛素制剂中。在另一个实施方案中，本发明的 PEG-胰岛素结合物可以不含脂质体、脂类基质和封装剂。

通常，本发明的药物组合物含有从大约 1% 到大约 99% 重量的赋形剂，在优选情况下含有从大约 5% 到 98% 重量的赋形剂，在更优选情况下含有从大约 15% 到 95% 重量的赋形剂。在更优选情况下，喷雾干燥的组合物含有从 0 到 50% 重量的赋形剂，更优选情况下，含有从 0 到 40% 重量的赋形剂。一般来说，希望在最终的药物组合物中含有高的胰岛素浓度。通常情况下，赋形剂/添加剂的最适量由实验确定，即通过制备含有不同赋形剂量的组合物（范围从低到高），检测 PEG-胰岛素的化学和物理稳定性、药物组合物的 MMAD 和可分散性，然后进一步探索获得最适气雾剂性能、同时对胰岛素的稳定性无明显副作用的剂量范围。

A.2、制备干粉

本发明的含有 PEG-胰岛素结合物的干粉制剂可以通过任何一种干燥技术制备，优选采用喷雾干燥的方法。制剂的喷雾干燥在例如“Spray Drying Handbook（喷雾干燥手册）”第5版，K. Masters, John Wiley & Sons 出版社，NY, NY(1991)以及 Platz, R.等的国际专利公开 No. WO 97/41833(1997)和 No. WO 96/32149(1996)中有一般性的描述，其内容在此引为参考。

PEG-胰岛素结合物的溶液在常规喷雾干燥器，例如那些从商业供应商如 Niro A/S(Denmark)、Buchi(Switzerland)等处获得的干燥器中进行喷雾干燥，得到一种可分散的干粉。PEG-胰岛素溶液喷雾干燥的最适条件随着制剂成分而变化，一般通过实验确定。用于喷雾干燥材料的气体一般是空气，尽管惰性气体如氮气或氩气也可适用。此外，用于干燥所喷雾材料的气体的入口和出口的温度以不引起被喷雾材料中的 PEG-胰岛素的降解为宜。这样的温度一般由实验确定，尽管在通常情况下，入口的温度范围从大约 50℃到大约 200℃，而出口的温度范围从大约 30℃到大约 150℃。优选的参数包括雾化压力从大约 20 到 150psi，在优选情况下从大约 30-40 到 100psi。一般所用的原子化压力为下列之一（单位为 psi）：20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 或更高。

具有本文描述的特征的可呼吸的 PEG-胰岛素组合物也可以按照 WO 99/16419 中描述的方法生产，对某些制剂成分进行干燥，从而形成有孔的微型结构粉末，该专利的全部内容在此引为参考。有孔的微型结构粉末一般含有喷干的中空的微球，具有相对薄的孔壁，形成大的内部空间。有孔的微型结构粉末可以分散在一种选定的悬浮介质中（例如非水的和/或用氟化的发泡剂）以在干燥前提供稳定的分散作用。使用相对低密度的有孔的微型结构或微型颗粒显著地减少了微粒间的吸引力，从而降低了剪切力，增加了产生的粉末的流动性的分散性，以及减少了由絮凝作用、沉淀作用或其稳定的分散体的分层所引起的降

解。

此外，肺部给药的 PEG-胰岛素组合物可以含有空气动力学上轻的颗粒，如美国专利 No. 6,136,295 中所描述的那样。

本发明的粉末制剂还可以通过冷冻干燥、真空干燥、喷雾冻干、超临界液体加工（如在 Hanna 等的美国专利 No. 6,063,138 中所描述的那样）、空气干燥或其它形式的蒸发干燥方法来制备。

在另一种方法中，干粉的制备方法可以是将粉末成分凝聚、将材料筛分以获得凝聚物、球化以提供更呈球状的凝聚物以及筛分以获得大小均一的产品，这种方法在例如 Ahlneck, C.等的国际 PCT 公开 No. WO 95/09616(1995)中有描述，在此引为参考。

干粉也可以通过对干粉形式的制剂成分进行混合、研磨、筛分或喷射研磨来制备。

干粉组合物一旦形成，在生产、加工和储存过程中最好保持在干燥条件下（即相对低的湿度）。不论使用何种干燥工艺，最好将产生可吸入的高度可分散的颗粒，所述颗粒含有在此描述的化学修饰的胰岛素。

A.3、干粉制剂的特征

本发明的粉末还具有几个特点，其中最显著的是下面的一个或多个特征：（1）始终如一的高度可分散性，即使在储存后也可维持；（2）小的气动粒度（MMADs）；（3）细小颗粒剂量值高，即粉末中粒度小于 3.3 微米 MMAD 的百分含量较高；这些特征都有助于提高粉末穿过下呼吸道的组织（即肺泡）传送到全身循环中的能力。本发明的可吸入粉末的这些物理性质，对于将这些粉末雾化传送到肺部深处的效率最大化是非常重要的，将在下面更充分地描述。

本发明的干粉由能够有效透入肺中的可雾化颗粒组成。本发明颗粒的质量中值粒径(MMD)小于大约 20-30 μm , 或小于 20 μm , 或小于大约 10 μm , 优选情况下小于大约 7.5 μm , 以及更优选情况下小于大约 4 μm , 甚至小于大约 3.5 μm , 通常粒径是在 0.1 μm 到 5 μm 的范围内。优选的粉末由 MMD 从大约 0.2 到 4.0 μm 的微粒组成。在某些情况下, 粉末也含有不可呼吸的载体微粒例如乳糖, 这些不可呼吸的微粒大小一般大于大约 40 μm 。

本发明的粉末还具有这样的特征, 其气雾剂粒度分布的质量中值气动粒径(MMAD)小于大约 10 μm , 优选情况下 MMAD 小于大约 5 μm , 更优选情况下小于 4.0 μm , 在更优选情况下甚至小于 3.5 μm , 以及最优选情况下小于 3 μm 。粉末的质量中值气动粒径范围在特征上从大约 0.1 到 10 μm , 优选情况下 MMAD 从大约 0.2 到 5 μm , 更优选情况下 MMAD 从大约 1.0 到 4.0 μm , 在更优选情况下甚至从 1.5 到 3.0 μm 。小的气动粒径一般可以通过将最适的喷雾干燥条件与赋形剂的选择和浓度结合起来而获得。

本发明的 PEG-胰岛素粉末其特征还在于它们的密度。用于吸入的粉状组合物一般来说堆积密度从大约 0.1 到 10g/立方厘米, 优选情况下从大约 0.1 到 2 g/立方厘米, 更优选情况下从大约 0.15 到 1.5 g/立方厘米。

粉末的水分含量一般低于大约 20%重量, 通常低于大约 10%重量, 以及在优选情况下低于大约 5%重量。本发明优选的粉末的水分含量低于大约下列重量百分比中的一个或多个: 15%、10%、7%、5%或 3%。这样的低水分含量的固体在包装和储存时倾向于表现出较高的稳定性。

此外, 在此描述的喷雾干燥方法和稳定剂能够有效地提供高度可

分散的 PEG-胰岛素制剂。对于粉剂来说，这些粉末的发射剂量（ED）一般大于 30%，通常大于 40%。在更优选情况下，本发明粉末的 ED 大于 50%，并且经常大于 60%。

在此描述的组合物还具有良好的稳定性，包括化学稳定性和物理稳定性两方面，即经过长时间后的气雾剂性能。一般而言，在化学稳定性方面，经过喷雾干燥后，制剂中包含的 PEG-胰岛素结合物的降解一般不超过大约 15%。也就是说，粉末将含有至少大约 85%的完整的 PEG-胰岛素结合物，在优选情况下至少大约 90%或 95%的完整的结合物，在更优选情况下甚至含有至少大约 97%或更多的完整的 PEG-胰岛素。在优选情况下，喷雾干燥过程产生的粉末含有少于大约 10%的总蛋白聚合物，也就是说，大于 90%重量的化学修饰的胰岛素是单体形式。

在气雾剂性能方面，本发明的组合物其特征为，当在环境条件下储存 3 个月后，发射剂量的降低一般不超过大约 20%，在优选情况下不超过大约 15%，以及更优选情况下不超过大约 10%。

A.4、组合物的给药

在此描述的 PEG-胰岛素制剂的传送可以使用任何合适的干粉吸入器（DPI），即利用病人的吸气作为运载工具将干粉药物输送到肺部的吸入装置。其中优选的是吸入 Inhale Therapeutic System 的干粉吸入装置，如在 Patton, J.S.等的美国专利 No.5,458,135, 1995 年 10 月 17 日、Smith, A.E.等的美国专利 No.5,740,794, 1998 年 4 月 21 日和 Smith, A.E.等的美国专利 No.5,785,049, 1998 年 7 月 28 日中所描述，在此引为参考。当通过这种类型的装置给药时，粉状药剂被放置在一个接受器中，该接受器具有一个可刺穿的盖或其它可进入的表面，优选情况下是硬质泡沫料衬垫的包装或盒，在接受器中可以含有单个剂量单位或多个剂量单位。在例如 Parks, D.J.等的国际专利公开 WO 97/41031, 1997 年 11 月 6 日中描述了将计量剂量的干粉药剂填入大量空腔（即单位剂

量包装)的便利的方法,在此引为参考。

其它用于干粉肺部给药的干粉分散装置包括在例如 Newell, R.E. 等的欧洲专利 No. EP 129985, 1988 年 9 月 7 日、Hodson, P.D. 等的欧洲专利 No. EP472598, 1996 年 7 月 3 日、Cocozza, S. 等的欧洲专利 No. EP467172, 1994 年 4 月 6 日和 Liloyd, L.J. 等的美国专利 No. 5,522,385, 1996 年 6 月 4 日中描述的那些,在此引为参考。其它适合于传送 PEG-胰岛素干粉的吸入装置例如 Astra-Draco 的“TURBUHALER”。这种类型的装置在 Virtanen, R. 的美国专利 No. 4,668,218, 1987 年 5 月 26 日、Wetterlin, K. 等的美国专利 No. 4,667,668, 1987 年 5 月 26 日和 Wetterlin, K. 等的美国专利 No. 4,805,811, 1989 年 2 月 21 日中被详细描述,在此全部引为参考。其它适合的装置包括干粉吸入器如 Rotahaler®(Glaxo)、Discus® (Glaxo)、Spiros™吸入器 (Dura Pharmaceuticals) 和 Spinhaler® (Fisons)。其它合适的装置使用了一个活塞来提供空气,既可用于夹常粉末药剂、将空气通过载体筛网从筛网上扬起药剂,也可在一个混合室中将空气与粉末药剂混合,然后通过装置的喷嘴将粉末导入病人,例如在 Mulhauser, P. 等的美国专利 No. 5,388,572, 1997 年 9 月 30 日中所描述,在此引为参考。

可吸入的 PEG-胰岛素组合物也可以使用一种加压的计量剂量吸入器 (MDI) 来给药,例如 Ventolin®计量剂量吸入器,它含有的药物溶解或悬浮在药物学上惰性的液体推进剂中,例如氯氟烃或氟烃,如在 Laube 等的美国专利 No. 5,320,094, 1994 年 6 月 14 日和 Rubsamen, R.M. 等的美国专利 No. 5,672,581(1994)中所描述,在此均引为参考。

此外,在此描述的 PEG-胰岛素可以溶解或悬浮在溶剂,如水或盐水中,然后通过雾化给药。传送雾化溶液的喷雾器包括 AERx™ (Aradigm)、Ultravent® (Mallinkrodt)、Pari LC Plus™或 Pari LC Star™ (Pari GmbH, Germany)、De Vilbiss Pulmo-Aide、和 Acorn II® (Marquest Medical Products)。

