



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I451876 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：098117491

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 26 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)* *A61K38/28 (2006.01)*
C07K14/62 (2006.01) *A61P3/10 (2006.01)*

(30)優先權：2008/06/13 美國 61/061,281
 2008/12/10 美國 61/121,394

(71)申請人：美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)
 美國

(72)發明人：比爾斯 約翰 麥可 BEALS, JOHN MICHAEL (US)；卡勒 高登 巴勒 二世
 CUTLER, GORDON BUTLER JR. (US)；漢森 雷恩 約翰 HANSEN, RYAN JOHN
 (US)；李翔 LI, SHUN (US)；張連山 ZHANG, LIANSHAN (US)；道爾 布蘭登
 DOYLE, BRANDON (US)；席朗尼 沙赫里耳 SHIRANI, SHAHRIAR (CA)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

EP 1172114A2 US 4179337A
 US 6890518B2 WO 2006097521A1
 WO 2008015099A2

Holleman et al. "Drug therapy-Insulin lispro" NEW ENGLAND JOURNAL
 OF MEDICINE, 337(176-183), 1997

Hinds et al. "Effects of PEG conjugation on insulin properties"
 ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 54(505-530), 2002.

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：2 共 0 頁

(54)名稱

聚乙二醇化之離脯胰島素化合物

PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS

(57)摘要

本發明係關於糖尿病領域。更特定言之，本發明係關於聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，其經高分子量聚(乙二醇)聚乙二醇化，於生理 pH 高度可溶，具有延長之作用期間及小於 2 之峰-谷比。本發明亦關於提供該等分子之方法，含有該等分子之醫藥組合物，及其治療用途。

The present invention relates to the field of diabetes. More particularly, the invention relates to PEGylated insulin lispro compounds that are PEGylated with high molecular weight poly(ethylene glycol), are highly soluble at physiological pH, have an extended duration of action, and peak-trough ratios of less than 2. The invention also relates to methods of providing such molecules, to pharmaceutical compositions containing them, and to their therapeutic uses.

(無元件符號說明)

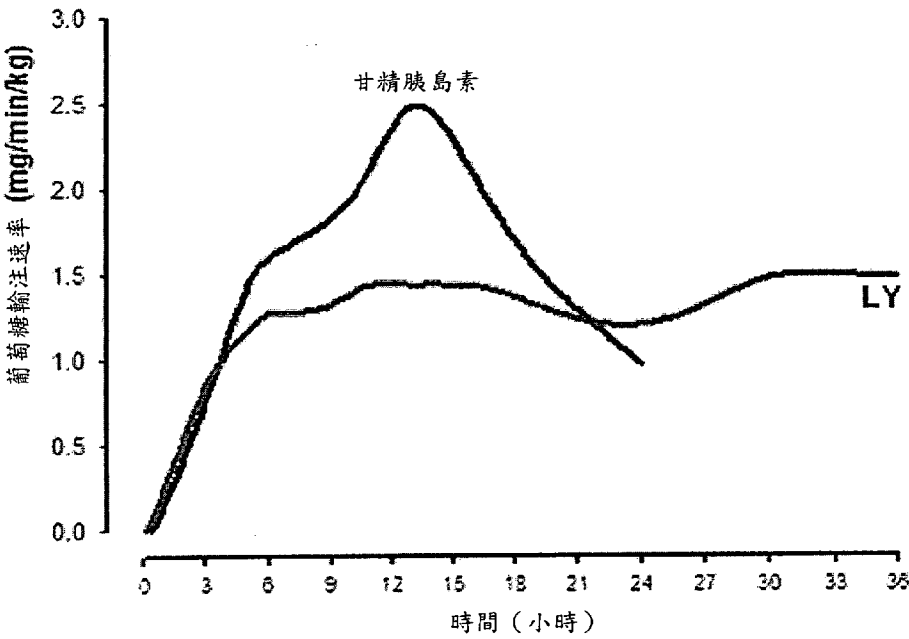


圖2

公告本 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98117491

※ 申請日：98.5.26

※ IPC 分類：~~C07K~~ A61K

一、發明名稱：(中文/英文)

聚乙二醇化之離脯胰島素化合物

PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS

二、中文發明摘要：

本發明係關於糖尿病領域。更特定言之，本發明係關於聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，其經高分子量聚(乙二醇)聚乙二醇化，於生理 pH 高度可溶，具有延長之作用期間及小於 2 之峰-谷比。本發明亦關於提供該等分子之方法，含有該等分子之醫藥組合物，及其治療用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to the field of diabetes. More particularly, the invention relates to PEGylated insulin lispro compounds that are PEGylated with high molecular weight poly(ethylene glycol), are highly soluble at physiological pH, have an extended duration of action, and peak-trough ratios of less than 2. The invention also relates to methods of providing such molecules, to pharmaceutical compositions containing them, and to their therapeutic uses.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於糖尿病領域。更特定言之，本發明係關於高度可溶且具有延長之作用概況之聚乙二醇化的離脯胰島素化合物、提供該等分子之方法、含有其之醫藥組合物，及該等化合物之醫療用途。

【先前技術】

為了達到正常血糖，將胰島素替代療法設計成儘可能緊密類似於正常個體體內之內源性胰島素分泌之模式。對胰島素之每日生理需求波動不定且可分為兩個階段：(a)需要胰島素脈衝來處理進餐相關血糖猛增之吸收階段及(b)需要持續量之胰島素來調節肝葡萄糖排出量以維持最佳空腹血糖之吸收後階段。因此，糖尿病之有效胰島素療法一般包括組合使用兩種類型之外源性胰島素調配物：藉由快速注射所提供之短效餐時胰島素，及藉由每日注射一或兩次所投與之長效胰島素以控制餐間之血糖含量。

目前可利用之胰島素替代療法在一或多個臨床重要方面存在不足。舉例而言，諸如基礎胰島素類似物地特胰島素(insulin detemir)之傳統中效及長效胰島素調配物具有不足以在每日投與時提供全天之基礎葡萄糖控制之活性持續時間。因此，基礎胰島素之持續作用時間時常不足以經由單一每日注射適當地控制高血糖症及尤其吸收後階段之需要。此外，現行療法之單一注射之疏忽會引起藥物之「峰谷比」水準顯著增加，導致葡萄糖控制減弱。此外，利用

延長傳統中效及長效胰島素調配物(例如赫氏中性魚精蛋白(Neutral Protamine Hagedorn, NPH)胰島素及ULTRALENTE[®]之結晶懸浮液)之胰島素釋放之不溶性策略或甘精胰島素(insulin glargine)之活體內沈澱策略增加個體內變異性，導致劑量-反應曲線之變異性增加。更特定言之，NPH及ULTRALENTE[®]懸浮液需要機械混合以確保產物均一性，使個體內變異性增加，且傾向於峰值而非提供為維持餐間長時間之最佳空腹血糖所需之理想的「平坦」藥效學概況。因此，依靠不溶性狀態來延長胰島素釋出之胰島素調配物固有地比可溶性調配物難以預測且導致對血糖之控制不夠及更易受危急生命之低血糖事件影響。另外，現代基礎胰島素類似物不易與短效或中效胰島素調配物混合。因此，現行胰島素替代療法仍使得糖尿病患者易受危急生命之低血糖事件、糖尿病之嚴重長期醫學併發症影響且/或強加於患者相當大之不便及生活品質損失。

名稱為「Non-Immunogenic Polypeptides」之美國專利第4,179,337號揭示與具有約500 Da至約20,000 Da之間分子量之線性PEG分子結合之胰島素。Hinds及Kim揭示與低分子量(600 Da、750 Da及2000 Da)單甲氧基聚(乙二醇)結合之胰島素(Hinds, K.D., 及Kim等人, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:505-530 (2002))。該等著者在彼文中論述，「因為[先前]發現較高分子量mPEG(5000 Da)之連接顯著降低結合物之生物活性」，所以其將其研究限於低分子量mPEG胰島素結合物。PCT國際專利申請公開案第WO 2006/079641

揭示胰島素衍生物(包含離脯胰島素)與小分枝聚合物之結合。PCT國際專利申請公開案第WO 2004/091494號尤其揭示與分別具有高達約10 kDa及約20 kDa之PEG總分子量之線性及分枝PEG分子結合的胰島素分子。PCT國際專利申請公開案第WO 2008/015099號(2008年2月7日公開)及WO 2008/084051(2008年7月17日公開)尤其揭示與具有約200 Da至約40,000 Da範圍內之標稱分子量之PEG分子結合的多種胰島素類似物。

顯然，仍急需更適用於基礎胰島素替代療法之長效型胰島素。詳言之，需要如下可溶性基礎胰島素：可與膳食胰島素調配物混合，具有延長之時間作用概況(亦即，能夠經由每日一次或更小頻率注射適當地控制血糖含量)、更平坦之活性概況(亦即，更低「峰谷」比)、減少之患者內變異性(亦即，更可預測之時間作用概況，解釋為減少之低血糖症發病率及/或體重增加)及/或注射後更少之注射部位刺激或疼痛。

【發明內容】

在本文中，本發明報導如下發現：離脯胰島素可經高分子量聚(乙二醇)衍生物聚乙二醇化以提供具有治療上有效之基礎胰島素活性、延長之時間作用概況、於生理pH值下高度可溶且/或可與其他常用膳食胰島素調配物混合的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物。

本發明之一例示性態樣包含一種下式I之化合物：

P-[(A)-(B)]或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

A為離脯胰島素之A鏈(SEQ ID NO: 1)；

B為離脯胰島素之B鏈(SEQ ID NO: 3)；且

P為具有約20 kDa至約40 kDa範圍內之分子量的PEG，且其中該A與該B適當地交聯且P經由共價鍵直接或間接地連接於A之位置1處之甘胺酸的 α -胺基、B之位置1處之苯丙胺酸的 α -胺基或B之位置28處之離胺酸的 ϵ -胺基。

本發明之第二例示性態樣包括包含式I之單聚乙二醇化合物及二聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的組合物。在一或多個特定實施例中，本發明之組合物包含複數種單聚乙二醇化及二聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，其中該組合物中之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中約75%以上為式I之單聚乙二醇化合物。在其他實施例中，本發明之組合物包括式I之單聚乙二醇化之胰島素化合物，其中該組合物中之單聚乙二醇化合物中約50%以上係使PEG直接或間接共價連接於B鏈之位置28處之離胺酸之 ϵ -胺基。

本發明之第三例示性態樣包括包含式I之聚乙二醇化之離脯胰島素及一或多種醫藥學上可接受之防腐劑、等張劑、金屬離子或緩衝液的醫藥組合物。在本發明之某些實施例中，包含式I之聚乙二醇化之離脯胰島素及一或多種醫藥學上可接受之防腐劑、等張劑、金屬離子或緩衝液的醫藥組合物進一步包括治療有效量之胰島素類似物。

本發明之第四例示性態樣包括治療糖尿病(DM)及妊娠性糖尿病之方法，其包含向患者投與治療有效量之包含本

發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的醫藥組合物。

本發明之另一例示性態樣包括本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物用於治療、較佳用於治療糖尿病或高血糖症之用途。

本發明之另一例示性態樣包括本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的用途，係用於製造供治療低血糖或糖尿病之用之藥物。

【實施方式】

本文中使用的縮寫：ACN：乙腈；Boc：第三丁氧基羰基；BSA：牛血清白蛋白；DCM：二氯甲烷；DMF：*N,N*-二甲基甲醯胺；DMSO：二甲亞砜；DTT：二硫蘇糖醇；EDTA：乙二胺四乙酸；Et：乙基；EtOH：乙醇；Fmoc：9-芴基甲氧基羰基；HCl：鹽酸；Da：道爾頓 (Dalton)；kDa：千道爾頓。Lilly：Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN)；mAb：單株抗體；Me：甲基；MeOH：甲醇；PBS：磷酸鹽緩衝生理食鹽水；RP-HPLC：逆相高效液相層析法；SEC：尺寸排阻層析法；SEM：平均值之標準誤差；SPA：閃爍親近檢定；TFA：三氟乙酸。本揭示案中所使用之所有胺基酸縮寫均為美國專利商標局 (United States Patent and Trademark Office) 所認可、如 37 C.F.R. § 1.822(B)(2) 中所列之彼等縮寫。

術語「胰島素」意欲涵蓋來自任何物種之野生型胰島素，包括(但不限於)豬胰島素、牛胰島素及人類胰島素。天然或野生型胰島素係指胺基酸序列對應於如自然界中存

在之胰島素之胺基酸序列的胰島素。編碼來自諸多不同物種之胰島素之聚核苷酸及胺基酸序列為一般技術者所熟知。舉例而言，人類胰島素具有21個胺基酸A鏈及30個胺基酸B鏈(分別為SEQ ID NO: 1及2)。胰島素可為天然的(亦即，自天然來源分離)、生物合成或合成產生。術語「胰島素」亦意欲包括任何胰島素衍生物及/或胰島素類似物。

「胰島素類似物」或「胰島素衍生物」在本文中定義為具有胰島素活性及與人類胰島素具有大體相同之胺基酸序列的蛋白質，但其與人類胰島素不同之處為相對於人類胰島素之修飾，包括一或多個胺基酸取代、缺失、反轉或添加。該等化合物已熟知於此項技術中。參見例如，PCT國際專利申請公開案第WO 96/15804號及第WO 03/053339號；美國專利第3,528,960號、第5,514,646號、第5,618,913號、第5,750,497號、第6,011,007號、第6,251,856號；及歐洲專利第254,516號及第280,534號。熟習此項技術者已知之胰島素類似物之例示性但非詳盡清單包括門冬胰島素(insulin aspart)、離脯胰島素、甘精胰島素、地特胰島素及格魯辛胰島素(insulin glulisine)。此外，術語「胰島素」在本文中亦涵蓋可視為胰島素衍生物與胰島素類似物之化合物。該等化合物之實例描述於美國專利第5,750,497號及第6,011,007號中。熟習此項技術者已知之該化合物之一特定實例為地特胰島素。

多種胰島素類似物及/或衍生物已知為「速效」或「短

101年9月19日修(變)正換頁

效」胰島素類似物。術語「速效」與「短效」在本文中可互換使用。「短效胰島素類似物」產生：(a)在皮下投與後比人類胰島素更早開始；及/或(b)在皮下投與後呈現比人類胰島素更短之持續作用時間的膳食葡萄糖效應。例示性速效胰島素類似物包括速效「單體胰島素類似物」，因為在生理條件下其一般不易二聚合或自締合。單體胰島素類似物在此項技術中已知。參見例如，美國專利第5,700,662號及歐洲專利第214 826號。離脯胰島素為短效、單體胰島素類似物，其中野生型胰島素B鏈(SEQ ID NO: 2)之位置28處的脯胺酸與野生型胰島素B鏈(SEQ ID NO: 2)之位置29處的離胺酸已交換。因此，離脯胰島素在此項技術中以多種名稱為人所知，包括(但不限於)Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素、LysB28ProB29-人類胰島素及B28Lys, B29Pro人類胰島素。

術語「交聯」意謂半胱胺酸殘基之間存在二硫鍵。舉例而言，適當交聯之人類胰島素含有介於SEQ ID NO: 1之位置7處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 2之位置7處之半胱胺酸之間、SEQ ID NO: 1之位置20處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 2之位置19處之半胱胺酸之間及SEQ ID NO: 1之位置6處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 1之位置11處之半胱胺酸之間的二硫鍵。類似地，適當交聯之離脯胰島素化合物含有介於SEQ ID NO: 1之位置7處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置7處的之半胱胺酸之間、SEQ ID NO: 1之位置20處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置19處之半胱胺酸之間及SEQ

ID NO: 1之位置6處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 1之位置11處之半胱胺酸之間的二硫鍵。

