(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115916243 A
(43)申请公布日 2023.04.04

(21)申请号 202180032056.3
(22)申请日 2021.03.02
(30)优先权数据
62/984165 2020.03.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/020491 2021.03.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/178417 EN 2021.09.10
(71)申请人 塞尔玛琳公司
地址 美国马萨诸塞州
申请人 卡斯西部储备大学
(72)发明人 M·A·维斯 M·穆拉杰
L·A·布罗德沃特 T·哈蒂尔
R·伯伦森
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 任晓华 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 38/28(2006.01)

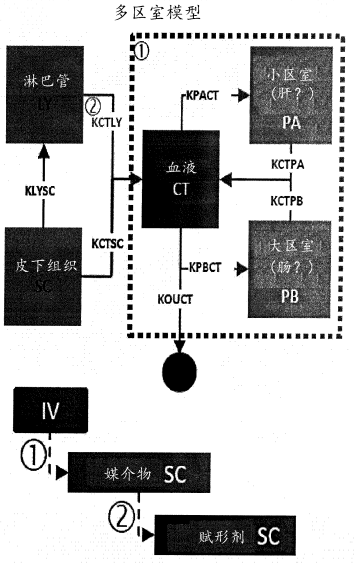
权利要求书4页 说明书36页
序列表5页 附图21页

(54)发明名称

含有速效胰岛素类似物的组合物

(57)摘要

药物组合物包含有效量的胰岛素类似物，所述胰岛素类似物包含修饰的A链和B链多肽。修饰的A链包含选自以下的相对于野生型人胰岛素A链的一种或多种取代：在位置A8处的Gln、His或Glu取代，在位置A14处的Glu或Ala取代，以及在位置A21处的Ala、Gln、Gly或Thr取代。修饰的B链多肽包含选自以下的相对于野生型人胰岛素B链的一种或多种修饰：在位置B1、B1和B2或B1-B3处的一个或多个氨基酸的缺失，在位置B2处的Ala或Glu取代，在位置B3处的Glu或Ala取代，在位置B4处的Ala取代；以及在位置B29处的Glu取代。该组合物还包含伊洛前列素、柠檬酸盐、EDTA或多聚磷酸盐化合物中的一种或多种。该组合物可以用于治疗糖尿病。



CN 115916243 A

1.一种药物组合物,其包含有效量的胰岛素类似物,所述胰岛素类似物包含修饰的A链多肽和修饰的B链多肽,

其中所述修饰的A链包含选自以下的相对于野生型人胰岛素A链的一种或多种取代:

在位置A8处的Gln、His或Glu取代;

在位置A14处的Glu或Ala取代;和

在位置A21处的Ala、Gln、Gly或Thr取代;

和/或其中所述修饰的B链多肽包含选自以下的相对于野生型人胰岛素B链的一种或多种修饰:

在位置B1处的氨基酸缺失;

在位置B1和B2处的氨基酸缺失;

在位置B1-B3处的氨基酸缺失;

在位置B2处的Ala或Glu取代;

在位置B3处的Glu或Ala取代;

在位置B4处的Ala取代;和

在位置B29处的Glu或Lys取代;

其中所述组合物包含伊洛前列素、柠檬酸盐、EDTA和多聚磷酸盐化合物中的一种或多种。

2.权利要求1的药物组合物,其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Gly取代。

3.权利要求1或2的药物组合物,其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Glu取代。

4.权利要求1的药物组合物,其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Ala取代。

5.权利要求1的药物组合物,其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Ala取代。

6.权利要求1的药物组合物,其中所述胰岛素类似物由关于野生型人胰岛素的下述修饰组成:EA8、EA14、GA21、desB1、AB2、EB3和EB29。

7.权利要求1或6中任一项的药物组合物,其中当以U-500进行配制时,所述胰岛素类似物是单体或二聚体。

8.权利要求7的药物组合物,其中与野生型人胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素或谷赖胰岛素相比,所述胰岛素类似物具有更高的稳定性。

9.权利要求7的药物组合物,其中与Humalog®、Novolog®或Apidra®相比,所述胰岛素类似物具有更低的原纤化。

10.权利要求7的药物组合物,其中与至少U-500的浓缩制剂中的赖脯胰岛素、门冬胰岛素、或谷赖胰岛素或野生型人胰岛素相比,所述胰岛素类似物具有增加的对原纤化的抗性。

11.权利要求7的药物组合物,其中所述胰岛素类似物经配制用于以U-500或更高的皮下或皮内施用。

12.权利要求11的药物组合物,其中所述胰岛素类似物与多聚磷酸盐化合物一起配制。

13.权利要求12的药物组合物,其中所述多聚磷酸盐化合物是焦磷酸盐、三磷酸盐、三偏磷酸盐和四磷酸盐中的一种或多种。

14.权利要求13的药物组合物,其中所述多聚磷酸盐化合物是三磷酸钠。

15.权利要求12的药物组合物,其中所述多聚磷酸盐化合物以约1 mM至约50 mM、或约1 mM至约40 mM、或约5 mM至约30 mM存在。

16.权利要求15的药物组合物,其中所述胰岛素类似物与伊洛前列素一起配制。

17.权利要求16的药物组合物,其中所述伊洛前列素以约1 μg至约100 μg/mL的浓度,或任选地以约5 μg/mL至约50 μg/mL的浓度,或任选地以约10 μg/mL至约25 μg/mL的浓度存在。

18.权利要求1的药物组合物,其中所述胰岛素类似物与Tris和EDTA以及任选的柠檬酸盐一起配制。

19.权利要求18的药物组合物,其中所述胰岛素类似物以少于0.05摩尔锌/摩尔胰岛素进行配制。

20.权利要求18的药物组合物,其中所述胰岛素类似物用约10至约100 mM Tris进行配制。

21.权利要求18的药物组合物,其中所述胰岛素类似物用约0.1 mg/mL至约10 mg/mL间甲酚进行配制。

22.权利要求17、11至21的药物组合物,其中所述胰岛素类似物用约0.1 mg/mL至约25 mg/mL甘油进行配制。

23.权利要求11的药物组合物,其中所述胰岛素类似物进一步包含镁。

25.权利要求1的药物组合物,其中所述胰岛素类似物以约U-10至约U-1000进行配制。

26.权利要求25的药物组合物,其中所述组合物以U-500或更大进行配制。

27.权利要求26的药物组合物,其中所述组合物以U-500进行配制。

28.权利要求24至27中任一项的药物组合物,其包含以约1 μg至约100 ug/mL的浓度,或任选地以约5 μg/mL至约50 μg/mL的浓度,或任选地以约10 μg/mL至约25 μg/mL的浓度的伊洛前列素。

29.权利要求28的药物组合物,其包含选自焦磷酸盐、三磷酸盐、三偏磷酸盐和四磷酸盐的多聚磷酸盐化合物。

30.权利要求29的药物组合物,其中所述多聚磷酸盐以约1 mM至约50 mM、或约1 mM至约40 mM、或约5 mM至约30 mM存在。

31.权利要求30的药物组合物,其中所述多聚磷酸盐是三磷酸钠。

32.权利要求31的药物组合物,其中所述组合物是用于皮下或皮内施用的水性制剂。

33.权利要求25的药物组合物,其中所述组合物包含小于0.05摩尔锌/摩尔胰岛素。

34.权利要求33的药物组合物,其中所述组合物包含药学上可接受的缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、增溶剂、抗聚集剂、扩散增强剂、吸收增强剂和防腐剂中的一种或多种。

35.权利要求34的药物组合物,其中所述组合物包含一种或多种抗炎剂和/或一种或多种抗纤维化剂。

36.权利要求34的药物组合物,其包含药学上可接受的缓冲剂、防腐剂和稳定剂。

37.权利要求36的药物组合物,其中所述组合物包含约10至约100 mMTris。

38.权利要求36或37的药物组合物,其中所述组合物包含约0.1 mg/mL至约10 mg/mL间甲酚。

39.权利要求37的药物组合物,其中所述组合物包含约0.1 mg/mL至约25 mg/mL甘油。

40.权利要求39的药物组合物,其中所述组合物进一步包含镁。

41.权利要求25的药物组合物,其中所述A链由相对于野生型人胰岛素A链的下述取代

组成：

在位置A8处的Glu取代；

在位置A14处的Glu取代；和

在位置A21处的Ala、Gln、Gly或Thr取代；

和/或其中所述修饰的B链多肽由相对于野生型人胰岛素B链的下述修饰组成：

位置B1的缺失；

在位置B2处的Ala取代；

在位置B3处的Glu或Ala取代；和

在位置B29处的Glu或Lys取代。

42.权利要求41的药物组合物，其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Gly取代。

43.权利要求41或42的药物组合物，其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Glu取代。

44.权利要求41的药物组合物，其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Ala取代。

45.权利要求44的药物组合物，其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Ala取代。

46.权利要求41的药物组合物，其中所述胰岛素类似物由关于野生型人胰岛素的下述修饰组成：EA8、EA14、GA21、desB1、AB2、EB3和EB29。

47.一种用于治疗患有糖尿病或前驱糖尿病的受试者的方法，其包括：向所述受试者施用权利要求1至46中任一项的药物组合物。

48.权利要求47的方法，其中所述类似物或组合物在餐前30分钟进行施用。

49.一种用于确定包含活性药物成分(API)的制剂的药代动力学参数的方法，其包括：

向第一受试者施用API的多种非强效类似物(nonalog)组合物；

确定所述nonalog在来自所述第一受试者的一个或多个组织样品中的浓度；和

基于所述nonalog的浓度，来确定关于API制剂的一种或多种药代动力学参数。

50.一种胰岛素类似物，其包含修饰的A链多肽和修饰的B链多肽，

其中所述A链由相对于野生型人胰岛素A链的下述取代组成：

在位置A8处的Glu取代；

在位置A14处的Glu取代；和

在位置A21处的Ala、Gln、Gly或Thr取代；

和/或其中所述修饰的B链多肽由相对于野生型人胰岛素B链的下述修饰组成：

位置B1的缺失；

在位置B2处的Ala取代；

在位置B3处的Glu或Ala取代；和

在位置B29处的Glu或Lys取代。

51.权利要求50的胰岛素类似物，其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Gly取代。

52.权利要求50或51的胰岛素类似物，其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Glu取代。

53.权利要求50的胰岛素类似物，其中所述修饰的A链多肽包含在位置A21处的Ala取代。

54.权利要求53的胰岛素类似物，其中所述修饰的B链多肽包含在位置B3处的Ala取代。

55.权利要求50的胰岛素类似物，其中所述胰岛素类似物由关于野生型人胰岛素的下述修饰组成：EA8、EA14、GA21、desB1、AB2、EB3和EB29。

56.权利要求55的胰岛素类似物，其中当以U-500进行配制时，所述胰岛素类似物是单体或二聚体。

57.权利要求55的胰岛素类似物，其中与野生型人胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素或谷赖胰岛素相比，所述胰岛素类似物具有更高的稳定性。

58.权利要求55的胰岛素类似物，其中与Humalog®、Novolog®或Apidra®相比，所述胰岛素类似物具有更低的原纤化。

59.权利要求55的胰岛素类似物，其中与至少U-500的浓缩制剂中的赖脯胰岛素、门冬胰岛素、或谷赖胰岛素或野生型人胰岛素相比，所述胰岛素类似物具有增加的对原纤化的抗性。

60.权利要求55的胰岛素类似物，其中所述胰岛素类似物经配制用于以U-500或更高的皮下或皮内施用。

61.权利要求1的药物组合物，其用作药物。

62.权利要求1的药物组合物用于制备用于治疗糖尿病的药物的用途。

含有速效胰岛素类似物的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请是国际PCT申请,其要求2020年3月2日提交的美国临时专利申请号62/984,165的权益。上文引用的申请的公开内容通过引用并入本文。

[0002] 关于联邦资助研究或开发的声明

本发明在由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号DK040949和DK074176下,由政府支持完成。政府在本发明中拥有一定的权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及具有快速作用的胰岛素类似物及其组合物,以及使用胰岛素类似物或其组合物治疗糖尿病的方法或管理患者中的血糖水平的方法。

背景技术

[0004] 胰岛素已用于治疗糖尿病90多年。通常,治疗涉及每一天的多重胰岛素注射。根据常规方案,患者用满足基础胰岛素需求的长效胰岛素的每天1次或2次注射进行治疗,其补充有满足与进餐有关的胰岛素需求的速效胰岛素制剂(或速效胰岛素类似物制剂)注射。

[0005] 然而,即使当适当且及时施用时,胰岛素注射也不能模拟胰岛素的自然时间作用曲线。例如,商购可得的速效胰岛素类似物太慢进入血液和作用部位,并且具有太长的总体作用持续时间。这导致在进餐开始时的胰岛素水平不足,以及在两餐之间(并且特别是在餐后立即)存在过多的胰岛素。依次地,胰岛素作用的这种滞后导致在开始进餐后早期的高血糖以及在餐后的低血糖。

[0006] 在健康个体中,胰岛素分泌与血糖水平密切相联系。例如,在餐后增加的血糖浓度通过胰岛素直接释放到血流内的快速增加得到补偿。在禁食状态下,胰岛素水平下降到基础水平。胰岛素治疗的目的是在糖尿病患者中复制胰岛素的这种自然时间作用曲线,使得血糖水平可以保持在健康个体特有的正常范围内。然而,由于胰岛素或胰岛素类似物吸收的限制,目前的胰岛素产品和递送系统不能充分满足这一目标。

[0007] 例如,含有以单体形式(其是血液中循环的胰岛素的占优势形式)和二聚体形式的蛋白质分子为主的胰岛素制剂(或胰岛素类似物制剂)具有聚集且形成无活性原纤维的强烈趋势。例如,当胰岛素在不含锌的缓冲液中溶解并且在室温(25-30℃)下贮存时,胰岛素将形成淀粉样蛋白原纤维。为了避免这个问题,目前可用的胰岛素产品通常用锌进行配制,所述锌与胰岛素形成称为锌-胰岛素六聚体的复合物。锌-胰岛素六聚体可以在室温下在溶液中稳定超过30天,这足够长以满足关于胰岛素制剂稳定性的监管要求。然而,锌-胰岛素六聚体太大而不易被毛细血管吸收,并且因此在注射后在胰岛素可以被吸收到循环内之前,六聚体必须在皮下组织液中分解。关于小瓶中的胰岛素稳定所需的六聚体制剂防止这些制剂被足够快速地吸收,以匹配生理胰岛素分泌。

[0008] 相应地,需要速效胰岛素类似物及其组合物用于更好地管理糖尿病患者中的血糖水平。

发明内容

[0009] 本发明部分地涉及胰岛素类似物或其药学上可接受的组合物，例如与现有的商业胰岛素产品和其它相似的胰岛素类似物相比，其提供了类似物快速吸收到血液内，导致其快速起效。进一步地，在各个实施方案中，胰岛素类似物和组合物具有在稳定性(例如，如通过原纤维形成速率、在7天和28天后化学稳定性的变化、以及在7天和28天后物理稳定性的变化进行定量的)和促有丝分裂性(mitogenicity) (例如，如在基于细胞的增殖测定中定量的)方面的优点。具有优化选择和赋形剂浓度的类似物的制剂增强了类似物的药理学和热力学稳定性优点。相应地，在一些实施方案中，本发明提供了胰岛素类似物或其药学上可接受的组合物，其显示出更快速的胰岛素起效(与商业胰岛素类似物或野生型人胰岛素相比)，而没有稳定性的降低(与商业胰岛素类似物或野生型人胰岛素相比)。

[0010] 在一个方面，本发明提供了药物组合物，其包含有效量的胰岛素类似物，所述胰岛素类似物包含修饰的A链B链多肽。修饰的A链包含选自以下的相对于野生型人胰岛素A链的一种或多种取代：在位置A8处的Gln、His或Glu取代，在位置A14处的Glu或Ala取代，以及在位置A21处的Ala、Gln、Gly或Thr取代。修饰的B链多肽包含选自以下的相对于野生型人胰岛素B链的一种或多种修饰：在位置B1、位置B1和B2或位置B1-B3处的一个或多个氨基酸的缺失，在位置B2处的Ala或Glu取代，在位置B3处的Glu或Ala取代，在位置B4处的Ala取代；以及在位置B29处的Glu或Lys取代。该组合物还包含伊洛前列素、柠檬酸盐、EDTA和多聚磷酸盐化合物中的一种或多种。药物组合物可以配制用于糖尿病的治疗中。

[0011] 在另一个方面，本发明提供了胰岛素类似物，其包含修饰的A链多肽和修饰的B链多肽。例如，A链包含相对于野生型人胰岛素(HI) A链的取代或由其组成，所述取代选自：在位置A8处的Glu取代；在位置A14处的Glu取代；以及在位置A21处的Gly取代。进一步地，B链多肽包含相对于野生型人胰岛素B链的修饰或由其组成，所述修饰选自：在位置B1处的残基缺失、在位置B2或B3处的Ala或Glu取代；以及在位置B29处的Glu取代。

[0012] 在一些实施方案中，修饰的A链多肽包含在位置A21处的Gly取代。在一些实施方案中，修饰的B链多肽包含在位置B3处的Glu取代。在一些实施方案中，修饰的A链多肽包含在位置A21处的Ala取代。在一些实施方案中，修饰的B链多肽包含在位置B3处的Ala取代。在一个实施方案中，类似物被称为T-1123，具有下述修饰：GluA8、GluA14、GlyA21、desB1、AlaB2、GluB3和GluB29。

[0013] 本发明的另一个方面提供了药物组合物，其包含有效量的胰岛素类似物和赋形剂，以增强胰岛素类似物的药理学和热力学稳定性优点。例如，制剂可以包含但不限于张度剂、防腐剂、稳定剂、增溶剂或吸收增强剂。在一些实施方案中，药物组合物包含有效量的速效胰岛素类似物和多聚磷酸盐化合物(例如三磷酸钠)。在一些实施方案中，药物组合物包含有效量的速效胰岛素类似物和伊洛前列素。

[0014] 本发明的再一个方面提供了用于治疗患有糖尿病的受试者的方法，其包括将本公开内容的胰岛素类似物或药物组合物施用于有此需要的受试者。

[0015] 本发明的再一个方面提供了用于确定活性药物成分(API)制剂的药代动力学(PK)参数或概况的方法。该方法包括向测试受试者或第一测试受试者施用API的多重无活性或非强效类似物(nonalog)组合物，并且确定来自测试受试者或第一受试者的一个或多个组织样品中的nonalog浓度。该方法还包括基于测试受试者或第一受试者中的nonalog浓度，

来确定关于API制剂的一种或多种药代动力学参数。在一个实施方案中，该方法用于确定nonalog的PK参数，并且将其用作用于确定关于相应API的PK参数的替代物(proxy)。在一些实施方案中，nonalog是肽激素例如胰岛素的非强效类似物。

[0016] 在一些实施方案中，本发明提供了用于制备API的药物制剂的方法。该方法包括向测试受试者施用API的多重nonalog组合物，并且确定来自测试受试者的一个或多个样品中的nonalog浓度。该方法还包括确定关于nonalog组合物的药代动力学概况，并且将API配制为利用类似组合物的药物制剂以实现所需的药代动力学概况。在一个实施方案中，该方法进一步包括基于来自测试受试者的一个或多个样品中的nonalog浓度，来确定所需的药代动力学概况。一旦实现了关于nonalog组合物的所需药代动力学概况或参数，就可以这样配制这种API，使得它模拟nonalog组合物，除了所选nonalog组合物中的nonalog由相应的API替换之外。

[0017] 在另一个方面，本发明涉及非强效类似物(nonalog)组合物。该组合物包括API的nonalog和药学上可接受的载体。

[0018] 这种nonalog组合物用于确定相应API或相应API的药物制剂的药代动力学参数。

[0019] 本发明在各个方面提供了用于增加PK制剂研究效率的方法。由于施用多重基本上同时的临床相关剂量的API将在受试者的血流中产生比用于正常治疗高得多的API浓度(并且因此将呈现潜在的安全问题，并且导致测试受试者的发病率或死亡率)，因此本发明提供了非强效或无活性类似物(nonalog)的使用。本文所述的方法和产物允许评估潜在API制剂的PK，而不使多重受试者经受应激，同时将成本降到最低。

[0020] 本发明的其它方面和实施方案根据下述详细描述将是显而易见的。

附图说明

[0021] 图1显示了概括用于评估猪多重药代动力学研究结果的多室流动模型的图解。

[0022] 图2A-2D显示了从用于制剂筛选的多重PK研究的统计分析获得的结果。用含有多种候选加速赋形剂的制剂(替代胰岛素类似物)皮下注射的猪中的PK应答的起始斜率的图示。每列都是独特的制剂，其中各个动物显示为黑点，且平均值显示为空心点或实心点。实心点在统计上不同于对照(由在图的底部处的箭头突出显示，并且作为图中间的线用于与每个试验的比较)，而空心点与对照并无不同。如果实心点在与整个图相交的垂直线的右侧，则胰岛素类似物在统计上比对照更快地吸收，并且如果它在垂直线的左侧，则它在统计上比对照更慢地吸收。

[0023] 图3显示了从正常血糖钳夹研究获得的结果，显示了在非糖尿病尤卡坦猪(Yucatan pig)用基础制剂中的U-100 Fiasp或U-500 T-1123皮下给药后，在360分钟内维持正常血糖(n=7)所需的葡萄糖输注速率。

[0024] 图4显示了从正常血糖钳夹研究获得的结果，显示了在非糖尿病尤卡坦猪用加速制剂中的U-100 Fiasp或U-500 T-1123皮下给药后，在360分钟内维持正常血糖(n=7)所需的葡萄糖输注速率。

[0025] 图5显示了从正常血糖钳夹研究获得的结果，显示了在非糖尿病尤卡坦猪用对于稳定性进行优化的加速制剂中的U-100 Fiasp或U-500 T-1123皮下给药后，在360分钟内维持正常血糖(n=7)所需的葡萄糖输注速率。

[0026] 图6A-C概括了从正常血糖钳夹研究获得的结果，显示了在猪用U-100 Fiasp或U-500 T-1123减法制剂治疗后，维持正常血糖(n=7)所需的葡萄糖输注速率。图6A是减去柠檬酸盐；图6B是减去EDTA；且图6C是减去伊洛前列素。

[0027] 图7A显示了从加速原纤化测定获得的结果，显示了关于Humalog (n=6)、基础制剂中的T-1123 (n=11)、基础制剂 + 伊洛前列素中的T-1123 (n=3)、柠檬酸盐制剂 + 伊洛前列素中的T-1123 (n=6)、以及柠檬酸盐制剂 + 伊洛前列素 + Tris中的T-1123 (n=15)的平均原纤化滞后时间。关于U-500 T-1123的基础制剂为16 mg/mL甘油、3.2 mg/mL间甲酚和50mM Tris。

[0028] 图7B显示了从加速原纤化测定获得的结果，显示了关于用不含伊洛前列素(n=3)、15 μg/ml伊洛前列素(n=3)、50 μg/ml伊洛前列素和100 μg/ml伊洛前列素(n=3)配制的Humalog的平均原纤化滞后时间。

[0029] 图7C显示了从12个月实时原纤化测定获得的结果，显示了关于对于稳定性进行优化的加速制剂中的U-500 T-1123、U-400 Insuman和U-100 Humalog的平均原纤化滞后时间。所有样品都置于小瓶中，然后在30℃下置于章动器上共1年。对于所有样品N=3。原纤化滞后时间按天进行测量。

[0030] 图8A显示了从化学降解研究获得的结果，显示了对于基础制剂中的U-500 T-1123 (n=1)、商业U-100 Humalog (n=2)和商业U-500 Humulin (n=2)，由于有关物质(RS)和共价高分子量蛋白(HMWP)的累积的纯度损失。

[0031] 图8B显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于其中Mg^{2+}和Tris浓度不同的U-500 T-1123制剂中的有关物质累积。

[0032] 图8C显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于其中Mg^{2+}和Tris浓度不同的U-500 T-1123制剂中的HMWP累积。

[0033] 图8D显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于其中甘油和Tris浓度不同的U-500 T-1123制剂中的RS累积。

[0034] 图8E显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于其中甘油和Tris浓度不同的U-500 T-1123制剂中的HMWP累积。

[0035] 图8F显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于U-500 T-1123的有关物质纯度，所述U-500 T-1123置于小瓶中，然后在30℃下置于章动器上共1年。

[0036] 图8G显示了从化学降解测定获得的结果，以评估关于U-500 T-1123的有关物质纯度，所述U-500 T-1123置于小瓶中，然后在30℃下置于章动器上共1年。

[0037] 图9A显示了从细胞内蛋白质印迹测定获得的结果，所述测定测量在用HI (n=1)或T-1123 (n=3)治疗后，在180分钟内CHO细胞中的hIR-A去磷酸化。

[0038] 图9B显示了从细胞内蛋白质印迹测定获得的结果，所述测定测量在用HI (n=1)或T-1123 (n=2)治疗后，在180分钟内CHO细胞中的hIR-B去磷酸化。

[0039] 图10A显示了当用赖脯胰岛素(KP) (n＝215)或T-1123 (n＝19)治疗时，从在300分钟内就血糖浓度变化监测大鼠获得的结果。

[0040] 图10B显示了从大鼠研究获得的结果，显示了当动物用赖脯胰岛素(KP) (N＝215)或T-1123 (n＝19)治疗时的最大血糖下降(Max BG Drop)。

[0041] 图11A显示了从加速原纤化测定获得的结果，显示了关于Humalog® (含有或不含

三磷酸盐)、Novolog® (含有或不含三磷酸盐)和T-1123 (以U-500配制,含有或不含三磷酸盐)的平均原纤化滞后时间(n=3)。

[0042] 图11B显示了从加速原纤化测定获得的结果,显示了关于Humalog® (含有或不含三磷酸盐)、Novolog® (含有或不含三磷酸盐)和T-8602 (以U-100配制,含有或不含三磷酸盐)的平均原纤化滞后时间(n=3)。T-8602是具有下述修饰的单链胰岛素类似物:EA8、EA14、AA21、AB3、EB29,以及连接B30和A1位置的EEGRR接头。

[0043] 图11C显示了从加速原纤化测定获得的结果,显示了关于在3种不同制剂中的Humalog (n=3)和T-1123的平均原纤化滞后时间:STA-067 (n=3)、STA-109 (n=3)和STA-116 (n=3)。

