



(10) 授权公告号 CN 113727700 B

(45) 授权公告日 2024.09.17

(21) 申请号 202080027937.1

(22) 申请日 2020.04.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113727700 A

(43) 申请公布日 2021.11.30

(30) 优先权数据
62/839,246 2019.04.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/028988 2020.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/219391 EN 2020.10.29

(73) 专利权人 美药星制药有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·N·布朗 K·G·范斯科伊克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 张建 黄革生

(51) Int.Cl.
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107278154 A, 2017.10.20
US 2003146156 A1, 2003.08.07

审查员 洪梦实

权利要求书2页 说明书9页

序列表1页

(54) 发明名称

稳定的肽制剂的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了制备含有肽的粉末制剂的改进方法。本发明还提供了用于制备含有胰高血糖素或胰高血糖素类似物的粉末制剂的改进方法，其中所述粉末制剂适于鼻腔施用。

1. 制备肽粉末制剂的方法,其包括以下步骤:
 - a. 在水性载体中形成酸、磷脂表面活性剂和环糊精的第一混合物;
 - b. 使所述第一混合物经受第一过滤步骤,其中所述过滤器包含具有 $0.4\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 孔径的膜;
 - c. 向所述第一过滤产物中加入肽以形成第二混合物,并使所述第二混合物经受第二过滤步骤,其中所述过滤器包含具有 $0.4\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 孔径的膜;和d. 干燥第二过滤产物以形成固体制剂,并处理所述固体制剂以制备最终粉末制剂,其中所述的肽为胰高血糖素或[Lys¹⁷,¹⁸,Glu²¹]胰高血糖素,其中所述酸是柠檬酸或醋酸,其中所述表面活性剂是十二烷基磷酸胆碱、二癸烷基磷脂酰胆碱、溶血月桂酰磷脂酰胆碱、二辛酰磷脂酰胆碱或二月桂酰磷脂酰甘油,且其中所述环糊精是 α -环糊精、 β -环糊精、羟丙基 β -环糊精或 γ -环糊精。
2. 权利要求1的方法,其中所述肽是胰高血糖素。
3. 权利要求1的方法,其中所述肽是[Lys^{17,18},Glu²¹]胰高血糖素。
4. 权利要求1的方法,其中所述表面活性剂、所述环糊精和所述肽共同构成所述第二混合物重量的1.5%-3%。
5. 权利要求4的方法,其中所述表面活性剂、所述环糊精和所述肽共同构成第二混合物重量的2%。
6. 权利要求4的方法,其中所述表面活性剂、所述环糊精和所述肽共同构成第二混合物重量的2.5%。
7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中第一及第二过滤步骤中的膜包含聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。
8. 权利要求1-6中任一项的方法,其中第一及第二过滤步骤中的膜包含 $0.45\mu\text{m}$ 的孔径。
9. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述酸是柠檬酸。
10. 权利要求1-6的任一项的方法,其中所述酸为醋酸。
11. 权利要求10的方法,其中所述醋酸的浓度为1M。
12. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述表面活性剂是十二烷基磷酸胆碱、二癸烷基磷脂酰胆碱、溶血月桂酰磷脂酰胆碱或二辛酰磷脂酰胆碱。
13. 权利要求12的方法,其中所述表面活性剂是十二烷基磷酸胆碱。
14. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述环糊精是 α -环糊精或 β -环糊精。
15. 权利要求14的方法,其中所述环糊精是 β -环糊精。
16. 权利要求1的方法,其中所述的肽是胰高血糖素且所述的方法包括以下步骤:
 - a. 在水性载体中形成醋酸、十二烷基磷酸胆碱和 β -环糊精的第一混合物;
 - b. 使所述第一混合物经受第一过滤步骤,其中所述过滤器包含具有 $0.4\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 孔径的膜;
 - c. 将胰高血糖素加至所述第一过滤产物中以形成第二混合物,并使所述第二混合物经受第二过滤步骤,其中所述过滤器包含具有 $0.4\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 孔径的膜;和
 - d. 干燥第二过滤产物以形成固体制剂,并加工所述固体制剂以生产最终粉末制剂。
17. 权利要求16的方法,其中十二烷基磷酸胆碱、所述 β -环糊精和所述胰高血糖素共同构成第二混合物重量的2.5%。
18. 权利要求16的方法,其中第一和第二过滤步骤中的膜均包含PVDF膜。