如本文中所使用，「與PEG結合之離脯胰島素」或「聚乙二醇化之離脯胰島素」係指共價連接於至少一個PEG且具有活體內胰島素活性之人類離脯胰島素或其衍生物。

胰島素及離脯胰島素之生物活性已確認。就本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物而言，片語「胰島素活性」欲意謂在至少一種普遍接受之活體內動物模型中顯著降低血糖含量之能力，該模型包括(但不限於)下文分別在實例5及實例6中所述之1型及2型糖尿病的動物模型。因此，胰島素活性包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物在以568 nmol/kg之劑量單一皮下注射後約4小時至至少36小時範圍之期間使經STZ處理之大鼠之血糖含量降低至100 mg/dL或低於100 mg/dL的能力。

術語「聚乙二醇」或「PEG」係指具有或不具有偶合劑或衍生化有偶合或活化部分之聚伸烷二醇化合物或其衍生物。在其典型形式中，PEG為具有末端羥基之線性聚合物且具有式 $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ 。針對以道爾頓描述之分子質量估計PEG中之重複亞單元數目「n」。通常，用於製備聚乙二醇化之化合物的PEG試劑包括PEG聚合物中具有不同數目(n)之乙二醇亞單元之PEG異質混合物。PEG之單個乙二醇亞單元 $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}$ 具有約44道爾頓之分子量。因此，PEG聚合物之分子量視數目(n)而定。連接於本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的PEG具

有約400個至約1000個亞單元範圍內的 n 。較佳地，連接於本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的PEG具有約400個至約750個亞單元範圍內的 n 。更佳地，連接於本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的PEG具有約400個至約550個亞單元範圍內的 n 。最佳地，連接於本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的PEG將具有約400至約500之 n 。

PEG之多種衍生物及製備其及使其與諸如胰島素或離脯胰島素之蛋白質結合的方法在此項技術中已知且適用於本發明中。參見例如，PCT國際專利申請公開案第WO 01/62827號、第WO 2006/028745號、第WO 2006/096535號、第WO 2006/036825號；Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995; Veronese等人, *Applied Biochem. and Biotech.* 11:141-152, 1985；及Roberts, M.等人, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002。用於本發明之一種尤其較佳PEG為使聚合物之一端以相對惰性基團(諸如低碳 C_{1-6} 烷氧基)封端的PEG。較佳地，PEG為單甲氧基-PEG(通常稱為mPEG)，其為線性形式之PEG，其中聚合物之一末端為甲氧基($-OCH_3$)。甚至更佳地，用於本發明之PEG為「活化mPEG」，其中線性PEG之一端以甲氧基封端且另一端以反應性基團封端，該反應性基團適合與離脯胰島素或經衍生化之離脯胰島素衍生物上之預定位點偶合以便有利於預定活化mPEG在離脯胰島素分子之特定位點處之聚乙二醇化。

因為PEG通常以分子量在某種程度上變化之PEG化合物之混合物形式產生且使用，所以一般技術者通常藉由描述產生特定聚乙二醇化合物之聚乙二醇化反應中所用之PEG試劑之平均分子量大小來描述連接於化合物之PEG之分子量。在報導平均分子量之許多可行方法中，常用以下三種方法：數量平均分子量、重量平均分子量及Z均分子量。如本文中所使用，片語「平均分子量」意欲指可使用此項技術中熟知之技術來量測的重量平均分子量，該等技術包括(但不限於)基質輔助雷射脫附離子化飛行時間(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight, MALDI-TOF)質譜法、凝膠滲透層析法或其他液相層析技術、光散射技術、超速離心及黏度測定法。重量平均分子量之計算式可以 $\sum(M_i^2 N_i) / \sum(M_i N_i)$ 表示，其中 N_i 為混合物中具有分子量 M_i 之分子的莫耳分率(或數量分率)。數量平均分子量之計算式可以 $\sum(M_i N_i) / \sum(N_i)$ 表示，其中 N_i 為混合物中具有分子量 M_i 之分子的莫耳分率(或數量分率)。重量平均分子量與數量平均分子量之比率稱為多分散性指數(PDI)，且提供分布寬度之粗略指示。適於製備本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的PEG試劑通常具有多分散性(亦即，聚合物之數量平均分子量與重量平均分子量不相等)。較佳地，用於製備本發明之化合物或組合物之PEG試劑的PDI小於約1.1。更佳地，用於製備本發明之化合物或組合物之PEG試劑的PDI小於約1.05。

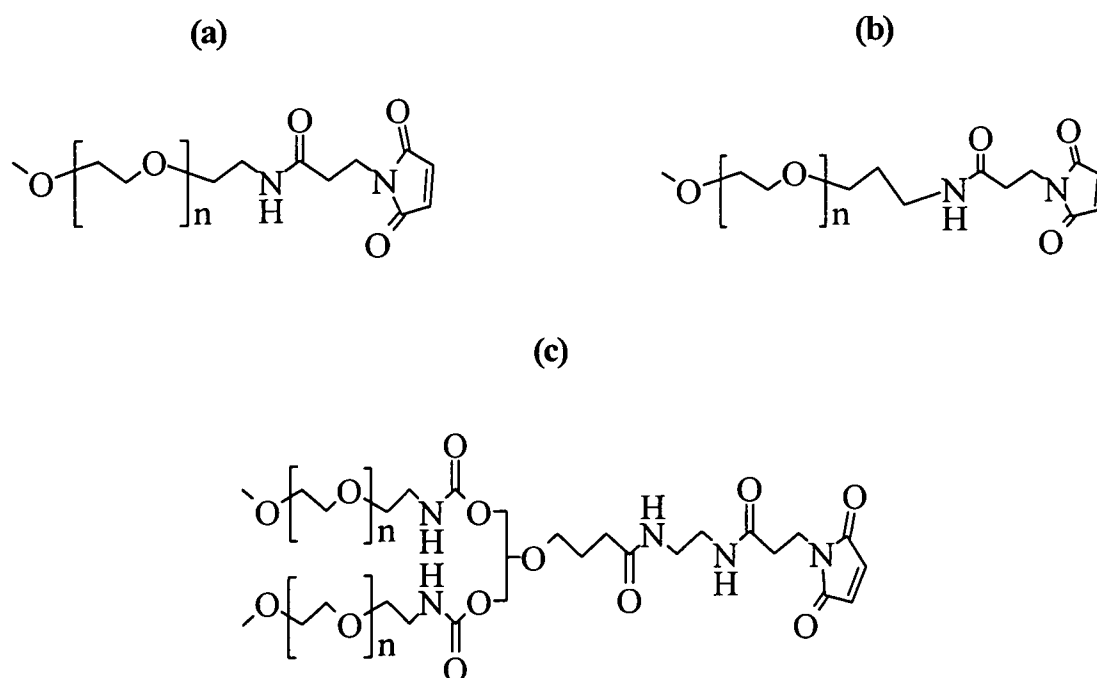
相對於本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，共價

連接於離脯胰島素分子之PEG具有約17.5 kDa至約40 kDa範圍內的分子量(n 在約400至約1000範圍內)或PEG具有約17.5 kDa至約40 kDa之平均分子量。較佳地，共價連接於離脯胰島素分子之PEG具有約20 kDa至約30 kDa範圍內的分子量(n 在約450至約750範圍內)或PEG具有約20 kDa至約30 kDa之平均分子量。更佳地，共價連接於離脯胰島素分子之PEG具有約17.5 kDa至約25 kDa範圍內的分子量(n 在約400至約550範圍內)或PEG具有約17.5 kDa至約25 kDa之平均分子量。最佳地，共價連接於離脯胰島素分子之PEG具有約17.5 kDa至約20 kDa範圍內的分子量(n 在約400至約500範圍內)或PEG具有約17.5 kDa至約20 kDa之平均分子量。

在某些實施例中，本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物係藉由使具有預定平均分子量之活化mPEG共價連接於離脯胰島素來製備。用於使離脯胰島素聚乙二醇化之反應條件視以下因素而變：所用之特定PEG、離脯胰島素上之連接位點、離脯胰島素上作為連接標靶之反應性基團的特定類型、聚乙二醇化之預定程度及其類似因素，且可易由熟習此項技術者判定。用於特定聚乙二醇化策略之最佳實驗條件可易由熟習此項技術者通常藉由常規實驗來判定。

在較佳實施例中，本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物係如下製備：藉由使硫醇選擇性活化mPEG與使用「胺-硫醇」修飾劑(諸如N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫代丙

酸酯 (SATP) 及 N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯 (SATA)) 引入離脯胰島素中之硫醇官能基結合來使具有相對硫醇選擇性之活化 mPEG (諸如 mPEG-順丁烯二醯亞胺 (mPEG-MAL) 或 mPEG-硫醇 (mPEG-SH)) 與離脯胰島素間接結合。更佳地，用於使 PEG 共價連接於離脯胰島素上之硫醇 (硫氫基) 的活化 mPEG 為 mPEG-順丁烯二醯亞胺，諸如以下所示之 (a)、(b) 或 (c)。



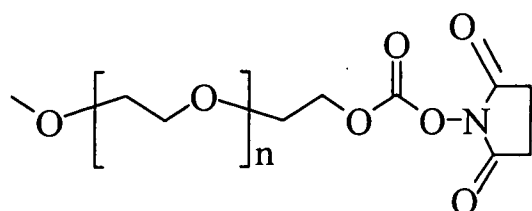
製備本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的較佳方法係利用邁克爾加成反應 (Michael addition) 來形成穩定硫醚鍵。該反應具有高度特異性且於溫和條件下、在其他官能性基團存在下進行。舉例而言，mPEG-順丁烯二醯亞胺適用作製備本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素結合物的活化 mPEG。較佳地，相對於 mPEG-順丁烯二醯亞胺，聚乙二醇化程序使用莫耳過量之硫醇衍生化離脯胰島素以促使

反應完成。較佳地，反應亦在pH值4.0與9.0之間、於室溫下進行1小時至40小時。過量之未聚乙二醇化之含硫醇肽易藉由習知分離方法與聚乙二醇化產物分離。使用活化mPEG-順丁烯二醯亞胺使離脯胰島素聚乙二醇化所需之例示性條件描述於實例1中。

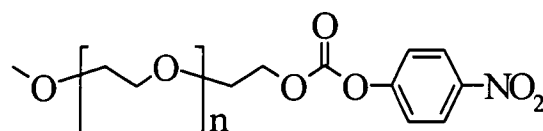
在某些實施例中，本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物係藉由與對於胺具有相對特異性之活化mPEG結合來製備。適用於離脯胰島素之主要胺特異性聚乙二醇化的活化mPEG包括mPEG-丁二醯亞胺丙酸酯(mPEG-SPA)、mPEG丁二醯亞胺丁酸酯(mPEG-SBA)、mPEG-丁二醯亞胺 α -甲基丁酸酯(mPEG-SMB)、mPEG-丁二醯亞胺碳酸酯(mPEG-SC)、mPEG-苯并三唑碳酸酯及mPEG-對硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)。

在本發明之較佳實施例中，用於離脯胰島素之聚乙二醇化的活化mPEG使得離脯胰島素經由水解穩定性共價鍵共價連接於mPEG，該共價鍵諸如醯胺鍵、胺基甲酸酯(亦稱為胺甲酸酯)鍵、胺鍵、硫醚(亦稱為硫化物)鍵或脲(亦稱為碳醯胺)鍵。更佳地，用於離脯胰島素之聚乙二醇化的活化mPEG為mPEG-SC或mPEG-NPC，兩者皆使得離脯胰島素經由胺基甲酸酯(或胺甲酸酯)鍵共價連接於PEG。使用不同分子量之mPEG-NPC使離脯胰島素聚乙二醇化所適用之例示性條件列於實例2中。

mPEG-SC:



mPEG-NPC:



本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物通常使用一或多種純化技術來純化，諸如離子交換層析法、尺寸排阻層析法、親和層析法、疏水性相互作用層析法及/或逆相層析法。樣品中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之總體非均質性(聚乙二醇化反應所產生之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的數目及比例)可使用一或多種以下方法來評估：層析法、電泳、質譜法及尤其MALDI-MS及NMR光譜法。

用於製備本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的離脯胰島素可藉由多種認可之肽合成技術中之任一者來製備，包括液相方法、固相方法、半合成方法及重組DNA方法。舉例而言，美國專利第5,700,662號(Chance等人)及歐洲專利第214 826號(Brange等人)揭示多種胰島素類似物之製備。離脯胰島素之A鏈及B鏈亦可使用重組DNA技術、經由前胰島素樣前驅體分子來製備。在較佳實施例中，使用前胰島素樣前驅體製造用於製造本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素的離脯胰島素。

本發明提供一種下式I之化合物：

P-[(A)-(B)]或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

A為離脯胰島素之A鏈(SEQ ID NO: 1)；

B為離脯胰島素之B鏈(SEQ ID NO: 3)；及

P為具有約20 kDa至約40 kDa範圍內之分子量的PEG，且其中A與B適當地交聯且P經由共價鍵直接或間接連接於A鏈之位置1處之甘胺酸的 α -胺基、B鏈之位置1處之苯丙胺酸的 α -胺基或B鏈之位置28處之離胺酸的 ϵ -胺基。本發明之較佳化合物為彼等化合物，其中(a)P經由胺基甲酸酯鍵或硫醚鍵共價連接於離脯胰島素；且(b)該化合物之特徵為相對於人類胰島素受體具有約30 nM、約20 nM、約10 nM或約5 nM或小於5 nM之 K_i 、在以約568 nmol/kg給藥之經STZ處理之大鼠中具有大於約6小時、約8小時、約10小時、約12小時或約14小時之消除半衰期，或特徵為以約568 nmol/kg之劑量單一皮下注射化合物後約4小時至至少約36小時、約48小時、約60小時、約72小時、約84小時、約96小時、約108小時或約120小時範圍之期間使經STZ處理之大鼠之血糖含量降低至約100 mg/dL或低於100 mg/dL的活性。甚至更佳化合物為彼等化合物，其中：(a)P經由胺基甲酸酯鍵共價連接於離脯胰島素；(b)該化合物之特徵為相對於人類胰島素受體具有約10 nM或小於10 nM的 K_i ；(c)該化合物之特徵為在以約568 nmol/kg給藥之經STZ處理之大鼠中具有大於6小時之消除半衰期；且(d)該化合物之特徵為以約568 nmol/kg之劑量單一皮下注射化合物後約4小時至至少約48小時、約60小時、約72小時、約84小時、約96小時、約108小時或約120小時範圍之期間使經STZ處理之大鼠之血糖含量降低至約100 mg/dL或低於100 mg/dL

的活性。最佳化合物為彼等化合物，其中：(a)P經由胺基甲酸酯鍵共價連接於離脯胰島素；(b)該化合物之特徵為相對於人類胰島素受體具有約10 nM或小於10 nM的 K_i ；(c)該化合物之特徵為在以約568 nmol/kg給藥之經STZ處理之大鼠中具有大於6小時之消除半衰期；(d)該化合物之特徵為以約568 nmol/kg之劑量單一皮下注射化合物後約4小時至至少約48小時、約60小時、約72小時、約84小時、約96小時、約108小時或約120小時範圍之期間使經STZ處理之大鼠之血糖含量降低至約100 mg/dL或低於100 mg/dL的活性；且(e)該化合物之特徵為在投與0.225 mg/kg之單一非經腸劑量之人類中具有大於約24小時、約30小時、約32小時、約34小時、約36小時、38小時、約40小時或約42小時之消除半衰期。

根據本發明之特徵及原理，本發明之一實施例提供一種單聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，其包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG直接或間接共價連接於離脯胰島素之A鏈之位置1處的甘胺酸之 α -胺基(PEG-GlyA1離脯胰島素)、離脯胰島素之B鏈之位置1處的苯丙胺酸之 α -胺基(PEG-PheB1離脯胰島素)或離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ε -胺基(PEG-LysB28離脯胰島素)。較佳地，該單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG直接或間接連接於離脯胰島素之B鏈之位置1處的苯丙胺酸之 α -胺

基或離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基。更佳地，單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG連接於離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基。最佳地，單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約17.5 kDa、約20 kDa之平均分子量的PEG，該PEG連接於離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基(20 kDa-PEG-LysB28離脯胰島素)。