[0044] 图12显示了在TriPO4的不存在和存在下,对U-500 T-1123基础制剂的强制化学降解测定之后,对于RS和HMWP获得的结果。

[0045] 定义

术语“制剂”和“组合物”在本文中可互换使用。如本文使用的,术语“制剂”或“组合物”涵盖加入活性药物成分(API)中的化学物质或赋形剂,以便例如赋予或支持对于API所需的药理性质。这些性质可以包括但不限于快速吸收、延迟吸收、延长释放、延长半衰期、减少的清除率、增加的清除率和电荷掩蔽。术语“制剂”还涵盖组合物中的API或nonalog的相对浓度,以及基础载体(例如,水溶液、胶囊中的固体粉末、胶囊上的包衣等等)。

[0046] 如本文使用的,术语“受试者”或“患者”预期涵盖人患者和非人动物,例如用于临床前测试中的那些非人动物,例如小鼠、大鼠、兔、犬、猪、猫、灵长类动物和牛。

[0047] 如本文使用的,术语“热力学稳定性”预期涵盖如分别通过无定形聚集物或不溶性高度结构化的原纤维种类的自组装、以及由于共价高分子量蛋白(HMWP)或有关物质(RS)累积的胰岛素类似物组合物的纯度损失所测量的物理稳定性和化学稳定性。

[0048] 如本文使用的,术语“活性药物成分(API)”是这样的物质或物质混合物,其预期用于制造药物(例如,医药)产品,并且当用于药物生产时,成为药物产品的活性成分。此类物质预期在疾病的诊断、治愈、减轻、治疗或预防中提供药理活性或其它直接效应,或者影响身体的结构或功能。API包括用于疾病的诊断、治愈、减轻、治疗或预防中的原料药。API可以是例如蛋白质、肽、小分子、寡核苷酸或聚合物。API可以是胰岛素类似物。如本文使用的,术语“药物产品”是最终剂型,例如含有一般但不一定与非活性成分结合的活性药物成分的片剂、胶囊或溶液。该术语预期涵盖与制备API制剂的各种药学上可接受的载体或赋形剂组合的API的最终剂型。

[0049] 如本文使用的,术语“施用”预期涵盖由此将API、药物产品或nonalog引入测试受试者的体内的方法。示例性施用途径包括但不限于经口、皮下、舌下、肌内、静脉内、皮内、腹膜内、经颊或经鼻。

[0050] 如本文使用的,术语“nonalog”预期涵盖API的无活性或非强效类似物。这些nonalog具有与API相似的化学结构、一级结构、二级结构、三级结构、四级结构、疏水性结构或相似的表面电荷模式。在一些情况下,nonalog与API的其它nonalog足够不同,使得它可以可靠地检测到和/或与样品中的其它nonalog分开,但又足够相似,以至于预计nonalog的PK性质并不显著不同于相应的API。在非限制性实例中,API的不同nonalog可以通过质量而彼此不同。

[0051] 如本文使用的，术语“组织样品”或“样品”预期涵盖取自受试者的固体、液体和气体提取物的样品，包括但不限于活组织检查样品、血液、尿和脊髓液样品，以及呼出物样品。

[0052] 如本文使用的，除非上下文另有要求，否则术语“约”意指相关数值的+或- 10%。

具体实施方式

[0053] 胰岛素具有自结合成二聚体、六聚体、高分子量聚集物和不溶性原纤维(在治疗浓度下)的能力。经由形成有关物质、高分子量共价和非共价蛋白质聚集物、或不溶性淀粉样蛋白原纤维的纯度损失是糖尿病治疗中的问题，尤其是在预期在使用前贮存的药物组合物的背景下。在原纤化过程期间，几种构象变化可能在胰岛素结构中发生。胰岛素被认为在原纤化之前的阶段形成淀粉样蛋白样结构或无定形聚集物。这些淀粉样蛋白原纤维富含β-折叠构象。与天然组装无关，原纤化被认为经由淀粉样原性(amyloidogenic)部分折叠而发生。无锌胰岛素尤其对在广泛范围的条件下的纯度损失敏感，并且被认为通过损害天然二聚化和高阶自组装的因素得到促进。在胰腺β细胞和大多数药物制剂中的胰岛素贮存形式通过与胰岛素氨基酸，特别是HisB10残基的侧链配位的轴向锌(Zn)离子得到稳定。将胰岛素或胰岛素类似物配制为锌稳定的六聚体延缓但不能防止原纤化，尤其是在高于室温和搅动时。将胰岛素类似物作为锌稳定的六聚体贮存具有延迟类似物作用的另外缺点，因为胰岛素需要解离成单体以与胰岛素受体结合。这特别是速效胰岛素类似物的产生中的障碍，其必须克服通过单体、无锌制剂显示出的稳定性问题或通过六聚体制剂显示出的延迟作用。

[0054] 本发明在各个方面和实施方案中涉及速效胰岛素类似物，以及在广泛范围的蛋白质浓度和制剂强度(通常为U-100至U-500，并且任选地高达U-1000)下提供快速作用的制剂。在各个实施方案中，胰岛素类似物的促有丝分裂性不大于赖脯胰岛素(缩写为KP，商购可得的速效胰岛素类似物)。在各个实施方案中，在锌离子的不存在下，胰岛素类似物或其组合物的热力学稳定性等于或大于在锌离子的存在或不存在下配制的商购可得的胰岛素类似物的热力学稳定性。

[0055] 本发明提供了胰岛素类似物或其组合物，在一些实施方案中，其不形成原纤维或显示出延迟的原纤维形成或显示出原纤化滞后时间的增加。在一些实施方案中，胰岛素类似物或其组合物以由于HMWP和RS累积的最低限度纯度损失的形式显示出高物理稳定性和化学稳定性。本发明进一步提供了包括各种赋形剂化合物的胰岛素组合物，所述赋形剂化合物提供了胰岛素类似物的高水平的热力学稳定性和高吸收率。

[0056] 在一些实施方案中，与例如野生型人胰岛素或商业胰岛素类似物制剂相比，胰岛素类似物或其组合物并不形成胰岛素原纤维或花费更长的时间形成胰岛素原纤维。在一些实施方案中，与例如野生型人胰岛素或商业胰岛素类似物制剂相比，胰岛素类似物或其组合物显示出增加的热力学稳定性。在实施方案中，本文所述的胰岛素类似物组合物提供了将组合物贮存更长的持续时间，而无不希望有的原纤维形成和/或不希望有的物理或化学降解或聚集的能力。还提供了使用胰岛素和胰岛素类似物组合物用于治疗患有糖尿病的受试者(例如，用于管理血糖水平)的方法。

[0057] 按照本发明的实施方案，提供了具有赋形剂的速效胰岛素类似物的制剂，所述赋形剂提供了出乎意料的优良药效学性质和/或在物理和/或化学稳定性方面出乎意料的优

良性质。在各个实施方案中，本公开内容提供了各种胰岛素类似物制剂组分的有效性的综合比较评估。这些研究鉴定了满足关于改善的人治疗的稳定性和吸收速度要求的组分制剂。按照本发明的实施方案，提供了更好地复制胰岛素的自然时间作用曲线，而不在贮存期间形成不期望的原纤维的胰岛素类似物和制剂。

[0058] 本发明的优良性质部分地由与B链的N末端缺失配对的，胰岛素类似物的A和B链内的取代的新型组合赋予。A链和B链取代落入四个类别内：(i) 在位置A8处的非β分支取代；(ii) 在含有极性、荷电或小于天然酪氨酸的侧链的位置A14处的致螺旋(helicogenic)取代；(iii) 在位置B28和/或B29处的取代，以降低胰岛素的二聚化或增强其在中性pH下的溶解度；以及(iv) 与N末端缺失结合的在B链的N末端附近的取代。这些取代中的一些可能单独地加强野生型胰岛素的稳定性，而其它取代可能单独地损害野生型胰岛素的稳定性。同样地，这些取代中的一些可能单独地延长胰岛素作用的尾部(在静脉内推注注射时)，而其它取代可能单独地减轻或缩短该尾部。本发明的一个方面提供了与B链的N末端缺失结合的此类取代的组合，其一起提供了胰岛素类似物，其制剂在0.6-12.0 mM范围内的广泛范围的蛋白质浓度下保持在皮下注射时的快速作用，并且显示出足够的物理稳定性和化学稳定性，以对于糖尿病治疗是实用的。

[0059] 在一些方面，本发明的胰岛素类似物是含有修饰的A链多肽和修饰的B链多肽的双链胰岛素类似物。参见例如，在此通过引用以其整体并入的WO 2018/094388。在一些实施方案中，本发明的胰岛素类似物包含关于野生型人胰岛素的下述修饰或由其组成：EA8、EA14、GA21、desB1、AB2、EB3和EB29。

[0060] 在一个实施方案中，本发明的胰岛素类似物包含具有下述氨基酸序列的修饰的A链：

GIVEQCCESICSLEQLENYCG (SEQ ID NO: 1)。

[0061] 在一个实施方案中，本发明的胰岛素类似物包含具有下述氨基酸序列的修饰的B链：

AEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET (SEQ ID NO: 2)。

[0062] 在各个实施方案中，本发明的胰岛素类似物是单体胰岛素类似物或二聚体胰岛素类似物。如本文使用的，“单体胰岛素类似物”指当它基本上不含锌(例如，每摩尔胰岛素少于约0.05摩尔锌)进行配制时，在25℃下稳定至少30天的胰岛素，并且因此与锌-六聚体形式相反，占优势地以单体和/或二聚体形式存在于溶液中。例如，单体胰岛素类似物可以以高浓度，例如以100 IU/ml(例如，约U-100)或更高(例如，约U-200、约U-300、约U-400、约U-500、约U-1000、约U-1500或约U-2000)进行配制，而无显著的原纤维形成或化学降解。在一些实施方案中，胰岛素类似物以约U-100至约U-1000，或约U-100至约U-500进行配制。在各个实施方案中，单体胰岛素在25℃下在药物组合物中稳定至少约1个月、或至少约2个月、或至少约3个月、或至少约4个月、或至少约5个月、或至少约6个月、或至少约9个月、或至少约12个月，而无胰岛素原纤维的显著形成(即，小于1%的原纤维形成)。

[0063] 在一些实施方案中，与在无锌或含锌制剂中的野生型胰岛素、赖脯胰岛素或门冬胰岛素相比，胰岛素类似物及其组合物具有更高的稳定性。在各个实施方案中，与Humalog® (Eli Lilly & Co.，Indianapolis，Indiana)、Novolog® (Novo Nordisk，Bagsværd，丹麦)或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出原纤化的更低速率。在各个实

施方案中，与Humalog®、Novolog®或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出降解成HMWP的更低速率。在各个实施方案中，与Humalog®、Novolog®或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出降解成RS的更低速率。

[0064] 在各个实施方案中，与U-500浓缩制剂中的Humalog®、Novolog®或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出原纤化的更低速率。在各个实施方案中，与U-500浓缩制剂中的Humalog®、Novolog®或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出降解成HMWP的更低速率。在各个实施方案中，与U-500浓缩制剂中的Humalog®、Novolog®或野生型人胰岛素相比，胰岛素类似物或其组合物显示出降解成RS的更低速率。

[0065] 在各个方面和实施方案中，本发明提供了药物组合物和/或制剂，其包含有效量的如本文所述的胰岛素类似物和多聚磷酸盐化合物。在一些实施方案中，制剂是至少U-100或至少U-500。多聚磷酸盐是聚合氧阴离子的盐或酯，其由通过共享氧原子连接在一起的四面体PO4 (磷酸盐)结构单元形成。在一些实施方案中，多聚磷酸盐化合物以有效增加胰岛素类似物在施用后的吸收速率的量掺入本发明的组合物中。在各个实施方案中，多聚磷酸盐选自焦磷酸盐、三磷酸盐、三偏磷酸盐和四磷酸盐中的一种或多种。多聚磷酸盐可以以其酸性形式或以各种盐形式使用，例如，作为碱(例如，钠或钾)盐或碱金属(例如，钙和镁)盐。在一些实施方案中，多聚磷酸盐包含三磷酸钠。

[0066] 组合物中的多聚磷酸盐(例如三磷酸钠)浓度为约1 mM至约100 mM、或约1 mM至约50 mM、或约1 mM至约40 mM、或约5 mM至约50 M。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约5 mM、约10 mM、约15 mM、约20 mM、约25 mM、约30 mM、约35 mM、约40 mM、约45 mM或约50 mM。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约10 mM至约100 mM、或约10 mM至约50 mM。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约15 mM至约35 mM。在一些实施方案中，多聚磷酸盐的浓度为约10 mM至约30 mM。在一些实施方案中，多聚磷酸盐的浓度为约20 mM，其中所述多聚磷酸盐任选地为三磷酸钠。

[0067] 在一些实施方案中，胰岛素或其类似物的原纤化可以通过使用硫黄素T (ThT)染料测定进行评估。硫黄素T染料对原纤维的构建是高度敏感的。ThT染料与淀粉样蛋白原纤维相互作用，而不改变蛋白质的结构或序列。参见，Wang J.-B.，Wang Y.-M.，Zeng C.-M.，*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011，415，675-679，其在此通过引用以其整体并入。该染料具有分别在λ=480 nm和440 nm处的发射和激发带。ThT染料通过其指示淀粉样蛋白原纤维的机制是ThT染料在原纤化发生时识别原纤维的β折叠结构，并且其发射强度稳定增加。原纤化滞后时间是胰岛素或其类似物开始形成原纤维所花费时间的量度。为了本公开内容的目的，原纤化滞后时间通过发射光谱的拟合曲线的斜率对时间的线性回归进行确定。

[0068] 在一些实施方案中，如本文所述的胰岛素类似物或其药物组合物显示出以下的原纤化滞后时间(在40℃下伴随快速搅动)：多于约5小时、或多于约10小时、或多于约15小时、或多于约20小时、或多于约25小时、或多于约30小时、或多于约35小时、或多于约40小时、或多于约45小时、或多于约50小时、或多于约55小时、或多于约60小时、或多于约65小时、或多于约70小时、或多于约75小时、或多于约80小时、或多于约85小时、或多于约90小时、或多于约95小时、或多于约100小时、或多于约125小时、或多于约150小时、或多于约200小时、或多于约250小时。

[0069] 在各个实施方案中，在用多聚磷酸盐(例如三磷酸钠)配制后，本文所述的胰岛素类似物或组合物并不显示出原纤化滞后时间的任何减少或显著减少。

[0070] 在一些实施方案中，如本文所述的胰岛素类似物具有比商购可得的赖脯胰岛素更低的促有丝分裂潜力。

[0071] 本发明在一些方面和实施方案中提供了使用例如nonalog用于确定API的药代动力学参数或药代动力学概况的方法。本发明进一步提供了使用例如nonalog组合物，用于确定合适或最佳API制剂的方法。本发明进一步包括可以用于确定API的药代动力学参数或药代动力学概况的nonalog或其组合物。如本文所述的，用于确定API制剂的PK性质的方法使测试受试者中的应激和毒性降到最低，降低了成本，降低了动物间变化性的效应，并且增加了通量。在一个实施方案中，该方法允许在单个实验中研究单个受试者中的多重制剂。

[0072] 在一些实施方案中，本发明提供了用于确定API制剂的药代动力学(PK)参数或概况的方法。该方法包括向测试受试者施用API的多种无活性或非强效类似物(nonalog)组合物，并且确定来自测试受试者的一个或多个组织样品中的nonalog浓度。该方法还包括基于测试受试者中的nonalog浓度，来确定关于API制剂的一种或多种药代动力学参数。在一个实施方案中，该方法用于确定nonalog的PK参数，并且将其用作用于确定关于相应API的PK参数的替代物。

[0073] 因此，本公开内容提供了用于制备API的药物制剂的方法。该方法包括向测试受试者施用API的多种nonalog组合物，并且确定来自测试受试者的一个或多个组织样品中的nonalog浓度。该方法还包括确定关于nonalog组合物的药代动力学概况，并且将API配制为具有所需药代动力学概况的药物制剂。在一个实施方案中，该方法进一步包括基于来自测试受试者的一个或多个组织样品中的nonalog浓度，确定所需的药代动力学概况。一旦实现了关于nonalog组合物的所需药代动力学概况或参数，那么就可以按照所选的nonalog组合物来配制该API，除非所选的nonalog组合物中的nonalog由相应的API替换。可以对API制剂制备并不显著影响药代动力学概况的其它修饰。

[0074] 在另一个方面，本发明提供了对于给定API (例如胰岛素)的非强效类似物(nonalog)或多重nonalog，其与非人测试受试者具有基本上相同的相互作用，但是化学或物理上可区分的。这个方面包括nonalog的组合物，其具有影响测试受试者中的药代动力学的不同药学上可接受的载体。这些nonalog组合物可用于确定相应API (例如胰岛素)的各种制剂的药代动力学参数。在一些实施方案中，本发明提供了至少三种、至少四种、至少五种或至少六种nonalog的试剂盒，其可以按照本公开内容进行差异地配制。

[0075] 在药物发现过程中，候选活性药物成分(API) (也称为“原料药”)就所需效应进行设计且评估，所述效应一般是诊断、治愈、减轻、治疗或预防特定疾病或状况。例如，肽可以就它们如何良好地与细胞受体结合以抑制其作用进行评估，或者小分子可以就其抗生素性质进行评估。当选择特定API用于进一步开发时，几种方法或工具通常用于优化其活性。这些方法或工具之一是API的制剂。API的制剂包含与API混合的化学物质，以便赋予优化的药理性质。配制的原料药或API称为药物产品。制剂中包括的物质称为赋形剂。例如，弱酸赋形剂可能包括在API制剂中，以使API在液体中可溶。在另一个实例中，离子盐赋形剂可以与API结合，以便掩盖皮下组织中的电荷，以防止API上的荷电表面被组织中的荷电元素“捕获”，并且从而致使API能够更快速地朝向血流移动。优化制剂在确保API具有其设计具有的

时间作用曲线方面发挥重要作用。因此,优化API制剂是药物开发中的重要步骤。

[0076] 药代动力学(PK)是物质在动物(例如人或非人哺乳动物)中的吸收、分布、代谢和消除的时间过程研究。吸收是物质(例如API)从施用部位移动到血流的过程。分布描述了物质(例如API)如何到达受试者身体的不同部分。代谢是物质在施用于受试者后被分解或转换成代谢物的过程。消除是从受试者的体内清除物质的过程,经常是通过肾且进入尿内或通过胆汁且进入粪便内。PK数据(或参数)的实例包括但不限于进入血流内的吸收率、生物利用度、半衰期、代谢物生成率、从血流中的清除率和从测试受试者中的清除率。取决于PK研究的目标或需要,药代动力学概况可以包括所有这些参数或这些参数的子集。

[0077] PK研究可用于优化API制剂,并且在动物中的高效和有效的PK研究的重要性得到充分认识。PK数据在评估任何药物产品或API方面是至关重要的,因为研究药物如何进入、与受试者的身体相互作用且离开受试者的身体对于确定剂型、剂量浓度和剂量施用之间的时间是重要的。PK影响在API制剂已施用后,血液中的API出现和消失模式。这种模式在产生药物的药效学(PD)或时间作用曲线方面是至关重要的,因为它驱动靶组织随着时间过去暴露于其的API浓度。

[0078] 然而,在药物产品筛选过程期间,由于进行研究所需的成本和时间,动物研究经常呈现瓶颈。动物研究经常具有较大的动物间变化,并且经常使这些变化降到最低的解决方案是使用大量动物来获取相关且经常是冗余的数据。

[0079] 尤其是在大型动物如猪中维持动物群落且进行所得到的大量研究的成本可能是成本高昂的。然而,由于对胰岛素的应答与人的相似性,猪中的研究可以是特别期望的。另外,维持大型群落所需的空间限制了可以同时进行多少研究。由于在动物模型中进行制剂研究的大成本,经常在药物开发过程中评估少量制剂,潜在地对于患者是最佳且有益的前述制剂。动物研究,包括PK研究,也旨在使对待测试动物的应激降到最低。对于大型动物模型中的研究,经常必须执行手术,以将导管安装到动物内,以允许对于研究的持续时间从动物上的同一部位重复获取血液。这些导管代表感染风险,并且在研究的跨度期间必须保持清洁和易接近。导管安装和维持增加了成本,并且是关于研究中使用的动物的外在应激源。即使在较小的动物中,对同一动物进行的重复实验也可能是持续且经常重复的应激来源。因此,进行PK研究的更有效方法减少测试动物群落中的应激。待测试的API的效应代表了关于待测试的动物的另一个成本和应激来源。例如,待用胰岛素类似物治疗的猪需要监测其血糖水平,并且必须对这些动物给予另外的葡萄糖,以避免低血糖事件。API在高剂量下具有其它毒性,限制了可以研究各个动物的频率。

[0080] 此外,关于药物吸收和可变生物利用度问题的经济和医学后果是巨大的。在药物开发的发现和临床前阶段期间未能鉴定有希望或可能成问题的药物候选物是关于药物生物利用度的问题的最显著后果之一。相应地,需要开发综合的、基于生理学的药代动力学测试系统,其能够评估在人中的药物生物利用度和变化性。此外,考虑到为医学界提供新的治疗替代方案的迫切需要、以及用于选择先导药物候选物的高通量药物筛选的目前使用,需要可以快速地提供药代动力学参数或概况的综合生物制药工具。

[0081] 因此,仍然需要优化API制剂的方法,所述方法是更有效、更具成本效益的,并且使对研究动物的应激和伤害降到最低。

[0082] 广义上,本发明在一些方面提供了在动物研究中评估制剂对PK参数的作用的方

法，由此将具有不同制剂的API的多重nonalog基本上同时施用于动物。在一个实施方案中，在研究期间在施用后的预定时间点，从动物中收集血液。关于每种nonalog制剂的PK性质通过评估在研究过程中的血浆样品中的每种nonalog浓度进行确定。由于nonalog都是密切相关和药理学无活性的，因此PK参数的任何变化主要或完全是由于不同的制剂。然后，该信息可以用于筛选出并不满足所需PK标准的制剂或精制制剂用于改善的PK参数。然后可以将具有所需特性的制剂用于API。

[0083] 在一个实施方案中，在nonalog组合物的施用后的预定时间点，从测试受试者中提取样品。样品(例如血液样品)含有研究中使用的所有nonalog。用于获取样品的时间点的数目和频率可以根据PK数据的所需分辨率进行确定。一般地，在同一时间段内的更多个时间点将在研究结束时获得的PK数据中给出更大的分辨率。时间点的数目和频率也可以根据对于获取的每个样品对测试受试者造成的应激水平进行确定。使用来自在时间过程内获取的样品的不同nonalog浓度，通过选择的检测方法评估不同制剂的效应。一旦在施用后的预定时间点从研究动物中获取样品，就确定每种nonalog的浓度，以便评估研究中使用的不同制剂的PK性质。因为当使用所选的检测方法时每种相关的nonalog具有不同的特征，所以可以从来自单一研究的样品评估在研究过程中的每种nonalog的浓度，并且用于确定每种施用的nonalog组合物的PK性质。在样品就在一段时间内的每种nonalog浓度进行评估后，评估数据。通过在一段时间内每个样品中的每种nonalog浓度所指示的，制剂可能对其分别的nonalog赋予或可能不赋予有益的PK性质，并且可以选择制剂以进展至更严格的测试或从筛选过程中消除。

[0084] 在一些实施方案中，该方法包括将多重nonalog组合物施用于第二受试者，并且确定来自第二受试者的一个或多个组织样品中的nonalog浓度。然后选择施用于第一受试者和第二受试者两者的nonalog，并且在第二受试者中确定其清除率。然后，基于所选nonalog在第二受试者中的清除率，来确定所选nonalog在第一受试者中的吸收率。在该实施方案中，通过将nonalog施用于一个或多个受试者，例如两个受试者、三个受试者或更多个受试者，来计算nonalog的清除率。在该实施方案的一个实例中，将一种或多种nonalog施用于测试受试者(例如，第一受试者和第二受试者)。然后从测试受试者中获得一种或多种组织或其它(例如血液)样品，并且确定每个样品中的每种nonalog (或所选nonalog)浓度。然后可以确定来自第二测试受试者的每种(或所选)nonalog的清除率，以便计算施用于第一测试受试者的API的nonalog制剂的吸收率。在一个实施方案中，将nonalog组合物同时或几乎同时施用于第一受试者和第二受试者。在另一个实施方案中，将nonalog组合物连续施用于第二受试者。可以从例如血液、肝、肾、肺、脾、心脏、脑中获取第二受试者的样品。从第二受试者中获取的组织或其它样品可以是与第一受试者相同或不同的组织或来源。在一个实施方案中，可以向受试者(包括第一受试者或第二受试者)同时施用多重nonalog，例如一至二十五种nonalog。在一个实施方案中，向受试者施用两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种nonalog组合物。

[0085] 适用于本文所述的制剂和方法中的活性原料药或API是治疗上、预防上和/或诊断上的活性原料药(本文也缩写为“活性原料药”)。例如，在各个实施方案中，API是蛋白质、肽、抗体或其一部分、小分子、寡核苷酸或聚合物。在一个实施方案中，API是胰岛素或用于治疗糖尿病的药物。替代API包括镇痛药、阿片类药物、解热药、麻醉药、抗偏头痛药、抗癫痫

药、抗帕金森病药、多巴胺能药、抗精神病药、抗焦虑药、镇静剂、抗抑郁药、精神兴奋剂、多巴胺、去甲肾上腺素、烟碱、α-肾上腺素能药、血清素、用于ADHD的H3拮抗剂和用于成瘾性病症中的促智剂。在更进一步的实施方案中，活性物质选自包括以下的治疗类别：中枢作用镇痛药、镇静催眠药、食欲抑制剂、减充血剂、镇咳药、抗组胺药、止吐药、止泻药、以及用于治疗发作性睡病和注意缺陷多动障碍的药物。在某些实施方案中，活性原料药与滥用综合征相关，并且活性原料药可以例如选自阿片类药物、CNS抑制剂、CNS兴奋剂、大麻素、尼古丁样化合物、谷氨酸盐拮抗剂和N-甲基-D-天冬氨酸盐(NMDA)拮抗剂。

[0086] 无活性或非强效类似物的使用允许同时或连续地向测试受试者施用多重nonalog组合物。在大多数情况下，以临床相关或有效浓度的完全活性API的同时施用导致测试受试者中极高浓度的API，并且很可能引起毒性。即使施用高剂量的特定API并不引起毒性，也必须处理活性API对动物的作用，其将增加研究的成本。此外，给予高剂量的API可能以PK研究并未给出可靠数据的方式影响受试者或其生理学。同样地，施用低浓度的完全活性的API以便降低毒性可以潜在地改变与其制剂组合的API的PK参数，或者导致对于分析无法检测到的API的血液浓度。无活性或非强效类似物允许对测试受试者的多重、几乎同时或连续的临床相关给药，伴随减少或消除的毒性风险。毒性风险的这种降低允许成本减少、有效性和受试者福利益处。