19. 权利要求16-18中任一项的方法,其中第一和第二过滤步骤中的膜均包含0.45 μm 的孔径。

20. 权利要求16-18中任一项的方法,其中所述醋酸的浓度为1M。

21. 权利要求16-18中任一项的方法,其中最终粉末制剂中通过反相HPLC测定的大于98%的胰高血糖素是非聚集型胰高血糖素。

22. 粉末制剂,其通过根据权利要求16-18中任一项的方法制备。

23. 根据权利要求22的粉末制剂,其中最终粉末制剂中通过反相HPLC测定的大于98%的胰高血糖素是非聚集型胰高血糖素。

稳定的肽制剂的制备方法

[0001] 本发明涉及医药领域。更具体地说,本发明提供了制备含肽粉末制剂的改进方法。本发明还提供了制备含有胰高血糖素或胰高血糖素类似物的粉末制剂的改进方法,其中所述粉末制剂适于鼻腔施用。

[0002] 肽在生产过程期间和之后易于发生物理不稳定性,例如聚集。聚集是由数种不同机制引起的复杂过程。聚集通常可能由数个肽或蛋白成核引发的,形成小的可溶性聚集体;然后这些聚集体成为随后更大不溶性聚集体生长的成核焦点。成核生长过程可随时间、温度、肽浓度和其他参数的增加而增加。在生产期间,肽通过使用各种手段例如超滤、亲和色谱、选择性吸收色谱、离子交换色谱、冻干、透析和沉淀或“盐析”得到纯化和浓缩。这种浓缩过程可导致聚集(Maggio,BioProcess International 2008;6(10):58-65)。除去这些聚集体或使它们溶解需要额外的工艺步骤,这些工艺步骤可能成本昂贵,且可能影响整体产品产量。聚集效应可包括物料损失、功效降低、药动学改变、稳定性降低和产品货架期缩短、和诱导不想要的免疫原性。

[0003] 聚集已成为生物药生产商的重大问题,特别是因为当前高浓度溶液趋势增加了蛋白质-蛋白质相互作用的可能性,这也就更利于聚集(Maggio,BioProcess International 2008;6(10):58-65)。已经研究过各种限制肽聚集的方法,包括但不限于调节:pH、缓冲条件、离子强度、和/或加入其它赋形剂,例如环糊精。

[0004] 众所周知胰高血糖素在水性溶液中有聚集倾向(Pedersen JS.,J Diabetes Sci Technol.2010;4(6):1357-1367;Beaven等人,The European J.Biochem.1969;11(1):37-42;Matilainen等人,European J.of Pharmaceutical Sciences 2009;(36):412-420),其在胰高血糖素粉末制剂生产过程中可能引起问题。W02016/133863公开了先前制备适于鼻腔施用的胰高血糖素粉末制剂的方法。

[0005] 需要制备肽粉末制剂的替代方法,特别是胰高血糖素或胰高血糖素类似物的粉末制剂。特别是,需要减少或消除肽在水性溶液中聚集的方法。通过减少或优选地消除聚集,最终粉末制剂将保留非常高百分比的活性肽,这是非常有利的。优选地,所述方法在干燥之前的水性溶液物理、化学稳定较长时间段,例如长达24小时。这种延长的稳定性使工艺更适合大规模生产。此外,还需要使最终粉末制剂具有长货架期、优选长达约24个月的方法。

[0006] 因此,本发明提供了在粉末制剂生产期间减少肽聚集的改进且具有成本效益的方法。该方法加入了双重过滤步骤。本发明中使用的此类肽是胰高血糖素或胰高血糖素类似物。根据本方法制备的粉末制剂特别适合鼻腔施用。

[0007] 根据本发明的一个方面,提供了制备肽粉末制剂的方法。所述方法包括以下步骤:

[0008] a. 在水性载体中形成酸、磷脂表面活性剂和环糊精的第一混合物;

[0009] b. 使所述第一混合物经受第一过滤步骤,其中所述过滤器包含具有约0.4 μ m-约0.5 μ m孔径的膜;

[0010] c. 向所述第一过滤产物中加入肽以形成第二混合物,并使所述第二混合物经受第二过滤步骤,其中所述过滤器包含具有约0.4 μ m-约0.5 μ m孔径的膜;和

[0011] d. 干燥第二过滤产物形成固体制剂,并加工该固体制剂以生产最终粉末制剂。

[0012] 在实施方案中,所述肽是胰高血糖素或胰高血糖素类似物。具体地,其为胰高血糖素。

[0013] 在实施方案中,所述酸是枸橼酸或醋酸。具体地,其为醋酸。更具体地,所述醋酸是1M浓度。

[0014] 在实施方案中,所述表面活性剂、所述环糊精和所述肽合起来占第二混合物重量的约1.5%-约3%。在具体实施方案中,所述成分占第二混合物重量的约2%。在进一步的实施方案中,所述成分占第二混合物重量的约2.5%。