本發明之其他實施例提供一種單聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，其包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG直接或間接共價連接於離脯胰島素之A鏈之位置1處的甘胺酸之 α -胺基、離脯胰島素之B鏈之位置1處的苯丙胺酸之 α -胺基或離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基。較佳地，該單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG直接或間接連接於離脯胰島素之B鏈之位置1處的苯丙胺酸之 α -胺基或離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基。更佳地，單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約17.5 kDa、約20 kDa、約30 kDa或約40 kDa之平均分子量的PEG，該PEG連接於離脯胰島素之B鏈之位置28處的離胺酸之 ϵ -胺基。最佳地，單聚乙二醇化之離脯胰島素包含具有約20 kDa之分子量、連接於離脯胰島素之B鏈之位置28處之離胺酸之 ϵ -胺基的PEG且該PEG-LysB28-

離脯胰島素之特徵為在投與0.225 mg/kg單一皮下劑量之組合物之人類中具有大於約24小時、約30小時、約32小時、約34小時、約36小時、約38小時、約40小時或約42小時之消除半衰期。

在另一實施例中，本發明提供包含其中PEG連接於不同位點之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物及/或單聚乙二醇化、二聚乙二醇化及三聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物的組合物。根據本發明之例示性組合物為包含一種以上選自由以下各物組成之群之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的彼等組合物：i)PEG-GlyA1離脯胰島素、ii)PEG-PheB1離脯胰島素、iii)PEG-LysB28離脯胰島素、iv)二-PEG-GlyA1PheB1-離脯胰島素、v)二-PEG-GlyA1LysB28-離脯胰島素、vi)二-PEG-PheB1LysB28-離脯胰島素及vii)二-PEG-GlyA1PheB1-離脯胰島素。更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中大於約80%、約85%、約90%、約95%或約97%為式I之單聚乙二醇化之離脯胰島素化合物。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中大於約80%、約85%、約90%、約95%或約97%為單聚乙二醇化之離脯胰島素化合物且總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中少於約20%、約15%、約10%、約5%或約3%為二聚乙二醇化之化合物。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素

化合物之混合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中大於約80%、約85%、約90%、約95%或約97%為PEG-LysB28-離脯胰島素。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中大於約80%、約85%、約90%、約95%或約97%為PEG-LysB28-離脯胰島素且總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中少於約20%、約15%、約10%、約5%或約3%為PEG-GlyA1-離脯胰島素。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中大於約80%、約85%、約90%、約95%或約97%為PEG-LysB28-離脯胰島素，總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中少於約20%、約15%、約10%、約5%或約3%為PEG-GlyA1-離脯胰島素且總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中少於約10%、約5%或約3%為二聚乙二醇化之離脯胰島素化合物。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中約80%為PEG-LysB28-離脯胰島素，約10%為PEG-GlyA1-離脯胰島素，且約10%為二-PEG-GlyA1LysB28-離脯胰島素。甚至更佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中約90%或大於90%為PEG-LysB28-離脯胰島素，約5%或少於5%為PEG-GlyA1-離脯胰島素，且約5%或少於5%為二-PEG-GlyA1LysB28-離脯胰島素。甚至更佳地，本發明之

組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中約90%或大於90%為PEG-LysB28-離脯胰島素，約5%或少於5%為PEG-GlyA1-離脯胰島素，約5%或少於5%為二-PEG-GlyA1LysB28-離脯胰島素且其中該PEG-LysB28-離脯胰島素之特徵為在投與0.225 mg/kg單一皮下劑量之組合物之人類中具有大於約24小時、約30小時、約32小時、約34小時、約36小時、約38小時、約40小時或約42小時之消除半衰期。最佳地，本發明之組合物包括聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之混合物，其中總聚乙二醇化之離脯胰島素化合物中約95%或大於95%為PEG-LysB28-離脯胰島素，約5%或少於5%為PEG-GlyA1-離脯胰島素，且該PEG-LysB28-離脯胰島素之特徵為在投與0.225 mg/kg單一皮下劑量之組合物之人類中具有大於約24小時、約30小時、約32小時、約34小時、約36小時、約38小時、約40小時或約42小時之消除半衰期。

如本文中所使用，術語「鹼性條件」係指聚乙二醇化反應之鹼度。為在離脯胰島素之B鏈之位置28處之離胺酸使離脯胰島素更多選擇性地聚乙二醇化，反應應用大體上去質子化之離脯胰島素之 α -胺基進行。在水性溶劑或共溶劑中，鹼性條件意謂反應在大於7.0之pH值下進行。較佳地，聚乙二醇化反應在約8.5至約11.5之pH值下進行。在有機溶劑中，反應在鹼存在下進行，其中鹼度等於在水中大於或等於10.75之pKa。

本發明亦包括一種製備式P-[(A)-(B)]或其醫藥學上可接

受之鹽之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的方法，其中：

A為離脯胰島素之A鏈(SEQ ID NO: 1)；

B為離脯胰島素之B鏈(SEQ ID NO: 3)；且

P為具有約20 kDa至約40 kDa範圍內之分子量的PEG，且其中A與B適當地交聯且P經由胺基甲酸酯共價鍵連接於B之位置28處之離胺酸的 ϵ -胺基，該方法包含在水性溶劑中、在約8.5至約11.5之間的pH值下及在約25°C與約30°C之間的反應溫度下使B之位置28處之離胺酸的 ϵ -胺基與具有約20 kDa至約40 kDa之間之重量平均分子量之單甲氧基聚(乙二醇)對硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)反應。較佳地，mPEG-NPC與離脯胰島素之比率在約2.5至約5.0之間的範圍內。更佳地，mPEG-NPC之重量平均分子量為約20 kDa。甚至更佳地，反應之pH值維持於約10.5之間且反應於約25°C與約30°C之間進行2小時與約12小時之間。最佳地，PEG：離脯胰島素之莫耳比在約2.5至約4.5之間的範圍內，mPEG-NPC之重量平均分子量為約20 kDa，反應之pH值維持於約10.5與約11.0之間，反應之溫度在25°C與約30°C之間維持約3小時與約6小時之間。

需要時，本發明之具有不同分子量的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物可使用熟習此項技術者已知之各種技術來分離，該等技術包括(但不限於)凝膠過濾層析法及/或離子交換層析法。亦即，可使用凝膠過濾層析法、基於不同分子量(其中差異基本上對應於用於聚乙二醇化反應之PEG的平均分子量)將單聚乙二醇化、二聚乙二醇化及三聚乙二醇

化之離脯胰島素化合物分離。舉例而言，在其中離脯胰島素與具有約20 kDa之平均分子量之活化mPEG結合的例示性反應中，所得反應混合物可含有具有約5,808道爾頓之分子量的未經修飾之離脯胰島素、具有約25,808道爾頓之平均分子量的單聚乙二醇化之離脯胰島素、具有約45,808道爾頓kDa之平均分子量的二聚乙二醇化之離脯胰島素及具有約65,808道爾頓之平均分子量的三聚乙二醇化之離脯胰島素。然而，因為凝膠過濾技術係基於流體動力大小來分離化合物，所以與具有約20 kDa之平均分子量之mPEG結合的單聚乙二醇化之離脯胰島素儘管具有約25,808道爾頓之平均分子量，但在凝膠過濾期間遷移如同約82 kDa之蛋白質。熟習此項技術者預期經約20 kDa平均分子量之mPEG聚乙二醇化的二聚乙二醇化及三聚乙二醇化之物質具有截然不同的遷移或滯留時間，從而容許將其純化及/或量化。

片語「血漿半衰期」係指體內藥物之血漿濃度下降二分之一所用的時間。另一所用術語為「消除半衰期」，其對應於終末(terminal)對數線性消除率。熟習此項技術者瞭解半衰期為隨清除率與分布體積函數變化之衍生參數。在血漿半衰期或消除半衰期中所用的術語「延長」、「較長」或「增加」在本文中可互換使用，且欲意謂在相當條件下測定，測試化合物(例如聚乙二醇化之離脯胰島素)之半衰期相對於參考分子(例如離脯胰島素)之半衰期在統計上顯著增加。

清除率為身體消除藥物能力的量度。當清除率由於例如藥物之修飾而降低時，預期半衰期增加。然而，此相反關係僅在分布體積無變化時正確。終末對數線性半衰期($t_{1/2}$)、清除率(CL)與分布體積(V)之間的有用近似關係由以下方程式表示： $t_{1/2} \sim 0.693 (V/CL)$ 。清除率並非指示多少藥物被移除，而是指示必須完全清除藥物之生物流體(諸如血液或血漿)之體積，以說明消除。清除率係以每單位時間之體積表示。

如本文中所使用，術語「治療」係指對患有糖尿病或高血糖症或其他胰島素投與所針對病狀之患者之處理及護理，以用於對抗或減輕該等病狀之症狀及併發症為目的。治療包括投與本發明之化合物或組合物以預防症狀或併發症之發作，減輕該等症狀或併發症，或消除疾病、病狀或病症。欲治療之患者為哺乳動物，較佳為人類。

式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物可有效治療高血糖症，藉由向有需要之患者投與治療有效量之一或多種式I化合物。如本文中所使用，片語「治療有效量」係指式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或其組合物足以調節患者血糖之量。較佳地，式I之聚乙二醇化之離脯胰島素的治療有效量為約0.01 nmol/kg至約100 nmol/kg。更佳地，治療有效量為約0.01 nmol/kg至約50 nmol/kg。甚至更佳地，治療有效量為約0.01 nmol/kg至約20 nmol/kg。甚至更佳地，治療有效量為約0.01 nmol/kg至約10 nmol/kg。甚至更佳地，治療有效量為約0.1 nmol/kg至約7.5 nmol/kg。甚

至更佳地，治療有效量為約0.1 nmol/kg至約5 nmol/kg。最佳地，治療有效量為約0.5 nmol/kg至約5 nmol/kg。然而，應瞭解聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或包含一或多種聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之組合物之實際上投與量由醫師根據相關情況來判定，該等情況包括正治療之病狀(亦即，高血糖症之病因)；欲投與之聚乙二醇化之離脯胰島素的特定種類或聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之特定混合物；欲共投與之其他藥物、胰島素或其他形式；所選非經腸投藥途徑；個別患者之年齡、體重及反應以及患者症狀之嚴重度。因此，不希望上述劑量範圍以任何方式限制本發明之範疇。

片語「足以調節血糖」意謂將化合物或組合物投與患者產生正常空腹血漿葡萄糖含量。臨床上正常空腹血漿葡萄糖含量為70-110 mg/dL。臨床上正常餐後血漿葡萄糖含量小於140 mg/dL。

已知胰島素結構中之共價化學變化在儲存時發生。此可導致形成活性較小且具潛在免疫原性之分子，諸如脫醯胺產物及較高分子量轉化產物(例如二聚物、寡聚物、聚合物)。Jens Brange, "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994對胰島素之化學穩定性進行了全面研究。儘管胰島素組合物通常儲存於不超過約2-8°C之低溫下，與例如儲存於室溫下相比大大改良存放期，但胰島素產物之存放期主要因隨時間形成可溶性聚集物(二聚物、寡聚物及聚合物)而受損。另外，胰島素產物因震動(例如當攜

帶在患者口袋中時或在運輸期間)而經受不溶性聚集物(原纖維)之形成。將因化學或物理影響而形成該等可溶性及不溶性聚集物之趨勢降低至絕對最小對於胰島素產物之品質而言為必須的。因此，胰島素組合物必須展示可接受之化學及物理穩定性特徵以便治療性使用。

如本文中所使用之術語「穩定性」係指聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之調配物的物理及/或化學穩定性。聚乙二醇化之離脯胰島素調配物的物理不穩定性可由蛋白質分子聚集形成高級聚合物或甚至沈澱物而引起。「穩定」調配物為其中蛋白質之聚集度可接受地得以控制且不會隨時間不可接受地增加之調配物。在本發明之某些實施例中，若聚集度在所觀測之起始物質之聚集度的約1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%或30%內，則聚乙二醇化之離脯胰島素調配物視為在某一時期內具有穩定性。在本發明之某些實施例中，若多肽之生物活性為對起始物質所觀測之活性的至少約99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%或50%，則聚乙二醇化之離脯胰島素調配物視為在某一時期內具有穩定性。

如本文中所使用之術語「化學穩定性」係指在靜態條件下(包括儲存於約2-8°C之低溫或約20-40°C之高溫下)儲存期間聚乙二醇化之離脯胰島素組合物形成可溶性蛋白質聚集物之趨勢。本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的化學穩定性可藉由在某一時期內、在特定條件下(諸如在特定溫度及濕度條件下)測定調配物之分析屬性來量測。

該等可量測之分析屬性包括例如使用尺寸排阻HPLC量測高分子量物質之形成。接著可監測結果且針對預指定參數進行比較。

如本文中所使用，術語「物理穩定性」係指聚乙二醇化之離脯胰島素組合物因對聚乙二醇化之離脯胰島素組合物之物理作用(諸如震動)而形成不溶性蛋白質聚集物之趨勢。本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物在不同溫度下、在不同醫藥調配物中儲存限定期限後的物理穩定性可藉由此項技術中熟知之方法評估，該等方法包括量測樣品之表觀光衰減(吸光度或光學密度)。對光衰減之該量測係關於調配物之混濁度。混濁度係因調配物中之蛋白質或錯合物之聚集或沈澱而產生。評估物理穩定性之其他方法在此項技術中已熟知，包括目測評估粒子之存在或不存在或藉由硫代黃素(Thioflavin)T螢光顯微法偵測原纖維/凝膠形成。

本發明之其他實施例提供適於投與患者、尤其人類之醫藥組合物，其包含治療有效量之式I之至少一種聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑、緩衝液、金屬離子或載劑。該等醫藥組合物通常(但非必定)呈非經腸性且可藉由多種任何技術、使用此項技術中熟知之用於非經腸產物的習知賦形劑、緩衝液、稀釋劑、金屬離子或載劑來製備。

因為本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物極易溶於水，所以本發明之醫藥組合物包含包括以下各者之組合

物：作為主要溶劑之水；總濃度為至少 1 mg/mL、至少 2 mg/mL、至少 5 mg/mL、至少 10 mg/mL、至少 15 mg/mL、至少 20 mg/mL、至少 25 mg/mL、至少 30 mg/mL、至少 35 mg/mL、至少 40 mg/mL、至少 45 mg/mL、至少 50 mg/mL 或大於 50 mg/mL 之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物，及醫藥學上可接受之緩衝液，其中該醫藥組合物具有約 4.0 至約 8.5 之 pH 值。較佳地，本發明之醫藥組合物具有介於約 6.0 與約 8.5 之間的 pH 值。更佳地，本發明之醫藥組合物包含總濃度在約 2.5 mg/mL 至約 60 mg/mL 之範圍內的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及緩衝液，其中該組成物具有約 6.0 至約 8.5 之範圍內的 pH 值。更佳地，本發明之醫藥組合物包含濃度在約 5 mg/mL 至約 50 mg/mL 之範圍內的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及緩衝液，其中該醫藥組合物具有約 6.5 至約 7.5 之範圍內的 pH 值。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含濃度在約 10 mg/mL 至約 40 mg/mL 之範圍內的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及緩衝液，其中該醫藥組合物具有約 6.5 至約 7.5 之範圍內的 pH 值。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含濃度在約 15 mg/mL 至約 40 mg/mL 之範圍內的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及緩衝液，其中該醫藥組合物具有約 7.0 至約 7.5 或約 7.0 至約 8.0 之範圍內的 pH 值。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物進一步包含治療有效量之胰島素。甚至更佳地，該胰島素為胰島素類似物。甚至更佳地，該胰島素類似物為短效胰島素類似物。最佳地，該短效胰島素類似物為離脯胰島素。