如前所述，在此描述的 PEG-胰岛素结合物也可以通过静脉内注射，或较少情况下通过肌肉或皮下注射而肠胃外给药。这些制剂的精确成分可以由本领域技术人员容易地确定。适合于肠胃外给药的制剂类型包括备注射的溶液、使用前与溶剂混合的干粉、备注射的悬浮液、使用前与介质混合的不溶性干组合物、给药前需要稀释的乳剂或液体浓缩物。例如，本发明 PEG-胰岛素组合物的可注射溶液可以包括溶解于水性介质如氯化钠水溶液、任氏液、葡萄糖注射液、乳酸化的任氏液等中的组合物，并可以包含一种或多种上述的可药用的相容性赋形剂或添加剂。

IV、用途

本发明的组合物，当通过任何适当的给药途径，优选为吸入或注射，以治疗有效量给药到哺乳动物受试对象时，可用于治疗糖尿病，特别是 I 型或 II 型糖尿病。

所有在此参考的文章、书籍、专利和其它出版物都以其全文引为参考。

下面的实施例举例说明了本发明的范围，但决不是打算对本发明的范围进行限制。

实施例

材料与方法

聚乙二醇试剂得自 Shearwater 公司 (Huntsville, Alabama)。

人胰岛素得自 Diosynthm Inc。

实施例 1

双-N^{αA1},N^{εB29}-t-Boc-胰岛素的合成

主要由单 PEG 化的胰岛素组成的组合物按照实施例 1 和 2 所述的位点特异性方式，使用示例性线性的 5,000 道尔顿的聚乙二醇制备。

双保护的胰岛素首先如下述方法制备。602mg 人胰岛素 (0.103mmol) 溶解于含有 166 μ L 三乙胺的 3.0mL 无水二甲亚砜 (DMSO) 中。在胰岛素溶液中加入 50 μ L 二-叔丁基-碳酸氢盐 (0.215mmol)。室温放置 60 分钟后，反应液倒入 240mL 丙酮中，然后加入 3 滴 6M 的 HCl 以起始絮凝作用。沉淀通过过滤分离，并在真空中干燥。反应产物使用制备型 HPLC 纯化，使用 Waters 25x100mm C18 柱 (平均粒度 15 μ m，孔径 100A)。乙腈和 0.1%TFA 的去离子水混合物用作洗脱液，洗脱速度 3.0mL/min。收集产物，蒸馏以除去乙腈，然后冷冻干燥。产量为 164.8mg (26.7%，通过 MALDI 测定分子量约为 6000)。

实施例 2

单 PEG-化的 mPEG-5K-SPA-PheB1-胰岛素结合物

N ^{α B1}-甲氧基聚乙二醇 5K-胰岛素 (mPEG5K-PheB1-胰岛素) 的合成

150mg (约 0.025mmol) 从实施例 1 得到的新纯化的双-N ^{α A1},N ^{ϵ B29}-t-Boc-胰岛素溶解于含有 95 μ L 三乙胺的 4mL DMSO 中。在胰岛素溶液中加入 169mg (0.032mmol) mPEG-SPA-5000 (m-PEG-琥珀酰亚胺基丙酸，mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-琥珀酰亚胺，分子量 5000)。在室温保温过夜 (29 小时) 后，得到的 mPEG-胰岛素衍生物用去离子水稀释到 100mL，对去离子水透析 4 小时，然后冷冻干燥。冷冻干燥的产品重新溶解在 4mL 无水 TFA 中，并在氮气中 0℃下维持 1.5 小时以除去 Boc 保护基团。去保护的 mPEG-胰岛素用去离子水稀释到 50mL，对 0.1% NH₄HCO₃ 和去离子水透析过夜。将产物冷冻干燥得到白色粉末。产量为 117.6mg (41.6%，通过 MALDI 测定分子量约为 11311.6)。

基于质谱数据，单结合的胰岛素的含量约为 90%，证实了这种合

成方法的位点特异性质。其它的特征数据在实施例 5 中提供。得到的产物的胰岛素含量为 51.3%。为便于引用，N^αB1-甲氧基聚乙二醇 5K-丙酰胺基-胰岛素或 mPEG5K-PheB1-胰岛素在本文中将被称为“5K PEG 胰岛素”。

实施例 3

mPEG-2K-SPA-胰岛素结合物的合成

下列方法用于制备以非位点特异性（即随机）方式 PEG 化的胰岛素，使用了分子量为大约 2,000 道尔顿的示例的线性聚乙二醇。0.1012g 胰岛素（分子量 5826 道尔顿，0.01737mmol）溶于 0.5mL 无水 DMSO，然后用 50μL 三乙胺（0.3587mmol，20 倍过量的克分子数）处理。在上述反应混合物中加入 52mg m-SPA-2000（mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸，Shearwater 公司，分子量约为 2000 道尔顿，0.02605mmol，1.5 倍过量的克分子数）。混合物在室温和氮气下搅拌大约 17 小时。然后将反应混合物溶解于 0.1%的 TFA 中，使总体积达到 5.5mL，然后通过反相 HPLC 纯化，使用 C-18 柱，乙腈/0.1%TFA 为洗脱液。反相 HPLC 显示了含有单-（结合了一个 PEG）和双-PEG 化（结合了两个 PEG）的产物的混合物，这种组合物在本文中称为“2K PEG 胰岛素”。

产量：68mg

通过 RP-HPLC 分析的胰岛素含量：50.5mg

实施例 4

mPEG-750Da-SPA-胰岛素结合物的合成

以位点特异的方式制备主要由在 B1 位点 PEG 化的胰岛素组成的组合物，使用一种具有代表性的聚乙二醇改性剂，即具有适合于共价结合到胰岛素上琥珀酰亚胺基丙酸末端的线性的 750 道尔顿的聚乙二醇。

4A、双-N^{A1},N^{B29}-t-Boc-胰岛素的合成

双保护的胰岛素制备如下。602mg 人胰岛素（0.103mmol）溶解于

含有 166 μ L 三乙胺的 3.0mL 无水二甲亚砜 (DMSO) 中。在胰岛素溶液中加入 50 μ L 二-叔丁基-碳酸氢盐(0.215mmol)。室温放置 60 分钟后, 反应液倒入 240mL 丙酮中, 然后加入 3 滴 6M 的 HCl 以起始絮凝作用。沉淀通过过滤分离, 在真空中干燥。反应产物使用制备型 HPLC 纯化, 使用 Waters 25x100mm C18 柱 (平均粒度 15 μ m, 孔径 100A)。乙腈和 0.1%TFA 的去离子水的混合物用作洗脱液, 洗脱速度 3.0mL/min。收集产物, 蒸馏以除去乙腈, 然后冷冻干燥。产量为 164.8mg (26.7%, 通过 MALDI 测定分子量约为 6000)。

4B、mPEG-750Da-SPA-PheB1-胰岛素结合物的合成

63.4mg (约 0.01056mmol) 从实施例 4A 得到的新纯化的双-N^{A1},N^{B29}-t-Boc-胰岛素溶解于含有 200 μ L 三乙胺的 0.5mL DMSO 中。在胰岛素溶液中加入 33mg(0.03137mmol, mSPA750 分子量大约为 1040 道尔顿) mPEG-SPA-750 (m-PEG-琥珀酰亚胺基丙酸, mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-琥珀酰亚胺, PEG MW 750)。室温下保温过夜 (29 小时) 后, 在反应混合物中加入 300 μ L TFA, 得到的 mPEG-胰岛素衍生物在 100mL 乙醚中沉淀, 然后真空干燥。产量为大约 28.5mg, 通过反相 HPLC 测定的胰岛素含量为 21.3mg (33.6%, 通过 MALDI 测定的分子量约为 6639.3 道尔顿)。为了简化, 该组合物在本文中称为 “750 PEG 胰岛素”。

对这种物质进行了两次不同的合成, 均利用前述的合成方法, 只有一点例外: 一个合成所用的 mPEG-SPA-750 与胰岛素的克分子比率为 7:1, 而另一个合成所用的 mPEG-SPA-750 与胰岛素的克分子比率为 3:1。从这两种制备得到的产物组合物在本文中称为 “750-1 PEG 胰岛素” (PEG 试剂与胰岛素的克分子比率为 7:1) 和 “750-2 PEG 胰岛素” (PEG 试剂与胰岛素的克分子比率为 3:1)。

实施例 5

示例性 PEG-胰岛素组合物的鉴定

使用各种分析技术对上述的 PEG 化的胰岛素结合物组合物的性质进行了进一步研究。

使用质谱法根据相对峰面积对每种组合物中存在的单、双和三-结合的胰岛素（也称为 PEG 胰岛素单体、二聚体和三聚体）的相对量进行了评估。结果见下面的表 1。

表 1、根据质谱获得的单、双和三-结合的胰岛素的相对量

PEG-胰岛素 组合物	单结合物%	双结合物%	三结合物%
5K PEG 胰岛素	91	4	未测定
750-1 PEG 胰岛素	46	39	15
750-2 PEG 胰岛素	60	32	8
2K PEG 胰岛素	51	45	未测定

对上述的 750-1、750-2 和 2K PEG-胰岛素组合物进行孔径排阻层析（SEC），在 Waters 2690 HPLC 系统上使用两个串联装配的 Shodex SEC 柱（部件号 KW-802.5）。流动相由 22%冰醋酸和 33%乙腈（v/v）的水组成。层析数据被用作另一种确定这些组合物中每种含有的单、双和三-结合的胰岛素的相对量的方法。结果见下面的表 2。对表 1 和表 2 中的数据进行比较可以看出，这两种不同的方法在组合物中存在的每种类型结合物的相对量方面提供了近乎一致的结果。

表 2、根据 HP-SEC 获得的单、双和三-结合的胰岛素的相对量

胰岛素 类型	单结合物%	双结合物%	三结合物%	其它物质%
PEG 750-1	48	47	5	0
PEG 750-2	66	26	7	2
PEG 2000	40	51	未检测	9

进行了其它的研究来确定这三种示例组合物的每种中不同位置结

合物的分布，即三个可能的结合位点 A-1 Gly、B-1 PheH 或 B-29 Lys 中的每个位置取代的程度。二硫苏糖醇（DTT, Sigma）被用来还原胰岛素样品中的二硫键，致使胰岛素 A 链和 B 链之间的共价结合被打破。

为进行还原反应，将 PEG-胰岛素样品溶解在含有 0.4M 碳酸氢铵的 8M 尿素中，使每种结合物物种中相当的胰岛素质量达到大约 0.2mg/mL。将 DTT 溶解于水中（7mg/mL）形成 DTT 水溶液。然后在 5 份的每种胰岛素溶液中加入 1 份 DTT 溶液，还原反应在 50℃进行 15 分钟。使用碘乙酰胺（Sigma）将还原的 750 PEG 胰岛素组合物烷基化。在层析和酶解前将 6 份 PEG-胰岛素溶液与 1 份 100mM 碘乙酰胺进行反应。然后用 HPLC 分析反应产物。根据在对照样品之后洗脱下来的胰岛素 A 链或 B 链的量（归因于和聚乙二醇结合）估计与胰岛素 A 链或 B 链结合的百分数。因此对于对照而言，这些后洗脱下来的峰在预期的保留时间不会出现。相对峰面积被用来对聚乙二醇与胰岛素 A 链或 B 链结合的百分数提供指示。

为了进一步研究 PEG 结合到 B-29 Lys 和 B-1 Phe 上的相对量，从上述 DTT 还原反应得到的还原和烷基化的 750-1 和 750-2 PEG 胰岛素组合物的 A 链和 B 链被进一步使用测序级的酶——内切蛋白酶 Glu-C（Sigma）进行消化。制备含有 0.125μg/μL 酶的碳酸氢铵水溶液。在加入酶液之前，每种还原反应混合物在含有 0.4M 碳酸氢铵的 8M 尿素中的胰岛素浓度为 0.05μg/μL。然后在 40 份胰岛素溶液中加入 1 份酶液。用内切蛋白酶 Glu-C 消化后产生 A1-A4、A5-A17、A18-A21、B1-B13、B14-B21 和 B22-B30 的胰岛素肽段。