[0015] 在实施方案中,所述表面活性剂为十二烷基磷酸胆碱(DPC)、二癸烷基磷脂酰胆碱(DDPC)、溶血月桂酰磷脂酰胆碱(LLPC)、二辛酰磷脂酰胆碱(D8PC)、或二月桂酰磷脂酰甘油(DLPG)。具体地,所述表面活性剂是DPC。

[0016] 在实施方案中,所述环糊精是 α -环糊精、 β -环糊精、羟丙基 β -环糊精、或 γ -环糊精。具体地,所述环糊精是 β -环糊精。

[0017] 在实施方案中,最终粉末制剂中所述肽大于98%是非聚集型肽,其通过反相HPLC测定。优选地,所述肽的大于99%是非聚集型肽。更优选地,所述肽的100%是非聚集型肽。

[0018] 根据本发明的另一方面,提供了肽粉末制剂的制备方法,其包含以下步骤:

[0019] a. 在水性载体中形成磷脂表面活性剂和环糊精的第一混合物;

[0020] b. 使所述第一混合物经受第一过滤步骤,其中所述滤器包含具有约0.4 μ m-约0.5 μ m孔径的膜;

[0021] c. 向所述第一过滤产物中加入肽以形成第二混合物,并使所述第二混合物经受第二过滤步骤,其中所述滤器包含具有孔径约0.4 μ m-约0.5 μ m孔径的膜;和

[0022] d. 干燥第二过滤产物形成固体制剂,并加工该固体制剂以生产最终粉末制剂。

[0023] 在实施方案中,所述表面活性剂、所述环糊精和所述肽一起构成第二混合物重量约1.5%-约3%。在具体实施方案中,其构成第二混合物重量的约2%。在进一步的实施方案中,其构成第二混合物重量的约2.5%。

[0024] 在实施方案中,所述表面活性剂DPC、DDPC、LLPC、D8PC或DLPG。具体地,所述表面活性剂是DPC。

[0025] 在实施方案中,所述环糊精是 α -环糊精、 β -环糊精、羟丙基 β -环糊精、或 γ -环糊精。具体地,所述环糊精是 β -环糊精。

[0026] 在实施方案中,最终粉末制剂中所述肽大于98%是非聚集型肽,其通过反相HPLC测定。优选地,所述肽的大于99%是非聚集型肽。更优选地,所述肽的100%是非聚集型肽。

[0027] 根据本发明的另一方面,提供了制备胰高血糖素粉末制剂的方法,其包含以下步骤:

[0028] a. 在水性载体中形成醋酸、DPC和 β -环糊精的第一混合物;

[0029] b. 使第一混合物接受第一过滤步骤,其中所述滤器包含孔径约0.4 μ m-约0.5 μ m的膜;

[0030] c. 向所述第一过滤产物中加入胰高血糖素以形成第二混合物,并使所述第二混合物经受第二过滤步骤,其中所述滤器包含具有孔径约0.4 μ m-约0.5 μ m孔径的膜;和

[0031] d. 干燥第二过滤产物形成固体制剂,并加工该固体制剂以生产最终粉末制剂。

[0032] 在实施方案中,胰高血糖素、DPC和 β -环糊精一起构成第二混合物重量的约1.5%-

约3%。在具体的实施方案中,它们构成第二混合物重量的约2%。在进一步的实施方案中,它们构成第二混合物重量的约2.5%。

[0033] 在实施方案中,所述醋酸浓度1M。

[0034] 在实施方案中,最终粉末制剂中所述胰高血糖素大于98%是非聚集型肽,其通过反相HPLC测定。优选地,所述胰高血糖素的大于99%是非聚集型肽。更优选地,所述胰高血糖素的100%是非聚集型胰高血糖素。

[0035] 本发明进一步提供了根据本发明方法制备的粉末制剂。

[0036] 在具体实施方案中,第二过滤产物的干燥可通过冷冻干燥或喷雾干燥进行。

[0037] 在具体实施方案中,在第一和第二两个过滤步骤中的所述滤膜包括但不限于,聚偏二氟乙烯(PVDF)、醋酸纤维素、硝酸纤维素、聚四氟乙烯(PTFE,特氟龙)、聚氯乙烯、聚醚砜、或适于cGMP生产环境的其他过滤材料。在优选的实施方案中,所述滤膜包含PVDF。