術語「緩衝液」係指藉由其酸鹼結合物組份之作用來阻止pH值變化的溶液。較佳地，所用緩衝液為醫藥學上可接受之緩衝液。片語「醫藥學上可接受之緩衝液」係指安全地用於胰島素調配物中且具有將醫藥組合物之pH值控制於預定pH值之作用的溶液。在較佳實施例中，緩衝液具有約6.0至約8.5之範圍內的pH值。更佳地，緩衝液具有約7.0至約8.0之範圍內的pH值。用於將本發明之組成物之pH值控制在此範圍內的醫藥學上可接受之緩衝液包括(但不限於)諸如磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、精胺酸、TRIS及組胺酸緩衝液以及其組合之藥劑。「TRIS」係指2-胺基-2-羥基甲基-1,3-丙二醇及其藥理學上可接受之任何鹽。游離鹼及鹽酸鹽形式(亦即TRIS-HCl)為TRIS之兩種常見形式。TRIS在此項技術中亦稱為三羥甲基胺基甲烷、緩血酸胺及參(羥基-甲基)胺基甲烷。較佳地，本發明之醫藥組合物包含約2.5 mM至約50 mM磷酸鹽或TRIS緩衝液。更佳地，本發明之醫藥組合物包含約5 mM至約20 mM磷酸鹽或TRIS緩衝液。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約5 mM至約10 mM磷酸鹽緩衝液。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約5 mM磷酸鹽緩衝液。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約7.5 mM至約50 mM TRIS緩衝液。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約10 mM至約25 mM TRIS緩衝液。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約15 mM至約20 mM TRIS緩衝液。最佳地，本發明之醫藥組合物包含約16 mM TRIS緩衝液。

本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及組合物可類似地以非經腸投與患者之胰島素的已知配方調配。該等調配物為熟習此項技術者所知。較佳地，式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物係類似地以HUMALOG[®]離脯胰島素或Humulin[®]之配方調配。因此，本發明之較佳醫藥組合物可包括水、式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物、等張劑及醫藥學上可接受之緩衝液。較佳地，本發明之醫藥組合物進一步包含防腐劑。更佳地，本發明之醫藥組合物進一步包含可促進胰島素之六聚合、諸如鋅及/或鈷之二階陽離子。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物進一步包含至少一種六聚物穩定劑。此外，可添加鹽酸及/或氫氧化鈉以調整pH值。

「等張劑」為生理上耐受且賦予調配物合適之張力以防止淨水流穿越與所投與之醫藥組合物接觸之細胞膜的化合物。亦稱為丙三醇之甘油常用作等張劑。其他等張劑包括：i)其他糖醇，諸如(但不限於)甘露糖醇及山梨糖醇；ii)鹽，諸如(但不限於)NaCl；iii)單糖，包括(但不限於)右旋糖；及iv)雙糖，包括(但不限於)乳糖、蔗糖及海藻糖。本發明之醫藥組合物可包括一或多種等張劑。較佳地，本發明之醫藥調配物具有一或多種等張劑，其使得調配物具有約270 mOsm至約330 mOsm範圍內之等張性。更佳地，等張劑為甘油、山梨糖醇、蔗糖、NaCl、海藻糖及/或甘露糖醇。甚至更佳地，等張劑為甘油、山梨糖醇、蔗糖、NaCl及/或海藻糖。甚至更佳地，濃度為約100 mM至約200 mM

之甘油、山梨糖醇、蔗糖、NaCl或海藻糖存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，濃度為約100 mM至約200 mM之甘油存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，濃度為約150 mM至約180 mM之甘油存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，濃度為約130至約175 mM之甘油存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，濃度為約50 mM至約300 mM之NaCl存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，濃度為約100 mM至約200 mM之NaCl存在於本發明之醫藥組合物中。最佳地，濃度為約150 mM之NaCl存在於本發明之醫藥組合物中。

本發明之醫藥組合物亦可含有六聚物穩定化合物。片語「六聚物穩定化合物」係指使本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物在六聚締合狀態下穩定之非蛋白質、小分子量化合物。鈣離子、鋅、鈷、銅、鎳、鐵、鎂、錳、陰離子(尤其氯離子、溴離子、碘離子、硫氰酸根)及酚系化合物(尤其苯酚)、酚系防腐劑、間苯二酚、4'-羥基乙醯苯胺、4-羥基苄醯胺及2,7-二羥基萘為已知用於胰島素分子之六聚物穩定化合物。較佳地，六聚物穩定化合物為苯酚、間甲酚、鄰甲酚、對甲酚、氯甲酚、對羥基苯甲酸甲酯、鈣、氯離子或此等化合物中兩者或兩者以上之組合。更佳地，六聚物穩定化合物為苯酚、間甲酚、鈣、氯離子或其組合。較佳地，本發明之醫藥組合物包含介於約1 mM與75 mM之間的鈣、介於約1 mM與約50 mM之間的鈣、介於約1 mM與約25 mM之間的鈣、介於約5 mM與約50 mM

之間的鈣、介於約 2.5 mM與約 30 mM之間的鈣、介於約 2.5 mM與約 15 mM之間的鈣、介於約 2.5 mM與約 10 mM之間的鈣、介於約 5 mM與約 30 mM之間的鈣、介於約 5 mM與約 15 mM之間的鈣。更佳地，本發明之醫藥組合物包含介於約 2.5 mM與 10 mM之間的鈣。

本發明之醫藥組合物的多用途調配物亦可含有防腐劑。術語「防腐劑」係指添加至醫藥調配物中以充當抗微生物劑之化合物。此項技術中已知在非經腸調配物中有效且可接受之防腐劑為氯苄烷銨(benzalkonium chloride)、苯銨松寧(benzethonium)、雙氯苯雙胍己烷(chlorohexidine)、苯酚、間甲酚、苳醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯丁醇、鄰甲酚、對甲酚、氯甲酚、硝酸苯汞、硫柳汞(thimerosal)、苯甲酸及其各種混合物。諸如對羥基苯甲酸甲酯、苯酚及間甲酚之某些酚系防腐劑已知與胰島素及胰島素樣分子結合且藉此誘發增加物理或化學穩定性或兩者之構形變化(參見例如 Birnbaum, D. T.等人, *Pharmaceutical Res.* 14:25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S.等人, *Biochemistry* 36:5837-5845 (1997))。「酚系防腐劑」包括以下化合物：苯酚、間甲酚、鄰甲酚、對甲酚、氯甲酚、對羥基苯甲酸甲酯及其混合物。本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之調配物中所用的防腐劑可為酚系防腐劑，且可與六聚物穩定化合物相同或不同。較佳地，酚系防腐劑為間甲酚或苯酚。更佳地，本發明之醫藥組合物包含pH 7.0至約pH 8.0、濃度為約 0.1 mM至約 75 mM之苯酚及/或間甲酚作為防腐

腐劑。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約pH 7.0至約pH 8.0、濃度為約1 mM至約60 mM之苯酚及/或間甲酚作為防腐劑。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約pH 7.0至約pH 8.0、濃度為約10 mM至約40 mM之苯酚及/或間甲酚作為防腐劑。甚至更佳地，本發明之醫藥組合物包含約pH 7.0至約pH 8.0、濃度為約30 mM之苯酚及/或間甲酚。最佳地，本發明之醫藥組合物包含約pH 7.3至約pH 7.5、濃度為約30 mM之苯酚及/或間甲酚。

如上文所述，本發明之醫藥組合物可包含促進胰島素六聚合或者使胰島素化合物穩定之二價金屬陽離子，諸如鋅或鈷。「二價金屬陽離子」意謂參與與許多蛋白質分子形成錯合物的離子。過渡金屬、鹼金屬及鹼土金屬為已知與胰島素化合物形成錯合物之金屬的實例。過渡金屬為較佳。較佳地，二價金屬陽離子為一或多種選自由鋅、銅、鈷、鎳、錳、鎂、鎘及鐵組成之群的陽離子。更佳地，鋅為二價金屬陽離子。鋅已知可促進胰島素及各種胰島素類似物及/或衍生物(包括離脯胰島素)之六聚物之形成。諸如鋅或鈷之二價陽離子在本發明之醫藥組合物中的主要作用係在包含本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的醫藥組合物中促進本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物及/或任何其他胰島素或胰島素類似物之六聚物之形成。在酚系防腐劑存在下，可藉由在Zn(II)離子存在下使包含本發明之醫藥組合物之溶液的pH值進入中性區，或藉由在pH值已調整至中性區後添加Zn(II)來促進六聚物形成。較

佳地，鋅與胰島素化合物、胰島素類似物及/或聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之比率以約0.33之下限為界，亦即，每個胰島素六聚物、胰島素類似物六聚物及/或聚乙二醇化之離脯胰島素六聚物有兩個鋅原子。更佳地，鋅與胰島素化合物、胰島素類似物及/或聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之比率為約0.33至約0.67。若存在與蛋白質競爭結合鋅之化合物(諸如檸檬酸鹽或磷酸鹽)，則在此過程中可使用甚至更多鋅。為更強地促進六聚合，可需要高於六聚合所需量之過量鋅，例如約0.33至約0.83之鋅與胰島素化合物、胰島素類似物及/或聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之比率。又，高於六聚所需量之過量鋅可存在於本發明之醫藥組合物中，且可為改良化學及物理穩定性、改良「可懸浮性」及可能進一步延長時間-作用所需的。另一方面，檸檬酸鹽或磷酸鹽緩衝液中之過量鋅可分別引起檸檬酸鋅或磷酸鋅之沈澱以及胰島素之沈澱。

根據本發明，鋅可以每莫耳胰島素、胰島素類似物及聚乙二醇化之離脯胰島素六聚物約0.3莫耳至約3莫耳之量存在於調配物中。更佳地，鋅可以每莫耳總胰島素、胰島素類似物及聚乙二醇化之離脯胰島素六聚物約0.3莫耳至約1莫耳之量存在於本發明之醫藥組合物中。甚至更佳地，鋅可以每莫耳總胰島素、胰島素類似物及聚乙二醇化之離脯胰島素六聚物約0.3莫耳至約0.7莫耳之量存在於本發明之醫藥組合物中。最佳地，鋅可以每莫耳總胰島素、胰島素類似物及聚乙二醇化之離脯胰島素六聚物約0.3莫耳至約

0.55莫耳之量存在於本發明之醫藥組合物中。為本發明提供鋅之鋅化合物可為醫藥學上可接受之任何鋅化合物。將鋅添加至胰島素製劑中在此項技術中已知，將醫藥學上可接受之鋅源添加至胰島素製劑中在此項技術中亦已知。較佳地，鋅以鹽形式提供，諸如硫酸鋅、氯化鋅、乙酸鋅、檸檬酸鋅、氧化鋅或硝酸鋅。

在本發明之另一實施例中，本發明之醫藥組合物進一步包含一或多種界面活性劑。如本文中所使用之術語「界面活性劑」包括藉由吸附於氣-液界面處來減少液體表面張力之藥劑。界面活性劑之實例包括(但不限於)非離子性界面活性劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188)；Triton™(例如™X-100)；聚乙二醇；聚丙二醇；及乙二醇與丙二醇之共聚物(例如泊洛尼克(pluronic)PF68)。舉例而言，界面活性劑可以約0.001-0.5%(例如約0.05-0.3%)之量存在於本發明之醫藥組合物中。較佳地，用於本發明之醫藥組合物中之界面活性劑為泊洛沙姆188。更佳地，界面活性劑為以下濃度之泊洛沙姆188：介於約0.5 mg/mL與約10 mg/mL之間、介於約1 mg/mL與約10 mg/mL之間、介於約2 mg/mL與約10 mg/mL之間、介於約3 mg/mL與約10 mg/mL之間、介於約4 mg/mL與約10 mg/mL之間、介於約1 mg/mL與約5 mg/mL之間、介於約2 mg/mL與約5 mg/mL之間、介於約3 mg/mL與約5 mg/mL之間及介於約4 mg/mL與約5 mg/mL之間。

本發明亦提供一種用於治療較佳人類之低血糖及/或糖尿病的式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

本發明亦提供一種用於製造供治療較佳人類之低血糖及/或糖尿病用之藥物的式I之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

包含根據本發明之聚乙二醇化之離脯胰島素的醫藥組合物可非經腸投與需要該治療之患者。非經腸投藥可藉助於注射器(視情況筆狀注射器或機械驅動注射器)、藉由皮下、肌肉內或靜脈內注射來執行。或者，非經腸投藥可藉助於輸注泵來執行。

製備 1

GlyA1-HSCH₂CH₂CO-離脯胰島素(3)及 LysB28-HSCH₂CH₂CO-離脯胰島素(4)

將各自 1 mmol 之 Trt-SCH₂CH₂CO-OH、N-羥基丁二醯亞胺(NHS)及二異丙基碳化二亞胺(DIC)於 2 mL DMF 中混合 30 分鐘以製備 Trt-SCH₂CH₂CO-NHS 酯。將 1/10 mmol 離脯胰島素溶解於 10 mL 於 DMSO 中之 5% 三乙胺(TEA)中。向溶液中添加 0.2 mmol 活化 Trt-SCH₂CH₂CO-NHS。於室溫下 2 小時後，添加 0.2 mL 乙醇胺以終止反應。接著用 90 mL H₂O 稀釋反應混合物且施加於 RP-C18 管柱上以進行純化。將 LysB28-Trt-SCH₂CH₂CO-離脯胰島素(2)之所要溶離份合並且凍乾。單獨地將 GlyA1-Trt-SCH₂CH₂CO-離脯胰島素(1)之所要溶離份合並且凍乾。將 1/10 mmol(1)或(2)溶解於

含有 0.2 mL 硫代苯甲醚及 0.4 mL 三異丙基-矽烷之 5 mL TFA 中。30 min 後，藉由蒸發移除 TFA 且將殘餘肽溶解於 50 mL 於 H₂O 中之 10% ACN 中。將所得溶液施加於 RP-C18 管柱上以進行純化。將 (3) 或 (4) 之所要溶離份合並且視情況凍乾。

製備 2

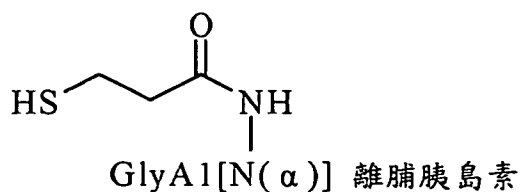
PheB1-HSCH₂CH₂CO-離脯胰島素 (7)

將 1/10 mmol 離脯胰島素溶解於 10 mL 於 DMSO 中之 5% TEA 中。向溶液中添加 DMSO 中之 0.2 mmol 碳酸二-第三丁酯。於室溫下 1 小時後，添加 0.2 mL 乙醇胺以終止反應。接著用 90 mL H₂O 稀釋反應混合物且施加於 RP-C18 管柱上以進行純化。將 Boc-GlyA1, Boc-LysB28-離脯胰島素之所要溶離份合並且凍乾以得到 (5)。將 1/10 mmol (5) 溶解於 10 mL 於 DMSO 中之 5% TEA 中。向溶液中添加 0.2 mmol 活化 Trt-SCH₂CH₂CO-NHS。於室溫下 2 小時後，添加 0.2 mL 乙醇胺以終止反應。接著用 90 mL H₂O 稀釋反應混合物且施加於 RP-C18 管柱上以進行純化。將所要溶離份合並且凍乾以得到 Trt-SCH₂CH₂CO-PheB1, Boc-GlyA1, Boc-LysB28-離脯胰島素 (6)。將 1/10 mmol (6) 溶解於含有 0.2 mL 硫代苯甲醚及 0.4 mL 三異丙基矽烷之 5 mL TFA 中。30 min 後，藉由蒸發移除 TFA 且將殘餘肽溶解於 50 mL 於 H₂O 中之 10% ACN 中。將所得溶液施加於 RP-C18 管柱上以進行純化。將所要溶離份合並且凍乾以得到 (7)。