酶法消化 750-1 和 750-2 PEG 胰岛素组合物的 A 链和 B 链得到的片段用 HPLC 分析以评估这些组合物每种中 PEG 结合到胰岛素上的位点的总体分布。相对于对照没有出现的峰的百分数为结合到 PEG 上的片段的量提供了一种评估，这是因为那个片段在层析图上别处被洗脱下来。

表 3A、示例性 PEG-胰岛素制剂中 PEG 结合位点的分布

胰岛素类型	A-1 位点结合的百分数	B-1 位点结合的百分数	B-29 位点结合的百分数
PEG 750-1	30	95	21
PEG 750-2	11	95	15
PEG 2000	63	85*	

*只是还原回收而没有消化的数据

表 3A 的数字是基于每个位点被百分之百结合的概率。例如，每个单结合物种有三种可能的构型（单-A1、单-B1 和单-B-29），每个双结合物也有三种构型（双-A1,B-1、双-A1,B-29 和双-B1,B29）。查看表 3A 中的数据，例如，对于 PEG-750-1，在组合物中存在的所有可能的物种中，95%的 PEG-胰岛素结合物具有一个共价结合在 B-1 位点上的聚乙二醇。

表 3B、各种可能的结合物物种

类型	单-结合物			双-结合物			三结合物	HMWP
物种#	1	2	3	4	5	6	7	8
结合位点	A-1	B-1	B-29	A-1+B-1	A-1+B-29	B-1+B-29	A-1+B-1+B-29	结合的胰岛素二聚体

实施例 6

酶法消化 750-2 PEG 胰岛素与未修饰胰岛素速率的比较

对 750-2 PEG 胰岛素与胰岛素被胰凝乳蛋白酶酶法消化的速率进行了比较。

制备 1mg/mL 胰岛素对照和 PEG 750 胰岛素-2 组合物的 pH7.8 的磷酸盐缓冲液。制备 1mg/mL 胰凝乳蛋白酶的 1mM 盐酸溶液。在 20 份胰岛素溶液中加入 1 份酶液。大约每个小时从混合液中取出少量等份样品。

开发了一种 RP（反相）-HPLC 方法，使用 C-18 柱，流动相含有高氯酸钠、磷酸和乙腈。使用乙腈梯度来分级洗脱 PEG 化的胰岛素物种，在 214nm 处检测得到一组略微可分辨的峰。这组峰被手动积分为一个峰并标记为 PEG 胰岛素。在消化的进程中，将完整的 PEG 胰岛素和胰岛素的减少作图（图 1）。它们在存在胰凝乳蛋白酶时的半衰期得以估算。

酶法消化一半浓度的 750-2 PEG 胰岛素组合物的主要成分所需的时间是未修饰的胰岛素所需时间的 5 倍长。也就是说，与常规的胰岛素相比，用胰凝乳蛋白酶消化一半浓度的图示的 PEG 化的胰岛素要花 5 倍长的时间。这些结果表明，与未修饰胰岛素相比，由于增强了对蛋白水解作用的抗性，PEG 胰岛素结合物在肺泡中具有延长驻留时间的潜力。

实施例 7

在大鼠中静脉内给药 5K PEG 胰岛素后血清葡萄糖和胰岛素浓度的评估（P-2001-015）

实施这个研究是为了确定 5K PEG 胰岛素组合物中的胰岛素在经过用示例的 5K 聚乙二醇链进行化学修饰后，其活性是否还予以保留，同时为了探索这些组合物在静脉内给药时的剂量和葡萄糖反应曲线。

露出颈背、皮下有螺纹接入口的预插导管的（位于颈/股骨静脉 [JVC/FVC]）雄性 Sprague Dawley 大鼠由 Hilltop Lab Animal Inc.提供（P.O.Box 183, Scottdale, PA15683）。颈静脉插管用药物级的聚乙烯吡咯烷酮（PVP-分子量 40000）、生理盐水和肝素钠的溶液（管腔填充物）填充以保持开放。在研究当天，取出密封插管的尼龙纤维塞，用 Monoject 钝导管 23Gx1（VWR #53498-484）代替。试验系统包括 1 只随机选取的雄性大鼠用于安慰剂组，2 只随机选取的雄性大鼠用于非 PEG 化的组，以及 4 只随机选取的雄性大鼠用于 PEG-胰岛素组。用于本研究的 PEG 化胰岛素来自实施例 2 的 5K PEG 胰岛素。剂量通过静

脉内给药。

动物的数量/性别

第一天：对于安慰剂组 1，每组 1 只雄性大鼠

对于组 2，每组 2 只雄性大鼠；对于组 3-5，每组 4 只雄性大鼠

在开始研究前，动物被禁食 12-18 小时。人胰岛素（Diosynth）在使用前储存于-20℃。5K PEG 胰岛素（实施例 2）在使用前储存于-20℃。制备两种不同的用于给药的溶液：

用于静脉内给药的溶液

非 PEG 化的人胰岛素（1.0mg/mL 储液）：在 1.0mL PBS 中加入 1.0mg 胰岛素粉末。

5K PEG 胰岛素（1.0mg/mL 人胰岛素，浓度基于胰岛素而不是结合物）：在 6.0mL PBS 中加入 11.7mg 5K PEG 胰岛素粉末。

通过吸入异氟烷（isoflurane）麻醉动物。通过 FVC 给予静脉内剂量（每只动物 300μL），然后将导管结扎以消除与抽取血液的交叉污染。所有的血样通过 JVC 抽取。磷酸盐缓冲液（PBS）以 300μL 的剂量静脉内给药到组 1。非 PEG 化的人胰岛素以每只动物 20μg 的剂量静脉内给药到组 2。PEG 化的人胰岛素以每只动物 20μg 的剂量静脉内给药到组 3，以每只动物 40μg 的剂量静脉内给药到组 4，以及以每只动物 30μg 的剂量静脉内给药到组 5。在给药前（给药前 2 到 2.5 小时）、给药后 10、15、30、60、120 和 180 分钟从 JVC 收集血样（约 500μL）。将少量血液置于葡萄糖试纸上，通过 Glucometer Elite 葡萄糖检测仪（Bayer Corp., Elkart, IN）测定血糖。将剩余的样品放入血清分离管中，置于离心机中分离血液。然后将血清倒入另一个试管中，通过放射免疫分析方法（RIA）进行分析。使用 Microsoft® Excel 2000 计算平均值和标准偏差（SD）。

表 4、体内实验概要

下面是实际的给药剂量和每组实际使用的动物数。研究在一天内完成。

组号	组合物	给药路线	总的胰岛素的日剂量 (μg/动物)	动物数/性别
1	安慰剂	静脉内	0	1 只雄性
2	非 PEG 胰岛素	静脉内	20	2 只雄性
3	PEG 胰岛素	静脉内	20	4 只雄性
4	PEG 胰岛素	静脉内	40	4 只雄性
5	PEG 胰岛素	静脉内	30	4 只雄性

结果表明 5K PEG 胰岛素组合物具有生物活性，即胰岛素分子经过聚乙二醇修饰后保留了活性，这从它降低血糖的能力可以看出。静脉内给药 PEG 化的胰岛素后，血清中的平均胰岛素浓度是剂量依赖的，同时也观察到了剂量依赖性的葡萄糖水平的降低。结果总结于图 2 和图 3 中。图 2 是静脉内给药图示的 PEG 化与非 PEG 化的胰岛素的组合物后血清中的平均胰岛素浓度图；图 3 是静脉内给药上述的组合物后的血糖浓度图。

实施例 8

5K PEG 胰岛素的肺部给药 (P-2001-017)

通过气管内给药，将一种示例的 PEG 化的胰岛素——5K PEG 胰岛素给药至大鼠，以确定 (1) 当给药到肺部后它的活性是否还维持，以及 (2) 如果有的话，当直接给药到肺部时它对血清胰岛素和血糖浓度的影响。

储存液

非 PEG 化的胰岛素：将 1mL PBS 加到 1.0mg 胰岛素粉末中以制备 1mg/mL 储存液。胰岛素（对照）的储存液在研究开始的当天配制。

5K PEG 胰岛素：将 4.0mL PBS 加到 7.8mg 5K PEG 胰岛素粉末中以制备 1mg/mL（基于胰岛素）的储存液。

用药溶液

每只动物 40 μ g 胰岛素：在用药 2 小时内，将 667 μ g 胰岛素储存液加到 4.33mL PBS 中。

每只动物 150 μ g 胰岛素 B-1：在用药 2 小时内，将 2.5mL 5K PEG 胰岛素储存液加到 2.5mL PBS 中。

气管内滴注

在一个树脂玻璃麻醉室中令大鼠吸入与氧气混合的 3.0-5.0%异氟烷 (Abbott Laboratories) 大约 5 分钟以将大鼠轻微麻醉。将安装在 1mL 注射器上的灌食针 (Popper & Sons Inc.; 18x3" W2-1/4 mm ball, New Hyde Park, NY 11040) 插入大鼠的嘴中，向下达到刚好位于主龙骨突上方的气管以完成给药。在将灌食针插入气管时，使用灌食针的球通过感觉咽喉皮肤下的软骨环的粗糙程度来确定插入是否合适。利用这种方法将剂量给药到肺中，然后拔出灌食针。

在这项研究中使用了 14 只(每组 7 只)内部带有颈静脉导管(JVC)的禁食的雄性大鼠 (Hilltop Lab Animal, Scottsdale, PA (300-350g))。非 PEG 化的人胰岛素以 40 μ g/300 μ L 的剂量气管内给药到组 1。PEG 化的人胰岛素制剂以 150 μ g/300 μ L 的剂量气管内给药到组 2。在给药前 (给药前 2 到 0.25 小时)、给药后 15、30、60、120、240、360、480 和 720 分钟收集血样 (约 500 μ L)。将少量血液置于葡萄糖试纸上，通过 Glucometer Elite 葡萄糖检测仪 (Bayer Corp., Elkart, IN) 测定血糖。将剩余的样品放入血清分离管中，通过放射免疫分析方法进行分析。使用 Microsoft® Excel 2000 计算平均值和标准偏差(SD)。由于导管堵塞，动物 2 和 3 从研究中舍弃。

表 5、大鼠体内实验总结

下面是实际的给药剂量和每组实际使用的动物数。

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数/性别	总的胰岛素日剂量 (μg /动物)	用药天数
1	胰岛素	气管内	7 只雄性	40	1
2	5K PEG 胰岛素	气管内	7 只雄性	150	1

表 6、体内剂量水平

组号	胰岛素类型	总的胰岛素日剂量 (μg /动物)	剂量体积 (μL)	用药溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	胰岛素	40	300	133.33
2	5K PEG 胰岛素	150	300	500

对气管内给药后胰岛素和 5K PEG 胰岛素在血清和血液中的平均浓度进行作图，分别显示在图 4 和图 5 中。结果表明本发明的 PEG 化的胰岛素组合物在传送肺部和留在肺中时具有活性。药代动力学数据进一步证明，PEG 化的胰岛素不仅通过肺进入了血液循环，而且同时维持了活性，正如在血清中可检测到的对应于非内源胰岛素的胰岛素水平所表明的那样。根据在气管内给药后大约 1 小时内观察到的血液中的胰岛素水平判断，似乎 PEG 化的胰岛素基本上不在肺中停留，在给药后很短的时间内就穿过肺部进入血流。结果还表明，PEG 化的胰岛素，当通过肺部给药时，能有效降低血糖。然而，在本实施例中，PEG 化的胰岛素与非 PEG 化的胰岛素相比，在所给药的剂量在降低血糖方面似乎有效性较低。气管内给药 PEG 化的胰岛素的药代动力学和药效学反应曲线与非 PEG 化的胰岛素有某种程度的相似之处，尽管根据图 4 的曲线，PEG-胰岛素的作用时间显得比非 PEG 化的胰岛素长。基于在此提供的指导原则，并根据一个特定化学修饰的胰岛素产物的用药需求、目标病人的种群、要治疗的病症等，一个本领域技术人员可以容易地完成对用药剂量和具体的聚乙二醇修饰剂的进一步优化。