[0038] 在具体实施方案中,在第一和第二两个过滤步骤中的所述滤膜具有约0.45 μm 的孔径。在优选的实施方案中,所述滤膜是具有0.45 μm 孔径的PVDF膜。

[0039] 在实施方案中,本发明在所述方法期间溶液的pH保持在2-3。

[0040] 在实施方案中,本发明的所述方法溶液阶段是在15-30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行的,优选18-25 $^{\circ}\text{C}$,更优选约20 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0041] 本发明的方法可被用于在粉末制剂生产期间有聚集倾向的肽。具体地,所述方法可被用于肽,包括但不限于胰淀素、胰淀素类似物、重组人因子VIII(rfVII)、降钙素基因相关肽(CGRP)、降钙素、GLP-10类似物、GLP-1-GLP双重激动剂、G1P激动剂、重组人生长激素(rhGH)、奥曲肽CCR5抑制剂、D-Ala-肽-T-酰胺、重组人胰岛素、胰岛素类似物、PTH1-31环肽类似物、干扰素- β 、干扰素 β -1a和 β -1b、白细胞介素-2(IL-2)、促红细胞生成素(EPO)、醋酸普兰林肽和尿激酶等酶。

[0042] 具体而言,本发明的方法可用于制备胰高血糖素粉末制剂。胰高血糖素是在医院内外治疗严重低血糖症的非常有效的方法。胰高血糖素是一种粉末制剂,必须在注射前即时与稀释剂混合。胰高血糖素的液体制剂也是已知的(Pontiroli等人,Br Med J(临床研究版)1983;287:462-463)。已开发出一种用于鼻腔施用治疗严重低血糖症的胰高血糖素粉末,并在W02016/133863中进行了描述,该粉末最近在美国和欧洲以BaqsimiTM的名称获得批准。

[0043] 根据本发明方法制备的胰高血糖素或胰高血糖素类似物制剂特别适于鼻腔施用。在优选实施方案中,根据本发明方法制备的制剂有以下一种或多种:

[0044] • 能够到达肺部的小颗粒比例较低

[0045] • 提供足够实现治疗效果所需药物总剂量的药物含量,作为单剂量用于单鼻孔

[0046] • 足够的药物含量,以递送总剂量几十毫克,或递送装置允许的最大剂量

[0047] • 尽管存在可能与过敏或普通感冒相关的鼻塞,但仍有足够的药物含量和吸收特性使其有效

[0048] • 在环境条件下长期储存期间的稳定性,优选至少24个月

[0049] • 良好的安全性和耐受性特性

[0050] 如本文所用,术语“聚集”指小的低聚物前体(例如肽)的蓄积、结块、集聚、二聚、聚合或种子核、成核焦点、原纤维或凝胶的形成。聚集体粒径范围从可溶性二聚体和其他多聚

体(表观球形直径约5-10nm)到较大的不溶性物质,这些物质被确定为亚可见和可见颗粒(表观球形直径约20-50 μ m)。从可溶性聚集体类别来看,较大的聚集体(如高分子量物种)可能能够引发免疫原性反应,从而产生不良的临床结局。

[0051] 如本文所用,术语“种子核”或“成核焦点”指形成较大聚集体的最小聚集体尺寸。

[0052] 可使用反相HPLC测定最终粉末制剂中非聚集型肽的含量。可以使用本领域技术人员已知的标准条件,例如以下实施例中所列出的条件。

[0053] 如本文所用,“胰高血糖素”指以下所述序列的多肽:

[0054] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(序列ID编号:1)。

[0055] 胰高血糖素可通过化学合成、重组DNA技术生产或从天然来源提取。术语“胰高血糖素类似物”是指保留刺激体内血糖升高的能力的该序列的变体。

[0056] Chabenne等人,Molecular Metabolism 2014,3:293-300中公开了胰高血糖素类似物的实例,其中所述天然序列的一个氨基酸被丙氨酸取代,以及有多个取代的类似物;其中三个氨基酸被修饰以产生具有增强生物活性的胰高血糖素类似物的示例性类似物为[Lys^{17,18},Glu²¹]胰高血糖素。Zealand Pharma已在美国专利公开20140080757、2014001733、20130316941、20130157935、20130157929、20120178670、20110293586、20110286982、20110286981和20100204105中公开了大量胰高血糖素类似物。据报告这些类似物对GLP受体的结合亲和力大于胰高血糖素受体,但仍保留胰高血糖素的活性。Zealand Pharma也已开始胰高血糖素类似物治疗低血糖症的临床试验,临床试验名称为ZP4207。美国专利公开20130053310公开了可用于治疗低血糖症的其他胰高血糖素类似物。