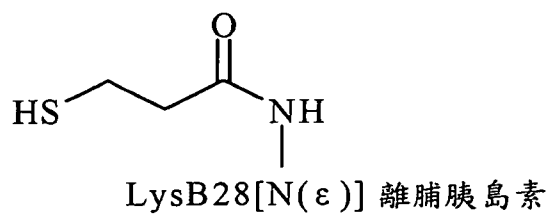
實例 1：硫醇衍生之離脯胰島素中間物之聚乙二醇化

具有約 20 kDa(b)、30 kDa(a)、40 kDa(a)或 60 kDa(c)之平均分子量的單甲氧基-PEG-MAL溶解於 100 mM NH₄Ac 緩衝液(pH 4.69)與 ACN 之 1:1 混合物中。將硫醇衍生之離脯胰島素之凍乾粉末(例如化合物(3)、(4)或(7))添加至溶液中。可藉由分析 RP-HPLC 追蹤反應。當反應完成時(通常約 4 小時後)，用 H₂O 稀釋混合物且施加於 RP-HPLC 管柱上以進行純化。將所要溶離份合並且凍乾以得到聚乙二醇化之離脯胰島素化合物。如實例 1 中所述製備之例示性聚乙二醇化之離脯胰島素化合物在下文以 (8(a))、(8(b))、(9(a))、(9(b))、(10(a))、(10(b))及 (15(c))顯示。較佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有約 400 至約 1000 之範圍內的 *n*。更佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有約 400 至約 750 之範圍內的 *n*。更佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有約 400 至約 550 之範圍內的 *n*。甚至更佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有約 400 至約 500 之 *n*。甚至更佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有約 450 至約 500 之 *n*。最佳地，此等聚乙二醇化之離脯胰島素化合物將具有約 450 之 *n*。

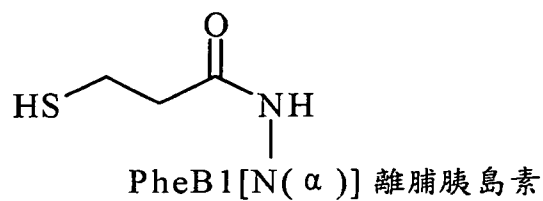
(3)



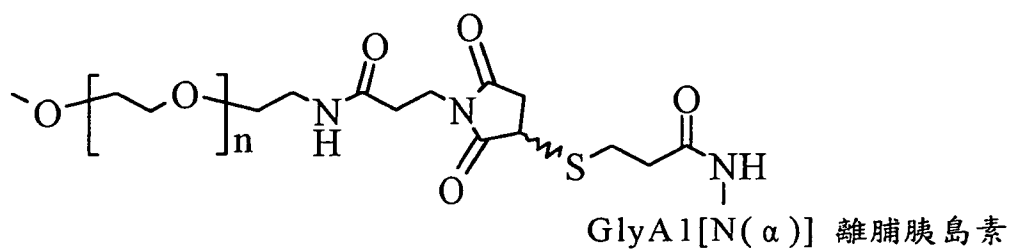
(4)



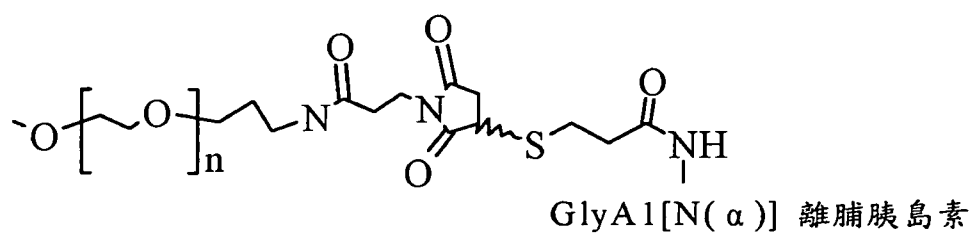
(7)



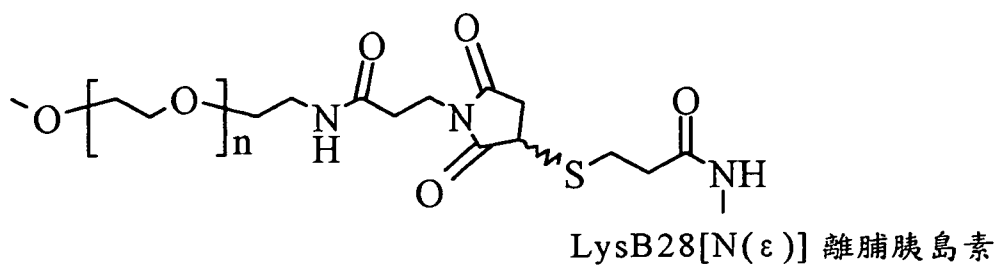
(8(a))



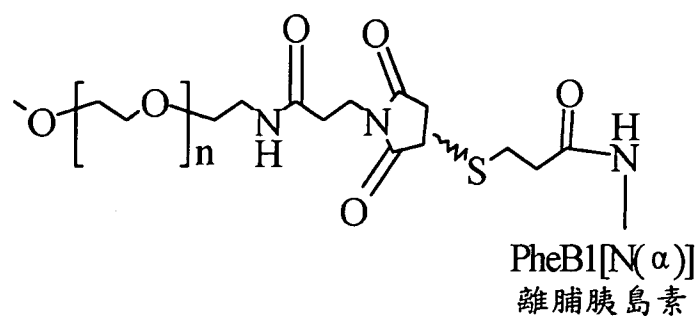
(8(b))



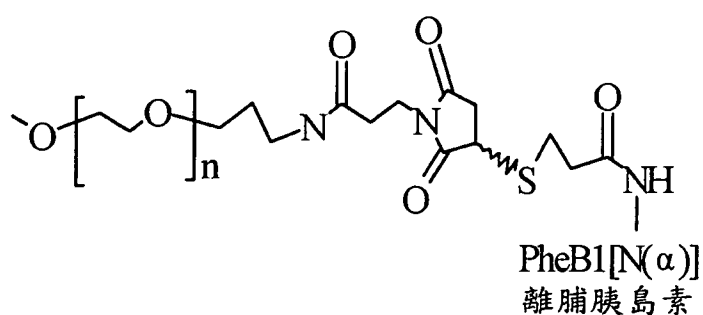
(9(a))



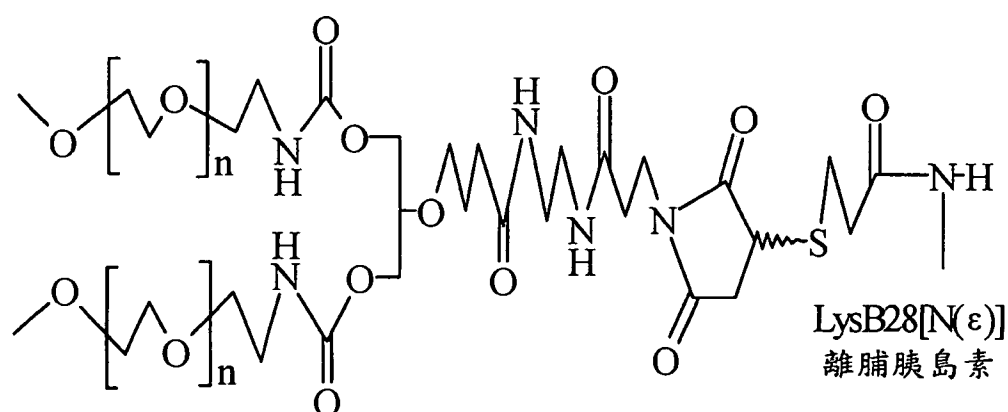
(10(a))



(10(b))



(15(c))



實例 2：使用單甲氧基聚(乙二醇)對硝基苯基碳酸酯
(mPEG-NPC)使離脯胰島素聚乙二醇化

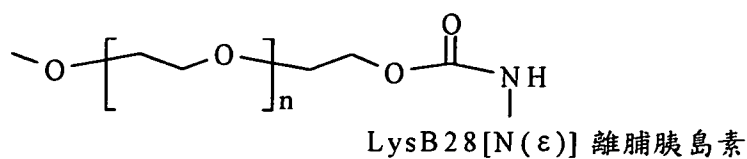
將 1/10 mmol 離脯胰島素溶解於 20 mL 0.2 M 硼酸鹽緩衝液 (pH 10.5) 中，且在強烈攪拌下將 1.98 g 具有約 20 kDa 之

平均分子量、於 20 mL ACN 中之 mPEG-NPC 添加至溶液中。藉由 RP-HPLC 以及 SEC 監測反應。約 4 小時後，使用乙酸將反應混合物酸化至 pH 5-7 且施加於 RP-HPLC 管柱上以進行純化。將所要溶離份合並且凍乾以得到 20% 至 45% 範圍內之產率之單聚乙二醇化之 PEG20K-離脯胰島素。藉由 RP-HPLC、SEC 及 MALDI-MS 證明身分及純度。連接於 A 鏈或 B 鏈上之 mPEG 的比率係藉由所得結合物經參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽 (TCEP) 處理後所釋放之游離 A 鏈及 B 鏈之面積積分來測定。mPEG-NPC 與離脯胰島素之比率決定單聚乙二醇化及二聚乙二醇化之物質之產物分布。反應 pH 值控制聚乙二醇化之位點特異性。當 pH 值由約 8 增加至約 12 時，化合物(11)變成主要產物。當於 pH 10.5 下用具有約 20 kDa 之平均分子量的 mPEG-NPC (n 為約 450) 進行反應時，(11) 與 (12) 之比率為約 85:15。

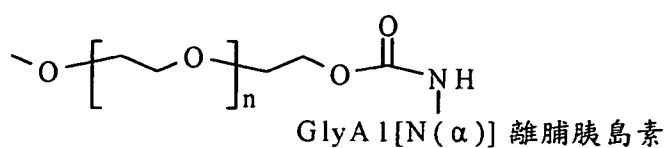
上述聚乙二醇化反應亦可藉由連續添加 0.2 M NaOH 維持反應混合物之 pH 值而於非緩衝性水溶液中進行。當使用具有約 20 kDa 之平均分子量的 mPEG-NPC 於非緩衝性水溶液中進行、同時使 pH 值維持於約 pH 11.5 時，聚乙二醇化反應產物包括比率為約 92:8 之 (11) 及 (12)。

較佳地，化合物(11)具有約 400 至約 1000 之範圍內的 n 。更佳地，化合物(11)具有約 400 至約 750 之範圍內的 n 。甚至更佳地，化合物(11)具有約 400 至約 550 之範圍內的 n 。甚至更佳地，化合物(11)具有約 400 至約 500 之 n 。甚至更佳地，化合物(11)具有約 450 至約 500 之 n 。最佳地，化合物(11)具有約 450 之 n 。

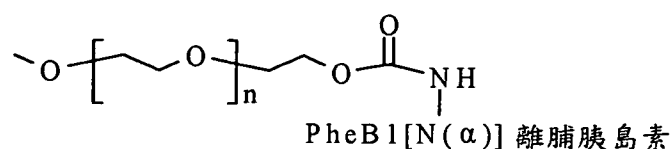
(11)



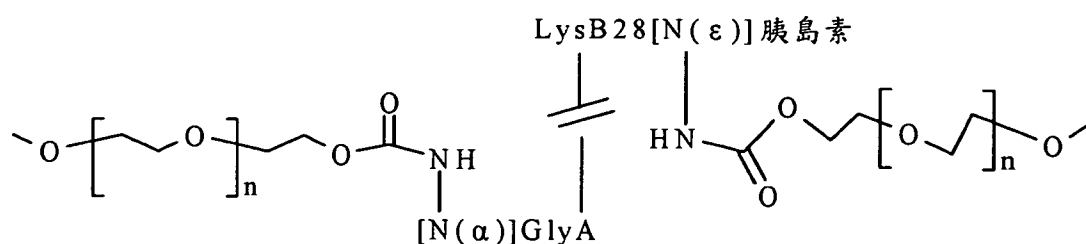
(12)



(13)



(14)



實例3：活體外受體親和力

對過度表現人類胰島素受體(hIR)或人類IGF-1受體(hIGF-1R)之穩定轉染之293 EBNA HEK細胞所製備的P1膜執行受體結合檢定。經由競爭性放射性配體結合檢定，使用人類重組(3-[¹²⁵I]碘酪胺鹽基A¹⁴)胰島素(2000 Ci/mmol)或人類重組[¹²⁵I]胰島素樣生長因子1(2000 Ci/mmol)測定結

合親和力。該檢定係用SPA方法，使用經PVT PEI處理之A型小麥胚芽凝集素偶合之SPA珠粒執行。所有試劑製備均使用SPA檢定緩衝液(50 mM TRIS-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% BSA)。使用Freedom/Evo自動儀(Tecan)製備化合物於檢定緩衝液中之三倍連續稀釋液(100 nM至2 pM)，添加至配有Multimek(Beckman Coulter)之96孔透明底白色微定量盤(Corning/Costar)中。使用自動液體分注儀器(multi-drop instrument; Titertek)添加放射性配體、膜及SPA珠粒。於室溫培育10小時後，使用Microbeta Trilux閃爍計數器測定放射活性。未標記之離脯胰島素及未標記之IGF-1分別作為陽性對照物及陰性對照物包括於各實驗中。經由4參數邏輯非線性回歸分析測定 IC_{50} 值。基於方程式 $K_i = IC_{50} / (1 + D / K_d)$ ，由 IC_{50} 值計算親和常數(K_i)，其中D等於實驗中所用之放射性配體之濃度， K_d 等於經由飽和結合分析所測定之放射性配體之平衡結合親和常數(hIR及hIGF-1R之 K_d 分別為0.124 nM及0.130 nM)。下文所報導之幾何平均 K_i 為 $10^{(\text{平均 Log } K_i)}$ ，其中平均 $\text{Log } K_i = (K_{i1} + K_{i2} + K_{i3} \dots K_{in})$ 之平均，獨立實驗之數目(n)大於2。然而，當下文述及人類IGF-1時， n 為2。

在上述hIR結合檢定中，如實例1中所述製備之以下聚乙二醇化之離脯胰島素化合物具有小於30 nM之幾何平均 K_i ：使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物10(a)、使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物8(a)、使用具有約60 kDa之

平均分子量之分枝mPEG-MAL所製備的化合物15(c)、使用具有約30 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物9(a)、使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物9(a)、及使用具有20 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物9(b)。在hIR及hIGFR結合檢定中，使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的化合物9(a)分別具有 $3.07 \text{ nM} \pm .32 \text{ nM} (\pm \text{S.E.M}; n=6)$ 及大於 84.3 nM (SEM=未測定； $n=6$)之幾何平均 K_i 。另外，在上述hIR結合檢定中，如實例2中所述使用40 kDa、30 kDa或20 kDa之線性mPEG-NPC所產生之非均質聚乙二醇化之離脯胰島素產物亦具有小於30 nM之幾何平均 K_i 。在上述hIR結合檢定中，離脯胰島素具有 $0.22 \pm .072 \text{ nM} (\pm \text{SEM}; n=4)$ 之幾何平均 K_i 。在上述hIGFR結合檢定中，所有上述化合物均具有大於75 nM之幾何平均 K_i 且人類IGF-1具有 $1.51 \pm .23 \text{ nM} (\pm \text{SEM}; n=2)$ 之幾何平均 K_i 。

此等資料顯示聚乙二醇化位置B28使hIR親和力降低約10倍，從而使離脯胰島素之此等聚乙二醇化物質成為hIR之弱促效劑。聚乙二醇化之離脯胰島素物質亦具有不可量測之IGFR-1結合性質。