实施例 9

750-1 PEG 胰岛素的肺部给药 (P-2001-025)

通过气管内给药, 将一种代表性的 PEG 化胰岛素——750-1-PEG 胰岛素给药至大鼠。开展本研究部分是为了研究共价结合了一个或多个分子量大约为 1000 道尔顿或以下的聚乙二醇链的胰岛素组合物当其传送到肺部时的效果。

大鼠的体内研究基本上如前面实施例 8 中所述的那样进行。其后精确的用药方案和给药剂量在下面的表中概述。

表 7

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数量/ 性别	总的胰岛素日剂量 ($\mu\text{g}/\text{动物}$)	用药天数
1	胰岛素	气管内	2 只雄性	80	1
2	750-1 PEG 胰岛素	气管内	4 只雄性	100	1
3	750-1 PEG 胰岛素	气管内	4 只雄性	300	1
4	750-1 PEG 胰岛素	气管内	4 只雄性	500	1

表 8

组号	胰岛素类型	总的胰岛素日剂量($\mu\text{g}/\text{动物}$)	剂量体积 (μL)	用药溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	胰岛素	80	300	266.67
2	750-1 PEG 胰岛素	100	300	333.33
3	750-1 PEG 胰岛素	300	300	1000.00
4	750-1 PEG 胰岛素	500	300	1666.67

对胰岛素和 750-1 PEG 胰岛素在大鼠中气管内给药后的血清胰岛素和血糖浓度进行作图, 分别显示在图 6 和图 7 中。从图 6 中的平均血清胰岛素浓度图可以看到, 天然或非 PEG 化的胰岛素在大约 15 分钟时达到最高的血清浓度, 而 PEG 化的胰岛素组合物在大约 6 小时 (每只动物 100 μg) 和 8 小时 (每只动物 300 μg) 达到最高的血清浓度, 证明了这些组合物在通过吸入给药到肺部时的长效性质。从图 6 可以看出, 未修饰的胰岛素在给药后大约 6 小时回到基线, 而 PEG 化的胰岛

素在 6 小时时的胰岛素水平仍显著高于基线（高于基线值大约 3 到 7 倍或更高）。此外，气管内给药 PEG 化的胰岛素使全身的胰岛素水平甚至在给药后 12 个小时仍然维持而不回到基线。事实上，PEG 化胰岛素的胰岛素水平在 8 小时和 12 小时是基线值（即未修饰胰岛素的值）的 3 倍以上。这些结果的图在图 6 中显示。

总而言之，当肺部给药时，750-1 PEG 胰岛素与未修饰的胰岛素相比产生了更高的全身性胰岛素水平。此外，PEG 化的胰岛素组的全身性胰岛素水平即使在 12 小时仍然显著高于基线。也就是说，PEG 化的胰岛素组升高的胰岛素水平的维持时间至少 2 倍长于未修饰胰岛素。这个数据进一步证明 PEG 化的胰岛素穿过肺部后仍具有生物活性，并且与未修饰胰岛素相比提供了时间延长的全身胰岛素水平。

图 7 提供了气管内给药非 PEG 化和 750-1 PEG 化的胰岛素后平均血糖浓度图。对于 PEG 化胰岛素组来说，血糖反应水平与血清胰岛素水平关联性很好。（也就是说，在血清胰岛素水平升高时，同时也观察到相应的血糖的抑制/降低。）从图 7 可以看出，本发明的 PEG 化胰岛素化合物当口服给药到肺部时，与天然胰岛素相比表现出快速的起效，而不是许多缓释制剂通常表现的延迟的起效。也就是说，对葡萄糖的抑制在给药后很快发生。此外，天然或非 PEG 化的胰岛素在大约 2 小时内达到最大的葡萄糖降低，而 PEG 化的胰岛素在使用 500 μ g、100 μ g 和 300 μ g 剂量后达到最大的葡萄糖降低的时间分别延长到至少 4 小时、6 小时和 8 小时。所以，PEG 化胰岛素当肺部给药时，达到最大葡萄糖降低的时间比非 PEG 化的胰岛素延长了 2 到 4 倍。总的来说，750-1 PEG 胰岛素与未修饰胰岛素相比，其葡萄糖抑制显著地增加了超过 12 个小时的时间。在 8 小时时，未修饰胰岛素组的葡萄糖水平已经基本上恢复正常，而 PEG 胰岛素组的葡萄糖水平比未修饰胰岛素组低 1.3 到 3 倍。PEG 化的胰岛素组的葡萄糖水平甚至在 12 小时仍未恢复到基线，这进一步表明本发明的化学衍生的胰岛素组合物具有延长的葡萄糖抑制能力。

实施例 10

750-1 PEG 胰岛素的肺部给药 (P-2002-001)

在与上述实施例 9 相似的研究中, 以比实施例 9 中使用的剂量低的剂量通过气管内给药方式将 750-1 PEG 胰岛素给药至大鼠。

体内气管内大鼠的研究基本上如前面实施例 8 中所述的那样进行。精确的用药方案和给药剂量在下面的表中概述。

表 9

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数量/性别	总的胰岛素日剂量 ($\mu\text{g}/\text{动物}$)	给药天数
1	胰岛素	气管内	5 只雄性	80	1
2	750-1 PEG 胰岛素	气管内	5 只雄性	80	1
3	750-1 PEG 胰岛素	气管内	5 只雄性	160	1

表 10

组号	胰岛素类型	总的胰岛素日剂量 ($\mu\text{g}/\text{动物}$)	剂量体积 (μL)	用药溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	胰岛素	80	300	266.7
2	750 PEG 胰 岛素-1	80	300	266.7
3	750 PEG 胰 岛素-1	160	300	533.3

对未修饰胰岛素和 750-1 PEG 胰岛素在大鼠中气管内给药后的血清胰岛素和血糖浓度进行作图, 结果分别显示在图 8 和图 9 中。从图 8 中的平均血清胰岛素浓度图可以看到, 天然或非 PEG 化的胰岛素在大约 15 分钟时达到最高的血清浓度, 而 PEG 化的胰岛素组合物在 2 小时 (每只动物 $80\mu\text{g}$) 和 6 小时 (每只动物 $160\mu\text{g}$) 达到最高的血清浓度。

也就是说，当通过肺部给药到全身循环中时，PEG 修饰的胰岛素达到最大血清胰岛素浓度的时间比天然或非 PEG 化胰岛素延长了 8 到 24 小时。从图 8 可以看出，未修饰的胰岛素在给药后大约 12 小时回到基线，而 PEG 化的胰岛素组在同样的 12 小时时间点其胰岛素水平是基线值的 2.5 到 3.5 倍。PEG 化胰岛素组的胰岛素水平直到大约 25 小时才回到基线，这意味着与未修饰胰岛素组相比，PEG 化胰岛素组回到基线要花两倍长的时间。对于 PEG 化胰岛素组，全身的胰岛素水平维持的时间大约为未修饰胰岛素组的两倍（25 小时对 12 小时）。在长达大约 6 小时时间点，两个 PEG 化胰岛素组的胰岛素水平与给药的剂量基本相对应（也就是说，每只动物 160 μ g 的组的胰岛素浓度大约为每只动物 80 μ g 的组的两倍）。

图 9 提供了气管内给药非 PEG 化和 750-1 PEG 化的胰岛素后平均血糖浓度图。在给药后 25 小时时，两个 PEG 化胰岛素组的葡萄糖抑制仍然没有回到基线，这与未修饰胰岛素组相反。与实施例 9 的结果相似，PEG 化胰岛素组的总体情况证明葡萄糖抑制的持续时间延长到 25 小时以上。在 8 小时时，未修饰胰岛素组的葡萄糖水平已经接近恢复正常，而 PEG 胰岛素组的葡萄糖水平比未修饰胰岛素组低大约 1.5 倍。这些结果进一步表明具有一个或多个聚乙二醇部分的修饰的胰岛素产生了穿过肺部的良好的生物有效度，以及延长的全身性胰岛素水平和葡萄糖抑制。

实施例 11

肺部给药 750-2 PEG 胰岛素（P-2002-003）

通过气管内给药，将一种代表性的 PEG 化的胰岛素组合物——750-2-PEG 胰岛素给药至大鼠。进行本研究是为了进一步探索不同剂量的 PEG 化与非 PEG 化的胰岛素当直接肺部给药时的效果。PEG 化和非 PEG 化形式的胰岛素以每只动物 80 μ g 胰岛素的剂量给药动物。体内大鼠的研究基本上如前面实施例 8 中所述的那样进行。其后精确的用药方案和给药剂量在下面的表中概述。

表 11

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数量/性别	总的胰岛素日剂量 ($\mu\text{g}/\text{动物}$)	用药天数
1	胰岛素	气管内	7 只雄性	80	1
2	750 PEG-2 胰岛素	气管内	7 只雄性	80	1

表 12

组号	胰岛素类型	总的胰岛素日剂量 ($\mu\text{g}/\text{动物}$)	给药体积 (μL)	用药溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	胰岛素	80	300	266.7
2	750 PEG-2 胰岛素	80	300	266.7

图 10 显示了非 PEG 化胰岛素和 750-2 PEG 胰岛素以每只动物 $80\mu\text{g}$ 的剂量气管内滴注后平均血清胰岛素浓度图。图 11 显示了非 PEG 化胰岛素和 750-2 PEG 胰岛素以每只动物 $80\mu\text{g}$ 的剂量气管内滴注后平均的血糖浓度图。结果与实施例 9 和 10 中获得的结果相似。

下面提供了实施例 10 和 11 的药代动力学参数列表。生物有效度是绝对生物有效度（即与静脉内给药胰岛素相比）。

表 13、平均血清胰岛素药代动力学

实施例	胰岛素类型	途径	剂量μg/ 动物	C _{max} μU/mL	T _{max} 分钟	AUC μU*min/mL	绝对生物 有效度
9(P-2001-2 5)	胰岛素	气管内	80	56	15	12878	
9	750-1 PEG	气管内	100	64	368	27954	
9	750-1 PEG	气管内	300	160	188	50691	
9	750-1 PEG	气管内	500	3474	184	255881	
10(P-2002-00 1)	胰岛素	气管内	80	132	15	28167	
10	750-1 PEG	气管内	80	56	210	36818	
10	750-1 PEG	气管内	160	117	78	60713	
静脉内参 比 (P-2002-00 2)	胰岛素	静脉内	20	3057	5	44388	
静脉内参比	750-2 PEG	静脉内	20	2638	7	63190	
静脉内参比	750-2 PEG	静脉内	30	3510	5	62746	
11(P-2002- 003)	胰岛素	气管内	80	89	24	22203	12.5
11	750-2 PEG	气管内	80	164	73	57639	32** 32***

*异常值没有从数据组中除去。

**相对于静脉内每只动物 20μg 的剂量。除去异常值后的值为 22%

***相对于静脉内每只动物 30μg 的剂量。除去异常值后的值没有变化

绝对生物有效度计算如下：
$$\frac{(AUC)}{(AUC_{\text{静脉内注射}})} \times \frac{\text{剂量}_{\text{静脉内注射}}}{\text{剂量}}$$

实施例 12

肺部给药 2K PEG 胰岛素（P-2002-010）

通过气管内给药，将另一种示例性 PEG 化胰岛素组合物——2K PEG 胰岛素给药至大鼠。用于本研究的 2K PEG 胰岛素的制备在实施例 3 中描述。非 PEG 化胰岛素以每只动物 80μg 胰岛素的剂量给药动物。