[0057] 磷脂表面活性剂是包括鼻粘膜的人体细胞和组织的一部分的生物膜的普遍成分。细胞中最常见的磷脂表面活性剂是磷脂酰胆碱和磷酸胆碱(PC),尽管磷脂酰甘油(PG)也是生物膜的重要成分。也可使用从二酰基PC或PG去除一个酰基而得到溶血磷脂。

[0058] 本发明中可使用的示例性磷脂表面活性剂为十二烷基磷酸胆碱(DPC)、二癸烷基磷脂酰胆碱(DDPC或1,2-二癸烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、溶血磷脂酰胆碱(LLPC或1-二癸酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、二辛酰基磷脂酰胆碱(D8PC或1,2-二辛酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)和二月桂酰磷脂酰甘油(DLPG或1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸(1'-rac-甘油))。

[0059] 优选的磷脂表面活性剂是粉末制剂生产期间使用的浓度下形成胶束、而非双层的表面活性剂。包括DPC、DDPC、LLPC和D8PC,但不包括DLPG。最优选的是DPC。

[0060] 在本发明的特定实施方案中,使用单一类型的磷脂表面活性剂。在其他实施方案中,磷脂表面活性剂组分可由磷脂表面活性剂的混合物组成,包括例如上述确定的表面活性剂的任意两种、三种或四种的组合。

[0061] 如本文所用,术语“环糊精”是指在形成锥形的环中含有六个、七个或八个葡萄糖残基的环糊精,即:

[0062] • α (α)-环糊精:6元糖环分子,

[0063] • β (β)-环糊精:7元糖环分子,

[0064] • γ (γ)-环糊精:8元糖环分子。

[0065] 诺和诺德公司(Novo Nordisk)在临床试验中将 α -CD用于粉末制剂(**HypoGon®**鼻用)(Stenniger等,Diabetologia 1993;36:931-935;Rosenfalk AM等,

Diabetes Res Clin Pract1992;17:43-50)。据报告, α -CD的水溶度约为5wt%。

[0066] 另外两种环糊精,一种水溶度小于 α -CD(β -CD,1.85wt%),另一种水溶度高于 α -CD的HP- β -CD与易溶于水的 γ -环糊精同样也适用于本发明。

[0067] 制剂中的环糊精起到填充剂的作用,其粘附在鼻粘膜表面,有助于胰高血糖素的吸收。在递送到鼻孔后,主要成分(按重量计为90%-70%)即环糊精有助于粉末粘附在粘膜表面。

[0068] 环糊精可单独使用,或以任何两种或多种环糊精的混合物形式使用。

[0069] 在特定实施方案中,根据本方法制备的胰高血糖素粉末制剂包含胰高血糖素、DPC和 β -环糊精。优选地,所述粉末制剂包含胰高血糖素、DPC和 β -环糊精(胰高血糖素:DPC: β -环糊精的重量比=10:10:80)。优选地,所述胰高血糖素以单鼻孔单剂量施用时有有效的治疗量存在。在实施方案中,所述胰高血糖素的剂量约为3mg。

[0070] 可通过包括静态和动态混合的方法进行混合。动态混合可以通过使用插入液体中的叶片、叶片连接在轴上并由电机转动所连接的轴来完成。静态混合可以通过液体流经静态混合器内的曲折路径来完成。在高速混合条件下进行混合时,空气-水界面的存在可能导致起泡。高速混合也可能反过来导致蛋白质因剪切应力而失稳。为了尽量减少泡沫,优选消除泡沫,优选采用低速混合条件。在动态混合的情况下,速度由搅拌器的每分钟转数(rpm)确定。优选的rpm值在50-300,更优选在50-250,甚至更优选50-100。

[0071] 干燥第二过滤产物以去除溶剂并留下固体产物。干燥可通过冷冻干燥、喷雾干燥、托盘干燥或其他技术进行。所述产品的宏观物理特性因干燥技术而异,冷冻干燥出来的可能是片状固体或干燥的固体饼状物。

[0072] 水分含量过高的粉末可能会变得粘稠,并形成团块,从而导致粉末灌装至施用装置的操作困难。重要的是,残余含水量的水平对稳定性有直接影响。与残留水分含量低于5%的粉末相比,散装粉末中残留水分含量超过5%会导致稳定性降低。因此,在特定实施方案中,根据本发明制备的粉末制剂优选具有低于5%的残余水含量。