實例4：使用胰島素受體磷酸化全細胞檢定評估聚乙二醇化之離脯胰島素之效能

可使用DELFI[®]A(市面上有售之一種非均質時差式螢光檢定方法(Perkin-Elmer))評估本發明之聚乙二醇化之離脯

胰島素化合物之功能活性。簡言之，使過度表現人類胰島素受體之293HEK細胞受胰蛋白酶作用且在塗有聚-D-離胺酸之半面積Costar 96孔組織培養盤中以60,000個細胞/孔塗於無血清培養基(SFM)(具有0.1%脂肪酸、無BSA之DMEM)中。將細胞培養盤在CO₂恆溫箱中、於37°C下培養隔夜。在使用Costar 1/2面積黑色96孔微滴定盤前夜，亦製備抗胰島素受體A鏈mAb 8314捕獲盤，於4°C下用30 μL於10 mM碳酸鈉中稀釋至1 μg/mL之抗胰島素受體A鏈mAb 8314(Soos, M.A.等人 *Biochem J* 235:199-208 (1986)；市面上有售，包括購自Abcam, Inc., Cambridge, MA))處理隔夜。用50 mM TRIS(pH 7.5)、150 mM NaCl及0.1% Tween(TBST)將mAb 8314捕獲盤洗滌4次以移除任何未結合之mAb 8314。接著於4°C下將mAb 8314捕獲盤用TBST中之1% BSA阻斷超過1小時。阻斷後，用TBST將捕獲盤洗滌兩次以移除過量BSA溶液。一旦捕獲盤置於阻斷緩衝液中，即將細胞培養盤自恆溫箱移除且平衡至室溫。將測試化合物連續稀釋於SFM中。為刺激胰島素受體之自體磷酸化，將50 μL經稀釋之測試劑添加至細胞單層中。於室溫下30分鐘後，藉由吸出測試化合物且往回添加50 μL 2×溶解緩衝液(2% NP40、100 mM TRIS(pH 7.4)、300 mM NaCl、具有EDTA之Roche Complete™蛋白酶抑制劑及4 mM鈳酸鹽)來中止反應。於室溫下在溶解緩衝液中30分鐘後，將30 μL溶解物轉移至含有30 μL於10 mM Hepes、140 mM NaCl及0.1% Tween中稀釋至50 ng/mL之鎢-N1-抗磷酸

化酪胺酸PY20-抗體(Eu-N1-PY20)(Perkin Elmer)的經阻斷之捕獲盤中。將此混合物於室溫下培養1小時，隨後用TBST洗滌6次以移除未結合之Eu-N1-PY20及細胞溶解物。在間歇震動下用50 μ L增強溶液(Perkin Elmer)一起培養10分鐘後，產生信號。使用Wallac Victor、使用時差式螢光銷設定來量化磷酸化胰島素受體。磷酸化程度係以針對胰島素之最大刺激劑量(100 nM)之反應之%計算。胰島素類似物之效能係使用劑量反應之四參數擬合法、以EC50劑量計算。在實例4所述之檢定中，如實例1所述製備之具有小於15 nM之EC50的聚乙二醇化之離脯胰島素化合物包括使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的10(a)、使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的9(a)、使用具有約30 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的9(a)及使用具有約20 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備的9(b)。在實例4所述之檢定中，使用線性mPEG-MAL所製備之化合物9(a)具有10.88 nM之EC50。在實例4所述之檢定中，如實例2所述使用具有約40 kDa、約30 kDa或約20 kDa之線性mPEG-NPC所產生的非均質聚乙二醇化之離脯胰島素產物亦具有小於15 nM之EC50。在實例4所述之檢定中，使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備之化合物8(a)與使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備之化合物9(a)之50:50及70:30混合物亦具有小於15 nM之EC50。在相同檢定中，人類胰島素及離脯胰島素分別具有2.3 nM

及 0.7 nM 之 EC50。

資料顯示聚乙二醇化位置 B28 使 hIR 活體外活性降低約 10 至 20 倍，從而使此等聚乙二醇化之離脯胰島素物質成為 hIR 之弱促效劑。聚乙二醇化之離脯胰島素物質亦具有不可量測之 IGFR-1 結合性質。

實例 5：評估 1 型糖尿病大鼠模型中之聚乙二醇化之離脯胰島素之活體內效能及藥物動力學概況

研究開始前三天，以靜脈內方式將 0.5 M 檸檬酸 (pH 4.5) 中之 45 mg/kg 鏈脲佐菌素 (streptozocotin) (STZ) 給與體重為 250-280 g 之十週齡雄性 Harlan 史泊格多利大白鼠 (Sprague-Dawley rat) (Harlan, Indianapolis) 的尾靜脈中。研究開始時，基於體重及血糖將動物分組。研究中僅包括血糖介於 400-550 mg/dL 之間的動物。在研究開始之早晨，動物接受單一皮下注射多種預定劑量之一的測試化合物。定時自尾靜脈抽取雙重複血樣且收集於含有 EDTA 二鈉之管中。用血糖測試儀量測血糖含量。又，經由靜脈血取樣收集血漿且使用市售大鼠胰島素放射免疫檢定來測定血漿中所投與之藥物的含量。計算每隻個別動物之血糖-時間曲線下面積 (mg*h/dL) 且用於四參數邏輯回歸分析以測定 ED50。在此檢定中，依典型劑量反應曲線，使用具有約 40 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備的化合物 9(a)、使用具有約 30 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備的化合物 9(a) 及使用具有約 20 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備的化合物 9(b) 分別具有 241 nmol/kg、138

nmol/kg及69 nmol/kg之效能(ED₅₀)。另外，彼等化合物在以568 nmol/kg單一皮下注射後至少36小時期間能夠使經STZ處理之大鼠的血糖降低至此品系大鼠之正常含量(100 mg/dL或低於100 mg/dL)。另一方面，在上述檢定中，在568 nmol/kg單一劑量後5-6小時期間，地特胰島素使葡萄糖正常化。

除評估藥效學參數外，亦使用雙重複血樣測定測試化合物之大鼠平均藥物動力學參數值。使用模型非依賴性方法(WinNonlin Pro)計算藥物動力學參數。所得藥物動力學參數值顯示與劑量之非線性關係。所報導之值範圍對應於所產生介於所測試之最高劑量(568 nmol/kg)與最低劑量(5.6 nmol/kg)之間的藥物動力學參數值。

使用具有約20 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備之化合物9(b)的藥物動力學結果指示6-12 h範圍內之達最大濃度之時間(T_{max})、0.05-0.14 L/h/kg範圍內之表觀清除速率(CL/F)、0.6-7.2 L/kg範圍內之表觀分布體積(V/F)及8.5-34.5 h範圍內之消除半衰期(t_{1/2})。

使用具有約30 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備之化合物9(a)的藥物動力學結果指示12小時之T_{max}、0.05-0.13 L/h/kg範圍內之CL/F、0.6-2.0 L/kg範圍內之V/F及8.3-11.0 h範圍內之t_{1/2}。

使用具有約40 kDa之平均分子量之線性mPEG-MAL所製備之化合物9(a)的藥物動力學結果指示12-24 h範圍內之T_{max}、0.06-0.2 L/h/kg範圍內之CL/F、1.0-7.5 L/kg範圍內

之 V/F 及 11.1-48.5 h 範圍內之 $t_{1/2}$ 。

當將離脯胰島素以 568 nmol/kg 類似地投與經 STZ 處理之雄性大鼠時，量測到約 1 h 之 $t_{1/2}$ 及約 1.2 L/h/kg 之 CL/F。

當將地特胰島素以 18.9-568 nmol/kg 範圍內之劑量類似地投與經 STZ 處理之雄性大鼠時，觀察到 1.9-3.1 h 範圍內之 $t_{1/2}$ 及約 0.8-1.7 L/h/kg 之 CL/F。

在地特與例示性聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之間，表觀 CL 比率因藥物動力學之複雜性而異，此視用於測定之劑量而定。然而，實例 5 所述之研究指示，在 STZ 誘發性糖尿病大鼠中，與 20 kDa 或 40 kDa PEG 結合之例示性聚乙二醇化之離脯胰島素化合物的表觀清除率比地特慢約 5 倍至 30 倍。

實例 6：評估 2 型糖尿病大鼠模型中之聚乙二醇化之離脯胰島素之活體內持續作用時間及藥物動力學特徵

在單一皮下注射媒劑對照物 (PBS) 或 517 nmol/kg 使用具有約 40 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備的 9(a) 後，評估具有 40 kDa 線性 PEG 之化合物 9(a) 在雄性 ZDF fa/fa 大鼠 (n=4 隻大鼠/組) 中之葡萄糖效應 (glucodynamic) 活性。收集一系列樣品用於藥物動力學與藥效學表徵。將 517 nmol/kg 使用具有約 40 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備的 9(a) 單一皮下投與雄性 ZDF fa/fa 大鼠與持續至少 7 天之統計顯著葡萄糖降低相關 (相對於安慰劑； $p < 0.05$)。亦可檢驗使用具有約 40 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-MAL 所製備之化合物 9(a) 在 7 天期間之暴露量。

實例7：在鈷離子存在下用苯酚對PEG-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-離脯胰島素、離脯胰島素或其混合物(70% PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-離脯胰島素:30%離脯胰島素)進行酚系防腐劑滴定

將PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-離脯胰島素或離脯胰島素溶解於pH 8.0之含有20 mM KSCN及50 mM TRIS-ClO₄之溶液中。以蛋白質含量計，任一種蛋白質之目標濃度為約4 mg/mL($\epsilon_{280}=1.05 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。用1 mL水溶解氯化鈷(41.9 mg)以得到鈷離子濃度為0.176 M之儲備溶液。將鈷儲備溶液之等分試樣(約2 μ L，視蛋白質濃度而定)添加至0.8 mL蛋白質溶液中以使得鈷離子與胰島素六聚物之最終莫耳比等於4。為評估六聚合，於574 nm下監測鈷配位化學構形之失真與酚系防腐劑濃度之關係。詳言之，使用微升等分試樣將濃苯酚溶液(0.564 M)滴定於0.8 mL蛋白質溶液中以使得滴定結束時之最終體積不超過0.84 mL。苯酚之各等分試樣滴定後，將最終溶液攪拌最少20分鐘，且收集400 nm至800 nm之溶液可見光譜。根據胰島素六聚物之His^{B10}部分與兩個二價金屬離子配位，藉由將吸光度除以His^{B10}配位之鈷莫耳濃度(亦即六聚蛋白質濃度乘以2)來將在574 nm下所記錄之吸光度換算為莫耳消光係數。製備PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素與離脯胰島素之70/30混合物(莫耳:莫耳)調配物時，首先混合蛋白質且接著添加鈷，隨後用酚系防腐劑滴定。

在離脯胰島素中，與野生型人類胰島素相比，位置B28處之脯胺酸與位置B29處之離胺酸的天然序列倒置。此倒

置導致B鏈之C-末端的構形變換，從而在空間上阻礙離脯胰島素單體形成二聚物之能力。因此，與野生型人類胰島素相比，二聚物締合常數降低300倍。表I中所示之結果指示，類似於Humalog®中所用之調配條件，在二價金屬離子及酚系防腐劑存在下，PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素可驚人且意外地締合為六聚合錯合物，儘管在離脯胰島素之已減弱(與野生型人類胰島素相比)之二聚域附近存在所結合之6個20 kDa PEG部分。此外，PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素與離脯胰島素之70/30混合物亦展示形成六聚合錯合物之能力，此有助於製備基礎胰島素與短效胰島素之臨時調配物及/或穩定預混合調配物。

表 I：

苯酚 (mM)	ε _{574nm} 離脯胰島素	ε _{574nm} PEG _{20kDa} - B28 _(92.4%) /A1 _(7.6%) -離脯胰島素	ε _{574nm} 70/30混合物
0.0	0	0	0
0.1	181	5	
0.2			42
0.3	259		93
0.4	329		125
0.6	347	26	
0.7	391	45	182
0.9	468		
1.1	514	88	244
1.4	628	146	
1.8	744		399
2.1	765	220	462
2.5	760		
2.8	799	358	535
3.5	826	413	567

4.2	828		600
4.9		392	614
5.6			635
6.3		500	
7.0	812		656
7.7		582	
9.0		596	
10.4		610	676
11.7		630	
13.8	865	648	
17.1		662	707
20.4	886	696	
23.7			736
26.9	903	725	764

實例 8：分析用 Zn、苯酚及/或鈣調配之 PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素之六聚合狀態

胰島素及一些胰島素類似物之化學存放期及使用時穩定性得益於在溶液中形成離散之六聚合錯合物之能力。在二價金屬離子 (Zn^{+2} 或 Co^{+2}) 及酚系防腐劑 (苯酚或間甲酚) 存在下使胰島素或離脯胰島素六聚合之能力減緩 AsnA21 之脫醯胺且隨後使高分子量粒子 (HMWP) 形成減至最少。

為評估 PEG_{20kDa}-LysB28-離脯胰島素形成六聚物之能力，將基於 A_{276nm} = 每毫升 8.6 毫克離脯胰島素或每毫升 38.2 毫克聚乙二醇化之離脯胰島素結合物之起始蛋白質濃度之 PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素 (pH 6.7) 在水中透析隔夜。接著用水稀釋經透析之蛋白質以將蛋白質濃度調整至每毫升 4.6 毫克或每毫升 20.6 毫克聚乙二醇化之蛋白質結合物。製備 pH 7.0 之 4×緩衝儲備溶液，其中磷酸鹽

緩衝液之最終濃度為 40 mM 且間甲酚之最終濃度為 12.8 mg/mL。藉由將氧化鋅溶解於 0.5 mL 1 N HCl 中、接著用水稀釋至 0.097 M 之最終 Zn 濃度來製備氧化鋅儲備溶液。藉由將蛋白質濃度為 4.6 mg/mL 之 450 μ L PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-胰島素與鋅儲備溶液之等分試樣(所添加之鋅儲備溶液之最大總體積 = 2.5 μ L 或相當於每個 PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-胰島素六聚物 4 個鋅離子)及 150 μ L 4 $\times$ 磷酸鹽緩衝儲備溶液混合來製備具有不同鋅濃度(0 至 400 μ M)之溶液樣品用於近 UV 圓二色性分析。必要時將最終 pH 值調整至約 pH 7.0。使用 0.2 cm 樣品池、在 250 nm (對二硫化物變化敏感之區域)下、以近 UV 圓二色現象監測 PEG_{20kDa}-B28_(96%)/A1_(4%)-離脯胰島素或離脯胰島素之六聚締合。繪製平均殘基橢圓率與 Zn 莫耳數/六聚物莫耳數之比率的关系。

表 II 中所示之結果進一步指示，類似於 Humalog® 之調配條件，在二價金屬離子及酚系防腐劑存在下，PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素可驚人且意外地締合為六聚合錯合物，儘管在離脯胰島素之已減弱(相對於野生型人類胰島素)之二聚域附近存在所結合之 6 個 20 kDa PEG 部分。

亦用 CD 熱變性實驗研究六聚合及配體結合對六聚物中有利於測試調配物之 PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-胰島素之熱穩定性的影響。用於熱變性研究之波長為 240 nm，因為發現總體信號變化在 240 nm 下比在 Zn²⁺ 結合研究所用之

250 nm下更大，但總溶液吸光度對於欲獲得之高品質CD資料為足夠低的。收集5°C至約95°C(對於各樣品而言最終溫度略有不同)、240 nm下、1 mm比色管之熱掃描資料，其中掃描速率及資料間距為每分鐘1°C，頻寬為1.5 nm，且回應時間為8秒。熱變性資料可以原始信號(mdeg，於240 nm下)與表觀展開分率(F_{unf})來繪製，表觀展開分率由下式給出： $F_{unf}(T)=[Y_{obs}(T)-Y_{nat}(T)]/[Y_{unf}(T)-Y_{nat}(T)]$ ，

其中 $Y_{obs}(T)$ 為所觀測之隨溫度變化之信號，且 $Y_{nat}(T)$ 及 $Y_{unf}(T)$ 分別為自然基線及展開基線之線性外推。展開起始溫度定義為 F_{unf} 自自然基線($F_{unf}=0$)開始增加時之溫度且中點溫度為 $F_{unf}=0.5$ 時之溫度。

基本上如上文所述執行之CD熱變性實驗指出，當PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-胰島素六聚物與離脯胰島素六聚物皆類似地以16 mM TRIS(pH 7.2)、3.1 mg/mL間甲酚及鋅調配時，PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-胰島素六聚物之熱穩定性與離脯胰島素六聚物相比大大降低。此外，CD熱變性研究偵測到PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-離脯胰島素之熔融溫度之顯著鈣及氯離子濃度依賴性增加(未展示資料)。更特定言之，在16 mM TRIS(pH 7.2)、3.1 mg/mL間甲酚及鋅中，觀測到展開起始溫度為約30°C，但在具有75 mM氯化鈣之相同調配物中顯著增至約50°C。在將NaCl(25 mM至150 mM NaCl)而非氯化鈣添加至調配物中後，觀測到r之類似效應。因此，鈣及/或氯離子在包含PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素化合物之醫藥組合物中可為極適用的六聚