[0087] nonalog可以具有广泛各种设计。在一个实施方案中，nonalog是无活性的，即它们不具有API的药理学/生物/化学活性或仅具有一部分药理学/生物/化学活性。在另一个实施方案中，API的nonalog彼此足够不同，使得可以在单一组织样品(例如，血浆样品)中检测到多重nonalog。在再一个实施方案中，nonalog与亲本API足够相似，使得根据nonalog中的一种或多种变化预计没有PK变化。在一个优选的实施方案中，nonalog不具有药理学/生物/化学活性；彼此足够不同，使得可以在单一组织样品中检测到多重nonalog；并且与亲本API足够相似，使得根据nonalog中的一种或多种变化预计很少或没有PK变化。

[0088] 在各个实施方案中，nonalog在重组DNA表达系统中产生或化学合成。在一个实施方案中，nonalog用不同的同位素进行同位素标记，以增加其使用质谱法检测方法检测的特异性。在另一个实施方案中，nonalog被设计为具有不同的疏水性，以增加使用HPLC检测方法的特异性。在另一个实施方案中，使用配体结合液相层析串联质谱法(LBA-LC-MS/MS)，在肽或蛋白质序列中取代具有相似化学性质但不同质量的氨基酸以增加特异性。分子设计中的这种灵活性提供了对于统计上相关的群体大小合成足够量的材料的方法。

[0089] 在一些实施方案中，nonalog是与API的完全活性形式相比，具有约75%或更低活性的API的无活性或非强效类似物。在一个实施方案中，与API的完全活性形式相比，nonalog具有约10%或更低的活性。API或nonalog的活性是例如生物、药理学、医学或化学活性。在一些实施方案中，API或nonalog的活性基于体外或体内测定。用于测量活性的测定可以是例如酶联免疫吸附测定、免疫组织化学测定、流式细胞术、测量API/nonalog与其靶(例如受体)的结合亲和力或测量酶活性抑制的生物化学测定。

[0090] 在一个实施方案中，nonalog具有与API相似的物理、化学或生物结构。例如，nonalog具有与API相似的化学结构、相似的一级结构、相似的二级结构、相似的三级结构或相似的四级结构。在另一个实施方案中，nonalog具有与API相似的疏水性质或相似的表面电荷模式。术语“疏水性质”包括API或nonalog的整体疏水性以及API或nonalog的一部分的

疏水性。例如，疏水性质包括蛋白质的疏水特性，所述蛋白质具有暴露在蛋白质的表面上或埋藏在蛋白质的结构内部的全部或例如一部分蛋白质。

[0091] 在各个实施方案中，肽或蛋白质(例如，胰岛素)的nonalog包含与API相比具有一种或多种氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中，一种或多种氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。nonalog可以具有例如一种突变、两种突变、三种突变、四种突变、五种突变、六种突变、七种突变、八种突变、九种突变或十种突变。在某些实施方案中，突变包括氨基酸取代，例如保守氨基酸取代和/或非保守取代。在一些实施方案中，nonalog是具有10至100个氨基酸的蛋白质或肽，其中一个或两个氨基酸被取代、插入或缺失，导致无活性或非强效类似物。在一些实施方案中，蛋白质具有多于100个氨基酸，并且可以具有一种或两种另外的取代、缺失或插入。在一些实施方案中，nonalog集合中的每种nonalog在相对于API的等同位置处具有一种或多种修饰。在一些实施方案中，nonalog具有的氨基酸序列在与API的氨基酸序列的90%同一性内、或在与API的氨基酸序列的95%同一性内、或在与API的氨基酸序列的98%或99%同一性内。“保守取代”包括在具有相似侧链的一组氨基酸内进行的那些取代，例如：中性和疏水性氨基酸，甘氨酸(Gly或G)、丙氨酸(Ala或A)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、异亮氨酸(Ile或I)、脯氨酸(Pro或P)、色氨酸(Trp或W)、苯丙氨酸(Phe或F)和甲硫氨酸(Met或M)；中性极性氨基酸，丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、酪氨酸(Tyr或Y)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Glu或Q)和天冬酰胺(Asn或N)；碱性氨基酸，赖氨酸(Lys或K)、精氨酸(Arg或R)和组氨酸(His或H)；以及酸性氨基酸，天冬氨酸(Asp或D)和谷氨酸(Glu或E)。进一步地，标准氨基酸也可以被非标准氨基酸例如属于同一化学类别的那些氨基酸取代。作为非限制性实例，碱性侧链赖氨酸可以被较短侧链长度的碱性氨基酸(鸟氨酸、二氨基丁酸或二氨基丙酸)替换。赖氨酸也可以被中性脂肪族电子等排体正亮氨酸(Nle)替换，所述中性脂肪族电子等排体依次又可以被含有较短脂肪族侧链的类似物(氨基丁酸或氨基丙酸)取代。在一些实施方案中，胰岛素nonalog具有关于赖脯胰岛素、门冬胰岛素或Fluorolog (Asp B10、邻-单氟苯丙氨酸-B24、赖脯胰岛素)的序列的1至5种突变。在一些实施方案中，这些突变是保守突变，具有不多于一种、两种或三种非保守突变或非标准突变。

[0092] 在一个实施方案中，突变导致nonalog的活性减少，例如，nonalog与API的受体或生物靶的结合亲和力或活性减少。在一个实施方案中，nonalog可以以减少的效力激活相应的API受体。在其它实施方案中，突变导致nonalog在相应API的受体或生物靶处具有减少或消除的激活活性。

[0093] 在另一个实施方案中，本文所述的nonalog进行修饰，以对于其受体或生物靶中的一种或多种具有减少的亲和力或活性，其使得活性(包括激动或拮抗在内)的减弱。在一些实施方案中，突变允许nonalog具有减弱的活性，例如，相对于未突变的，即API，对靶的结合亲和力减少，酶促活性减少，靶(例如，受体)的抑制或激活减少。在一些实施方案中，nonalog的活性可以通过使用本领域技术人员已知的体外和体内测定进行确定。本文所述的方法涉及基于药代动力学的API制剂设计，其使用向受试者施用一种或多种nonalog作为API的替代物。在一个实施方案中，nonalog组合物可以施用于受试者，以便确定哪种制剂用于相应的API以获得对于API期望的吸收、API从组合物中的期望解离或释放概况、API在受试者中的期望的分布概况、API在受试者中的期望代谢概况、或API在受试者中的期望排泄

概况。在一些实施方案中，本文公开的方法测量一种或多种制剂的吸收效应。由于API的代谢产生可预测的代谢物，因此可以经由LC-MS/MS或另一种检测方法确定在一段时间内一种或多种nonalog的代谢物浓度，以计算代谢率。本文所述的方法还促进基于nonalog的吸收和一种或多种另外的生物利用度参数(包括分布、代谢、消除和任选的毒性)，预测API在哺乳动物中的命运。

[0094] 在这方面，该方法允许使用nonalog组合物作为替代物来优化API制剂。nonalog组合物可以具有施用于受试者的赋形剂(或其浓度)的几次迭代，并且基于某些期望特性选择nonalog组合物。然后，这种所选的nonalog组合物用于设计/优化相应API的制剂。

[0095] 在一些实施方案中，消除率通过检测测试受试者的尿或粪便中的一种或多种nonalog及其/它们的代谢物的存在进行计算。

[0096] 在一些实施方案中，可以测量一种或多种PK参数以制备PK概况。使用本发明的nonalog组合物和方法生成的该PK概况可以是单维或多维输出，其反映受试者关于API的一种或多种PK参数。通过所选的PK参数以及任选的吸收和一种或多种另外的生物利用度参数和毒性，结果可以用于对nonalog组合物进行概况分析或排序。

[0097] 在一些实施方案中，nonalog组合物模拟所需的API制剂或现有的API制剂。在一些实施方案中，API制剂是这样的，使得它模拟nonalog制剂。如本文在制剂或组合物的上下文中使用的，术语“模拟物”意指两种或更多种组合物具有相似的成分。例如，模拟nonalog组合物的API制剂具有与nonalog组合物相似浓度的相似成分，除了组合物中的nonalog被API替换之外。类似地，模拟API制剂的nonalog组合物具有与API制剂相似浓度的相似成分，除了制剂中的API由nonalog替换之外。

[0098] 在一些实施方案中，nonalog组合物模拟API制剂的原因是使用nonalog制剂作为对照或测试现有API制剂，以便评价在其中多重nonalog组合物施用于受试者的多重测试环境中PK参数的任何变化。在一个实施方案中，已知的API制剂连同nonalog组合物一起施用，例如，以用作对照或校正在研究期间可能引入的错误，或将API制剂的已知PK参数与在API制剂与nonalog组合物组合施用后获得的PK参数进行比较。

[0099] 在另一个实施方案中，将具有不同组成的几种nonalog施用于受试者，并且基于受试者中的所需PK特性或应答，选择nonalog组合物。然后配制API制剂以模拟所选的nonalog组合物。

[0100] 本文公开的nonalog组合物可以同时、几乎同时或连续施用于受试者。例如，在一个实施方案中，将多种nonalog组合物同时施用于受试者，即连同其它nonalog一起施用。在一个实施方案中，nonalog经由相同的施用途径或经由不同的施用途径施用于受试者。例如，一种nonalog可以经口施用，而另一种可以静脉内施用。应当注意，在该实施方案的上下文中，同时施用可以意指所有nonalog一起施用或在彼此的短时间跨度内(几乎同时)施用。例如，在几乎同时的施用中，所有nonalog在范围为约1分钟至约30分钟的时间跨度内施用。

[0101] 在单一测试受试者中同时或接近同时施用nonalog或其分别的组合物允许增加的效率，并且降低PK制剂研究的成本。这是因为需要较少的测试受试者。另一个益处是它允许同时检测单一组织样品中的多重nonalog。这增加了用于评估不同制剂的PK参数的通量，并且减少了进行这些研究所需的时间和成本。这种方法的另一个益处是测试受试者中的应激水平减少。这种方法的再一个益处是动物间变化的降低，因为可以在一个研究中对于同一

测试受试者评估多重制剂。

[0102] 在一些实施方案中，将nonalog或其分别的组合物连续施用于测试受试者。连续施用使进行PK研究所需的动物数目降到最低，并且允许进行PK研究，而不在给定的时间跨度内用几种nonalog使受试者超负荷。连续施用可以以这样的方式进行，使得在第一批nonalog从受试者中消除后施用第二批nonalog。还可以进行连续施用，以研究nonalog的吸收率，使得在第二批nonalog完全吸收后施用第二批nonalog。例如，第二批或连续分批的nonalog可以在第一批nonalog或其组合物施用后约35分钟至约24小时进行施用。注意到，这些时间跨度是示例性的，并且nonalog或nonalog组合物的连续施用之间的时间跨度可以基于例如nonalog的消除率、nonalog的体内半衰期或nonalog组合物的吸收率进行计算。例如，在其中nonalog或其组合物是速效或快速吸收的一个实施方案中，第二次施用可以在第一次施用后不久(例如，在约35分钟内)进行，使得第二次施用避免第一速效nonalog组合物在受试者中的血浆浓度最大值，从而减少由于受试者中的高浓度nonalog的任何潜在不利效应。

[0103] 在各个实施方案中，在向测试受试者施用nonalog组合物之前或之后，以多重时间间隔收集组织样品。

[0104] nonalog及其制剂进入测试受试者内的施用途径可能不同。当从受试者中获取的样品是血液时，那么药物最终必须存在于血流中，使得可以从动物中获取血液样品以确定在一段时间内的nonalog浓度，以评估由待测试的不同制剂赋予的PK差异。设想施用途径不仅可以在研究之间变化，而且可以在同一研究中的同一测试受试者中的nonalog之间变化。

[0105] 在一些实施方案中，使用下述途径中的一种或多种，将nonalog组合物施用于受试者：肠内(例如，经颊或舌下、经口(PO)、直肠(PR))、肠胃外(例如，血管内、静脉内推注、静脉内输注、肌内、皮下注射)、吸入或经由鼻途径、经皮(经皮肤)、皮内、腹膜内或鞘内。在一个实施方案中，所选择的施用途径决定了用于获得PK参数的测定类型和/或来源。例如，对于经口施用，可以用于确定nonalog组合物在片剂或胶囊中的释放或溶解速率。在另一个实施方案中，多重施用途径用于确定nonalog对特定组织的分布。例如，经口、肝、全身和血脑屏障测定可以用于获得关于靶向脑组织的化合物的分布参数。在一些实施方案中，使用一种或多种组织或其它样品中的nonalog浓度来确定药代动力学参数，所述组织例如但不限于血液、骨、肝、肾、肺、脾、心脏、脑、胃肠道、脊柱、脊髓液、脑脊髓液、眼、口或肌肉。在一个优选实施方案中，组织样品是血液样品。

[0106] 在一些实施方案中，在nonalog组合物施用之前或之后，从受试者中收集的组织样品用于确定nonalog、API或nonalog的代谢物的浓度。在一个实施方案中，使用单一测定或分析方法测量nonalog、API或其代谢物的浓度。例如，在一种情况下，从受试者中收集几个组织样品，并且在单一测定例如LC-MS中在一个步骤中进行评估。在另一个实施方案中，使用多重测定或分析方法分析几个组织样品。例如，可以使用液相层析和紫外检测来分析一个组织样品集合，并且可以使用LC-MS分析来自同一受试者的另一个样品集合。分析方法的选择取决于待分析的nonalog，并且可以基于nonalog或API的物理或化学特性进行确定。可以用于本文所述方法的分析方法包括但不限于LC-MS/MS、LC-MS、免疫测定、放射免疫测定或层析。存在用于检测在一段时间内API在血液中的浓度的各种方法，以确定PK性质。使用以定量方式与API结合的特异性抗体的免疫测定可能是有用的，但适当的抗体必须是可获

得的。其中测试溶液通过由固相或液相分配而在气相或液相中分开的层析也可以用于API的定量。与质谱法(LC-MS)或串联质谱法(LC-MS/MS)配对的液相层析是用于准确地定量溶液中的API浓度的非常有用的方法。配体结合测定可以与LC-MS/MS联接,以从生物基质中提取API,以增强尿、血清、血浆或组织样品中的定量。

[0107] 在一些实施方案中,执行免疫测定以确定组织样品中的nonalog浓度。在另一个实施方案中,执行U/HPLC以确定组织样品中的nonalog浓度。在另一个实施方案中,执行LC-MS/MS以确定组织样品中的nonalog浓度。在另一个实施方案中,LBA-LC-MS/MS用于定量生物基质中的nonalog。这种方法允许精确计算溶液中的肽浓度,即使当溶液含有许多组分时。这对于本发明尤其有益,其中待评估的制剂可能潜在地是非常复杂的并且含有多重组分。

[0108] 在一些实施方案中,本文所述的nonalog这样进行标记,使得它们可以在分析方法中容易地检测到。在一些实施方案中,标记并不影响nonalog的药代动力学、物理、化学或药理学行为。在其它实施方案中,与API相比,标记导致nonalog丧失其活性。本文所述的nonalog可以用放射性标记,荧光标记,例如碳、氧、氢、硫或氮的重同位素进行标记。

[0109] 本文所述的nonalog、API和方法可用于评估广泛范围的制剂或组合物中的PK参数。组合物或制剂可以包括不同浓度的API。例如,浓度可以是高浓度、中浓度或低浓度。在这种情况下,本发明的方法可以用于评估API浓度和药物产品体积对制剂的药代动力学特性的影响。组合物或制剂还可以包括广泛范围的赋形剂。

[0110] 在各个方面和实施方案中,本文所述的胰岛素类似物的药物组合物包含适合于皮下或皮内施用的一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。特定赋形剂在制剂中可能具有两种或更多种功能。下表1提供了示例性赋形剂及其在制剂中的示例性功能的列表。

[0111] 表1:潜在赋形剂

	等渗性	防腐剂	缓冲剂	稳定	增溶	抗聚集	跨膜	吸收
甘油	√			√				
甘露醇	√			√				
山梨糖醇	√			√				
丙二醇	√					√		
苯酚/间甲酚		√		√				
TRIS			√	√				
精氨酸			√	√	√	√		
组氨酸			√	√		√		
天冬氨酸			√		√		√	
谷氨酸				√	√		√	
脯氨酸						√		
赖氨酸						√		
镁					√			√
柠檬酸盐			√		√	√	√	
烟酰胺				√		√		
表面活性剂				√		√		√
烷基糖苷				√		√		

乙二胺四乙酸(EDTA)								√
伊洛前列素				√				√

[0112] 在各个实施方案中，药物组合物包括药学上可接受的缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、增溶剂、抗聚集剂、扩散增强剂、吸收增强剂和防腐剂中的一种或多种。这些试剂可以以组合使用并且协同发挥功能，以例如增强胰岛素吸收，促进更快速的胰岛素药代动力学和/或增加胰岛素稳定性。

[0113] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括维持或调整制剂的张力的一种或多种试剂。此类试剂包括但不限于甘油、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、右旋糖、海藻糖、氯化钠和丙二醇(参见例如，美国专利公开号2012/0225810，其全部内容在此通过引用并入)。在各个实施方案中，制剂可以是高渗或低渗的。例如，药物组合物可以含有设计为使得制剂高渗的一种或多种试剂。示例性试剂包括在制剂中可溶且不能自由渗透细胞质膜的任何试剂，例如甘油、右旋糖、甘露醇、NaCl和KCl。在一些实施方案中，药物组合物包含约1 mg/ml至约100 mg/mL的甘油。在各个实施方案中，药物组合物包括约1 mg/mL至约50 mg/mL、或约8 mg/mL至约25 mg/mL的甘油(例如，约16 mg/ml)。

[0114] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种缓冲试剂，用于将制剂维持在特定pH下。示例性缓冲试剂包括但不限于磷酸钠、精氨酸、TRIS (2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇)、甘氨酰甘氨酸、L-组氨酸、HEPES、二羟乙基甘氨酸、乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、二羟乙基甘氨酸、三(羟甲基)甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、富马酸、酒石酸、天冬氨酸、乙二胺或其混合物。参见例如，美国专利号6,906,028和美国专利公开号2012/0225810，其全部内容在此通过引用并入。在一些实施方案中，本发明的药物组合物包括约5 mM至约100 mM Tris。在各个实施方案中，本发明的药物组合物包括约5 mM、约10 mM、约20 mM、约30 mM、约40 mM、约50 mM、约60 mM、约70 mM、约80 mM、约90 mM或约100 mM Tris。在一个实施方案中，药物组合物包括约50 mM Tris。

[0115] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括用于稳定胰岛素制剂的一种或多种稳定剂。示例性稳定剂包括但不限于单独或组合的锌(例如，与制剂中的胰岛素小于0.05的摩尔比)、苯酚、间甲酚、苯甲酸盐、TRIS、非还原性碳水化合物(例如，甘露醇或右旋糖酐)、表面活性剂(例如，聚山梨醇酯例如TWEEN，胆汁盐，脂肪酸盐或磷脂，多元醇、甘油或山梨糖醇和蔗糖的偏酯和脂肪酸酯和醚，以及多元醇(polyol)，多元醇(polyhydric alcohol)的偏酯和脂肪酸酯和醚，例如SPAN聚山梨醇酯、MYRJ、BRIJ、TRITON和CREMOPHOR、聚氧乙烯醚和聚乙二醇醚)、氨基酸(例如，L-精氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸或L-甲硫氨酸)、烷基糖类(例如，十二烷基-β-D-麦芽糖苷、十三烷基麦芽糖苷、十四烷基麦芽糖苷、蔗糖单十二烷酸酯、蔗糖单十三烷酸酯、蔗糖单十四烷酸酯)、A-L-S-L-A化合物、铬盐、丙酮、甲基乙基酮、丙基甲基酮、异丙基甲基酮、丙酮酸、乙醛酸、α-酮丁酸、α-酮戊二酸、乙酰乙酸、吡哆醛、焦磷酸吡哆醛和伊洛前列素。

[0116] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种增溶剂，以避免制剂内的胰岛素或胰岛素类似物沉淀，并且增强胰岛素或胰岛素类似物的溶解度。示例性增溶剂包括但不限于单独或组合的L-精氨酸、L-精氨酸类似物或者含有精氨酸的二肽和三肽、胍、镁、醇、有机酸的醇酯、含氮溶剂、磷脂、乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、己二酸、胍丁胺、4-胍基苯甲酸、胍基乙酸、胍基琥珀酸和共聚氨基酸。

[0117] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种抗聚集剂，以避免溶液中的胰岛素聚集。示例性抗聚集剂包括但不限于精氨酸、聚山梨醇酯20、组氨酸、脯氨酸或脯氨酸线衍生物、磺丁基醚-β-环糊精、三肽HTD、argininium离子或赖氨酸、以及丙二醇、柠檬酸和烟酰胺。

[0118] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括用于促进胰岛素或胰岛素类似物通过膜的渗透和扩散的一种或多种跨膜剂。示例性的跨膜剂包括但不限于单独或组合的触角足蛋白、HSV 1型蛋白VP22和HIV Tat蛋白。

[0119] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种吸收增强剂，用于通过各种机制中的任一种促进胰岛素或胰岛素类似物的吸收。示例性吸收增强剂包括但不限于单独或组合的表面活性剂(例如，胆汁盐、脂肪酸盐或磷脂)、烟碱剂(例如，烟酰胺、烟酸、尼克酸、尼克酰胺、维生素B3及其任何盐)、胰蛋白酶抑制剂、镁盐、多不饱和脂肪酸、二癸酰基磷脂酰胆碱、氨基聚羧酸盐、托美丁、癸酸钠、水杨酸、油酸、亚油酸、EPA、DHA、苄酸、NO供体(例如3-(2-羟基-1-(1-甲基乙基)-2-亚硝基肼基)-1-丙胺、N-乙基-2-(1-乙基-羟基-2-1-亚硝基肼基)-乙胺或S-亚硝基-N-乙酰青霉胺)、胆汁酸、胆汁酸的甘氨酸共轭形式、抗坏血酸钠、抗坏血酸钾、水杨酸钠、5水杨酸钾、乙酰水杨酸、水杨酰水杨酸、乙酰水杨酸铝、水杨酸胆碱、水杨酰胺、赖氨酸乙酰水杨酸、依沙酰胺、二氟尼柳、EDTA、乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、己二酸、多聚磷酸盐和乙水杨胺。

[0120] 在某些实施方案中，药物组合物中可以包括使活性剂(例如，胰岛素)降解降到最低的试剂。不希望受理论束缚，认为此类试剂抑制在组织创伤之后在肉芽组织内累积的嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和血小板的活性，并且释放降解输液导管周围的胰岛素的蛋白酶、脂肪酶、氧自由基、IL-1、IL-6、IL-8、MCP-1和TNF。这些试剂包括但不限于单独或组合的糖皮质激素例如地塞米松、皮质醇、甲强龙和美卓乐，麻醉剂例如利多卡因、布比卡因、普鲁卡因、依替卡因、罗哌卡因、甲哌卡因、异氟烷、氟烷、七氟烷、地氟烷和恩氟烷，抑肽酶或特斯乐，阿司匹林和非甾体抗炎药(NSAID)，色甘酸钠，以及免疫抑制剂例如环孢素、他克莫司和西罗莫司。

[0121] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种扩散增强剂，例如基础物质扩散增强剂。示例性扩散增强剂包括但不限于糖胺聚糖酶(例如透明质酸酶)。

[0122] 在某些实施方案中，药物组合物可以包括用于防止微生物生长的一种或多种防腐剂。示例性防腐剂包括但不限于苯酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯和苯甲酸钠。在各个实施方案中，药物组合物包括约0.1 mg/mL至约10 mg/mL的间甲酚。在实施方案中，药物组合物包括约0.1 mg/mL、约0.5 mg/mL、约1 mg/mL、约2 mg/mL、约3 mg/mL、约4 mg/mL、约5 mg/mL、约6 mg/mL、约7 mg/mL、约8 mg/mL、约9 mg/mL或约10 mg/mL的间甲酚。在一个实施方案中，药物组合物包括约3.2 mg/mL的间甲酚。

[0123] 在各个实施方案中，药物组合物可以包括一种或多种血管扩张剂、抗炎剂、抗血栓剂、抗降解剂、胰岛素结合拮抗剂、抗纤维化剂、抗氧化剂、抗增殖剂、神经镇静剂和抗生素。参见例如，美国专利号9,901,622，其全部内容在此通过引用以其整体并入。这些试剂可以与本文所述的任何其它赋形剂和试剂组合使用，并且可以协同发挥功能，以例如增强胰岛素吸收，促进更快速的胰岛素药代动力学，且增加胰岛素或胰岛素类似物的稳定性。在一些实施方案中，组合物包含前列环素PGI_2类似物，例如伊洛前列素或曲前列环素。

[0124] 在一些实施方案中，伊洛前列素以约1 μg至约100 ug/mL的浓度，或任选地以约5 μg/mL至约50 μg/mL的浓度，或任选地以约10 μg/mL至约25 μg/mL的浓度存在于药物组合物中。

[0125] 在一些实施方案中，药物组合物包含一种或多种多聚磷酸盐化合物。在各个实施方案中，多聚磷酸盐选自焦磷酸盐、三磷酸盐、三偏磷酸盐和四磷酸盐中的一种或多种。多聚磷酸盐可以以其酸性形式或以各种盐形式使用，例如，作为碱(例如，钠或钾)盐或碱金属(例如，钙和镁)盐。在一些实施方案中，多聚磷酸盐包含三磷酸钠。在这些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐(例如三磷酸钠)浓度为约1 mM至约100 mM、或约1 mM至约50 mM、或约1 mM至约40 mM、或约5 mM至约50 M。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约5 mM、约10 mM、约15 mM、约20 mM、约25 mM、约30 mM、约35 mM、约40 mM、约45 mM或约50 mM。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约10 mM至约100 mM、或约10 mM至约50 mM。在一些实施方案中，组合物中的多聚磷酸盐浓度为约15 mM至约35 mM。在一些实施方案中，多聚磷酸盐的浓度为约10 mM至约30 mM。在一些实施方案中，多聚磷酸盐的浓度为约20 mM，其中所述多聚磷酸盐任选地为三磷酸钠。