2K PEG 胰岛素以每只动物 300 μ g、600 μ g、900 μ g、1200 μ g 胰岛素的剂量给药动物。体内大鼠的研究基本上如前面实施例 8 中所述的那样进行。其后精确的用药方案和给药剂量在下面的表中概述。

表 14

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数量/性别	总的胰岛素日剂量 (μ g/动物)	用药天数
1	胰岛素	气管内	3 只	80	1
2	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	600	1
3	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	80	1
4	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	160	1
5	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	300	1
6	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	900	1
7	PEG 2K-1 胰岛素	气管内	3 只	1200	1

表 15

组号	胰岛素类型	总的胰岛素日剂量 (μ g/动物)	剂量体积 (μ L)	用药溶液浓度 (mg/mL)
1	胰岛素	80	300	0.267
2	PEG 2K-1 胰岛素	600	300	2.0
3	PEG 2K-1 胰岛素	80	300	0.267
4	PEG 2K-1 胰岛素	160	300	0.533
5	PEG 2K-1 胰岛素	300	300	1.0
6	PEG 2K-1 胰岛素	900	300	3.0
7	PEG 2K-1 胰岛素	1200	300	4.0

图 12 显示了气管内给药后平均的血糖浓度图。PEG 化胰岛素组合

物在肺部给药时观察到良好的剂量反应(即较高的 2K PEG 胰岛素剂量导致血糖浓度降低得更多)。尽管对于 PEG 化和非 PEG 化的组合物来说,曲线中达到最大葡萄糖抑制的时间点都显示为大约 3 小时,但 PEG 化与非 PEG 化胰岛素的图形在葡萄糖抑制的持续时间方面有显著差异。具体来说,对于大约 6 小时以后的时间点,在三个较高的 2K PEG 化胰岛素剂量(每只动物 600 μ g、900 μ g 和 1200 μ g)处,葡萄糖水平受到抑制,显著低于非 PEG 化胰岛素。这些结果进一步证明,通过肺部给药 PEG 化的胰岛素可以达到延长的全身性效果。

实施例 13

大鼠中静脉内给药 2K PEG 胰岛素后血清葡萄糖和胰岛素浓度的评估(P-2002-009)

进行本研究是为了进一步探索在一个示例 2K PEG 胰岛素组合物中胰岛素的活性,以及为了确定能够将血糖有效降低到大约 30 到 40mg/dL 浓度的 PEG 化人胰岛素(PEG 2K-1)的静脉内(i.v.)使用剂量。

使用下表中概括的组合物、动物组和剂量,按照与实施例 7 中描述的相似的步骤进行实验。

表 16

组号	胰岛素类型	给药途径	动物数量/性别	总的胰岛素日剂量(μ g/动物)	用药天数
1	胰岛素	静脉内	2 只雄性	20	1
2	PEG 2K-1 胰岛素	静脉内	2 只雄性	20	1
3	PEG 2K-1 胰岛素	静脉内	2 只雄性	30	1
4	PEG 2K-1 胰岛素	静脉内	2 只雄性	40	1
5	PEG 2K-1 胰岛素	静脉内	2 只雄性	80	1
6	PEG 2K-1 胰岛素	静脉内	2 只雄性	160	1

表 15

组号	对照/测试项目	总的胰岛素日剂量 (μg /动物)	剂量体积 (μL)	用药溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	胰岛素	20	300	67
2	PEG 2K-1 胰岛素	20	300	67
3	PEG 2K-1 胰岛素	30	300	100
4	PEG 2K-1 胰岛素	40	300	133
5	PEG 2K-1 胰岛素	80	300	267
6	PEG 2K-1 胰岛素	160	300	533

图 13 显示了以每只动物 20 μg (非 PEG 化胰岛素) 和每只动物 20、30 和 40 μg (2K PEG 胰岛素) 剂量将非 PEG 化的胰岛素和 2K PEG 胰岛素静脉内给药后平均血清胰岛素浓度图。图 14 显示了以上述剂量将非 PEG 化的胰岛素和 2K PEG 胰岛素静脉内给药后平均的血糖浓度图。