物促進賦形劑，以便增加醫藥組合物儲存後之化學及/或物理穩定性。

表 II：平均殘基橢圓率(MRE)隨 Zn/六聚物比率而變

Zn/六聚物 (mol/mol)	MRE PEG _{20kDa} -B28 _(96%) /A1 _(4%) -離脯胰島素 (度 公分 ² 分莫耳 ⁻¹ 殘基 ⁻¹)	MRE 離脯胰島素 (度 公分 ² 分莫耳 ⁻¹ 殘基 ⁻¹)
0	-116.103	-172.545
0.5	-135.764	-209.347
1	-158.861	-268.082
1.5	-190.81	-315.972
2	-213.12	-378.179
3	-255.23	-426.872
4	-298.729	-471.587

實例 9：產生 PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-離脯胰島素

將含有 150 mM 磷酸氫二鈉及 50 mM EDTA 之緩衝溶液與 150 mM 磷酸三鈉混合以得到 pH 值介於 10.85 與 11.10 之間、溫度介於約 4°C 與 6°C 之間的緩衝溶液。於約 4°C 與 6°C 之間的溫度下，在輕微攪拌下將離脯胰島素晶體 (30-60 mg/mL) 緩慢添加至緩衝液中以避免在晶體溶解期間形成聚結體。

藉由將所需量之冷激水置於容器中、攪動引起渦旋且將 mPEG-NPC 粉末緩慢傾倒於渦旋眼中以確保充分及快速分散來使具有約 20 kDa±2 kDa 重量平均分子量之 PEG 的單甲氧基聚(乙二醇)對硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)以 60-120 mg/mL 之濃度溶解於冷激水(4-6°C)中。mPEG-NPC 粉末為精細粉末且在分散後釋放大量氣泡於該容器中。視體積而定，使容器中之 mPEG-NPC 溶液脫氣 30 分鐘至 60 分鐘之間。

將以上所製備之離脯胰島素溶液轉移至機械攪拌夾套式容器中。該容器裝有量測溫度及pH值之儀器。藉由在擾流狀態下以雷諾數(Reynolds number)運作之標準葉輪提供攪拌。將mPEG-NPC(PEG)溶液以產生3小時至5小時之間之總PEG添加時間的速率計量供至容器中。夾套之溫度維持在4°C與6°C之間且持續混合。藉由添加所需量之150 mM磷酸三鈉緩衝液使反應之pH值維持在10.85至11.10之間。添加PEG直至最終PEG:離脯胰島素莫耳比在2.5至4.5之間的範圍內。

在PEG添加結束時，使夾套溫度在60分鐘內升高至25°C與30°C之間且於彼溫度下將反應混合物培養3小時至6小時，同時使pH值維持在10.7至11.0之間。在培養期結束時，藉由添加2×緩衝液(100 mM乙酸/乙酸鈉，pH 4.0)來使反應混合物驟冷且稀釋以調整其電導率(2.5 mS/cm)及濃度(3-5 mg/mL)。

使用裝填有適當樹脂(例如Fast Flow SP瓊脂糖樹脂)之陽離子交換層析(CEX)管柱將反應混合物純化。將該管柱用樹脂裝填至15 cm至30 cm之間的床層高度，用100 mM乙酸鈉(緩衝液A)平衡且用低pH值(2.5-3.5)之經稀釋反應混合物(5-8公克產物/公升樹脂)以適當流速(50-90 cm/h)裝載。單聚乙二醇化之產物及未反應之蛋白質優先結合於樹脂上，而多聚乙二醇化之副產物及過量試劑主要通過管柱。使用具有稀鹽濃度(20-30 mM)之緩衝液A洗去任何弱吸附之多聚乙二醇化之副產物，隨後使用具有更高鹽濃度

(50-70 mM)的緩衝液(8-12 CV)進行梯度溶離以優先移除樹脂中之聚乙二醇化產物，同時使任何未反應之蛋白質保持於管柱上。收集產物(3-5 CV)且用具有高鹽濃度(100 mM)之緩衝液A洗滌管柱以移除未反應之蛋白質。

使用標準平板膜(截留3-5 kDa分子量)使3-5 mg/mL之CEX管柱主流(3-5 CV)經受切向流過濾以使其濃度增加至40-80 mg/mL。經由初始濃縮、隨後緩衝液交換及最終濃縮至所需濃度來進行該過程。整個過程之運作流量維持在10-20公升/平方公尺過濾面積/小時(LMH)且跨膜壓力(TMP)維持在15 psi至30 psi之間。

將最終濃縮之塊狀活性藥物成份溶液冷凍於適當溫度(-20°C至-70°C)下且儲存於適當溫度(-20°C至-70°C)下。

實例10：聚乙二醇化之離脯胰島素在犬內的藥物動力學概況

將18.9 nmol/kg例示性測試化合物皮下給與7-10 kg體重之2-4歲雌性小獵犬。定時自頭靜脈或隱靜脈抽取血樣且收集於含有EDTA二鈉之管中。經由靜脈血取樣收集血漿且使用市售胰島素放射免疫檢定測定血漿中所投與之藥物的含量。測定基本上如實例2中所述製備之以下各例示性化合物的藥物動力學概況及參數：使用具有約40 kDa、約30 kDa及約20 kDa之平均分子量之線性mPEG-NPC所製備的化合物11。

使用模型非依賴性方法(WinNonlin Pro)計算藥物動力學參數。使用具有約20 kDa之平均分子量之線性mPEG-NPC所製備的化合物11展現約12小時之達最大濃度的時間

($T_{\max}$)、約 0.046 L/h/kg 之表觀清除速率 (CL/F)、約 14 nM 之最大濃度 ($C_{\max}$) 及約 14 小時之消除半衰期 ($t_{1/2}$)。

使用具有約 30 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-NPC 所製備的化合物 11 展現約 24 h 之 $T_{\max}$ 、約 0.027 L/h/kg 之 CL/F、約 18 nM 之 $C_{\max}$ 及約 23 小時之 $t_{1/2}$ 。

使用具有約 40 kDa 之平均分子量之線性 mPEG-NPC 所製備的化合物 11 展現約 24 h 之 $T_{\max}$ 、約 0.026 L/h/kg 之 CL/F、約 15 nM 之 $C_{\max}$ 及約 20 小時之 $t_{1/2}$ 。

將地特胰島素以 18.9 nmol/kg 之劑量類似地投與雌性小獵犬，且其展現約 1.3 小時之 $T_{\max}$ 、約 0.12 L/h/kg 之 CL/F、約 23 nM 之 $C_{\max}$ 及約 3.5 小時之 $t_{1/2}$ 。

表 III 列出犬內之可比參數。用於此等研究之胰島素特異性 RIA 偵測聚乙二醇化之離脯胰島素與內源性胰島素兩者。

表 III：聚乙二醇化之離脯胰島素在犬內的 PK 參數

參數	20 kDa PEG- 化合物 11	30 kDa PEG- 化合物 11	40 kDa PEG- 化合物 11	地特胰島素
$C_{\max}$ (nM)	14 ± 1	18 ± 3	15 ± 1	23 ± 2
$T_{\max}$ (hr)	12 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1.3 ± 0.6
$T_{1/2}$ (hr)	14 ± 3	23 ± 6	20 ± 1	3.5 ± 0.7
AUC(nM hr)	419 ± 43	727 ± 118	729 ± 86	161 ± 20
CL/F (L/hr/kg)	0.046 ± 0.005	0.027 ± 0.004	0.026 ± 0.003	0.12 ± 0.02

18.9 nmol/kg 皮下劑量；n=3 隻/組

實例 11：預測人類之平均「平坦度」及劑量

用於改良基礎胰島素療法之基本準則為在患者中達成真正平坦概況、順應於每日給藥一次之能力。足夠平坦度定

義為小於2之峰谷(PT)比。出於比較之目的，由所公開之PK概況計算之PT比率範圍對於地特而言為約4-9且對於甘精而言為約1.2-2.6。將18.9 nmol/kg劑量之例示性化合物及地特胰島素之大鼠及犬PK資料(分別參見實例5及10)與1-CMT PK模型擬合，用 k_a 、 CL/F 及 V/F 參數表示。接著將各PK參數(P)與 $P=aBW^b$ 形式之異速生長方程式擬合，其中針對 k_a 、 CL/F 及 V/F 之 b 分別固定為-0.25、0.75及1，且 a 為擬合參數。對於各PK參數獲得平均人類估計值，且所產生之模擬值意謂每日給與人類後之概況。由於30 kDa與40 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素結合物之間相似，故僅展示20 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素、40 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素及地特胰島素之模擬值。所產生之模擬值指示，20 kDa及40 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之峰谷(PT)比比地特胰島素之峰谷(PT)比顯著平坦。模擬結果展示於圖1中。

為功效所需之聚乙二醇化之離脯胰島素之人類劑量之估算策略係在大鼠功效模型中使用已知臨床比較物(地特胰島素)作為內部對照物，假設在大鼠模型中聚乙二醇化之離脯胰島素與地特胰島素之間的相對效能類似於臨床上之相對效能。臨床上聚乙二醇化之離脯胰島素之所需每日劑量可使用以下方程式獲得：

$$\frac{\text{劑量}_{\text{det}}}{\text{劑量}_{\text{PEG}}} = \frac{EC_{50,\text{det}}}{EC_{50,\text{PEG}}} \times \frac{CL/F_{\text{det}}}{CL/F_{\text{PEG}}} \quad \circ$$

各種聚乙二醇化之離脯胰島素結合物的相對效能比可在表IV中獲得。例示性聚乙二醇化之離脯胰島素/地特在大鼠、犬及人類(預測)中的相對表觀清除率彙編於表V中。

表IV：聚乙二醇化之離脯胰島素結合物及地特胰島素在大鼠中之基於濃度的相對效能

化合物11	地特/聚乙二醇化之離脯胰島素之效能比
20 kDa PEG-離脯胰島素	1.34 ± 0.68
30 kDa PEG-離脯胰島素	0.68 ± 0.35
40 kDa PEG-離脯胰島素	0.65 ± 0.36

表V：地特胰島素/聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之相對CL/F比率

化合物11	CL/F大鼠	CL/F犬	CL/F人類(預測)
20 kDa PEG-離脯胰島素	5.5	2.6	3.3
40 kDa PEG-離脯胰島素	4.8	4.6	4.1

使用表IV之相對效能估計值及表V之相對CL/F估計值，聚乙二醇化之離脯胰島素結合物在人類中之平均劑量預測值對於20 kDa及40 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素化合物而言分別為4.2及6.9 nmol/kg。此等預測值係基於如針對經地特標記之2型糖尿病患者所報導之18.5 nmol/kg地特胰島素的平均每日臨床劑量。考量作用時間與效能時，最大平均臨床劑量預測值比地特胰島素低約3倍。在最佳情況下，20 kDa、30 kDa及40 kDa聚乙二醇化之離脯胰島素結合物之平均臨床劑量估計值比地特胰島素低為約20倍至約

45倍。

實例 12：單一投與健康自願者後之葡萄糖輸注速率：

PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%)-離脯胰島素及甘精投藥

三部分首次人類劑量研究係使用基本上如實例 9 中所述製備之單一劑量之 PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%)-離脯胰島素(LY)來進行。部分 A 包括 3 個研究期，其中個體在第一期內接受皮下(SC)注射之 LY 劑量，隨後在第二期內注射甘精胰島素劑量(0.5 U/kg)，且隨後接著在第三期內注射另一劑 LY。部分 B 為開放標記、單一劑量、雙重複期研究，其中個體在兩期內均使用 24 小時及 36 小時葡萄糖鉗夾(glucose clamp)接受單一劑量之 LY。部分 C 為開放標記、雙期、單一劑量、固定順序、有比較物對照之研究，其中個體在一期內接受單一 0.5 mg/kg SC 劑量之 LY 且在另一期內接受單一 0.8 U/kg SC 劑量之甘精胰島素。個體在部分 A 及 C 之各期內經受 24 小時葡萄糖鉗夾程序且在部分 B 之各期內經受更長持續時間(多達 36 小時)的葡萄糖鉗夾程序。在部分 A、B 及 C 中，LY 如下以單一劑量皮下投與：

部分 A 劑量：每公斤體重 0.0025 mg、0.0125 mg、0.075 mg、0.325 mg

部分 B 劑量：0.15 mg/kg、0.225 mg/kg

部分 C 劑量：0.5 mg/kg。

向個體投與單一劑量之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或單一劑量之甘精胰島素(0.5 U/kg)作為比較物且在第三時期內投與另一單一劑量之 LY。在所有治療期內，在各種胰島素化合物注射後，個體經歷長達 24/36 小時的正常血

糖鉗夾程序。調整葡萄糖輸注速率(GIR)以維持正常血糖，所記錄之GIR-時間提供胰島素作用之GD量度。正常血糖葡萄糖鉗夾之目的係在一定劑量之胰島素化合物投與後經由葡萄糖輸注維持正常血糖。假設內源性胰島素分泌及肝葡萄糖排出量最小且自葡萄糖空間移出之任何葡萄糖(亦即，代謝之葡萄糖)為投與外源性胰島素之直接結果。在此情況下GIR為胰島素作用隨時間之葡萄糖效應(GD)量度。所有葡萄糖鉗夾研究均在約8小時之空腹隔夜後執行。在研究之早上，將小導管置於一手臂之靜脈中，理想地置於肘窩中，以在容積泵之控制下投與20%右旋糖溶液(緩衝至接近中性pH值)。將另一導管理想地置於腕或手中以進行靜脈葡萄糖取樣。用加溫裝置將此區域加熱至約55-60°C以對動脈化之靜脈血液進行取樣。床側獲得血樣以使用自動葡萄糖氧化酶技術立即測定全血葡萄糖濃度。基礎血樣抽取及約30分鐘之穩定期後，每一個體接受皮下投與之一定劑量的胰島素化合物。胰島素化合物之皮下注射開始時間定義為零時。完成給藥後，在頻繁抽取血樣以便量測血糖的同時，以可變速率靜脈內輸注葡萄糖以便在投與胰島素後維持長達24或36小時之正常血糖。

在給藥前約30分鐘期間約每10分鐘抽取血樣，且繼續在給藥後最初2小時每5-10分鐘抽取血樣(可選擇每2.5分鐘之頻繁取樣)，且接著減少至10-30分鐘間隔直至鉗夾結束。

在葡萄糖鉗夾期間，調整葡萄糖輸注速率以維持個別個體之預定目標血糖濃度。較佳地，目標濃度接近空腹血

糖。葡萄糖鉗夾程序之目的在於使血糖濃度維持在給藥前目標值之+5%，該目標值定義為低於平均空腹血糖5 mg/dL。從而使血糖濃度保持恆定，而GIR變化。因此，變化之葡萄糖輸注速率反映測試胰島素化合物之活性。

已記錄整個鉗夾期間樣品之血糖含量及輸注速率變化。

基本上如實例12中所述進行之研究證明，在人類中，LY具有理想「基礎」胰島素之特徵：長持續作用時間、24-44小時範圍之表觀半衰期及基礎特性，亦即小於2之峰谷比(圖2)。另外，LY之持續作用時間比甘精胰島素長(圖2)。葡萄糖效應之個體內變異性小於30%(未展示資料)，此類似於或優於甘精。最後，來自研究部分C的葡萄糖效應資料(0.5 mg/kg)得到LY之GIR概況，其「無峰」、維持GD大於36小時且超過甘精之峰值GIR反應(0.5 U/kg；未展示資料)。

實例 13：PEG_{20kDa}-B28(~95%)/A1(~5%)-離脯胰島素醫藥組合物之化學及物理穩定性

如上文實例7及8中所述，PEG_{20kDa}-B28(~95%)/A1(~5%)-離脯胰島素可在二價金屬離子及酚系防腐劑存在下、在類似於Humalog[®]之調配條件下締合為六聚合錯合物。因此，對類似於離脯胰島素之市售溶液調配物(亦即，Humalog[®]溶液調配)的PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素調配物進行化學及物理穩定性研究。若在不同溫度下之指定儲存期期間未偵測到各種分析性質顯著不同於初始時點，則測試醫藥調配物之化學穩定性視為可接受。若目測評估未觀測到粒子且藉