[0126] 在某些实施方案中，增加活性剂(例如，胰岛素)扩散、通过增加肌肉运动和每分钟通气量来增加淋巴流量、增加活性剂(例如，胰岛素)流入淋巴管内、增加通过毛细血管和小静脉壁进入血浆内的吸收、和/或增加通过脂肪组织毛细血管和小静脉的血流量的试剂可以包括在药物组合物中(参见例如，美国专利号9,901,622，其全部内容在此通过引用以其整体并入)。

[0127] 在各个实施方案中，本发明的药物组合物提供了在施用后少于约40分钟，或在各个实施方案中，在施用后少于约30分钟、或少于约20分钟、或少于约15分钟、或少于约10分钟、或少于约5分钟的胰岛素活性开始(例如，在正常血糖钳夹中的第一次正葡萄糖输注速率的时间或T_{onset})。

[0128] 在各个实施方案中，药物组合物提供了如通过例如C_{max}和/或T_{max}测量的快速胰岛素吸收曲线。如本文使用的，C_{max}是在其施用后观察到的药物的最大浓度或峰浓度。如本文使用的，T_{max}是在其下出现最大浓度(C_{max})的时间。在某些实施方案中，药物组合物在施用后少于约120分钟、或少于约90分钟、或少于约60分钟、或少于约50分钟、或少于约40分钟、或少于约30分钟、或少于约20分钟、或少于约15分钟达到½ T_{max}Early。

[0129] 在各个实施方案中，药物组合物提供了胰岛素活性的短持续时间。在某些实施方案中，药物组合物提供了在施用后约6小时或更短、约5小时或更短、约4小时或更短、约3小时或更短、或者约2小时或更短的胰岛素活性持续时间。在一些实施方案中，活性的持续时间作为胰岛素作用下降到小于1/2最大活性的时间进行测量。

[0130] 在各个实施方案中，药物组合物提供了增强的贮存稳定性。在某些实施方案中，药物组合物在25℃下稳定至少约1个月、或至少约3个月、或至少约6个月、或至少约12个月、或至少约18个月或更长时间，而无胰岛素原纤维的显著形成。

[0131] 在进一步的实施方案中，药物组合物在25℃下6个月后维持至少约60%的效力、约70%的效力、约80%的效力、约90%的效力或约95%的效力。在另一个实施方案中，药物组合物在30℃下9个月后维持至少约60%的效力、约70%的效力、约80%的效力、约90%的效力或约95%的效力。在一个进一步的实施方案中，药物组合物在25℃下12个月后维持至少约60%的效

力、约70%的效力、约80%的效力、约90%的效力或约95%的效力。

[0132] 在一些实施方案中，药物组合物配制用于皮下施用，并且可以配制为水性制剂。在一些实施方案中，制剂在输注装置、预填充胰岛素泵或预填充注射笔和/或单剂量或多剂量小瓶或药液筒中提供用于皮下施用。例如，制剂可以在含有1至约1000个推注剂量、或1至约100个推注剂量、或1至约50个推注剂量、或1至约25个推注剂量的小瓶中提供。在一些实施方案中，小瓶或药液筒足以对于患者提供每日、每周或每月的胰岛素需求。小瓶或药液筒可以含有例如以约3 mL至约50 mL总体积，例如约3 mL至约10 mL总体积的剂量。推注剂量一般具有1 mL或更少，例如约0.5 mL或更少、或约0.2 mL或更少、或约0.1 mL的可注射体积。例如，制剂可以在一次性胰岛素泵内部的预填充储存器中提供，所述储存器含有约0.5 mL的体积、约1.0 mL的体积、约1.2 mL的体积、约1.5 mL的体积、约2 mL的体积、或约2.5 mL的体积。

[0133] 应了解，待根据本发明施用的胰岛素或胰岛素类似物的实际剂量将根据例如特定剂型和施用模式、以及每个患者的疾病和重量而变。

[0134] 本发明的胰岛素组合物的pH通常为7.0至7.8，并且它使用生理学上适当的酸和碱，通常为10%的盐酸和10%的氢氧化钠进行调整。在一些实施方案中，pH在约7.2至约7.6的范围内，其中7.4 ± 0.1作为常见的靶pH。

[0135] 本文所述的胰岛素或胰岛素类似物的各个剂量可以以下述进行配制：例如约1U/mL (1个胰岛素单位/mL)至约2000 U/mL、或约1 U/mL至约1000 U/mL、或约1 U/mL至约500 U/mL、或约1 U/mL至约400 U/mL、或约1 U/mL至约300 U/mL、或约1 U/mL至约200 U/mL、或约1 U/mL至约100 U/mL、或约1 U/mL至约50 U/mL、或约1 U/mL至约10 U/mL。

[0136] 在一些实施方案中，制剂含有约100 U/mL至约1000 U/mL、或约100 U/mL至约500 U/mL。

[0137] 在各个实施方案中，药物组合物不包括添加的锌、或含有每摩尔胰岛素少于0.05摩尔锌。在各个实施方案中，药物组合物不包括镁。

[0138] 在一些实施方案中，药物组合物包含一种或多种抗炎剂和/或一种或多种抗纤维化剂。在各个实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的缓冲剂、增溶剂、血管扩张剂、吸收增强剂、张度剂、防腐剂和稳定剂，或由其组成或基本上由其组成。

[0139] 例如，关于指定为T-1123的类似物的示例性速效制剂包含5至100 mM柠檬酸盐、1至10 mM EDTA、0.25至30 μg/mL伊洛前列素、0.5至10 mM Mg^{++}、1至50 mM Tris (pH7.4)和1至25 mg/ml甘油。例如，关于指定为T-1123的类似物的示例性速效制剂包含约45 mM柠檬酸盐、约6.2 mM EDTA、约15 μg/mL伊洛前列素、约4 mM Mg^{++}、约10 mM Tris (pH7.4)和约16 mg/mL甘油。例如，关于指定为T-1123的类似物的另一种示例性速效制剂包含约50 mM Tris缓冲液(pH7.4)、约3.2 mg/mL间甲酚、约16 mg/mL甘油和约20 mM三磷酸钠。

[0140] 在一些方面，本发明提供了通过施用本文所述的胰岛素类似物或药物组合物，来治疗或预防患者中的状况的方法。在一些实施方案中，本发明提供了使用包括如本文所述的胰岛素或胰岛素类似物的任何药物组合物或制剂，用于治疗患有糖尿病或者用胰岛素或其类似物治疗的其它状况的受试者的方法。在一个实施方案中，受试者患有1型糖尿病或2型糖尿病。在一些实施方案中，患者显示出胰岛素抗性。在进一步的实施方案中，受试者患有妊娠糖尿病或前驱糖尿病。

[0141] 任选地，受试者可能患有胰岛素施用对于其可能是有益的代谢疾病，例如肥胖或代谢综合征。如本文使用的，术语“代谢疾病”指其中发生代谢错误、代谢失衡或亚最佳代谢稳态的一组鉴定病症。

[0142] 在一个实施方案中，代谢疾病是肥胖。例如，受试者可能患有向心性肥胖。在一些实施方案中，肥胖是单纯性肥胖(消化性肥胖；通常起因于消费比身体可以利用的更多的卡路里)、继发性肥胖(通常起因于潜在的医学状况，例如库欣氏综合征和多囊卵巢综合征)和儿童肥胖。在一些实施方案中，肥胖分类为：I类，其包括30至34.99的BMI；II类，其包括35至39.99的BMI；以及III类，其包括超过40的BMI。进一步地，本发明提供了进一步分类为严重、病态和超级肥胖的I、II或III类中的任一种的肥胖。

[0143] 在另一个实施方案中，代谢疾病是脂肪萎缩性糖尿病。例如，受试者可能在任何地方或某些身体区域没有脂肪，并且可能需要非常大剂量的外源性胰岛素来维持血糖正常。在另一个实施方案中，代谢疾病是妊娠期糖尿病、成人潜伏性自身免疫性糖尿病(LADA)和青少年发病的成人型糖尿病(MODY)。

[0144] 在进一步的实施方案中，本发明提供了使用本文所述的任何类似物和药物组合物，治疗其为前驱糖尿病的受试者的方法。前驱糖尿病，也称为空腹葡萄糖受损(IFG)或葡萄糖耐量受损(IGT)，是2型糖尿病的前兆状况。当空腹血糖为100至125 mg/dL (5.56-6.94 mmol/L)；或血浆葡萄糖水平在75 g的葡萄糖负荷后2小时为140至199 mg/dL (7.78-11.06 mmol/L)；或HbA1c水平为5.7%至6.4%时，诊断糖尿病前期。如果没有干预和适当的治疗，患有前驱糖尿病的人处于发展2型糖尿病的风险中。

[0145] 药物组合物和/或制剂可以用于在餐前或进餐期间施用胰岛素。由于快速吸收，递送的胰岛素可以阻断肝中的糖原至葡萄糖的转换，从而防止高血糖。在一个实施方案中，药物组合物和/或制剂用于在餐前小于约30分钟、小于约20分钟、小于约15分钟、小于约10分钟或小于约5分钟，或约开始进餐的时间施用速效胰岛素。在一个实施方案中，药物组合物和/或制剂用于在开始进餐后约10分钟至约20分钟内(例如，在开始进餐之前或之后)施用胰岛素。在某些实施方案中，受试者正在经历基础胰岛素制剂或基础胰岛素类似物制剂的方案。基础胰岛素可以作为推注注射每天施用一到三次。

[0146] 在各个实施方案中，药物组合物或制剂与进餐结合或不依赖于进餐每天施用至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次或更多次。在一个实施方案中，药物组合物或制剂与膳食消耗结合每天施用至少三次。在某些实施方案中，药物组合物或制剂在高血糖时进行施用(或递送被启动)。在一个实施方案中，药物组合物在胰岛素泵例如管式泵或贴片泵中施用。在一个实施方案中，胰岛素泵根据直接人输入或根据算法来施用药物组合物，所述算法基于来自一个或多个传感器例如葡萄糖或活性或其它传感器的输入来计算剂量。在一个实施方案中，药物组合物以可变大小的基础剂量和推注剂量两者进行递送。

[0147] 在某些实施方案中，药物组合物或制剂作为推注皮下注射进行施用。例如，施用可以通过单次推注皮下注射来实现。在一些实施方案中，药物组合物和/或制剂在检测到低或下降的血糖水平后自动进行施用。在一些实施方案中，药物组合物作为单次推注皮下注射或输注进行施用。

[0148] 在一些实施方案中，所施用的药物组合物或制剂的体积不同。在一些实施方案中，所递送的组合物的体积不同。在各个实施方案中，注射物体积小于约3 ml、小于约2.9 ml、

小于约2.8 ml、小于约2.7 ml、小于约2.6 ml、小于约2.5 ml、小于约2.4 ml、小于约2.3 ml、小于约2.2 ml、小于约2.1 ml、小于约2 ml、小于约1.9 ml、小于约1.8 ml、小于约1.7 ml、小于约1.6 ml、小于约1.5 ml、小于约1.4 ml、小于约1.3 ml、小于约1.2 ml、小于约1.1 ml、小于约1.0 ml、小于约0.9 ml、小于约0.8 ml、小于约0.7 ml、小于约0.6 ml、小于约0.5 ml、小于约0.4 ml、小于约0.3 ml、小于约0.2 ml、或小于约0.1 ml、或小于约90 μl、或小于约80 μl、或小于约70 μl、或小于约60 μl、或小于约50 μl、或小于约40 μl、或小于30 μl、或小于约20 μl、或小于约10 μl、或小于约9 μl、或小于约8 μl、或小于约7 μl、或小于约6 μl、或小于约5 μl、或小于约4 μl、或小于约3 μl、或小于约2 μl、或小于约1 μl、或小于约0.5 μl、或小于约0.1 μl，包括两者之间的所有值和范围在内。

[0149] 本发明通过下述非限制性实施例进行进一步说明。

实施例

[0150] 实施例1：具有优化稳定性的双链胰岛素的开发

在此通过引用并入的US 2019/0322719描述了在约16个位点中具有特定突变的速效胰岛素类似物，所述位点可以潜在地突变为有利效应(参见其中的表1)。总的来说，所有这些潜在的突变限定了潜在类似物的巨大空间(参见表2)。

[0151] 表2：潜在有利的取代

位置	潜在有利的取代#
A8	18
A12	10
A13	8
A14	8
A17	10
A21	7
B1	2
B2	4
B3	4
B13	11
B17	9
B18	2
B29	2
B30	2
B31	2
B32	1

[0152] 通过基于在每个位置处与天然氨基酸的电荷、大小和疏水性差异缩小特定位置中的突变数目，减少了考虑的可能类似物的数目。

[0153] *位置A8和A14*。相对于替代取代，在位置A8和A14两者处的谷氨酸选择是优选的，以共优化(a)胰岛素单体或二聚体在中性pH下的净负电荷，从而增强溶解度和单体之间的静电排斥；(b)由于避免了在A8处不利的β-支链氨基酸以及在A14处不利的反向疏水效应的热

力学稳定性;以及(c)由于天然或部分展开单体之间的静电排斥、加强的热力学稳定性和抑制的构象波动,延长了无锌溶液中的原纤化滞后时间。Glu^{A8}和Glu^{A14}均位于α-螺旋区段中,对于其这种氨基酸具有很高的固有倾向。A链中引入的两个负电荷补充了B链中的三个负电荷的净增加(即,在位置B3和B29处的谷氨酸,后者代替野生型人胰岛素中的碱性侧链赖氨酸)。

[0154] *"位点2取代"*。在胰岛素的不存在下,游离胰岛素受体如颠倒的马蹄形(∩)位于细胞表面上,其开放端(IR β-亚基)穿透细胞膜且进入细胞内。当胰岛素与其受体结合时,发生IR四级结构中的总体变化,使得两条IR腿聚集在一起。跨膜β-亚基α-螺旋的接近然后传播到细胞内酪氨酸激酶结构域,以触发它们的自磷酸化。在此通过引用并入的WO 2013/110069提出了干扰胰岛素的位点2界面残基可以破坏这种自磷酸化信号的持续时间。为了评价这一点,在大鼠中进行了>1000次胰岛素耐量测试,以评价位点2残基的突变对体内胰岛素活性的持续时间的功效。

[0155] 雄性Lewis大鼠(平均体重~300 g)通过用链脲佐菌素治疗而致使糖尿病。血糖值在对照组和糖尿病大鼠中分别为平均100和360 mg/dL。每笼饲养两只大鼠(250-350 g体重),并且在测定期间不受约束。为了测试代表性胰岛素类似物相对于野生型人胰岛素的体内效力,静脉内注射含有野生型人胰岛素的蛋白质溶液、待评价的类似物或单独的缓冲液(得自Lilly的无蛋白质无菌稀释剂;由16 mg甘油、1.6 mg间甲酚、0.65 mg苯酚和3.8 mg磷酸钠(pH 7.4)/ml构成),并且使用血糖仪通过连续测量监测所得到的血糖变化。在禁食条件下执行测定(在2小时禁食之后的晚期AM开始)。在时间t=0时,用在100 μl缓冲液中的10 μg胰岛素/300-g大鼠注射到大鼠的尾静脉内。野生型胰岛素的剂量应答研究指示了,在该剂量下,在注射之后的第一个小时期间,接近最大的葡萄糖处置率。在时间0和每10分钟直至90分钟,从剪断的尾尖获得血液。研究了含有一种(>35种类似物)、两种(65种类似物)、或三种(16种类似物)位点2突变的>115种类似物(具有n=8只大鼠的平均值)。

[0156] 关于每只动物的血糖时间过程使用(1) Loess模型和/或(2)由以下邻接线性区段组成的"4阶段"模型进行拟合:"起始"区段、水平"峰值"区段(其中血糖下降处于或接近最大值)、当血糖快速恢复时的"第一恢复阶段"、以及当血糖更缓慢地朝向研究前水平恢复的"第二恢复阶段"。根据拟合数据,对于每只动物以及暴露于相同测试物品的动物的曲线拟合平均值计算下述值:起始曲线的斜率、峰值作用(在注射前的平均血糖和测量的最低血糖之间的差异)和峰值作用的持续时间(对于4阶段拟合)、达到峰值作用的时间(从给予注射时到观察到峰值作用时的时间)、来自的峰值作用50%恢复的时间、以及第一恢复曲线的斜率。计算统计学,以确定哪些突变或突变集合对缩短胰岛素作用的持续时间具有潜在影响。基于这些研究,剔除了下述突变,因为具有可能的所需效应:

表3:在位点2研究后剔除的取代

位置	取代
A13	H,W
A17	F,H,L。
B17	A,N

[0157] 尽管大鼠中的研究已提示了,一旦胰岛素受体在靶组织中接合,经典的"位点2"取代(如DeMeyts和Schaffer在1994年定义的)就可以(在一些情况下)导致胰岛素信号传导的

持续时间降低(参见在此通过引用以其整体并入的WO 2014/145593),此类取代在体外趋于降低胰岛素的稳定性并促进原纤化。当大鼠中观察到的PD趋势未能在猪中观察到时,剔除了这类取代。此类剔除的关键优点在于可以实现在分子中的其它地方的有利特征(例如,在上文的位置A8和A14处由谷氨酸赋予的),而不抵消在位点2位置处的惩罚(如可能由于亚最佳侧链关于邻近侧链堆积的潜在取代,降低的α-螺旋倾向,非极性表面的暴露或胰岛素单体之间的静电排斥减少而出现)。

[0158] *N末端B链区段*。人胰岛素的N末端区段(残基B1-B3)促成胰岛素原的可折叠性,但对于成熟激素的生物活性是可有可无的。天然序列Phe^{B1}-Val^{B2}-Asn^{B3}与体内生物合成和后续步骤相容:锌六聚体在胰腺β细胞中的贮存,以及分泌和代谢的激素调节。然而,相同的序列元素在原料药中是亚最佳的,因为Phe^{B1}和Val^{B2}的悬垂、无序的非极性侧链促成原纤化,并且Asn^{B3}的侧链易于化学降解。为了避免这些问题,胰岛素类似物可能含有在该区段中的缺失和取代的组合。Phe^{B1}的去除消除了悬垂的芳环,而在B2处通过丙氨酸取代缬氨酸通过对于α-螺旋具有优先的残基替换对于β-折叠具有优先的残基。Asn^{B3}通过甘氨酸的取代增强了上文在位置A8和A14处通过谷氨酸赋予的净负电荷,以进一步增加在中性pH下的溶解度,增强在单体之间的静电排斥并避免在B3处对Asp或Asn开放的化学降解途径。残基B1的缺失优于残基[B1,B2]或B1-B3的缺失,以使与野生型胰岛素的变化降到最低,并且避免在新N末端处对谷氨酸或谷氨酰胺开放的化学降解途径;在位置A2处的丙氨酸提供了在α-氨基以及在B3和B4处的官能化侧链之间的中性间隔物元件。可替代地,当残基B1和B2缺失时,残基B3可以是Ala,而当残基B1-B3缺失时,残基B4可以是Ala。

[0159] *酸性B链尾部*。在增强在中性pH下的溶解度且增加蛋白质(无论是作为单体、二聚体还是六聚体)的净负电荷的努力中,在延长位置B31和B32处包含谷氨酸的B链的两个残基延伸被视为引入两个负电荷的手段。酸性C末端B链尾部降低胰岛素与促有丝分裂的1型IGF-1受体(IGF-1R)的交叉结合。然而,此类尾部可能提供新表位,引发抗胰岛素抗体,其复合可以延迟来自皮下贮库的吸收或干扰胰岛素作用。由于在A链和B链中的其它地方(A8、A14、B3和B29)的五个负电荷的净引入,因此没有必要包括另外的B31-B32负电荷,以共优化溶解度、物理稳定性和化学稳定性;进一步地,在位置B29处的谷氨酸足以不利于与IGF-1R的交叉结合。因此,酸性B链尾部的包括已引入抗原风险而不抵消优点。

[0160] 基于此类理由,剔除了下述突变:

表4:通过结构分析剔除的取代

位置	取代	剔除的原因
A8	R、N、D、C、G、L、K、M、F、P、S、Y、W	pI和稳定性的共优化
A12	全部	“位点2”取代的重新评价
A13	A、Q、Y	“位点2”取代的重新评价
A14	N、R、W	
A17	A、N、W、Y	“位点2”取代的重新评价
B1		缺失以去除悬挂的芳环
B2	V、E、Q	取代Ala以延迟降解/原纤化。
B3	N、A、Q	使用Glu以增强溶解度、净电荷
B13	A、D、F、H、N、L、R、W、Y	“位点2”取代的重新评价
B17	H、Q、W、Y	“位点2”取代的重新评价
B18	L	“位点2”取代的重新评价
B31	E	对于以下不需要：pI、溶解度或IGF-1R选择性
B32	E	

[0161] 这使可能的排列数目降到约200万。

[0162] 表达、纯化和稳定性

胰岛素类似物通过生物发酵进行商业制备。酵母或细菌进行遗传修饰以产生胰岛素，然后这些细胞在大罐中进行发酵。然后加工所得到的培养基，以提取且纯化胰岛素类似物。因为胰岛素是用于许多人的必需用药，所以生产成本是重要的考虑因素。因此，关于选择候选物用于临床开发的重要标准是以高产率制备类似物的能力。发酵或纯化某些双链胰岛素类似物的最初努力导致在A21处含有亮氨酸或缬氨酸或者在A17处含有精氨酸的类似物剔除。这将类似物的数目减少到约162,000种。使用USP标准执行的物理稳定性和化学稳定性研究导致本发明人排除了在A14处具有亮氨酸的类似物，将该域减少到约86,400种类似物。

[0163] 梯度下降

剩余的类似物集合表示33维离散状态空间(分别具有5、3、5、2、5、3、3、2、3、2和2种可能的离散状态的11个位置)。执行了实验计划，以在该空间内快速搜索遵循各种度量使效用达到最大的类似物：稳定性、促有丝分裂性、细胞信号传导和药效学性能。选择了56种类似物的集合，使得对于被检查的11个位置中的每一个，存在至少三对类似物，其中(a)每对通过相同的残基对彼此不同，但在其它方面相同(即，具有相同的“背景”)，并且(b)没有一对具有彼此相同的背景。这56种类似物中的每一种都被合成并且如下进行评估：

表5：对于梯度下降分析完成的实验

实验	确定的关键实验值
1．有关物质稳定性	百分比有关物质
2．高分子量蛋白(HMWP)稳定性	百分比共价HMWP
3．原纤化稳定性	原纤化滞后时间
4．胰岛素受体激活(IR-A、IR-B)	效力(EC_{50})
5．胰岛素受体失活时间过程	百分比失活

[0164] 这导致了下述发现：

表6：通过梯度下降确定的最佳取代

	A8	A13	A14	A17	B2	B3	B17

最佳RS	T或E	L	E	Q	A	A	L
最佳HMWP	E	L	E	E	A	A或E	E
最佳原纤化	Q	L	A	Q	A	E	L
最佳效力	H或E	L	-	-	-	-	-

[0165] 基于这些发现，该团队剔除了下述突变：

表7:通过梯度下降剔除的取代

位置	取代
A8	T,A,H,Q
A13	E,F
A14	Y,A,Q 。
A17	Q
B2	E
B17	E,F

[0166] 这些研究将空间减少到约160种可能的类似物。

[0167] 设计优化

T-1123分子设计的优化扩展了来自梯度下降研究的优选序列，以集中于5种可能的A21突变和在位置B13处的2种可能，以评估对化学稳定性和物理稳定性的影响。对包括2种不同的B1-B3和B29-B30设计的40种类似物执行了评估，以及在A8位置处的4种不同突变的有限的重新评估。更严格的稳定性和生产产率标准导致在A21处选择Gly，在B13处维持天然残基，选择desB1 AlaB2和GluB3作为最佳N末端组合，以及对于C末端选择GluB29超过desB30。这将最佳序列缩小到以下氨基酸取代:GluA8 GluA14 GlyA21 desB1 AlaB2 GluB3 GluB29 (称为T-1123)。亚军包括：

表8:考虑的潜在类似物

T代码	取代
T-1147	GluA8 GluA14 GlyA21 desB1 AlaB2 AlaB3 GluB29 (SEQ ID NOS: 1 + 3)
T-1467	GluA8 GluA14 ThrA21 desB1 AlaB2 GluB3 LysB28 (SEQ ID NOS: 4 + 5)
T-1470	GluA8 GluA14 GlnA21 desB1 AlaB2 GluB3 GluB29 (SEQ ID NOS: 6 + 2)
T-1474	GluA8 GluA14 AlaA21 desB1 AlaB2 GluB3 GluB29 (SEQ ID NOS: 7 + 2)
T-1488	GluA8 GluA14 GlnA21 desB1 AlaB2 AlaB3 GluB29 (SEQ ID NOS: 6 + 3)

[0168] 实施例2:雄性尤卡坦小型猪中的胰岛素类似物的多重研究

对雄性尤卡坦小型猪进行研究，以确定在阉割的雄性尤卡坦猪中的单次静脉内(IV)或多重皮下(SC)施用之后，多达5种非强效胰岛素类似物的各种制剂的药代动力学(PK)概况。用于该实施例的胰岛素类似物是“死”类似物(先前定义为一类nonalog)，由于本领域已知几乎完全抑制与IR的结合的LeuA3的修饰，所述“死”类似物不与IR结合。

[0169] 在研究的IV阶段，用含有所有五种无活性胰岛素类似物的单一制剂进行静脉内给药(表9)。这在动物的正常住所中执行。该剂量通过一个VAP进行施用，在用~6 ml肝素化盐水冲洗后，所述VAP并不用于在IV阶段期间的PK血液取样。

[0170] 表9:Nonalog的实例

T代码	修饰
T-0068	LeuA3 DesB30 (SEQ ID NOS: 8 + 9)

T-1069	LeuA3 AlaB25 DesB30 (SEQ ID NOS: 8 + 10)
T-1071	LeuA3 GlyB25 DesB30 (SEQ ID NOS: 8 + 11)
T-1072	LeuA3 ValB25 DesB30 (SEQ ID NOS: 8 + 12)
T-1106	LeuA3 LeuB25 DesB30 (SEQ ID NOS: 8 + 13)

[0171] 在研究的SC阶段，用类似物制剂的个别单独注射进行皮下给药：每次注射具有不同的类似物，尽管每种类似物的制剂在一种情况下是相同的，而在另一种情况下是不同的。将动物从其住所移出并且以曲膝背卧位约束在“V形槽”中，以避免对注射部位施加压力。