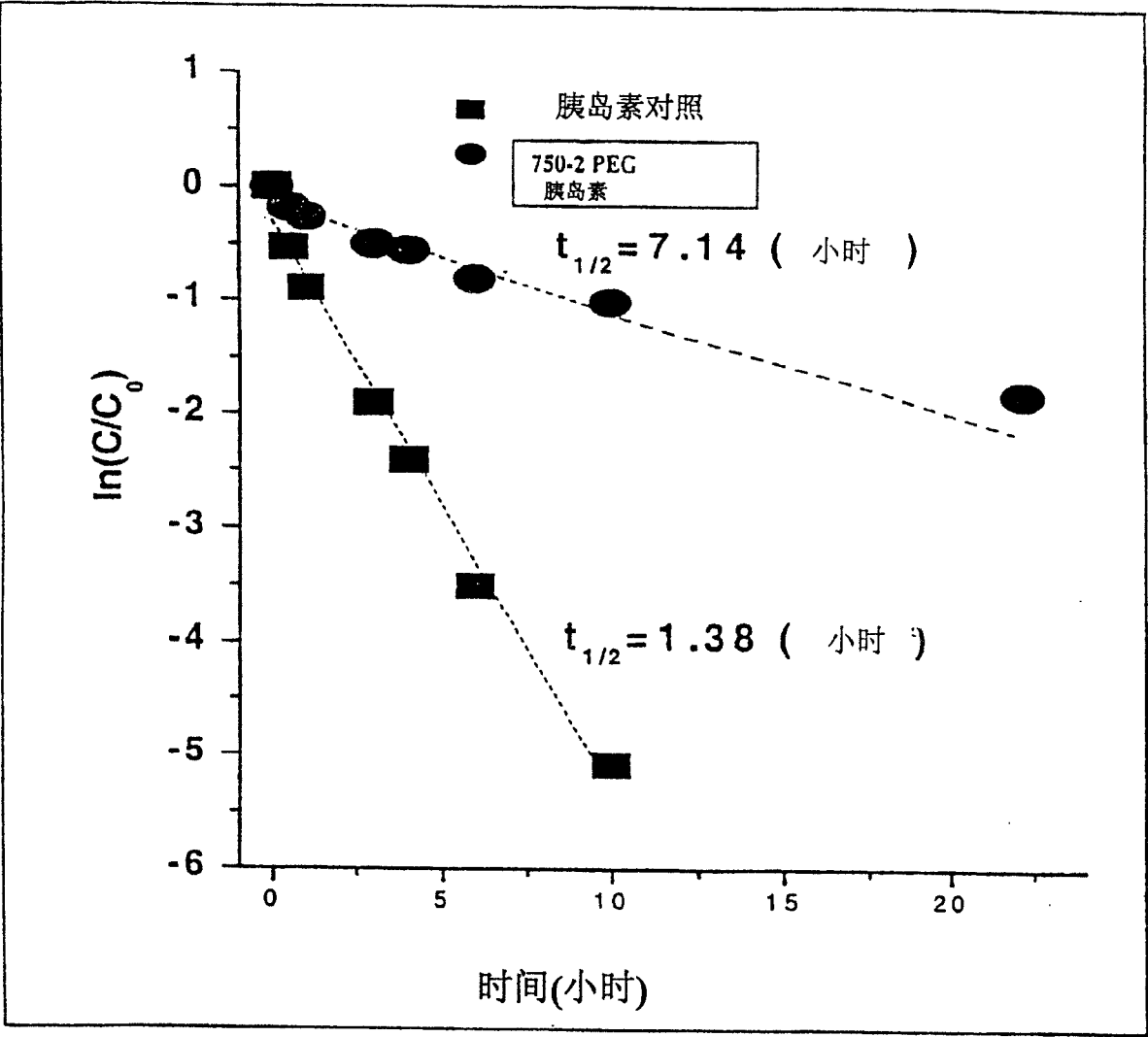


图1 750-2 PEG胰岛素与未修饰的胰岛素对照的酶解速率

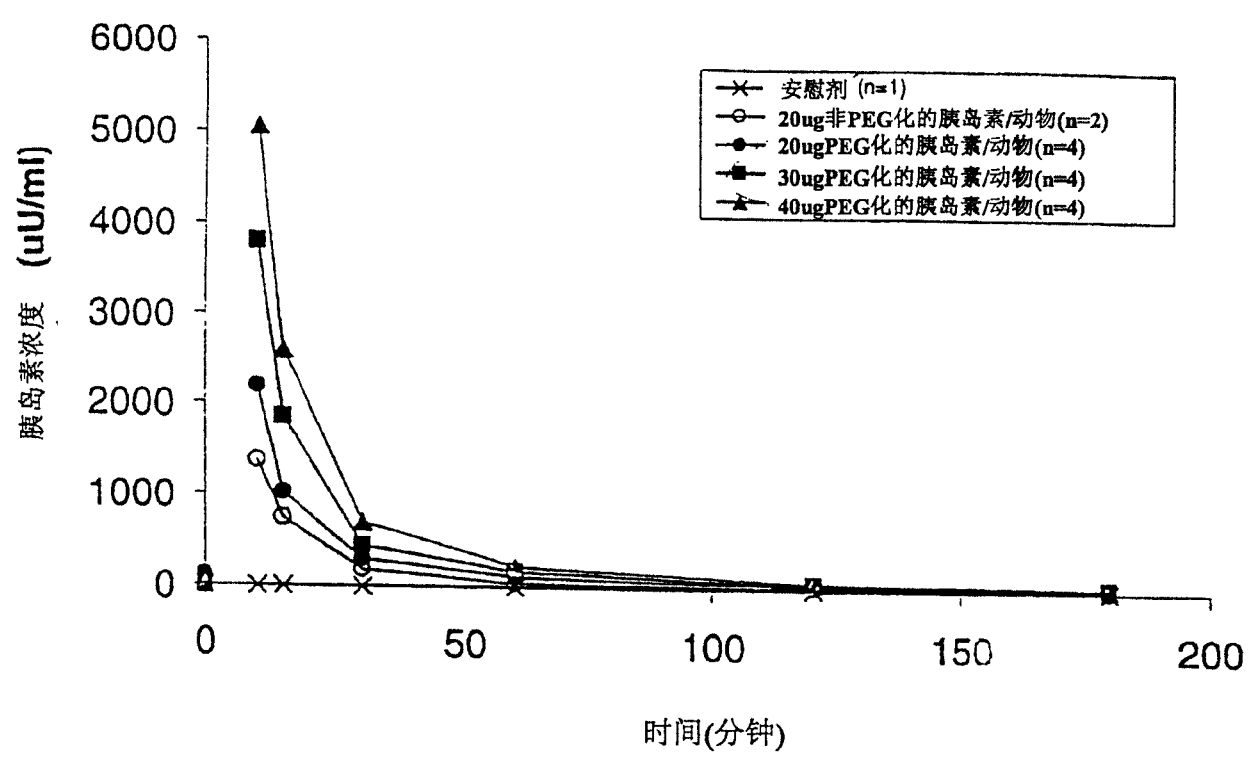


图2 在大鼠中静脉内传送5K PEG胰岛素：
血清清除率图

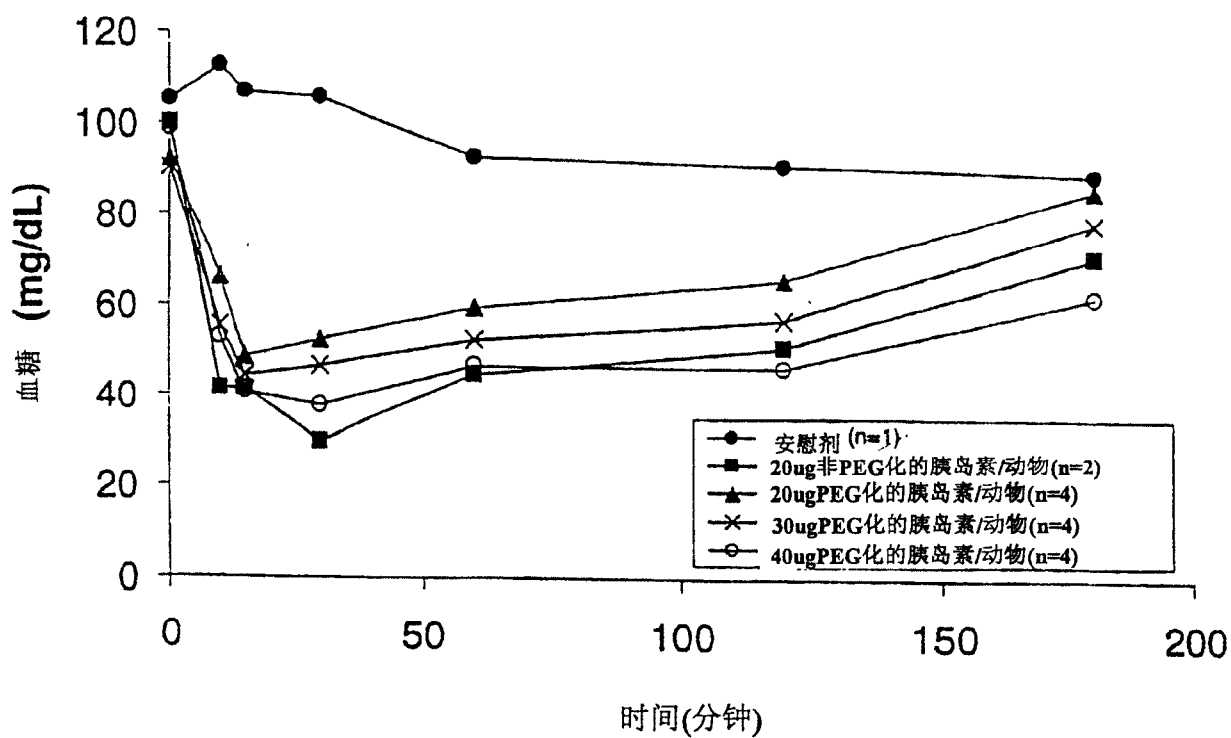


图3 在大鼠中静脉内传送5K PEG胰岛素：
平均血糖浓度

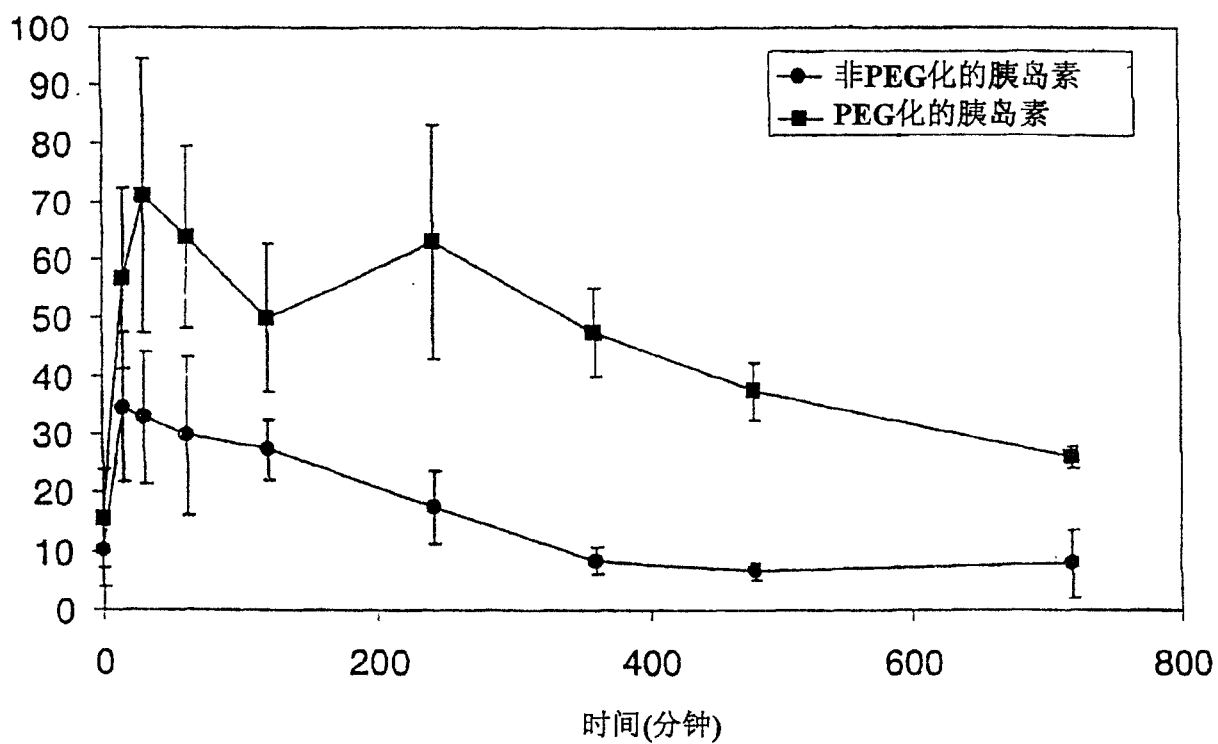


图4 在大鼠中气管内传送5K PEG胰岛素：
血清清除率图

(● = 40 μg /动物；■ = 150 μg /动物)

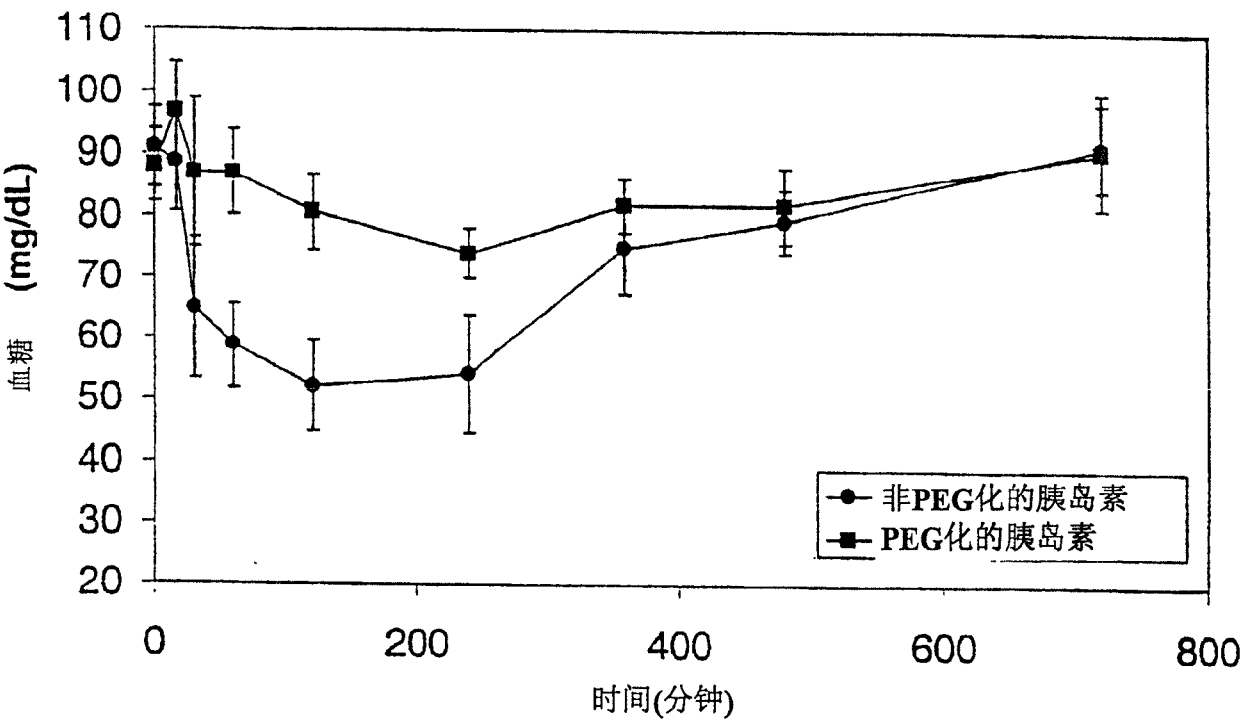


图5 在大鼠中气管内传送5K PEG胰岛素:
平均血糖浓度

(● = 40 μ g/ 动物 ; ■ = 150 μ g/ 动物)