[0073] 在特定实施方案中,根据本发明制备的粉末制剂中的酸量低于10%w/w,优选低于6%w/w。

[0074] 适于鼻腔施用的粉末要求允许充分流动性的物理特性,以便将粉末灌装到鼻腔给药装置中。流动性由各种参数决定,包括粒径、形状、密度、表面质地、表面积、密度、内聚力、附着力、弹性、孔隙率、吸湿性和脆性。

[0075] 可通过加工散装粉末以去除过小或过大的颗粒来生产具有适当粒径和流动性特征的粉末。去除过小或过大颗粒的散装粉末加工方法可包括研磨散装粉末以粉碎较大颗粒和筛分以分离出所需粒径范围的颗粒。可采用各种筛分方法,包括抛掷式筛分、水平筛分、轻拍筛分、超声筛分和空气圆射流筛分。可以固定标称孔径的单个筛子使用筛子,或可通过一系列孔径逐渐变小的筛子处理散装粉末,以获得所需的粒度分布。筛子可以是标称孔径为25-1000 μ m的编织丝网筛。

实施例

[0076] 实施例1-胰高血糖素粉末制剂的制备-双重过滤步骤

[0077] 通过搅拌将DPC溶解到1M醋酸溶液中。之后,将 β -环糊精添加到DPC溶液中,搅拌直

至溶解,形成第一溶液。使第一溶液通过0.45 μm PVDF过滤器经受第一过滤步骤。将过滤产物(赋形剂溶液)收集到一个新的清洁的罐中,将罐的温度调节到20 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 以确保材料在溶液中的溶解度。一旦达到罐中的目标温度,在搅拌溶液的同时向罐中加入胰高血糖素或胰高血糖素类似物。一旦胰高血糖素出现溶解(通过目视确认),搅拌立即终止。然后通过第二个0.45 μm PVDF过滤器过滤胰高血糖素溶液,并将过滤物料收集在第二个清洁罐中。第二种过滤物料(第二过滤产物)含有97.5%w/w 1M醋酸水溶液、0.25%w/w DPC、2%w/w β -环糊精和0.25%w/w胰高血糖素(按重量计,总固体含量为2.5%w/w)。然后将该物料冻干并进行致密化步骤以制备最终胰高血糖素粉末制剂。

[0078] 对比实施例-胰高血糖素粉末制剂的制备-单次过滤步骤

[0079] 通过搅拌将DPC溶解在1M醋酸溶液(8升)中。在搅拌的同时向溶液中加入胰高血糖素。一旦胰高血糖素溶解(通过目视确认),在搅拌的同时加入 β -环糊精。一旦所有加入的固体看起来已经溶解,则通过0.45 μm PVDF过滤器过滤溶液。如果单个滤膜发生堵塞或污染,可能必须使用多个过滤器。过滤物料含有0.3%w/w DPC、2.4%w/w β -环糊精和0.3%w/w胰高血糖素(总固体含量为3%w/w)。收集过滤物料并冷冻干燥。

[0080] 赋形剂溶液首次过滤后的稳定性

[0081] 所述赋形剂溶液(乙酸、DPC和 β -环糊精)基本上如实施例1所述在2.5%w/w固体浓度下制备。在研究期间,溶液保持在25 $^{\circ}\text{C}$ 。将数据总结在表1中。22小时内含量无显著变化,质量平衡得到确认。

[0082] 表1

[0083]

样品时间,小时	DPC含量(%w/w)	β -环糊精含量(%w/w)
0	0.26	2.02
1	0.26	2.00
2.7	0.26	2.05
3.2	0.26	1.97
7.4	0.25	1.96
22	0.25	1.98

[0084] 含有胰高血糖素的水溶液的稳定性

[0085] 溶液含量测定

[0086] 胰高血糖素溶液基本上如实施例1所述制备(第二过滤产物)。制备后,使胰高血糖素溶液静置、不搅拌。在预先确定的时间采集溶液样品,通过0.45 μm 过滤器之后分析。任何转化为聚集物的胰高血糖素都会通过该过滤步骤去除,因此这种含量测定提供了对聚集程度的估计值。