[0172] 无论哪种给药途径，在指定时间点收集系列3 ml血液样品，用于确定各种类似物的血糖浓度和血浆浓度。时间0=剂量施用的时间：

· IV阶段：剂量前，剂量后1、2、5、10、15、30、60、120、180、240、480和720分钟

· SC阶段：剂量前，剂量后1、3、5、7、10、15、20、30、45、60、90、120和180分钟。

[0173] 将血液样品收集到含有抗凝剂K_2EDTA的管内。全血液样品在收集的30分钟内进行加工。血浆通过在~4℃下以~3,000 RPM离心~15分钟进行加工。将所得到的血浆均匀地拆分到两个预标记的聚丙烯冷冻管(初期和备用)内，置于干冰上，然后冷冻贮存(大约-70℃)。

[0174] 实施例3：血浆样品中的nonalog的检测和定量

使用经由在琼脂糖顺磁珠上的链霉抗生物素蛋白包衣衍生为磁珠的生物素化的单克隆抗胰岛素抗体，从小型猪血浆中分离nonalog。简言之，生物分析样品在冰上解冻，涡旋，转移到深孔板中，并且用内标(IS)赖脯胰岛素(USP)进行掺料。

[0175] 将赖脯胰岛素校准、质量控制、内标以及用IS掺料的nonalog血浆样品与生物素化的抗胰岛素抗体衍生的磁珠混合，离心，覆盖并且伴随混合进行温育。液体处理系统用于洗涤抗体衍生的珠，并且从珠中洗脱内标和nonalog。将洗脱物转移到圆底板上，并且贮存于4℃下，直到使用混合液相层析质谱法系统的分离和检测。使用配备恒温柱区室和自动进样器的超高效液相层析(UPLC)系统来实现分离。所有样品都使用C4化学柱以及水性流动相A和有机流动相B在60℃下进行分离。分离在10%至40%流动相B梯度上经过3分钟发生。使用三重四极杆质谱仪以正离子模式检测nonalog，其中T-0068在*m/z* 954.40→136.10的离子跃迁处检测到，T-1069在941.60→136.10处检测到，T1072在946.40→136.10处检测到，T-1071在939.30→136.10处检测到，并且赖脯胰岛素内标使用*m/z* 968.8→217.20离子跃迁检测到。使用校准曲线对样品进行定量，所述校准曲线使用赖脯胰岛素作为内标，使用伴随加权的$1/x^2$线性回归的峰面积比方法进行开发。

[0176] 实施例4：初步研究

在大鼠中进行的初步研究显示了，实施例3中的无活性胰岛素类似物在8小时内从血流中清除。这证实了无活性形式的胰岛素类似物可以有效地从血流中去除，而不与胰岛素受体结合。

[0177] 实施例5：使用nonalog的多重PK研究的分析

将来自实施例2中的IV和SC研究的数据合并到单个数据库内，并且如下进行分析。开发了胰岛素作用的多区室模型(图1)，其鉴定了五个分开的区室：(1)最初在其内进行注射的皮下(SC)空间，(2)吸收一些胰岛素并且将其最终递送到血液系统的淋巴系统(LY)，(3)吸收来自SC的剩余胰岛素的血液系统，其也称为中央区室(CT)，(4)大加工区室(PB)，其接受且代谢胰岛素，但将一些返回CT，以及(5)小加工区室(PA)，其也接受胰岛素、代谢胰岛

素并将胰岛素返回CT。该模型还具有无代谢的消除途径(OU) (即,来自CT的肾消除)。该模型由关于变量的一系列偏微分方程(基于标准的区室间流动方程)表示,所述变量代表根据时间在区室内的胰岛素浓度以及在区室之间的流动。

[0178] 首先,利用来自IV实验的数据,分析在吸收到CT内之后nonalog的药效学。关于简化的CT后模型(排除SC和LY)的参数对利用数值方法来自IV研究的数据进行拟合。由此确定nonalog在猪中的半衰期为8小时左右(与强效胰岛素类似物的5分钟相比)。

[0179] 应该注意的是,上述分析并非唯一可能的分析方法。虽然上述消除参数通过IV预评估进行固定,并且被视为跨越受试者和nonalog是恒定的,但实际上,消除参数很可能因受试者(并且很可能因nonalog)而变。另外,这种设计仅提供了一个或两个时间点用于表征PK曲线的尾部。如果在PK曲线的尾部上已包括更多个取样时间点,则可以去除消除参数是恒定的假设。

[0180] 一旦确定了这些CT后参数,它们就在整个模型中固定为常数,并且来自每个SC实验的数据对这个更大的模型进行拟合,以便确定关于每个SC实验的SC→LY、SC→CT和LY→CT流动参数。然后通过利用对于CT前流量计算的参数,并且将CT后流量设置为零,来确定关于每个SC实验的吸收模型。根据这个吸收模型,获得了某些经验吸收度量(例如,在前30分钟内的吸收率、最大吸收斜率和吸收曲线下面积(AUC))。来自每个SC实验的这些经验吸收度量然后用于评估不同赋形剂对吸收的影响。

[0181] 利用混合效应模型来分离特定赋形剂对吸收度量的作用,控制变量例如nonalog剔除、猪变化性和不同的实验天数。结果鉴定了赋形剂或赋形剂混合物(cocktail)对吸收的影响的量级和意义。这些结果用于鉴定待在正常血糖钳夹中评估的最有希望的赋形剂和混合物。

[0182] 实施例6:制剂设计

基于实施例2、3、4和5中描述的方法的一系列研究用于确定在胰岛素组合物中使用的最佳赋形剂以及浓度。

[0183] 图2显示了从用于制剂筛选的多重PK研究的统计分析中获得的结果。

[0184] 在尤卡坦小型猪模型中调查了各种T-1123制剂的药效学性质。在研究当天,为了阻断内源性胰腺α和β细胞分泌,在开始钳夹研究前大约60分钟,向猪给予乙酸奥曲肽(7.2 μg/kg)的静脉内推注,随后立即为3.6 μg/kg/小时的静脉内维持输注直到钳夹结束。在用10%右旋糖输注建立基线正常血糖后,向腹部内给予1.35 nmol/kg T-1123制剂、1.35 nmol/kg Fiasp或稀释剂的皮下注射。为了定量外周胰岛素介导的葡萄糖摄取,给予可变速率的葡萄糖输注,以在胰岛素作用的持续时间内(通常为4-6小时)维持大约85 mg/dl的血糖浓度。葡萄糖消耗(GC)是在正常血糖钳夹期间的胰岛素作用的量度。它与葡萄糖输注速率(GIR)不同,因为它考虑了血糖(BG)水平的变化。这是重要的,因为钳夹方案是不完善的,并且当实际胰岛素作用与在设定GIR时的时间段开始预测的不同时,BG波动。时间t1和时间t2之间的GC计算为GIR(在t1和t2之间) - (BG(t2) - BG(t1))*Vd/(t2-t1),其中Vd是"分布体积"(即,受试者中的血液量)。GIR的单位是mg/分钟。在美国,BG的单位是mg/dL。Vd的单位是dL。t1和t2的单位是分钟。

[0185] 拟合的GC曲线用于计算下述参数:达到半最大效应的时间(早期)、达到半最大效应的时间(晚期)、达到最大效应的时间和基线的曲线下面积(AUC)。当与U-100 Fiasp相比

时,由中性缓冲剂、防腐剂和张度剂组成的基础制剂(表10)中的U-500 T-1123显示了相似的效力和起效。相比之下,与U-100 Fiasp相比,基础制剂中的U-500 T-1123显示出延长的作用尾部(图3)。

[0186] 通过图2中概述的多重PK研究鉴定的几种吸收增强赋形剂在U-500 T-1123制剂中进行测试,以与U-100 Fiasp进行比较。在U-500 T-1123 (加速制剂)中证实了三种活性赋形剂(柠檬酸盐、EDTA、伊洛前列素)的组合,与U-100 Fiasp的时间作用曲线和药效学性质相匹配,其中对于作用的开始和尾部没有显著差异(图4)。该制剂的进一步修饰(在对于稳定性进行优化的加速制剂中的U-500 T-1123)显示出等价效力的AUC、起始和Tmax,伴随略微更长的作用尾部(图5)。

[0187] 表10:U-500 T-1123超快速制剂

TA	伊洛前列素(μg/ml)	EDTA (mM)	Mg^{++} (mM)	甘油 (mg/ml)	间甲酚 (mg/ml)	柠檬酸盐(mM)	Tris (mM)
基础制剂中的U-500 T-1123	0	0	0	16	3.2	0	50
加速制剂中的U-500 T-1123	15	6.2	6.2	16	3.2	45	0
对于稳定性进行优化的加速制剂中的U-500 T-1123	15	6.2	0	16	3.2	45	10

[0188] 一旦确定了最佳赋形剂集合,就用其中减去特定赋形剂的变体T-1123制剂在猪中进行PD研究(表11)。这些减法分析研究确保了制剂的每种活性组分都是实现最佳PD参数所必需的。在图6A、6B和6C中,分别用Tris替换柠檬酸盐,去除EDTA且去除伊洛前列素。当用Tris替换柠檬酸盐时(图6A),在猪中达到最大葡萄糖消耗的时间增加,并且存在朝向研究结束的葡萄糖消耗增加的延长尾部。当从制剂中去除EDTA时(图6B),存在朝向研究结束的葡萄糖消耗增加的延长尾部。当从制剂中去除伊洛前列素时(图6C),在猪中达到最大葡萄糖消耗的时间增加,并且存在朝向研究结束的葡萄糖消耗增加的极大延长尾部。PD度量在表12中进行概括。总的来说,这些研究显示了Tris、EDTA和伊洛前列素对于T-1123组合物提供了良好的PD概况。

[0189] 表11:U-500 T-1123减法制剂

TA	伊洛前列素(μg/ml)	EDTA (mM)	Mg^{++} (mM)	甘油 (mg/ml)	间甲酚 (mg/ml)	柠檬酸盐(mM)	Tris (mM)
U-500 T-1123减去柠檬酸盐	15	6.2	6.2	16	3.2	0	50
U-500 T-1123减去EDTA	15		6.2	16	3.2	45	
U-500 T-1123减去伊洛前列素		6.2	6.2	16	3.2	45	10

[0190] 表12:U-500 T-1123减法制剂猪PD度量(括号中为SE)

TA	n	前30分钟的AUC (%)	在180分钟后的AUC (%)	起始(分钟)	达到最大GC的时间(分钟)	抵消(分钟)	AUC (mg/kg/分钟)	最大GC (mg/kg/分钟)
U-100 SC Fiasp，1.35 nmol/kg	7	3.81 (0.42)	42.03 (2.77)	22.64 (2.19)	135.28 (20.31)	297.00 (18.77)	4170.27 (401.26)	17.65 (1.53)
U-500 SC T-1123减去柠檬酸盐,1.35 nmol/kg	6	3.42 (0.29)	50.34 (2.47)	20.83 (2.65)	180.33 (21.54)	346.83 (12.35)	4913.03 (274.4)	17.46 (0.76)
U-500 SC T-1123减去EDTA，1.35 nmol/kg	10	3.55 (0.2)	46.69 (1.18)	20.00 (1.14)	137.80 (16.45)	343.25 (6.87)	4483.46 (217.02)	16.70 (0.61)
U-500 SC T-1123减去伊洛前列素,1.35 nmol/kg	7	3.36 (0.2)	49.06 (2.14)	20.64 (1.6)	187.85 (20.37)	344.7 (8.8)	4609.18 (167.98)	18.07 (0.93)

[0191] 实施例7:伊洛前列素对原纤化滞后时间的作用

根据表13配制的胰岛素类似物(Humalog®,T-1123)对于通过加速硫黄素T (ThT)染料测定确定的原纤化滞后时间进行评估。在40℃下伴随搅动,在加速原纤化测定中一式三份地测试制剂。简言之,将250 μL配制的样品加入96孔板中,使得每个孔含有5 μM硫黄素T (ThT)。在440 nm处激发后,在480 nm发射波长处,每20分钟采集荧光数据。板阅读器在40℃下保持7天,伴随30秒线性搅动(1000 cpm)和30秒休息的连续循环。ThT染料通过其指示淀粉样蛋白原纤维的机制是ThT染料在原纤化发生时与原纤维的β折叠结构结合,并且其发射强度稳定增加。原纤化滞后时间是胰岛素或其类似物开始形成原纤维所花费时间的量度。为了本公开内容的目的,原纤化滞后时间通过发射光谱的拟合曲线的斜率对x轴(时间)的线性回归进行确定。

[0192] 表13:U500 T-1123原纤化制剂

TA	伊洛前列素(μg/ml)	EDTA (mM)	Mg++ (mM)	甘油 (mg/ml)	间甲酚 (mg/ml)	柠檬酸盐(mM)	Tris (mM)

基础制剂中的U-500 T-1123	0	0	0	16	3.2	0	50
基础制剂中的U500 T-1123 + 伊洛前列素	15	0	0	16	3.2	0	50
柠檬酸盐制剂中的U-500 T-1123 + 伊洛前列素	15	6.2	6.2	16	3.2	45	0
柠檬酸盐制剂中的U-500 T-1123 + Tris	15	6.2	6.2	16	3.2	45	10

[0193] 当与缓冲剂、防腐剂和张度剂一起配制时(“基础制剂”),T-1123具有明显高于Humalog (7.47小时)的原纤化滞后时间(25.1小时) (表14,图7A)。令人惊讶的是,对相同制剂添加伊洛前列素使T-1123的原纤化滞后时间极大地增加至168+小时,超过6倍的增加。当Tris被缓冲剂柠檬酸盐替换时,并且当Tris和柠檬酸盐以组合使用时,原纤化滞后时间的增加得到保留。在所述的观察之前,不存在伊洛前列素作为稳定赋形剂具有显著特性的指示。

[0194] 表14:伊洛前列素延长T-1123的原纤化滞后时间

TA	重复(n)	平均滞后时间(小时)	SD (小时)	注释
Humalog	6	7.47	1.89	
基础制剂中的U-500 T-1123	11	25.1	5.59	
基础制剂中的U500 T-1123 + 伊洛前列素	3	168	0	在168小时内并未原纤化
柠檬酸盐制剂中的U-500 T-112 + 伊洛前列素3	6	168+	0	在168小时内并未原纤化
柠檬酸盐制剂中的U-500 T-1123 + 伊洛前列素 + Tris	15	168+	0	在168小时内并未原纤化

[0195] 接下来,在商购可得的胰岛素类似物中测试了伊洛前列素针对原纤化的保护效应。根据上述方法,在Humalog中用3种递增浓度的伊洛前列素评估了原纤化滞后时间。在测试的伊洛前列素浓度下,伊洛前列素对Humalog的原纤化滞后时间仅具有轻微作用(表15)。

[0196] 表15:伊洛前列素并不延长赖脯胰岛素的原纤化滞后时间

TA	制剂	重复	平均滞后时间(小时)	SD (小时)
Humalog	商业Humalog + 0 μg/ml伊洛前列素	6	7.47	1.89
Humalog	商业Humalog + 15 μg/ml伊洛前列素	3	8.97	2.07
Humalog	商业Humalog + 50 μg/ml伊洛前列素	3	9.90	1.36

Humalog	商业Humalog + 100 μg/ml伊洛前列素	3	9.45	3.59

[0197] 使用ThT荧光在加速原纤化测定中就物理稳定性表现评估证实与Fiasp (实施例6,表10)等价的时间作用曲线的T-1123制剂。含有15 ug/mL伊洛前列素的U-500 T-1123制剂在168小时内并未原纤化(表14),而不含伊洛前列素的基础制剂中的U-500 T-1123在25.10 ± 5.59小时内原纤化,而商购可得的Humalog在7.47 ± 1.89小时内原纤化(表15)。

[0198] 实施例8:T-1123的化学稳定性和物理稳定性

使用RS和HMWP、以及如实施例7中的原纤化,将在基础制剂中配制的U-500 T-1123(表10)的化学稳定性与商购可得的U-100 Humalog和U-500 Humulin进行比较。为了确定RS和HMWP,胰岛素类似物的U-500 (17.5 mg/ml)无锌制剂、U100 Humalog和U500 Humulin在40℃下热应激28天。RS通过反相UPLC和LC-MS进行表征。

[0199] 通过尺寸排阻高效液相层析(SEC-HPLC),来定量作为共价二聚体和寡聚体的HMWP形成。在温育期后,基础制剂中的T-1123显示了由于RS和HMWP的化学降解,其水平与U-100 Humalog和U-500 Humulin相似(图8A)。跨越测试的所有三种组合物,在研究过程中损失不多于3%的纯度。U-500 T-1123显示出与U-100 Humalog相比略微改善的RS,以及与U-100 Humalog和U-500 Humulin相比略微改善的HMWP。

[0200] 还执行了长期研究,以评估T-1123的化学稳定性和物理稳定性。对于这些研究,U500 T-1123如表13中所述的在具有Tris的柠檬酸盐制剂中进行配制,然后在30℃下置于章动器上的小瓶中共一年。在一年后,关于T-1123的RS显示在这些条件下仅3.14%的下降(图8F)。另外,与U400 Insuman (在81天的原纤化)和U100 Humalog (在32.75天的原纤化)的商业制剂形成对比,测试样品无一已原纤化(图7D)。

[0201] 实施例9:T-1123超快速制剂的化学稳定性优化

在赋形剂的迭代中执行滴定,以确定用于T-1123的制剂开发中的最佳组合和浓度。所有测试制剂都含有以U-500 T-1123浓度的45 mM柠檬酸钠、6.2 mM EDTA (各种盐)、15 μg/mL伊洛前列素和0.32%间甲酚。胰岛素类似物的制剂在45℃下热应激7天,并且如实施例8中所述表征RS和HMWP。示例性研究显示于图8B-8E中。图8B和8C概括了镁和Tris对T-1123的化学稳定性具有的作用。在EDTA/Mg^{2+}的非等摩尔浓度下,存在API纯度与渐增浓度的Tris之间的直接相关性,指示了改善的稳定性。图8D和8E概括了在4mM Mg^{2+}下甘油和Tris滴定的效应。渐增浓度的Tris和甘油降低HMWP生成,并且这种效应在20 mM Tris和20 mg/mL甘油下达到最大。

[0202] 图8F提供了进一步化学降解研究的结果。T-123组合物如表16所示的进行配制。图8F显示了对于选择的制剂STA-0067 (n=3)、STA-0109 (n=3)和STA- 0116 (n=2),由于有关物质(RS)和共价高分子量蛋白(HMWP)累积的纯度损失。

[0203] 表16:各种浓度的Mg+、甘油和Tris的U500 T-1123制剂

制剂	柠檬酸盐(mM)	伊洛前列素(ug/mL)	Na2-EDTA(mM)	MgSO4(mM)	甘油(mg/mL)	间甲酚(%)	Tris(mM)
STA-067	45	15	6.2	6.2	16	0.32	10

STA-109	45	15	6.2	4	13	0.32	10
STA-116	45	15	6.2	5	13	0.32	12

[0204] 实施例10:T-1123制剂的聚集

使用Wyatt Dynapro板阅读器III (Wyatt Technology),通过动态光散射(DLS),在Tris缓冲液,pH 7.4中含有间甲酚和甘油的无锌制剂中3.0 mM的蛋白质浓度下,调查了T-1123的自结合状态。U-500 T-1123无锌制剂样品以及U-100 Humalog和U-500 Humulin R的商业样品在40℃下监测聚集状态的变化共28天。对于原位测量,使用10次采集(每次采集5秒)收集散射光的自相关函数,并且使用"正则化"尺寸分布和瑞利球模型转换成粒度分布。对于研究过程,无锌U-500 T-1123的聚集状态对于热应激并未改变。散射数据的分析揭示了,在这些条件下,T-1123占优势地是二聚体,而U-100 Humalog和U-500 Humulin R的估计平均分子量是在t=0分钟对于胰岛素六聚体预计的分子量,并且U-500 Humulin R在研究过程内显示了平均摩尔质量的显著进一步增加(即,超过六聚体)。表17中描述的T-1123超快速制剂如上就响应热应激(40℃共28天)的聚集状态变化进行评价,并且证实了在研究过程中并未改变。

[0205] 表17:U-500 T-1123超快速制剂证实了延长的滞后时间

TA	伊洛前列素(μg/ml)	EDTA (mM)	Mg^{++} (mM)	甘油 (mg/ml)	间甲酚 (mg/ml)	柠檬酸盐 (mM)	Tris (mM)	平均滞后时间(小时)	n
加速制剂中的U-500 T-1123	15	6.2	6.2	16	3.2	45		168+	3
对于稳定性进行优化的加速制剂中的U-500 T-1123	15	6.2		16	3.2	45	10	168+	3

[0206] 实施例11:基于细胞的测定

T-1123相对于人胰岛素的体外效力在基于细胞的受体激活测定中进行确定,所述测定定量过表达人胰岛素受体的A (hIR-A)或B (hIR-B)同种型的CHO细胞中的酪氨酸磷酸化,包括胰岛素受体的酪氨酸磷酸化。在胰岛素刺激后,使用抗pTyr一抗4G10 (Millipore),使用In Cell Western试剂盒(LICOR),来测量酪氨酸磷酸化的增加。结果使用DNA定量对于细胞数目进行标准化。剂量应答数据符合四参数逻辑模型,以确定EC_{50}值。关于T-1123和HI的人胰岛素受体(同种型A;hIR-A)激活分别显示出23.2 ± 1.28和10.5 ± 2.28 nM的EC_{50}值;类似地,分别的hIR-B激活EC_{50}值为3.7 ± 0.13和2.6 ± 0.11 nM。T-1123在IR激活测定中的相对效力与相对于HI的体内完全效力一致。

[0207] T-1123和HI的去磷酸化动力学通过在胰岛素刺激的清除后的酪氨酸磷酸化降低的In-Cell Western (LICOR)定量进行评价。在过表达hIR-A或hIR-B受体的CHO细胞中进行去磷酸化测定。CHO细胞用以100 nM的固定浓度的T-1123或HI刺激5分钟,然后洗涤以去除

胰岛素。在清除之后的五个时间点(0、30、60、120和180分钟),使用抗pTyr一抗4G10(Millipore),使用In Cell Western试剂盒(LICOR),来测量酪氨酸磷酸化。结果使用DNA定量对于细胞数目进行标准化。关于hIR-A和hIR-B细胞中的T-1123的信号传导持续时间小于或等于HI (图9A、图9B),指示了不大于HI的促有丝分裂风险潜力。

[0208] 使用分化的人前脂肪细胞,在抗脂解测定中评价T-1123的代谢效力。前脂肪细胞在96孔板中用DM-2 Subcutaneous Preadipocyte Differentiation Medium (Zen-Bio)分化14天。用异丙肾上腺素(0.5 nM)刺激分化的细胞,以刺激脂解,其可以通过作为释放到细胞培养基内的甘油进行测量。脂解通过HI或T-1123的稀释系列压制4小时。将细胞培养基转移到新的96孔板中,并且通过3步过程测量甘油的释放,所述3步过程最终产生具有在540 nm处的吸光度的醌亚胺(quinoeimine)染料。用四参数逻辑模型拟合甘油释放剂量应答数据,以确定关于抑制的EC_{50}值;对于T-1123和HI分别为0.54 ± 0.14 nM和0.56 ± 0.15 nM。在抗脂解测定中,T-1123相对于HI无法区分的效力与T-1123的完全代谢效力一致。

[0209] T-1123的促有丝分裂潜力通过在使用人乳腺癌衍生的MCF-7细胞的细胞增殖测定中的 [2-^{14}C]-胸苷掺入进行评价。用以10 pM至1500 nM的T-1123或HI对照的稀释系列刺激血清饥饿细胞,并且温育过夜,随后为与[2-^{14}C]-胸苷溶液的6小时温育。[2-^{14}C]-胸苷的掺入用闪烁计数器进行测量,并且剂量应答曲线由n=8个技术重复进行计算。T-1123证实相对于HI较低的促有丝分裂效力,具有80.5 nM和12.9 nM的分别EC_{50}值。即使在校正了较低的固有IR激活效力后,T-1123的促有丝分裂效力保持低于HI。

[0210] 实施例12:体内效力

在糖尿病Lewis大鼠中确定了在中性缓冲液、防腐剂和张度剂中配制的T-1123和赖脯胰岛素的效力。T-1123和赖脯胰岛素(KP)在光照周期开始时,在2小时禁食之后,以10 μg/300g大鼠进行静脉内施用。使用EasyMax V血糖仪,在剂量施用之后5小时内测量所得到的血糖(BG)变化。时间作用拟合的BG曲线显示于(图10A)中。(图10B)中的效力显示为通过施用的每μg mg/dl的BG降低,并且根据PD曲线的最大下降进行计算。测量的效力指示了T-1123在糖尿病大鼠模型中至少与赖脯胰岛素一样有效。

[0211] 实施例13:用于评价多聚磷酸盐制剂中的原纤维形成的制剂

胰岛素类似物T-1123 (相对于野生型人胰岛素的EA8、EA14、GA21、desB1、AB2、EB3和EB29)和T-8602 (相对于野生型人胰岛素的A8、EA14、AA21、AB3、EB29和EEGRR接头;SEQ ID NO. 14)就原纤化滞后时间进行评估,所述原纤化滞后时间通过实施例7中所述的加速硫黄素T (ThT)染料进行确定。制备样品用于在50 mM Tris缓冲液(以7.4的pH)中的测试,所述Tris缓冲液含有3.2 mg/mL间甲酚、16 mg/mL甘油、以及含有或不含20 mM三磷酸钠(三磷酸盐)。参见表18。另外,Humalog® (Eli Lilly;含有或不含三磷酸盐)以及Novolog®(Novo Nordisk,含有或不含三磷酸盐)也测试了在ThT阳性原纤化的开始前的滞后时间。参见表19。

[0212] 表18:用于原纤化测定的胰岛素类似物制剂

T代码	Mg+2 (mM)	甘油(mg/mL)	间甲酚(mg/mL)	三磷酸盐(mM)	Tris (mM)
T-1123	0	16	3.2	0	50
T-1123	0	16	3.2	20	50
T-8602	0	16	3.2	20	50

T-8602	0	16	3.2	0	50

[0213] 表19:用于原纤化测定的Humalog®和Novolog®制剂

	批次#	终止	三磷酸盐(mM)
Humalog®	D065900A	4月22日	0
Humalog®	D065900A	4月22日	20
Novolog®	JZFF071	9月21日	0
Novolog®	JZFF071	9月21日	20