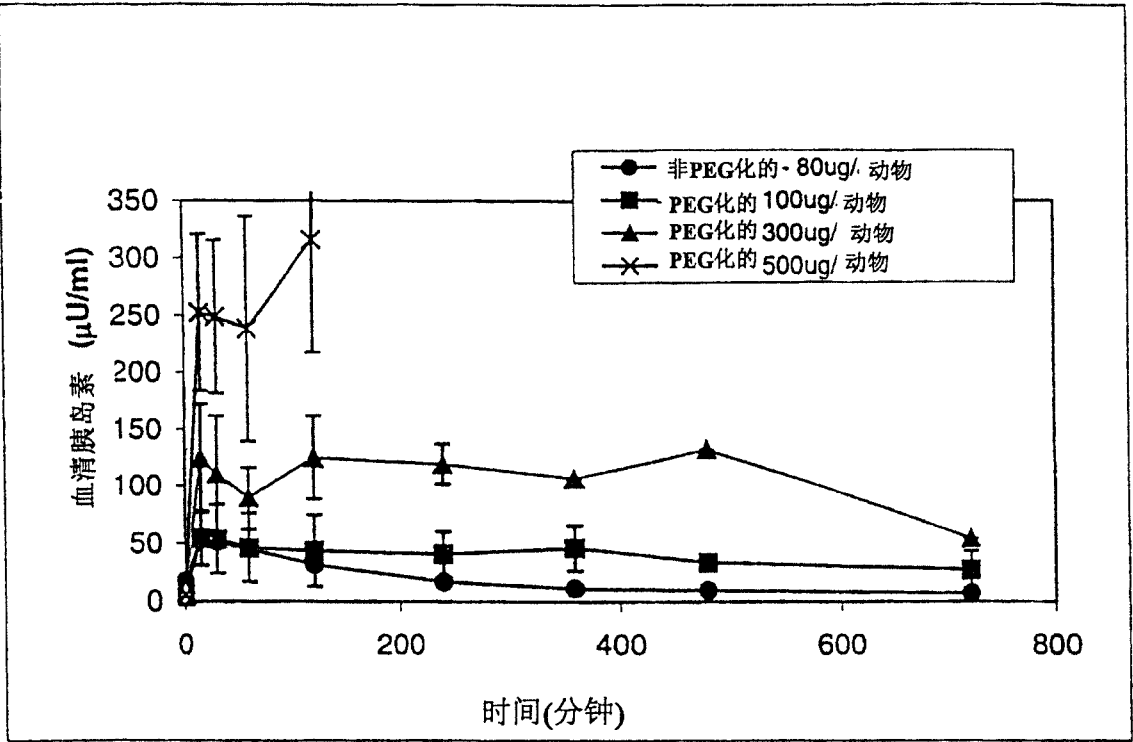


图6 在大鼠中气管内传送750-1 PEG胰岛素:
血清清除率图

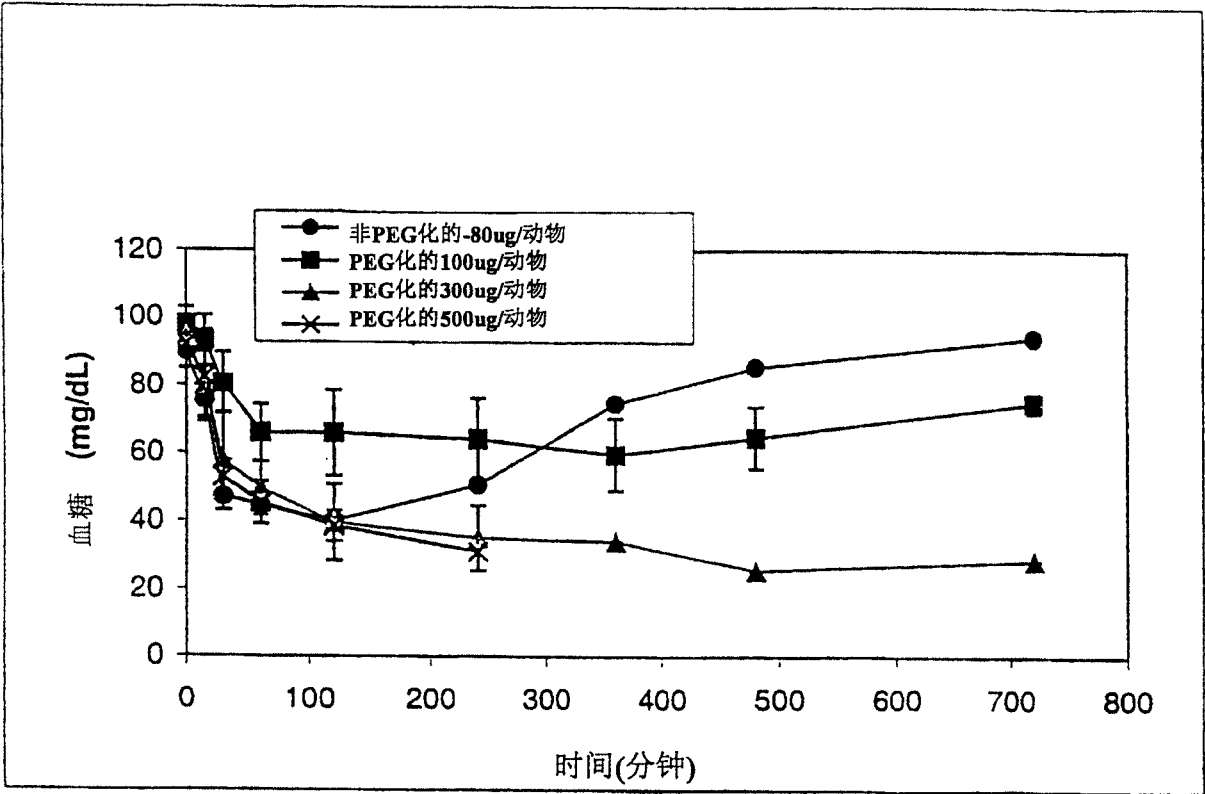


图7 在大鼠气管内传送750-1 PEG胰岛素：
平均血糖浓度

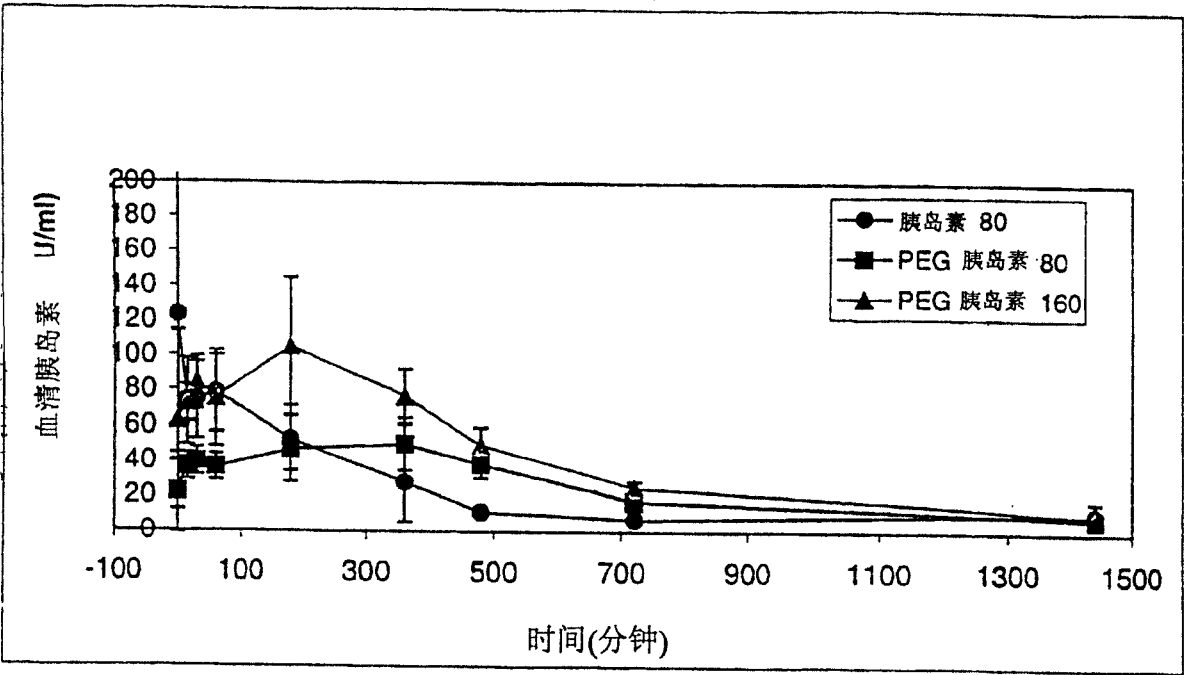


图8 在大鼠中气管内传送750-1 PEG胰岛素：
血清清除率图

(● = 80 μ g/ 动物；■ = 80 μ g/ 动物；▲ = 160 μ g/ 动物)

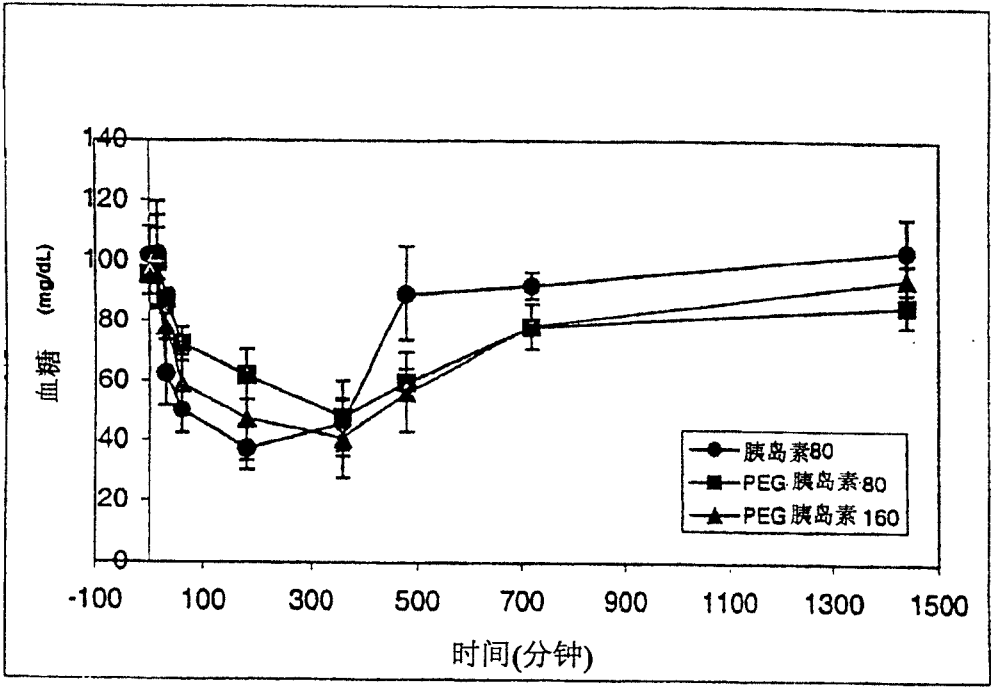


图9 在大鼠中气管内传送750-1 PEG胰岛素

(● = 80 μ g/ 动物; ■ = 80 μ g/ 动物; ▲ = 160 μ g/ 动物)

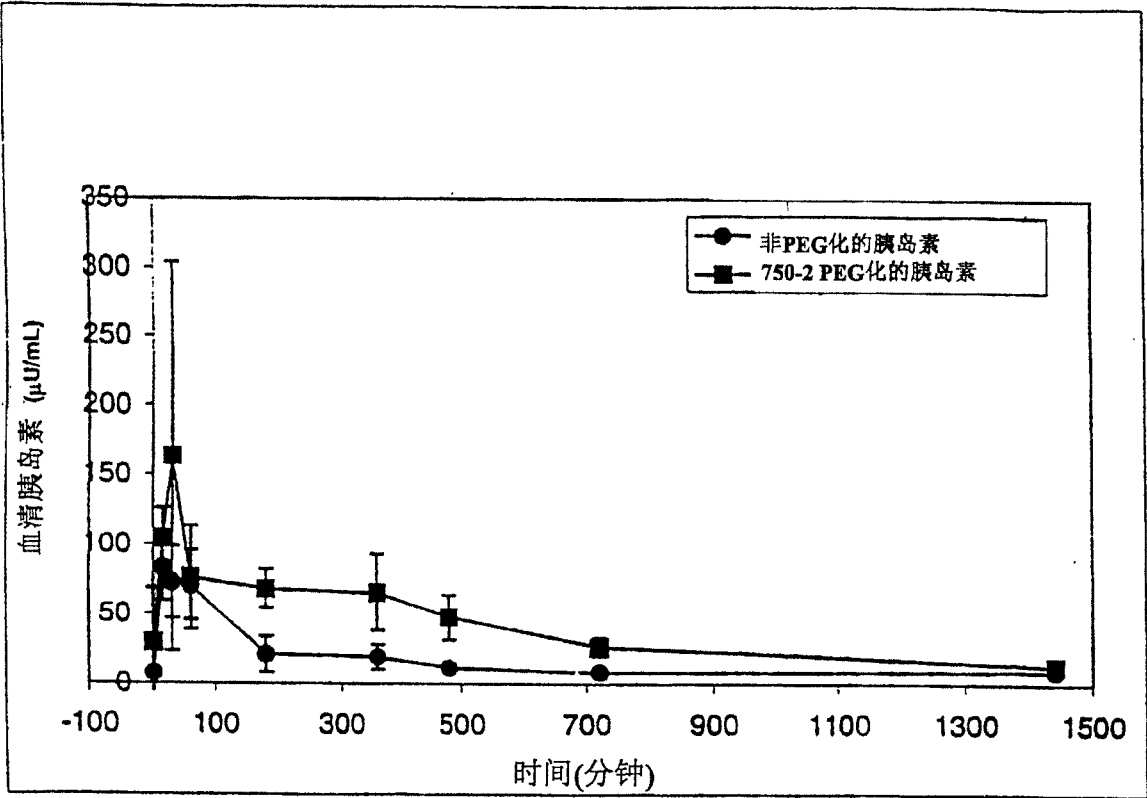


图10 在大鼠中气管内传送750-2 PEG胰岛素：
血清清除率图
(● = 80 $\mu\text{g/}$ 动物；■ = 80 $\mu\text{g/}$ 动物)