[0087] 荧光分析

[0088] 荧光法的基础是利用胰高血糖素分子中单一色氨酸残基发射波长的偏移(Pedersen JS., JDiabetes Sci Technol., 2010; 4(6):1357-1367)。当胰高血糖素分子将其构象从无规卷曲或 α 螺旋变为聚集形式时,色氨酸分子的局部环境以发射光谱蓝移的形式改变。因此,通过使用光纤光学耦合后向散射荧光探针监测胰高血糖素发射荧光信号的波长随时间的变化,可以计算非聚集型胰高血糖素与分子聚集型的发射峰比值作为实时监测聚集的工具。

[0089] 胰高血糖素溶液基本上如实施例1所述制备(第二过滤产物)。荧光探针用于监测发射光谱随时间的变化。不搅拌溶液,并在室温下监测24小时。

[0090] 在小规模实验(100毫升)中,在这24小时内未观察到胰高血糖素荧光比值的变化。

[0091] 在进一步的实验中,胰高血糖素溶液基本上如实施例1所述制备(第二过滤产物)并保持在不同的温度下。出于比较目的,将其与未通过第二过滤步骤的胰高血糖素溶液进行比较。结果总结在表2中。

[0092] 表2

[0093] 胰高血糖素溶液过滤和保持温度研究

试验	过滤	保持温度, 时间	搅拌	结果
A	是	20°C, 24 小时	否	胰高血糖素溶液含量无变化
B	是	5°C, 24 小时	否	胰高血糖素溶液含量无变化
C	否	20°C, 24 小时	否	胰高血糖素溶液含量损失; 荧光发射峰比值变化

[0095] 研究结果表明,当胰高血糖素溶液通过第二过滤步骤并在5°C或20°C下不搅拌保持时,胰高血糖素不会通过聚集而从系统中丢失。然而,当溶液未经过滤时,24小时内其胰高血糖素含量损失约8%。

[0096] 基本上如实施例1所述制备的胰高血糖素溶液的化学稳定性也可使用基本上如下文所述的反相HPLC进行测试。

[0097] 在基本上按照上述方法进行的制备中,两次过滤量高达100升(含2.5%w/w固体),令人惊讶的是,在第二过滤步骤后收集的溶液在24小时内保持物理和化学稳定,没有任何可检测的聚集(通过上述一种或多种方法确定)。然而,仅经过一个过滤步骤的胰高血糖素溶液物料(比较实施例-8升和3%w/w固体)在加入胰高血糖素后约15分钟内显示出可见的聚集。

[0098] 鼻用胰高血糖素粉末制剂的HPLC化学稳定性分析

[0099] 使用常规RP-HPLC技术测定根据实施例1制备的鼻用胰高血糖素粉末制剂相对于外部明确定义的参考标准品的稳定性。简单地说,使用HPLC反相柱C18,3.0mm i.d.x 150mm,2.6- μ m粒径,磷酸钾缓冲液:乙腈流动相,紫外检测波长214nm。梯度流动相组成开始时54%,80:20150mM磷酸钾缓冲液:乙腈保持3分钟,然后70%,60:40磷酸钾缓冲液:乙腈组成8分钟,并以该组成终止梯度。

[0100] 在基本上如上所述进行的实验中,如表3所示,根据实施例1(100L)制备的三个不同批次的鼻用胰高血糖素粉末制剂的代表性样品在试验精密度内保留约100%的胰高血糖素活性。

[0101] 鼻用胰高血糖素粉末制剂的效力生物测定

[0102] 利用稳定表达胰高血糖素细胞表面受体和CRE荧光素酶报告基因的胚胎肾细胞系HEK293,测定最终鼻用胰高血糖素制剂产品的相对效力。在这种基于细胞的分析中,来自CRE启动子的荧光素酶的转录通过触发内源性环腺苷酸(cAMP)信号通路的反应来调节。因此,胰高血糖素与细胞表面受体结合,诱导cAMP生成。这导致cAMP反应元件结合蛋白(CREB)

的磷酸化和激活,导致CRE荧光素酶报告基因表达荧光素酶。荧光素酶的产生是通过向反应混合物中加入荧光素底物并使用光度计定量荧光素氧化来定量的。发光信号与荧光素酶的量成正比,荧光素酶的量与用于诱导细胞的胰高血糖素的量成正比。通过比较参考标准品的典型8点剂量-反应曲线与样品的8点剂量-反应曲线,测定测试样品的相对效力。反应数据适用于4参数逻辑模型,以确定参考标准品的 EC_{50} 和样品的 EC_{50} ,这些 EC_{50} 值之间的比值代表试验材料的相对效力。