[0214] 实施例14:用于测试胰岛素类似物的稳定性的加速原纤化测定

胰岛素类似物(Humalog®、Novolog®、T-1123和T-8602)的一式三份样品在40℃下在快速搅动下分布到协同H1荧光分光光度计(BioTek Instruments,Inc.,Winooski,VT)中的微板内至多七(7)天,并且使用硫黄素-T (ThT)荧光测定检测到原纤维。使用分别为440和485 nm的激发和发射波长,每20分钟执行ThT荧光测量。

[0215] 以U-500在缓冲剂、防腐剂和张度剂的基础制剂中配制的T-1123证实了原纤化滞后时间不受20 mM三磷酸钠添加的影响(表20,图11A)。这与Humalog®和Novolog®形成鲜明对比,后者显示了伴随20 mM三磷酸钠的添加原纤化滞后时间的急剧减少(表20)。还值得注意的是,在含有和不含三磷酸钠的基础制剂中的T-1123 U-500的原纤化滞后时间是不含三磷酸钠的Humalog®或Novolog®的商业制剂的>4倍。

[0216] 以U-100在缓冲剂、防腐剂和张度剂的基础制剂中配制的T-8602证实了原纤化滞后时间不受20 mM三磷酸钠添加的影响(表20,图11B)。这与Humalog®和Novolog®形成鲜明对比,后者显示了伴随20 mM三磷酸钠的添加原纤化滞后时间的急剧减少。还值得注意的是,在含有和不含三磷酸钠的基础制剂中的T-8602 U-100的原纤化滞后时间是不含三磷酸钠的Humalog®或Novolog®的商业制剂的>20倍。

[0217] 表20:三磷酸盐对原纤化滞后时间的作用

TA	平均滞后时间(小时)	SD (小时)	注释
Humalog® + 三磷酸盐	0.8	0.1	
Humalog®	6.59	0.6	
Novolog® + 三磷酸盐	0.65	0.19	
Novolog®	2.24	0.05	
基础制剂中的U-500 T-1123	26.25	1.56	
基础制剂中的U-500 T-1123 + 三磷酸盐	25.29	0.6	
基础制剂中的U-100 T-8602	168+		在168小时内并未原纤化
基础制剂中的U-100 T-8602 + 三磷酸盐	168+		在168小时内并未原纤化

[0218] 图11C提供了进一步加速原纤化测定的结果。T-123组合物如表16中提供的进行配制,并且针对Humalog进行测试(在每种情况下n=3)。每种T-1123制剂显示出超过168天的原纤化滞后时间,而Humalog显示出6.96天的平均原纤化滞后时间。

[0219] 实施例15:在多聚磷酸盐制剂中的T-1123化学稳定性

如表21中指示的,使用含有和不含TriPO4的基础制剂配制T-1123。为了确定RS和HMWP,这些制剂在40℃下热应激28天。RS和HMWP如实施例8所述进行表征。在温育期后,TriPO4的存在并不影响T-1123化学稳定性(图12),因为RS和HMWP均在20 mM TriPO4添加后保持相似。

[0220] 表21:TriPO4对T-1123基础制剂的作用

TriPO4 (mM)	RS (%纯度)	HMWP (%纯度)
0	97.44	98.84
20	97.6	98.54

[0221] 等同方案

尽管本发明已与其具体实施方案结合进行描述,但应理解,它能够进一步修改,并且本申请预期涵盖本发明的任何变化、用途或适应,其一般而言遵循本发明的原理,并且包括如在本发明所属领域内的已知或惯常实践内、以及如可以应用于上文所述的基本特征以及在下述所附权利要求的范围内的与本公开内容的此类背离。

[0222] 本领域技术人员将认识到或能够使用不超过例行实验来确定本文具体描述的具体实施方案的众多等价方案。此类等价方案预期涵盖在所附权利要求的范围内。

[0223] 通过引用并入

本文引用的所有专利和出版物都在此通过引用以其整体并入。

序列表

<110> THERMALIN INC.
CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY
MULAJ, Mentor
WEISS, Michael A.
BROADWATER, Laurie A.
HATTIER, Thomas
<120> 速效胰岛素类似物和组合物
<130> 200512-00465
<150> US 62/984,165
<151> 2020-03-02
<160> 14
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 1
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Glu Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20
<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 2
Ala Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
20 25
<210> 3
<211> 29
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 3
Ala Ala Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
20 25
<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 4
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Glu Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Thr
20
<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 5
Ala Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Lys Thr
20 25
<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 6
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Glu Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gln
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 7

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Glu Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Ala
20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 8

Gly Ile Leu Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 9
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 9

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 Leu
20 25

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 10
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 Ala Tyr Thr Pro Leu
20 25
<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
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 Gly Tyr Thr Pro Leu
20 25
<210> 12
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 12
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 Val Tyr Thr Pro Leu
20 25
<210> 13
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 13
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 Leu Tyr Thr Pro Leu

20 25

<210> 14

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Phe Val Ala 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 Leu Glu Glu Glu
20 25 30

Gly Arg Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Glu Ser Ile Cys Ser Leu
35 40 45

Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Ala
50 55

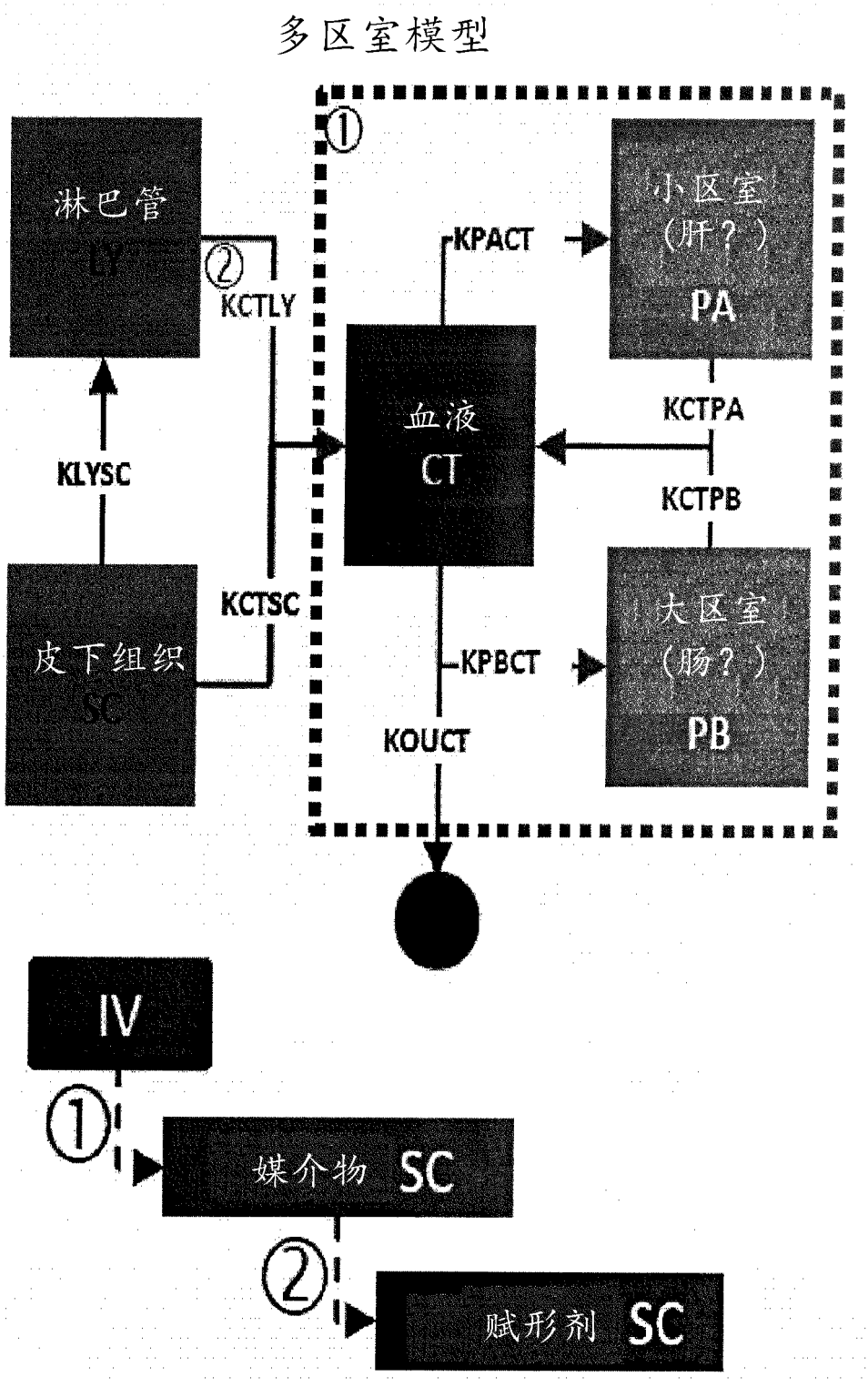

多区室模型
①
淋巴管
LY
②
KCTLY
KPACT
小区室
(肝?)
PA
血液
CT
KCTPA
KCTPB
KLYSC
KCTSC
皮下组织
SC
大区室
(肠?)
PB
KPBCT
KOUCT
IV
①
媒介物 SC
②
赋形剂 SC

图 1

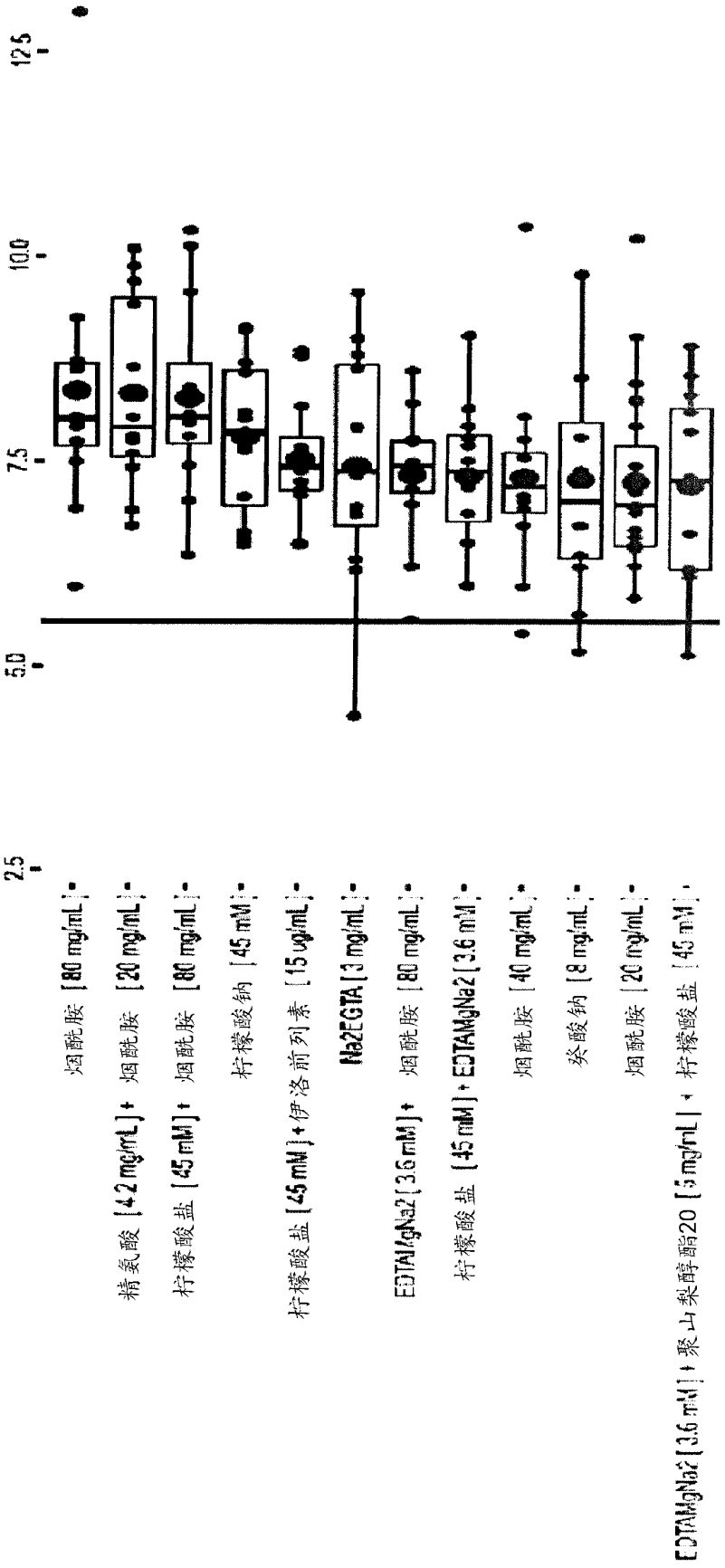

12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
烟酰胺 [80 mg/mL]+
精氨酸 [42 mg/mL]+ 烟酰胺 [20 mg/mL]+
柠檬酸盐 [45 mM]+ 烟酰胺 [80 mg/mL]+
柠檬酸钠 [45 mM]+
柠檬酸盐 [45 mM]+伊洛前列素 [15 ug/mL]+
Na2EGTA [3 mg/mL]+
EDTAMgNa2 [3.6 mM]+ 烟酰胺 [80 mg/mL]+
柠檬酸盐 [45 mM]+EDTAMgNa2 [3.6 mM]+
烟酰胺 [40 mg/mL]+
癸酸钠 [8 mg/mL]+
烟酰胺 [20 mg/mL]+
EDTAMgNa2 [3.6 mM]+聚山梨醇酯20 [5 mg/mL]+柠檬酸盐 [45 mM]+

图 2A

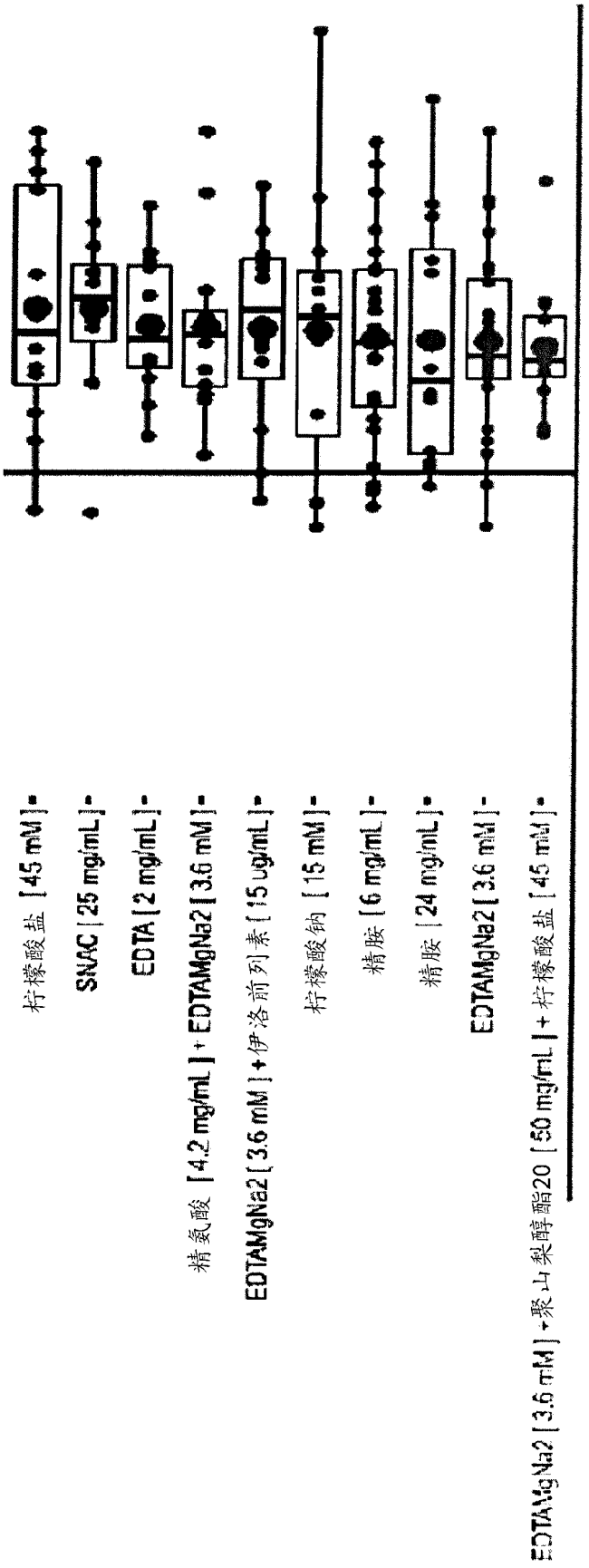

柠檬酸盐 [45 mM] -
SNAC [25 mg/mL] -
EDTA [2 mg/mL] -
精氨酸 [4.2 mg/mL] + EDTAMgNa2 [3.6 mM] -
EDTAMgNa2 [3.6 mM] + 伊洛前列素 [15 ug/mL] -
柠檬酸钠 [15 mM] -
精胺 [6 mg/mL] -
精胺 [24 mg/mL] -
EDTAMgNa2 [3.6 mM] -
EDTAMgNa2 [3.6 mM] + 聚山梨醇酯20 [50 mg/mL] + 柠檬酸盐 [45 mM] -

图 2B

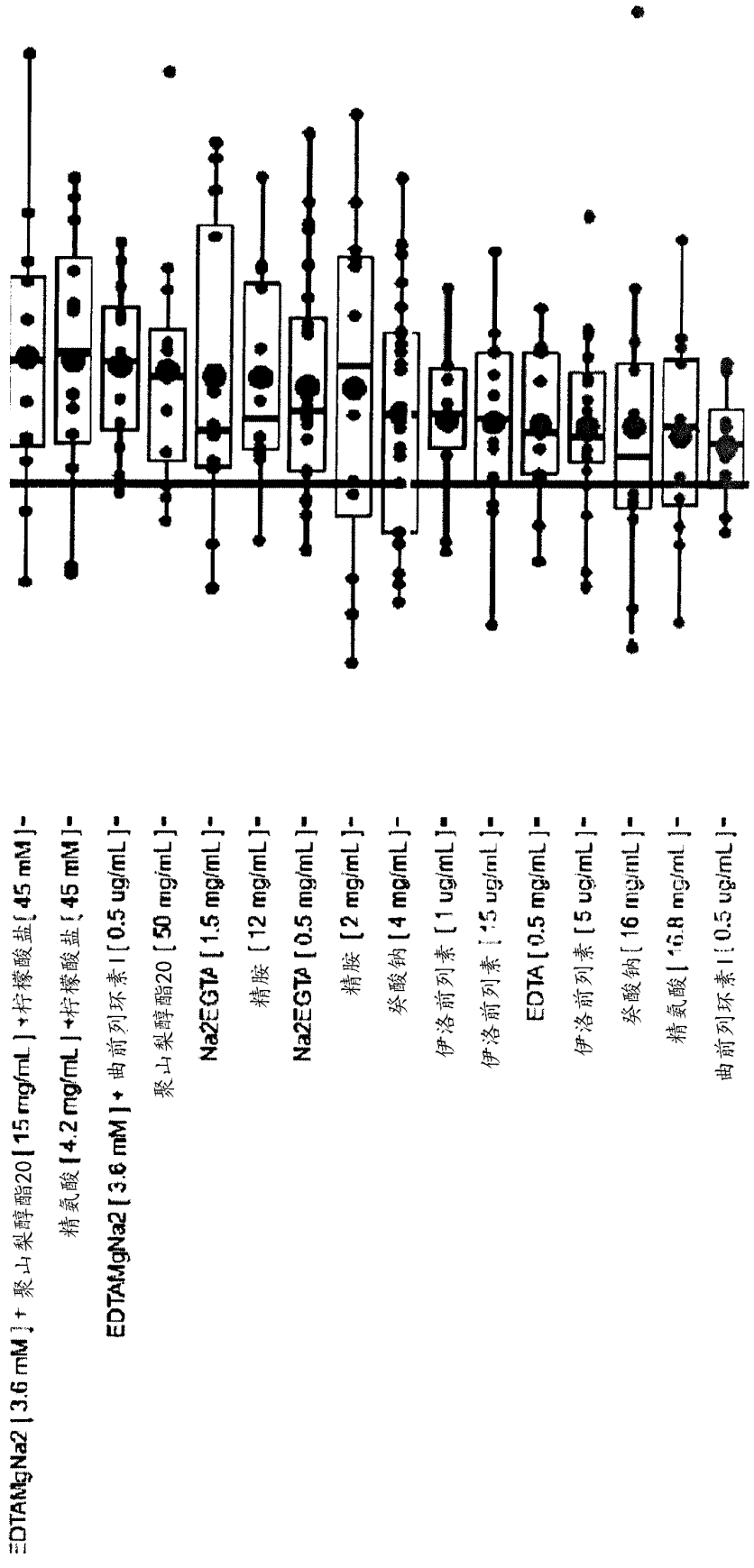

EDTAMgNa2 [3.6 mM] + 聚山梨醇酯20 [15 mg/mL] + 柠檬酸盐 [45 mM]
精氨酸 [4.2 mg/mL] + 柠檬酸盐 [45 mM]
EDTAMgNa2 [3.6 mM] + 曲前列环素 [0.5 ug/mL]
聚山梨醇酯20 [50 mg/mL]
Na2EGTA [1.5 mg/mL]
精胺 [12 mg/mL]
Na2EGTA [0.5 mg/mL]
精胺 [2 mg/mL]
癸酸钠 [4 mg/mL]
伊洛前列素 [1 ug/mL]
伊洛前列素 [15 ug/mL]
EDTA [0.5 mg/mL]
伊洛前列素 [5 ug/mL]
癸酸钠 [16 mg/mL]
精氨酸 [16.8 mg/mL]
曲前列环素 [0.5 ug/mL]

图 2C

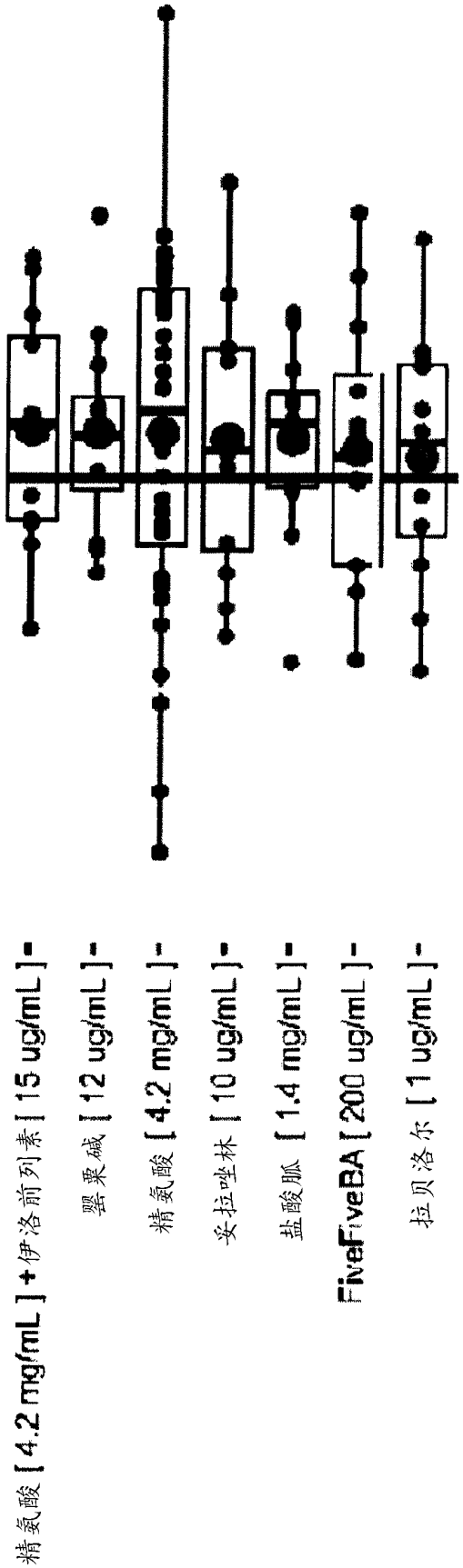

精氨酸 [4.2 mg/mL] + 伊洛前列素 [15 ug/mL] -
罂粟碱 [12 ug/mL] -
精氨酸 [4.2 mg/mL] -
妥拉唑林 [10 ug/mL] -
盐酸胍 [1.4 mg/mL] -
FiveFiveBA [200 ug/mL] -
拉贝洛尔 [1 ug/mL] -

图 2D

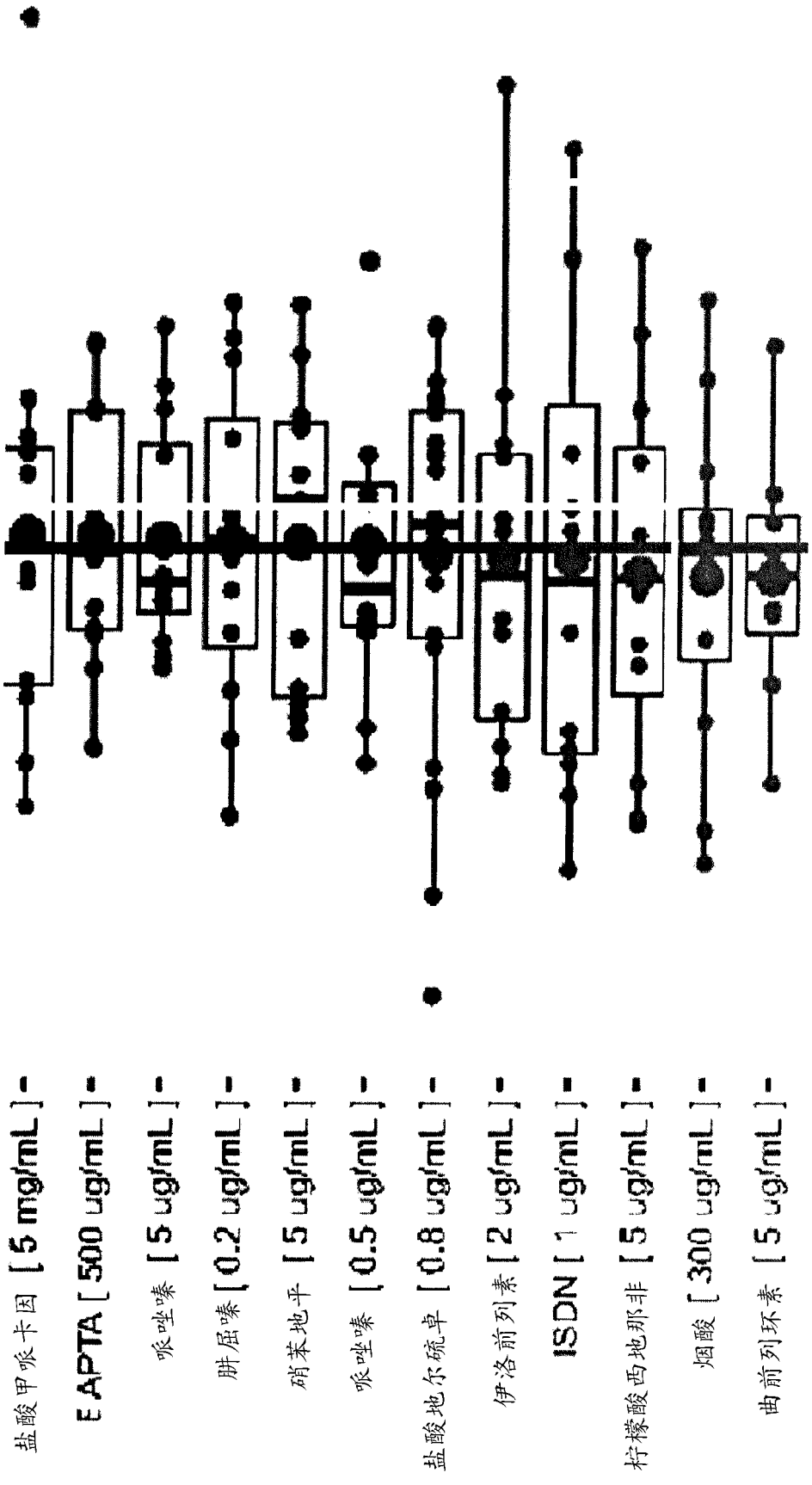

盐酸甲哌卡因 [5 mg/mL]
EAPTA [500 ug/mL]
哌吡嗪 [5 ug/mL]
肼屈嗪 [0.2 ug/mL]
硝苯地平 [5 ug/mL]
哌唑嗪 [0.5 ug/mL]
盐酸地尔硫卓 [0.8 ug/mL]
伊洛前列素 [2 ug/mL]
ISDN [1 ug/mL]
柠檬酸西地那非 [5 ug/mL]
烟酸 [300 ug/mL]
曲前列环素 [5 ug/mL]