由硫代黃素T螢光顯微法評估未觀測到原纖維或凝膠形成，則測試醫藥調配物之物理穩定性視為可接受。

製備經磷酸鹽或檸檬酸鹽(分別為pH 7.0或pH 6.5)緩衝、含有每莫耳PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素0.5莫耳鋅、16 mg/mL丙三醇、3.15 mg/mL間甲酚的PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素調配物且測試化學與物理穩定性。測試不含鋅之類似調配物以評估鋅對穩定性之影響。儲存約1個月後樣品於35°C下形成膠粒且儲存約2個月後樣品於25°C下顯示大量粒子/氣泡形成。經檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝之調配物以及含鋅/無鋅之調配物於加速35°C條件下皆顯示類似化學/物理穩定性，但目測評估時檸檬酸鹽緩衝樣品似乎劣於磷酸鹽緩衝樣品。離脯胰島素對照調配物保持透明。檸檬酸鹽與磷酸鹽緩衝調配物皆展示5°C下至少13個月之可接受之化學穩定性。

隨後研究指出，酚系防腐劑間甲酚當與所構成之PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素組合且曝露於高溫(>25°C)時促進膠凝。有趣地是，當將間甲酚添加至單獨mPEG(活化或未活化)中時，曝露於高溫後並不產生膠粒。

當離脯胰島素之原型調配物未賦予PEG_{20kDa}-B28-離脯胰島素化合物在高溫下可接受之穩定性時，開發包含PEG_{20kDa}-B28(~95%)/A1(~5%)-離脯胰島素化合物之醫藥組合物，其展示經改良之化學及物理穩定性且適合作為非經腸投與之醫藥調配物商品化。

PEG_{20kDa}-B28(~95%)/A1(~5%)-離脯胰島素(15 mg/mL)之以

下調配物在40℃下展示一週、在30℃下展示一個月、在25℃下展示三個月且在5℃下展示逾八個月的可接受之化學及物理穩定性：

1) 16 mM TRIS緩衝液(pH 7.0-8.0)、10 mM氯化鈣、20 mg/mL糖(蔗糖或海藻糖)、3 mg/mL(28 mM)間甲酚及每1.0莫耳PEG_{20kDa}-B28(_{~95%})/A1(_{~5%})-離脯胰島素0.5莫耳鋅；

2) 16 mM TRIS緩衝液(pH 7.0-8.0)、10 mM氯化鈣、3 mg/mL泊洛沙姆、3 mg/mL(28 mM)間甲酚及每1.0莫耳PEG_{20kDa}-B28(_{~95%})/A1(_{~5%})-離脯胰島素0.5莫耳鋅；

3) 5 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.0)、130 mM丙三醇、3 mg/mL(28 mM)間甲酚、3 mg/mL泊洛沙姆、每1.0莫耳PEG_{20kDa}-B28(_{~95%})/A1(_{~5%})-離脯胰島素0.3莫耳鋅。

含有六聚物促進賦形劑(例如鋅、間甲酚及鈣)之PEG_{20kDa}-B28(_{~95%})/A1(_{~5%})-離脯胰島素的調配物一般展現較好物理及化學穩定性，尤其在高溫下。將鈣、氯離子及/或NaCl添加至含有鋅及間甲酚之PEG_{20kDa}-B28(_{~95%})/A1(_{~5%})-離脯胰島素調配物中進一步增強曝露於40℃或高於40℃溫度之調配物的物理穩定性。此外，磷酸鹽及檸檬酸鹽緩衝調配物一般展現比TRIS緩衝調配物小之物理穩定性。

【圖式簡單說明】

圖1基於大鼠及犬之PK參數之異速生長尺度律、以圖形描繪20 kDa PEG-B28-離脯胰島素、40 kDa PEG-B28-離脯胰島素及地特胰島素之模擬人類PK概況。概況代表給藥一週後之一個給藥時間間隔。數值意謂峰谷比；及

圖 2 為皮下給與 PEG_{20kDa}-B28($\geq 95\%$)/A1($\leq 5\%$)-離脯胰島素 (LY; 0.225 mg/kg) 或甘精胰島素 (0.5 U/kg) 後之人類葡萄糖輸注速率 (GIR) 的曲線圖。GIR 曲線係基於觀測資料且使用 Lilly 研究實驗室 (Lilly Research Laboratories) 內所開發之「loess 平滑」(Splus 2000, 專業版, MathSoft, Inc) 功能來擬合觀測資料。

101年9月19日修(更)正本

第 098117491 號專利申請案
中文序列表替換本(101 年 9 月)

序列表

<110> 美國禮來大藥廠

<120> 聚乙二醇化之離脯胰島素化合物

<130> x-18199

<140> 098117491

<141> 2009-05-26

<150> 61/061281

<151> 2008-06-13

<150> 61/121394

<151> 2008-12-10

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5					10					15	

Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
				20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5					10					15	

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr
			20					25					30

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

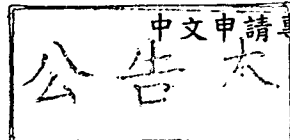
<220>

<223> 合成構築體

<400> 3

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5					10					15	

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Lys	Pro	Thr
			20					25					30



七、申請專利範圍：

1. 一種下式之聚乙二醇(PEG)化之離脯(lispro)胰島素化合物： $P-[(A)-(B)]$ ，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

A為離脯胰島素之A鏈(SEQ ID NO: 1)；

B為離脯胰島素之B鏈(SEQ ID NO: 3)；及

P為具有約 20 kDa至約 40 kDa範圍內之分子量的PEG，

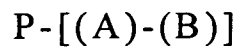
其中A與B經由介於SEQ ID NO: 1之位置7處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置7處的之半胱胺酸之間、SEQ ID NO: 1之位置20處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置19處之半胱胺酸之間及SEQ ID NO: 1之位置6處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 1之位置11處之半胱胺酸之間的二硫鍵適當地交聯，且其中P經由胺基甲酸酯共價鍵連接於B之位置28之離胺酸的 ϵ -胺基。

2. 如請求項1之化合物，其另外特徵為對於人類胰島素受體具有約 10 nM或小於 10 nM之 K_i 。
3. 如請求項1之化合物，其另外特徵為在以約 568 nmol/kg給藥之經STZ處理之大鼠中具有大於約 6小時之消除半衰期。
4. 如請求項1之化合物，該化合物在以約 568 nmol/kg之劑量單一皮下注射後足以使經STZ處理之大鼠的血糖降低至低於 100 mg/dL約 4小時至至少約 36小時範圍之期間。
5. 如請求項4之化合物，其中該化合物另外特徵為在以約 0.225 mg/kg單一皮下給藥之人類中具有大於約 36小時之

消除半衰期。

6. 如請求項5之化合物，其中該PEG具有約20 kDa之分子量。
7. 一種如請求項6之化合物用於製造藥物之用途。
8. 一種如請求項6之化合物的用途，係用於製造供治療低血糖或糖尿病之藥物。
9. 一種醫藥組合物，其包含如請求項6之化合物及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑及/或載劑。
10. 如請求項9之醫藥組合物，其進一步包含TRIS濃度在約10 mM至約25 mM之範圍內的TRIS緩衝液，其中該醫藥組合物之pH為約pH 7.0至約pH 8.0；及至少一種等張劑(isotonicity agent)，產生等張性在約270 mOsm至約330 mOsm之間之溶液。
11. 如請求項10之醫藥組合物，其中聚乙二醇化之離脯胰島素化合物之總濃度為約15 mg/mL至約40 mg/mL。
12. 如請求項11之醫藥組合物，其進一步包含約130 mM間甲酚、每莫耳該聚乙二醇化之離脯胰島素約0.5莫耳鋅、約100 mM至約150 mM之間的NaCl、約2.5 mM至約25 mM之間的鈣、及界面活性劑。
13. 一種如請求項12之醫藥組合物的用途，係用於製造供治療高血糖症或糖尿病之藥物。
14. 如請求項13之用途，其中該藥物係用於治療糖尿病。
15. 如請求項14之用途，其中該藥物係用於治療妊娠糖尿病。

16. 一種製備下式之聚乙二醇化之離脯胰島素化合物或其醫藥學上可接受之鹽的方法



其中：

A為離脯胰島素之A鏈(SEQ ID NO: 1)；

B為離脯胰島素之B鏈(SEQ ID NO: 3)；及

P為具有約20 kDa至約40 kDa範圍內之分子量的PEG，

其中A與B經由介於SEQ ID NO: 1之位置7處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置7處的之半胱胺酸之間、SEQ ID NO: 1之位置20處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 3之位置19處之半胱胺酸之間及SEQ ID NO: 1之位置6處之半胱胺酸與SEQ ID NO: 1之位置11處之半胱胺酸之間的二硫鍵適當地交聯，且其中P經由胺基甲酸酯共價鍵連接於B之位置28之離胺酸的 ϵ -胺基，

該方法包含使B之位置28之離胺酸的 ϵ -胺基與具有約20 kDa至約40 kDa之間之重量平均分子量的單甲氧基聚(乙二醇)對硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)在水性溶劑中在約8.5至約11.5之間的pH且在約25°C與約30°C之間反應。

17. 如請求項16之方法，其中該PEG:離脯胰島素莫耳比係在約2.5至約5.0之間的範圍內。
18. 如請求項17之方法，其中該mPEG-NPC之重量平均分子量為約20 kDa。
19. 如請求項18之方法，其中該反應之pH係維持於約10.5與

約 11.5 之間。

20. 如請求項 19 之方法，其中該反應係於約 25°C 與約 30°C 之間進行 3 小時與約 12 小時之間。

八、圖式：

公告本

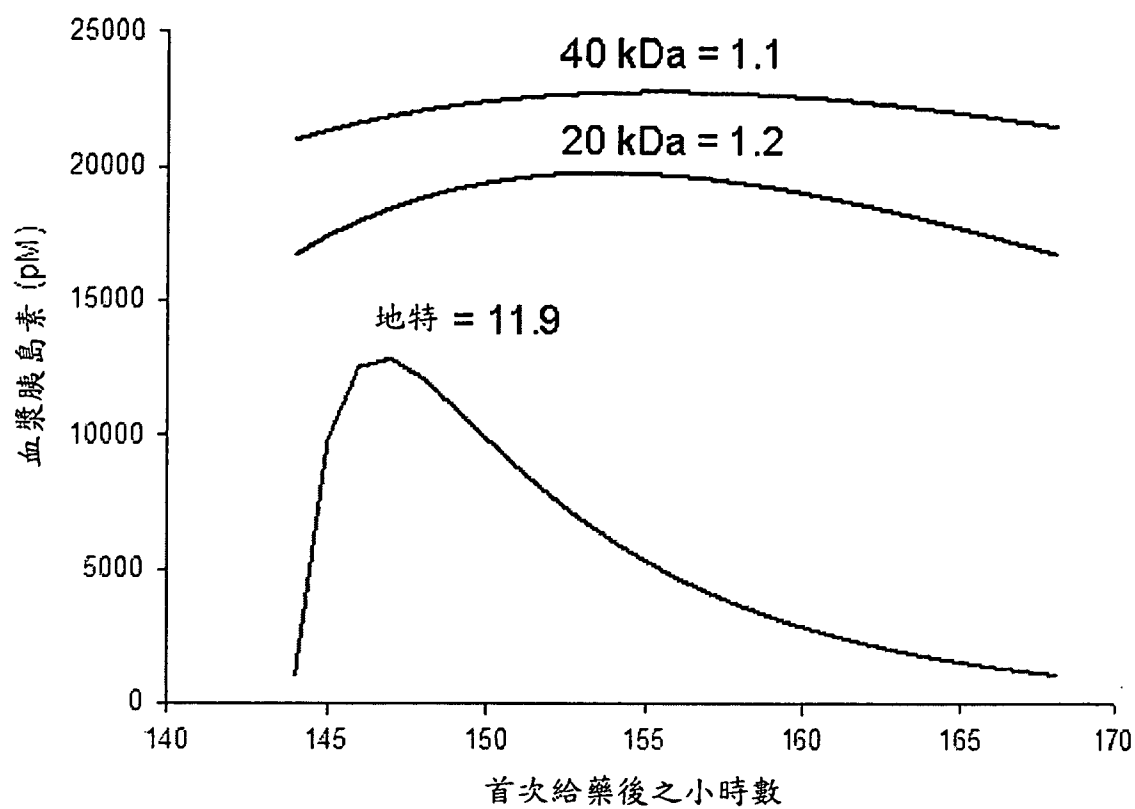


圖1

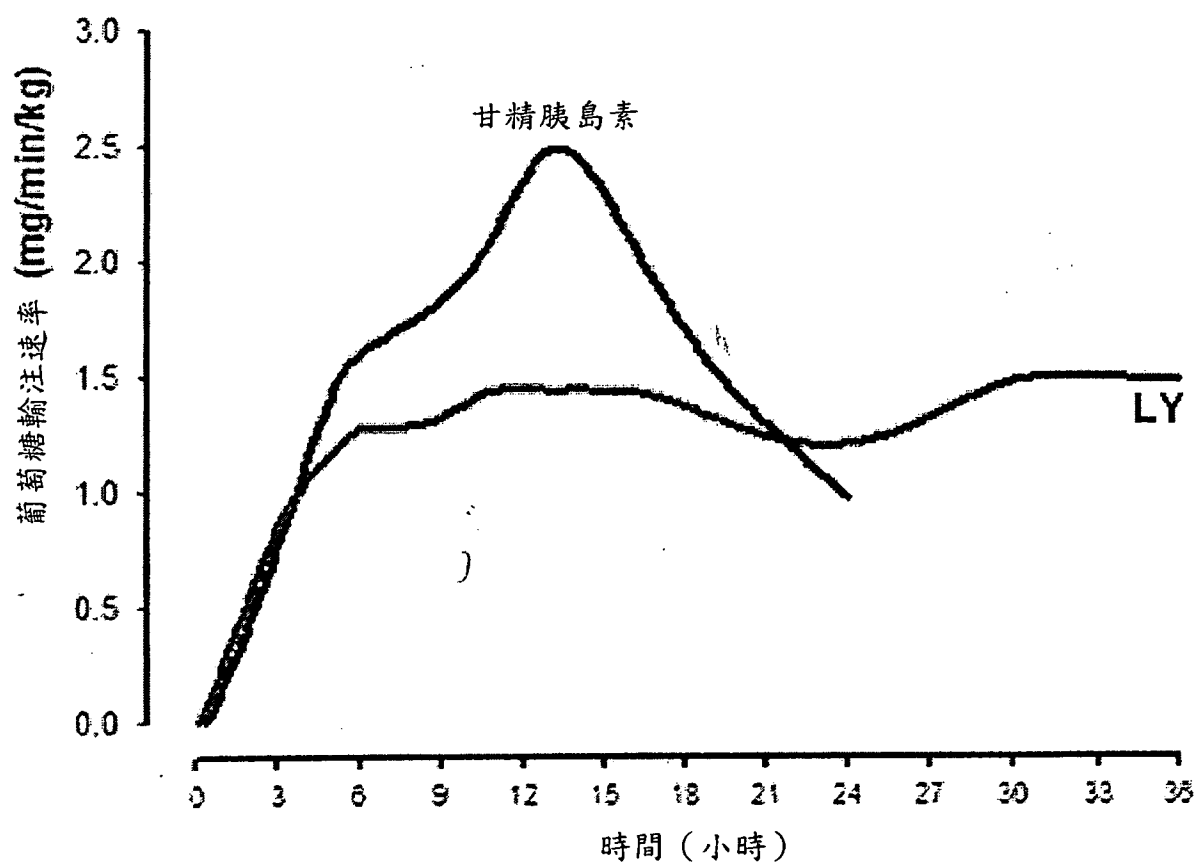


圖2