[0103] 将HEK293细胞接种在96孔细胞培养板的培养基中,培养基为生长培养基(10%胎牛血清(FBS)于Dulbecco改良Eagle's培养基(DMEM),其中含有1.0mg/mL **Genetecin®**和125 μ g/mL潮霉素B。可加入青霉素和链霉素,最终浓度为100单位/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)并在37°C下附着30分钟至2.5小时。清洗生长培养基,并替换以含有0.25%FBS(在DMEM中)和0.5%牛血清白蛋白、1倍青霉素/链霉素和浓度范围为0.00032ng/mL-25ng/mL的胰高血糖素的分析培养基。平板在37°C下培养4.5小时。每个孔加入100 μ L **SteadyGlo®**,然后在环境温度下连续搅拌孔30分钟。用光度计读板。

[0104] 在基本上如上所述进行的试验中,如表3所示,通过基于细胞的分析测得的胰高血糖素相对效力百分比在94%-102%之间,表明在根据实施例1(100L)制备制剂的过程中未发生聚集。这些结果与使用相同参考标准品的胰高血糖素化学分析结果相当。

[0105] 鼻用胰高血糖素粉末制剂的杂质分析

[0106] 使用常规RP-HPLC技术对鼻用胰高血糖素粉末制剂中的潜在杂质进行鉴定和定量。杂质可能由于生产工艺或最终制剂中物料的化学分解产生。所述方法是基于USP41-NF36中概述的条件。该分析表明了胰高血糖素粉末制剂的稳定性。

[0107] 在基本上如上所述进行的试验中,如表3所示,批放行时的总杂质水平范围为约0.4%-约0.56%。此外,根据实施例1制备的鼻用胰高血糖素粉末制剂所提出的长达约24个月的货架期质量标准分析的总杂质水平约为20%(a/a)或更低。令人惊讶的是,鼻用胰高血糖素粉末制剂的总杂质水平显著低于市场上当前胰高血糖素应急试剂盒的建议水平,当前USP专论(USP41-NF36)规定存在的总杂质和相关化合物的限值不超过31%(a/a)。

[0108] 表3

[0109] 鼻用胰高血糖素粉末制剂化学稳定性、生物测定和杂质分析

批号#	胰高血糖素化学含量测定(%)	胰高血糖素生物测定(%相对效力)	总杂质(%)
1	103.1	102	0.40
2	101.1	94	0.39
3	102.1	97	0.56

[0110] 上述数据是装入鼻腔递送装置中然后取出的粉末制剂批次数据。

[0112] 鼻用胰高血糖素粉末制剂的临床功效

[0113] NCT03339453临床试验研究(Suico等人,EASD-2008;摘要150)研究了使用实施例1两步过滤工艺的大规模质量控制生产批次的鼻用胰高血糖素粉末制剂的临床功效。简单地说,在成人1型糖尿病患者中,在胰岛素诱导的受控低血糖期间,比较了鼻用胰高血糖素粉

末制剂 (NG) 与肌肉胰高血糖素 (IMG) 的功效和安全性。将所述鼻用胰高血糖素粉末制剂包装到装置中,以3.0mg的剂量递送至一个鼻孔。

[0114] 如表4所示的结果表明,100%的患者成功地进行了NG或IMG治疗,并且在本研究中NG活性与IMG活性相当。

[0115] 表4

	主要功效分析	
	IGBI (TID) (N=66) ^a	
	NG 3 mg	IMG 1 mg
[0116] 治疗成功 - n (%)	66 (100%)	66 (100%)
治疗差异 (双侧 95%置信限) ^b	0% (-1.5%, 1.55) ^c	
符合胰高血糖素标准- n (5)		
(i) ≥ 70 mg/dL (3.9 mmol/L)	66 (100%)	66 (100%)
(ii) 从最低点升高 ≥ 20 mg/dL (1.1 mmol/L)	66 (100%)	66 (100%)
(i)和(ii)均符合	66 (100%)	66 (100%)

[0117] ^a功效分析人群由接受两个剂量研究药物且血糖浓度合格的所有患者组成。

[0118] ^b差异计算为 (IMG成功百分比) - (NG成功百分比), 非劣效性

[0119] ^c连续性调整的Wald方法的双侧95%置信区间 (CI)

[0120] 序列

[0121] (SEQ ID NO:1)

[0122] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr

序列表

<110> 伊莱利利公司

<120> 稳定的肽制剂的制备方法

<130> X21945

<150> 62/839246

<151> 2019-04-26

<160> 1

[0001]

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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
			20					25				