图 2E

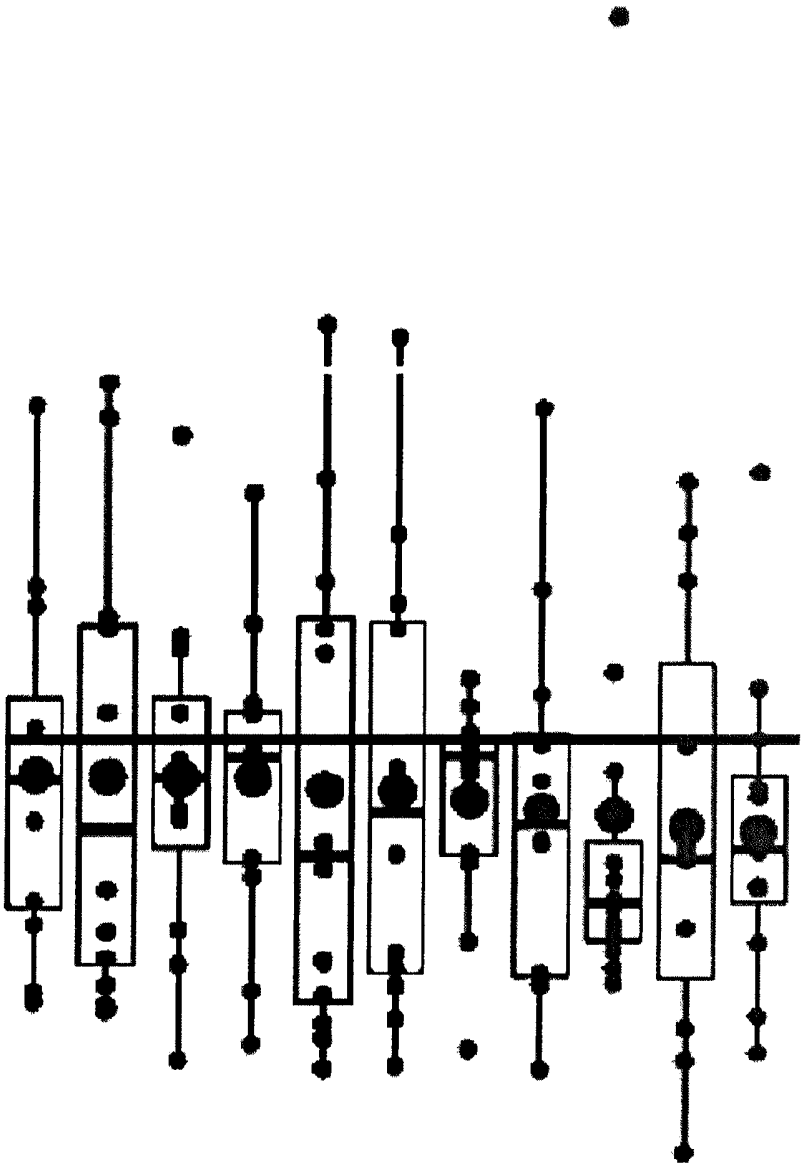

精氨酸 [8.4 mg/mL]
烟酸 [100 ug/mL]
盐酸利多卡因 [5 mg/mL]
非诺多泮 [0.02 ug/mL]
烟酸 [30 ug/mL]
盐酸地尔硫卓 [2.4 ug/mL]
C肽 [9.9 nM]
柠檬酸西地那非 [0.5 ug/mL]
盐酸地尔硫卓 [8 ug/mL]
哌唑嗪 [0.015 ug/mL]
ISM [0.5 ug/mL]

图 2F

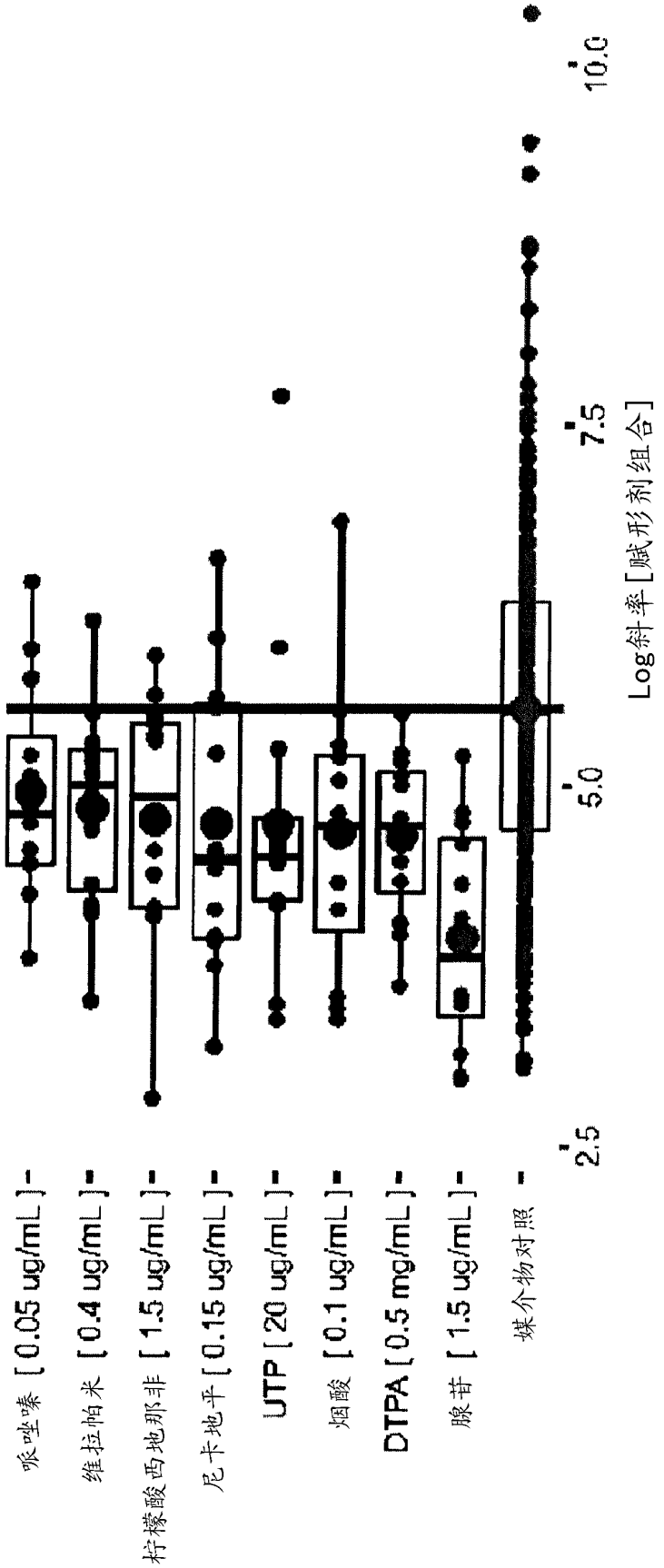

哌唑嗪 [0.05 ug/mL]
维拉帕米 [0.4 ug/mL]
柠檬酸西地那非 [1.5 ug/mL]
尼卡地平 [0.15 ug/mL]
UTP [20 ug/mL]
烟酸 [0.1 ug/mL]
DTPA [0.5 mg/mL]
腺苷 [1.5 ug/mL]
媒介物对照
2.5
5.0
7.5
10.0
Log斜率[赋形剂组合]

图 2G

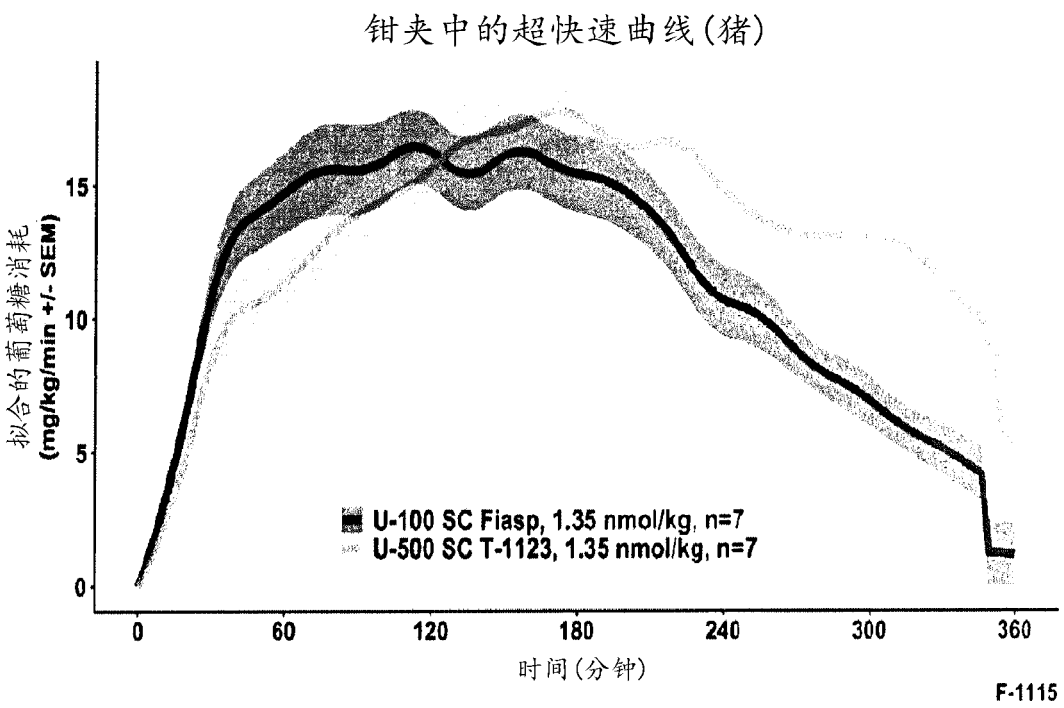

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1115

图 3

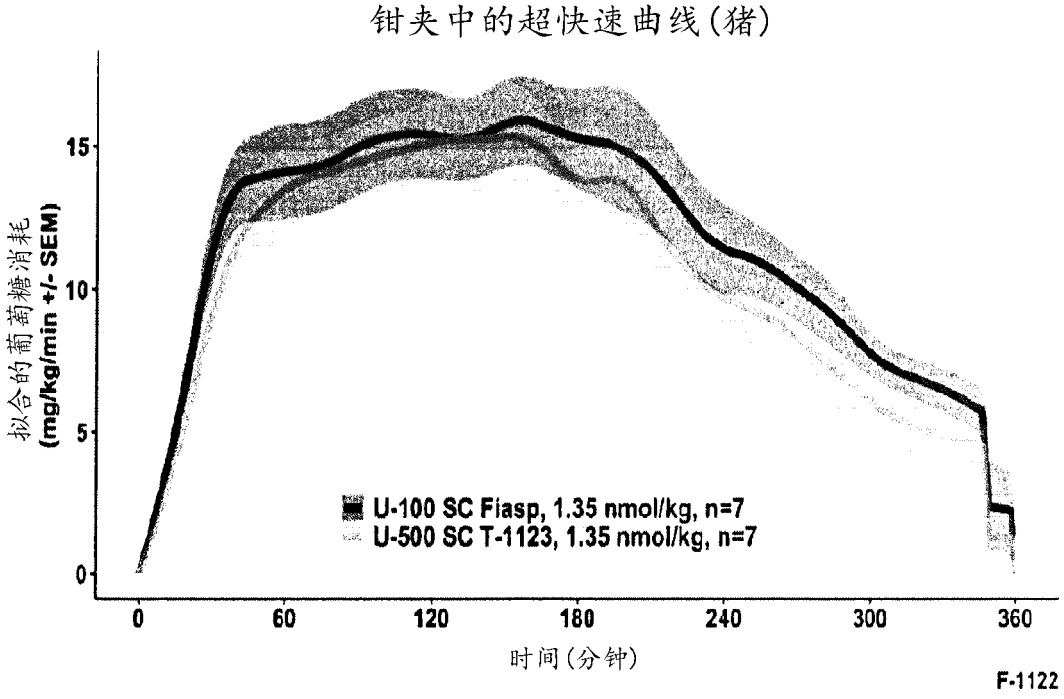

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1122

图 4

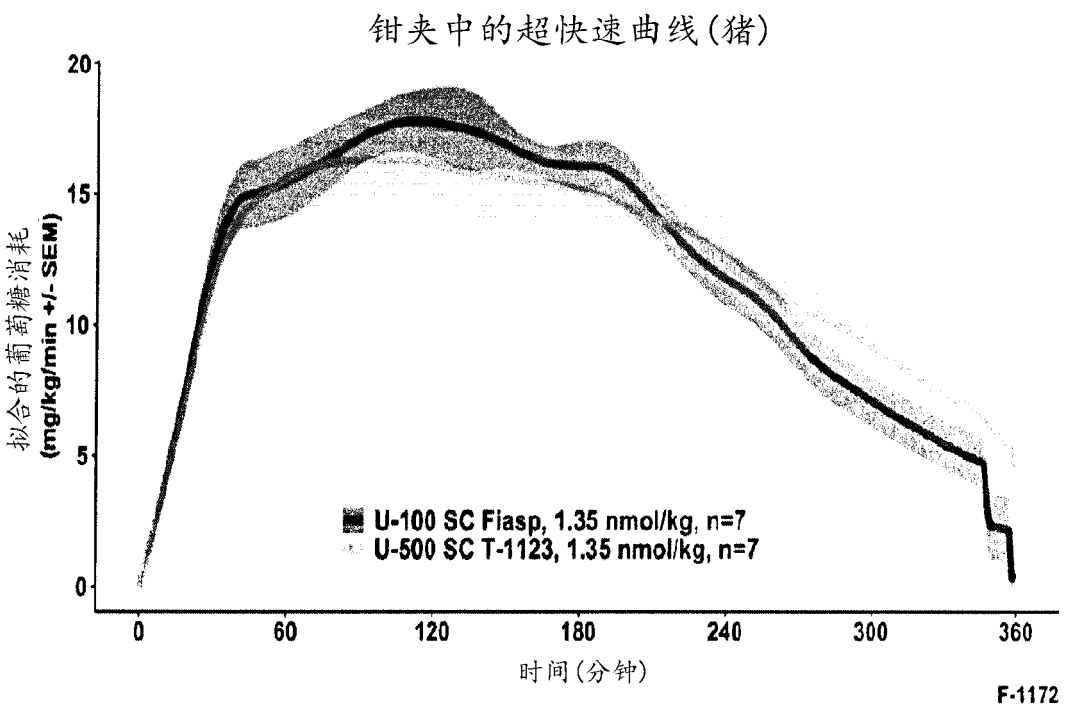

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
20
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1172

图 5

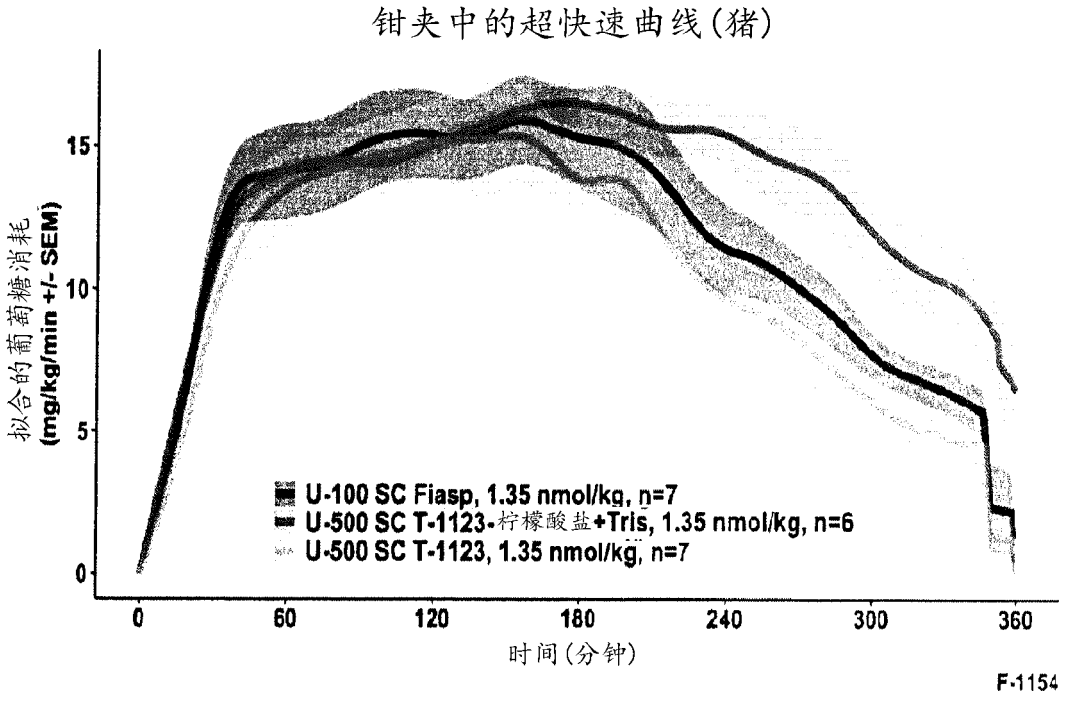

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123-柠檬酸盐+Tris, 1.35 nmol/kg, n=6
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1154

图 6A

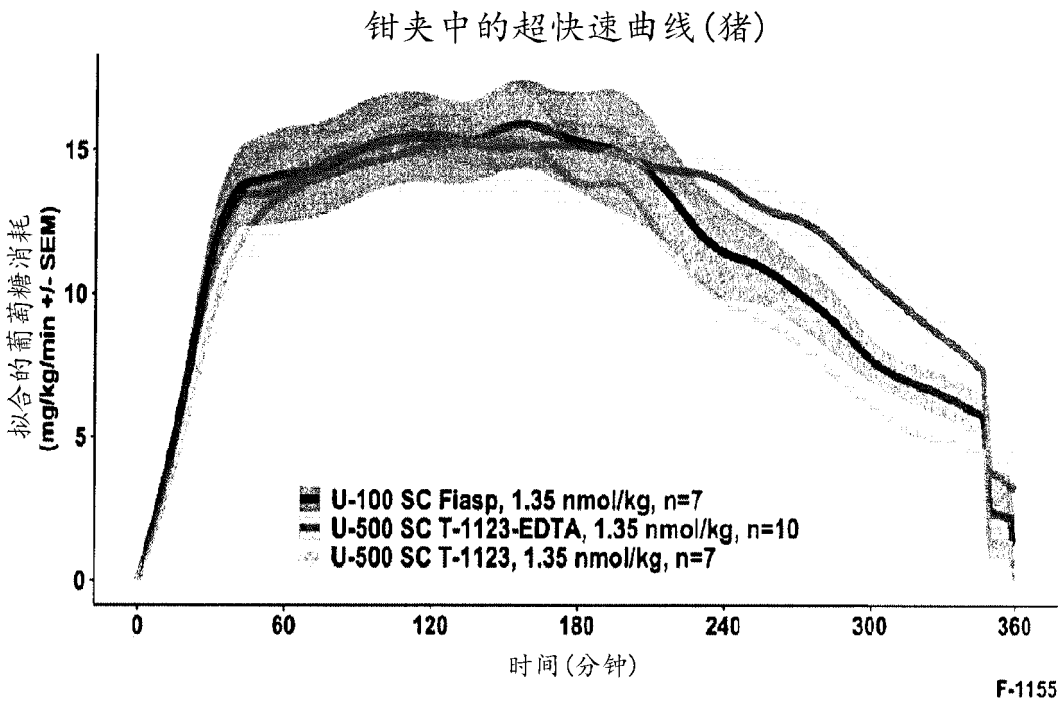

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123-EDTA, 1.35 nmol/kg, n=10
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1155

图 6B

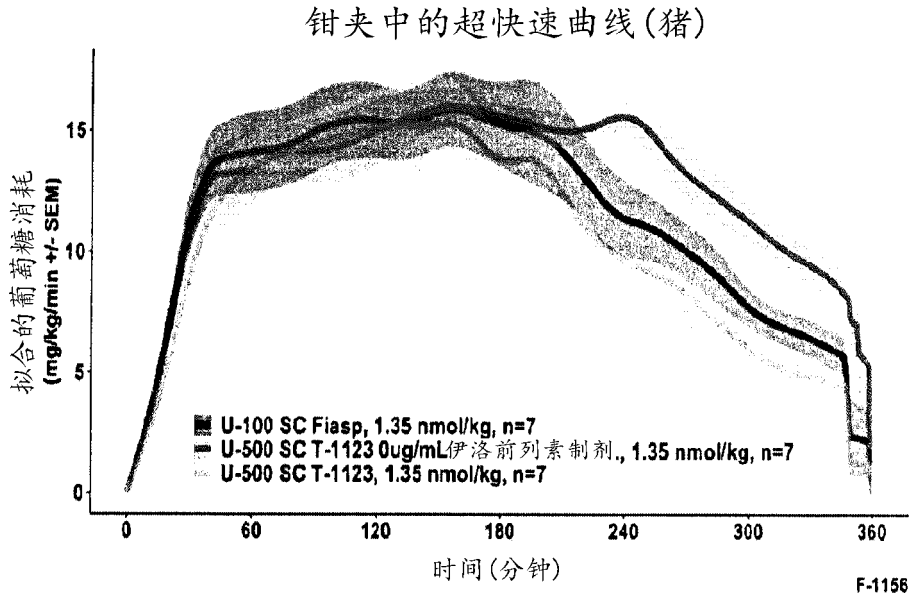

钳夹中的超快速曲线(猪)
拟合的葡萄糖消耗
(mg/kg/min +/- SEM)
15
10
5
0
U-100 SC Fiasp, 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123 0ug/mL伊洛前列素制剂., 1.35 nmol/kg, n=7
U-500 SC T-1123, 1.35 nmol/kg, n=7
0
60
120
180
240
300
360
时间(分钟)
F-1156

图 6C

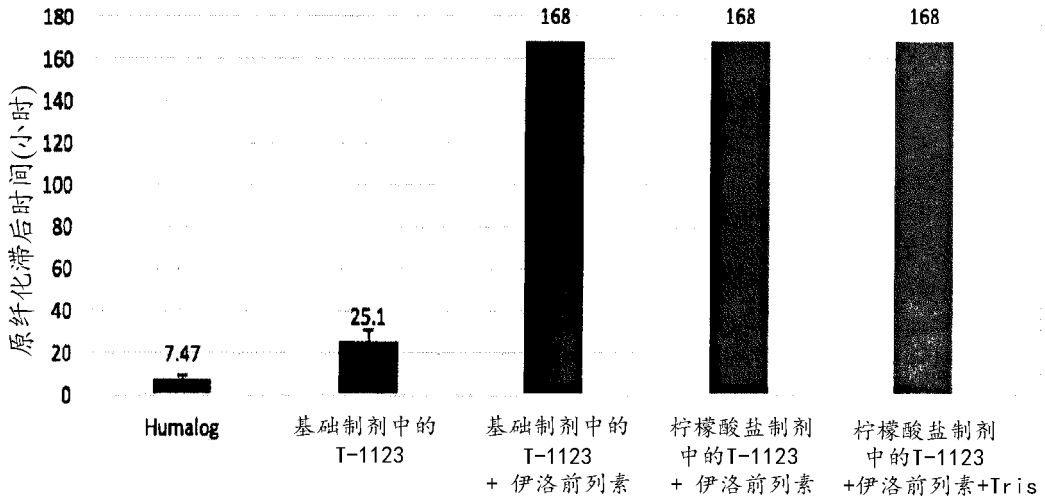

原纤化滞后时间(小时)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
7.47
25.1
168
168
168
Humalog
基础制剂中的 T-1123
基础制剂中的 T-1123 + 伊洛前列素
柠檬酸盐制剂中的T-1123 + 伊洛前列素
柠檬酸盐制剂中的T-1123 +伊洛前列素+Tris