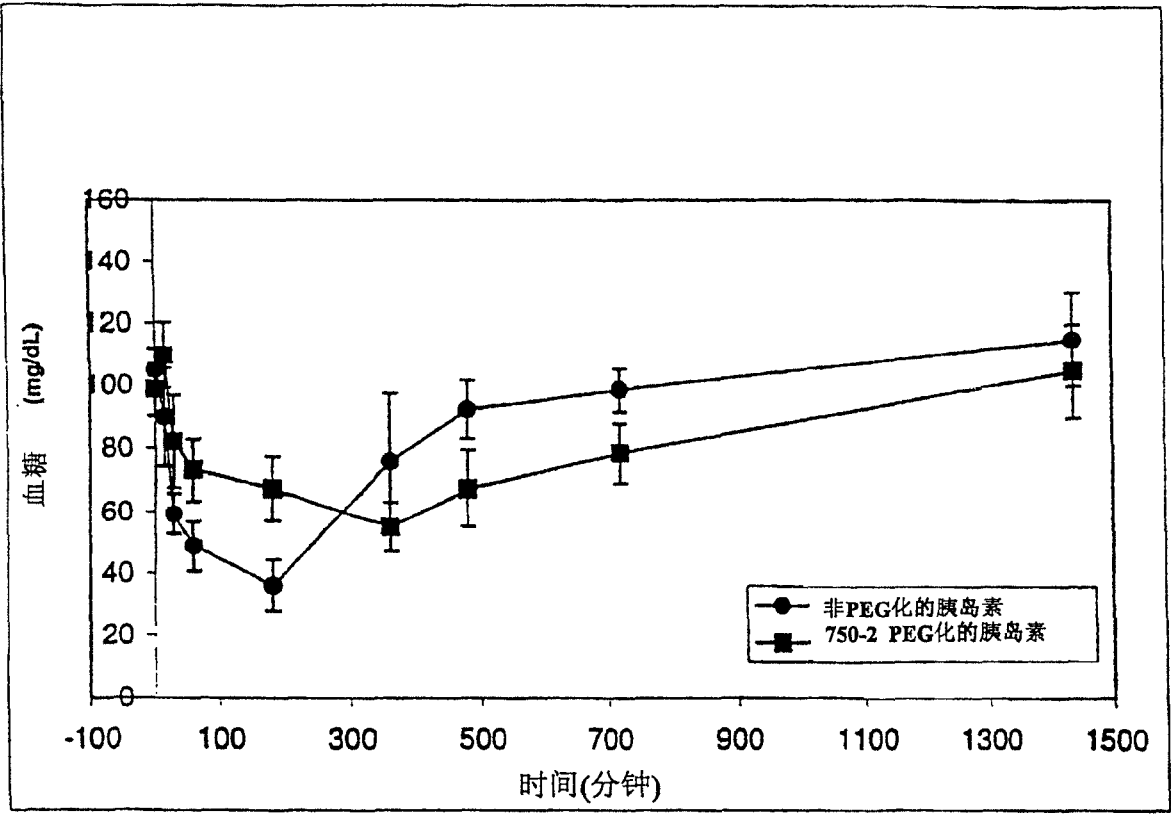


图11 在大鼠中气管内传送750-2 PEG胰岛素：
平均血糖浓度
● = 80 μ g/ 动物；■ = 80 μ g/ 动物)

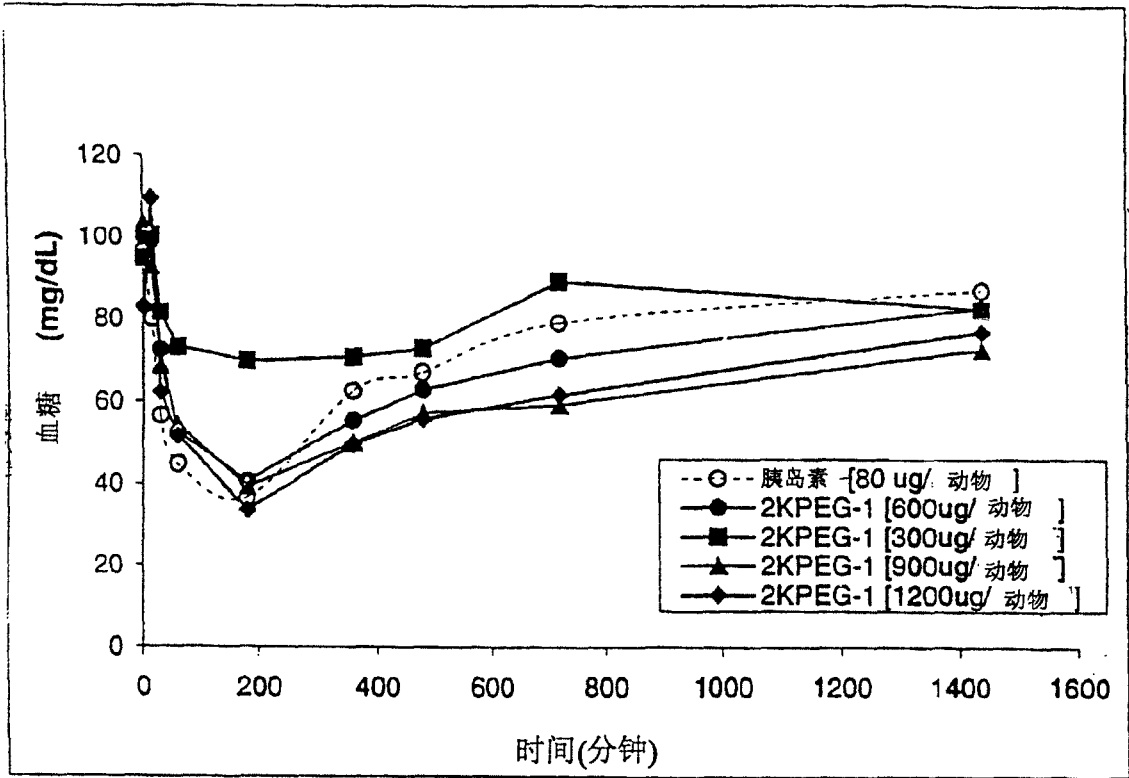


图12 在大鼠中气管内传送2K PEG胰岛素：
平均血糖浓度

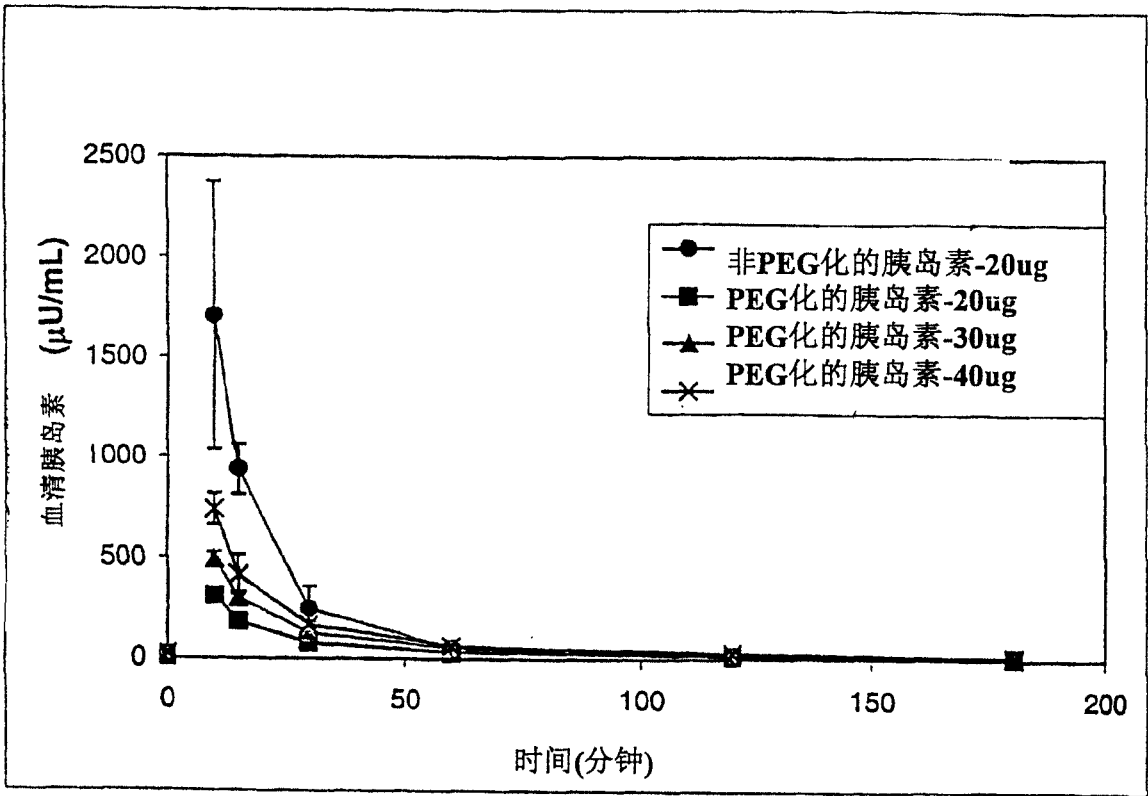


图13 在大鼠中静脉内传送2K PEG胰岛素：
血清清除率图

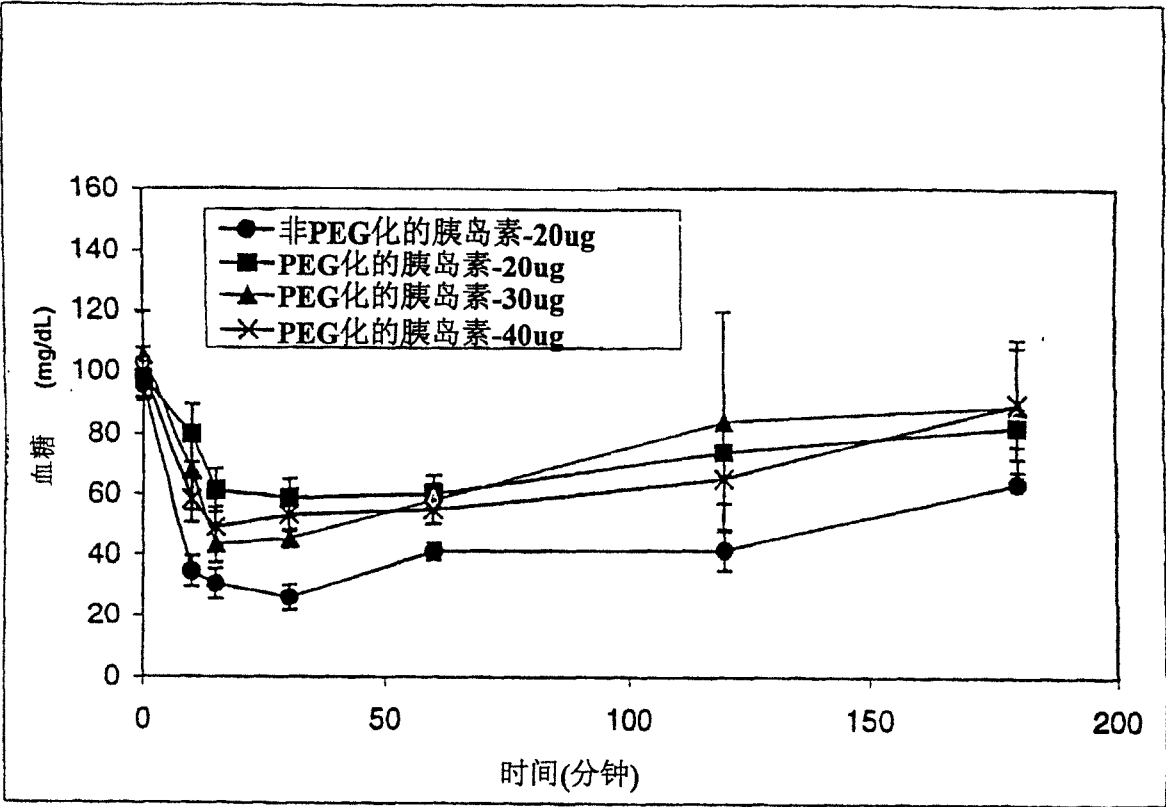


图14 在大鼠中静脉内传送2K PEG胰岛素：
血糖浓度