图 7A

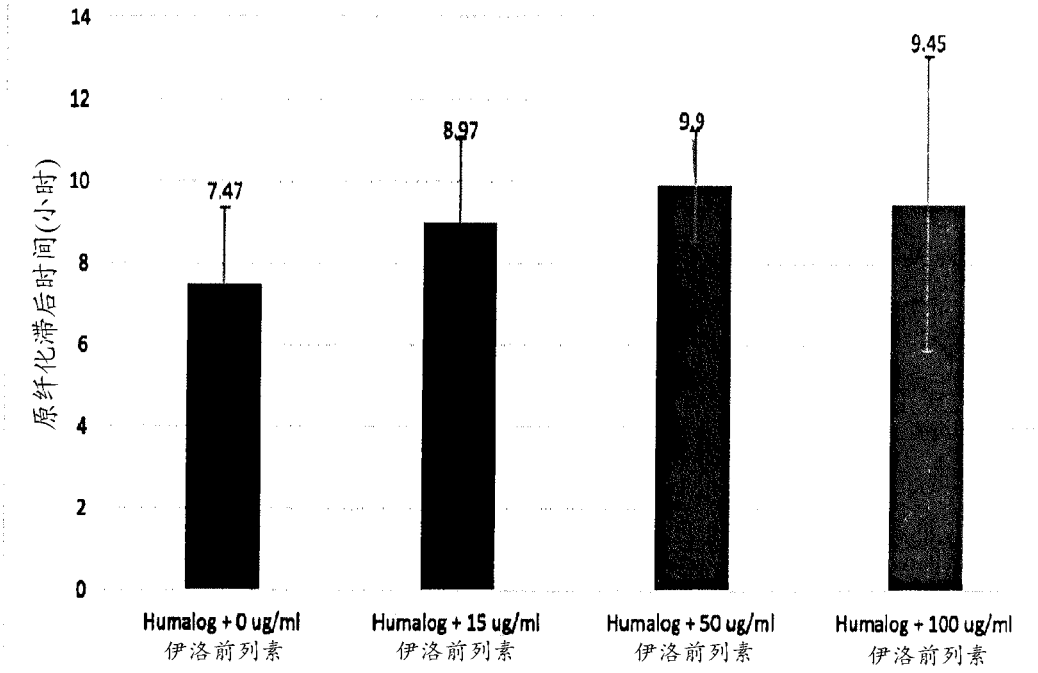

原纤化滞后时间(小时)
14
12
10
8
6
4
2
0
7.47
8.97
9.9
9.45
Humalog + 0 ug/ml 伊洛前列素
Humalog + 15 ug/ml 伊洛前列素
Humalog + 50 ug/ml 伊洛前列素
Humalog + 100 ug/ml 伊洛前列素

图 7B

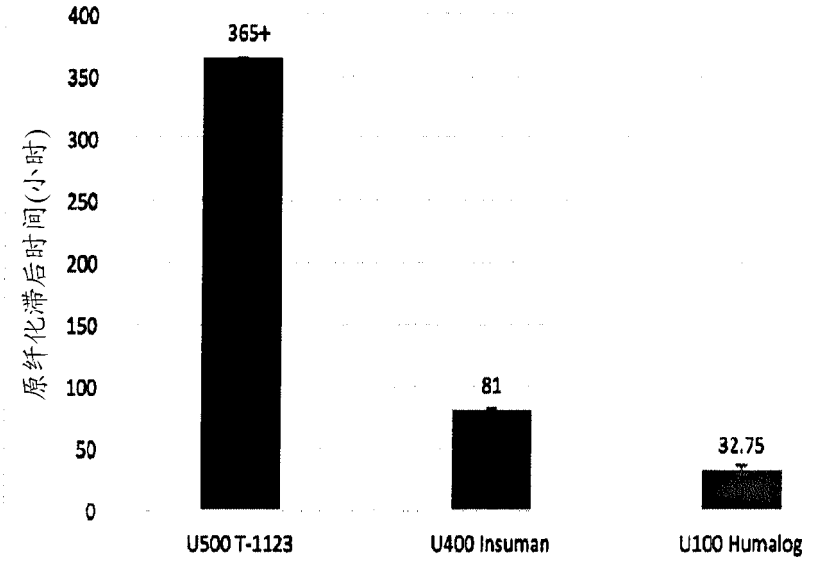

400
350
300
250
200
150
100
50
0
原纤化滞后时间(小时)
365+
81
32.75
U500 T-1123
U400 Insuman
U100 Humalog

图 7C

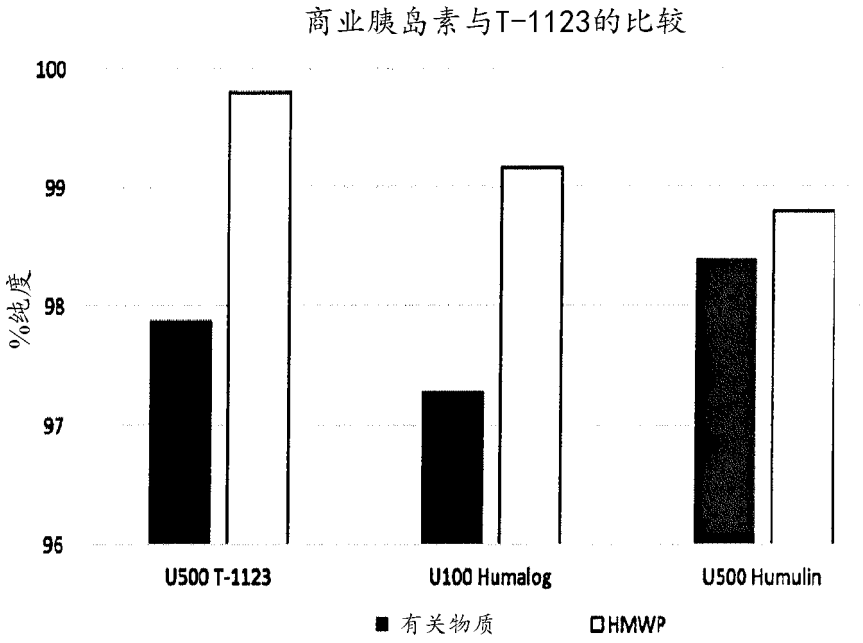

商业胰岛素与T-1123的比较
100
99
98
97
96
%纯度
U500 T-1123
U100 Humalog
U500 Humulin
有关物质
HMWP

图 8A

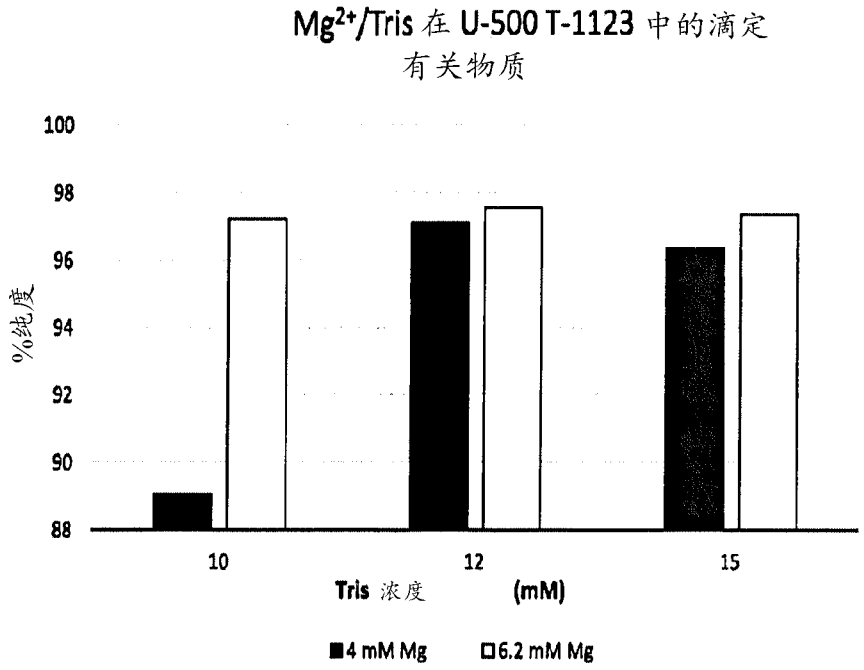

Mg2+/Tris 在 U-500 T-1123 中的滴定
有关物质
100
98
96
94
92
90
88
%纯度
10
12
15
Tris 浓度 (mM)
4 mM Mg
6.2 mM Mg

图 8B

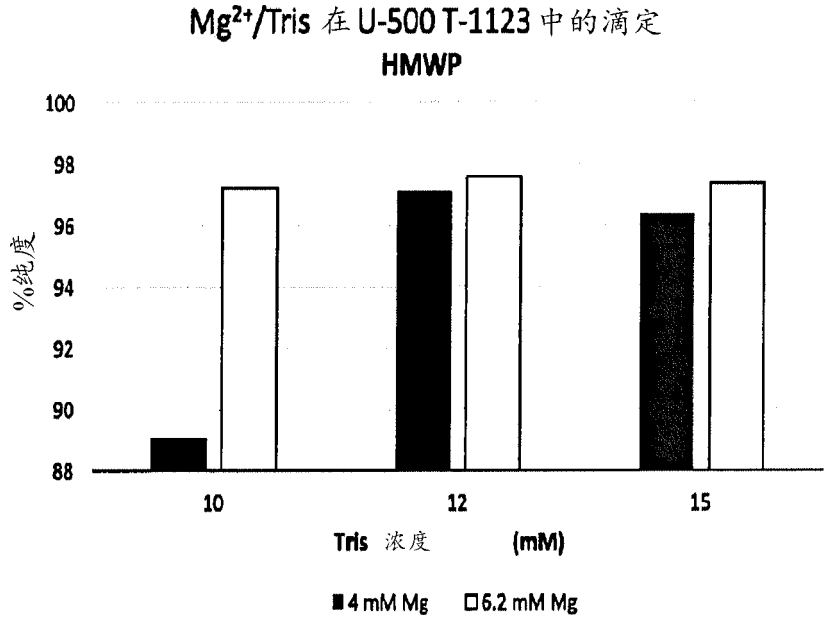

Mg2+/Tris 在 U-500 T-1123 中的滴定
HMWP
100
98
96
94
92
90
88
%纯度
10
12
15
Tris 浓度 (mM)
4 mM Mg
6.2 mM Mg

图 8C

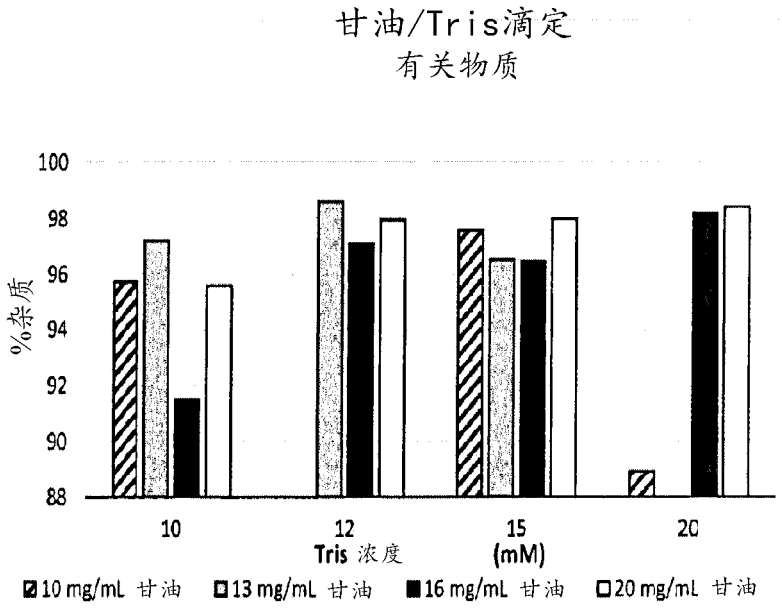

甘油/Tris滴定
有关物质
100
98
96
94
92
90
88
%杂质
10
12
15
20
Tris 浓度
(mM)
10 mg/mL 甘油
13 mg/mL 甘油
16 mg/mL 甘油
20 mg/mL 甘油

图 8D

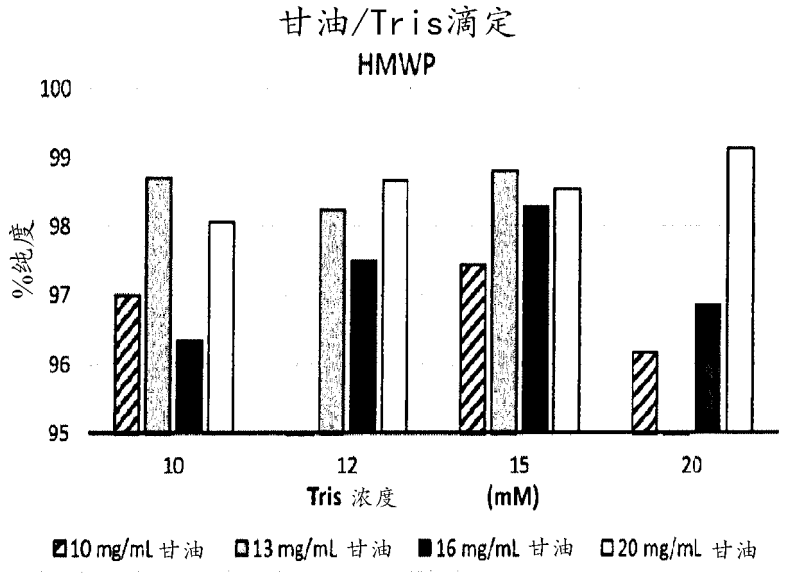

甘油/Tris滴定
HMWP
100
99
98
97
96
95
%纯度
10
12
15
20
Tris 浓度
(mM)
10 mg/mL 甘油
13 mg/mL 甘油
16 mg/mL 甘油
20 mg/mL 甘油

图 8E

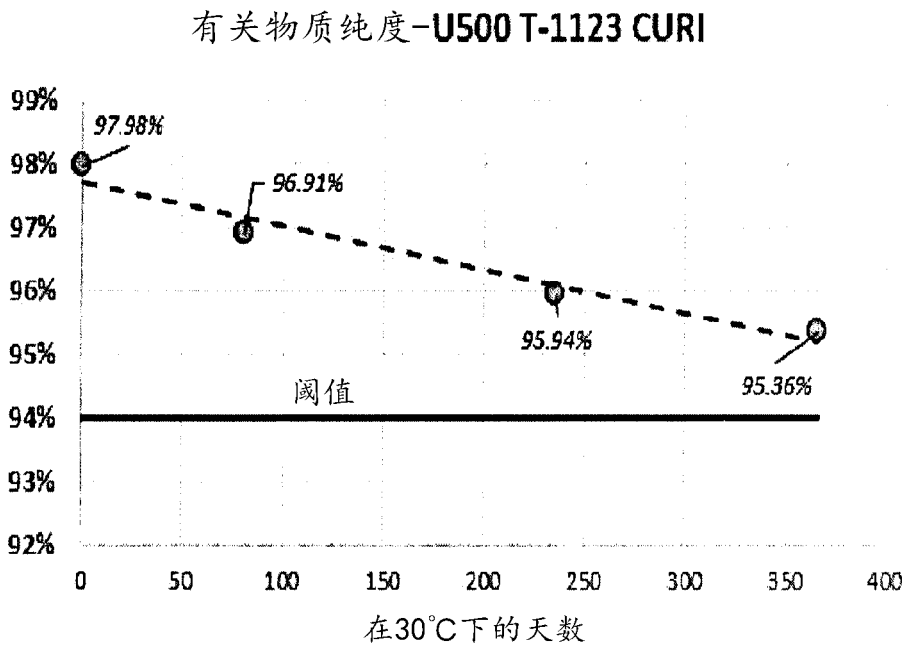

有关物质纯度-U500 T-1123 CURI
99%
98%
97%
96%
95%
94%
93%
92%
97.98%
96.91%
95.94%
95.36%
阈值
0
50
100
150
200
250
300
350
400
在30°C下的天数

图 8F

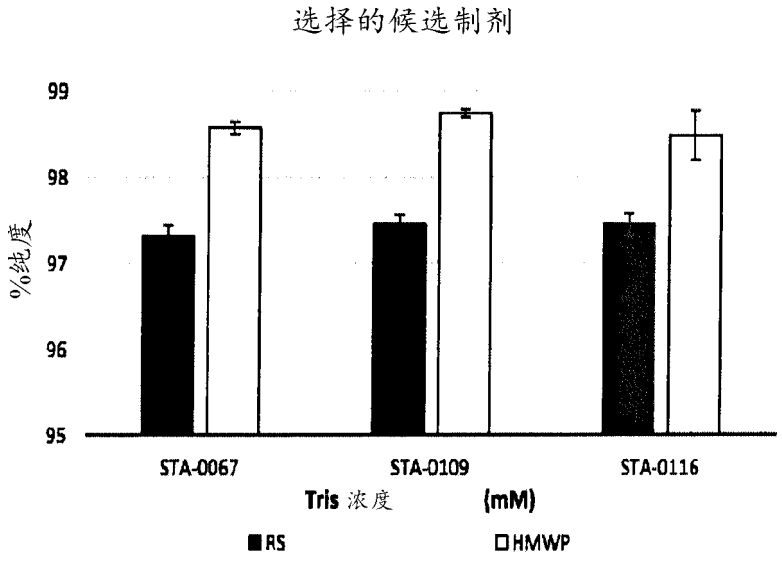

选择的候选制剂
99
98
97
96
95
%纯度
STA-0067
STA-0109
STA-0116
Tris 浓度 (mM)
RS
HMWP

图 8G

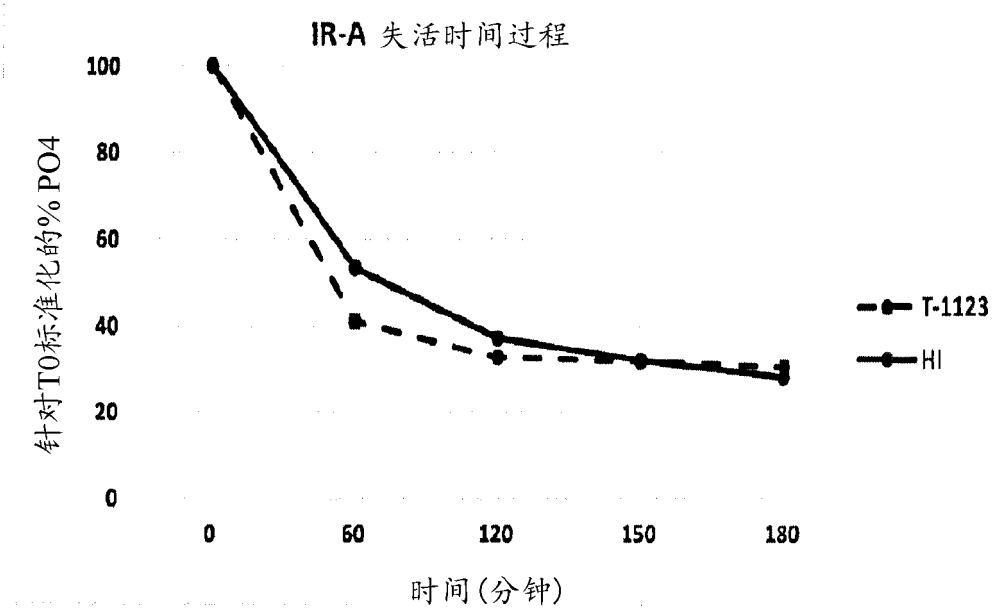

IR-A 失活时间过程
针对T0标准化的% PO4
100
80
60
40
20
0
0
60
120
150
180
时间(分钟)
T-1123
HI

图 9A

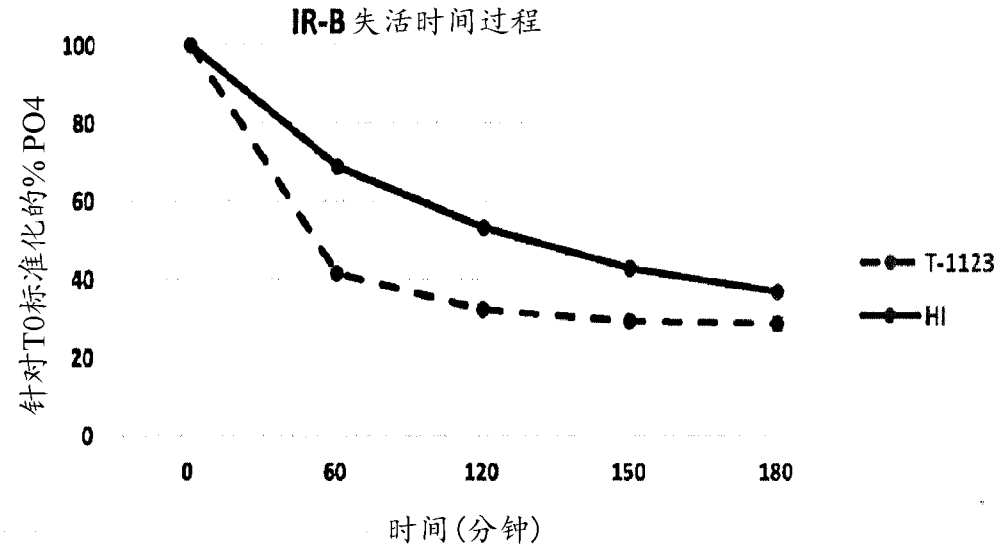

IR-B 失活时间过程
针对T0标准化的% PO4
100
80
60
40
20
0
0
60
120
150
180
时间(分钟)
T-1123
HI

图 9B

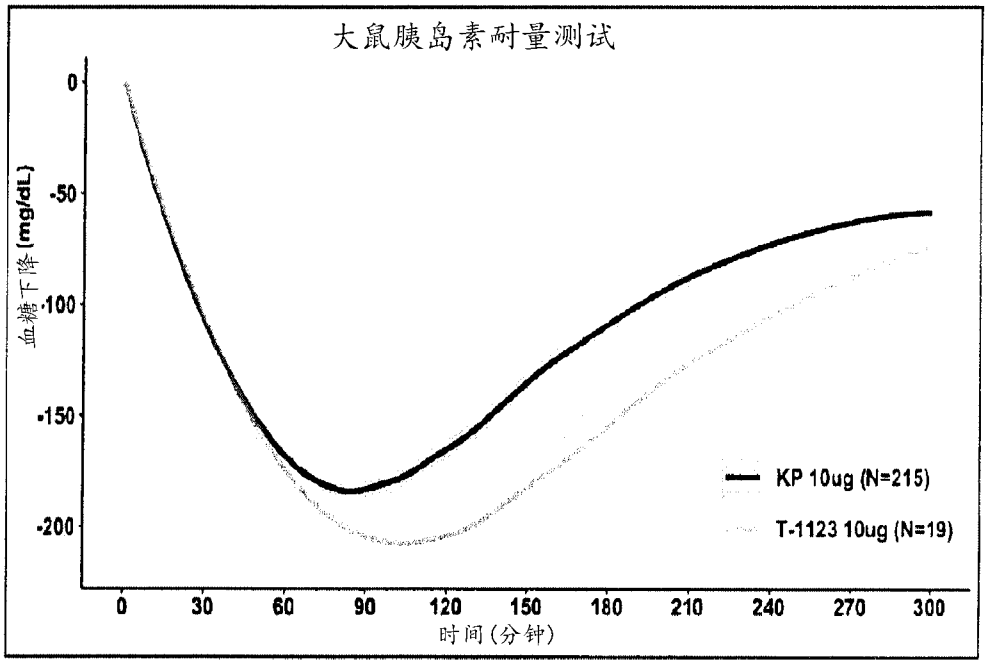

大鼠胰岛素耐量测试
血糖下降(mg/dL)
0
-50
-100
-150
-200
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
时间(分钟)
KP 10ug (N=215)
T-1123 10ug (N=19)

图 10A

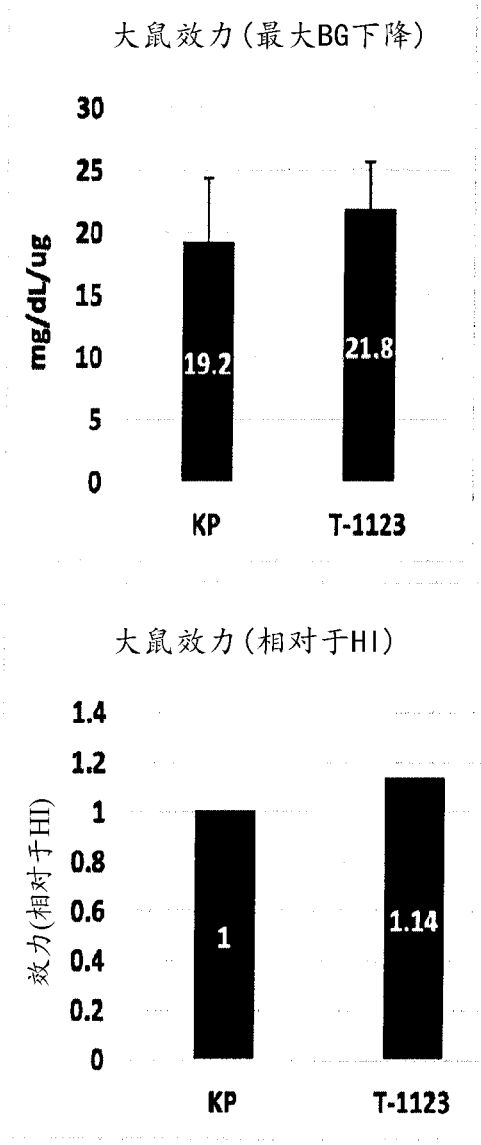

大鼠效力(最大BG下降)
mg/dL/ug
30
25
20
15
10
5
0
19.2
21.8
KP
T-1123
大鼠效力(相对于HI)
效力(相对于HI)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
1.14
KP
T-1123

图 10B

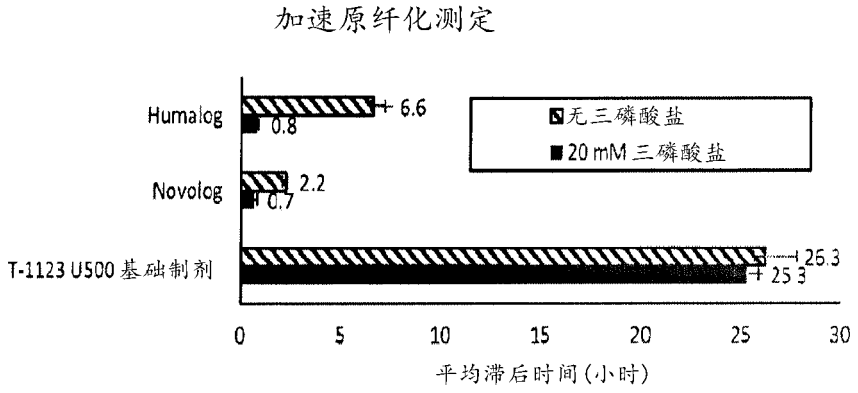

加速原纤化测定
Humalog
Novolog
T-1123 U500 基础制剂
6.6
0.8
2.2
0.7
26.3
25.3
无三磷酸盐
20 mM 三磷酸盐
0
5
10
15
20
25
30
平均滞后时间(小时)

图 11A

加速原纤化测定

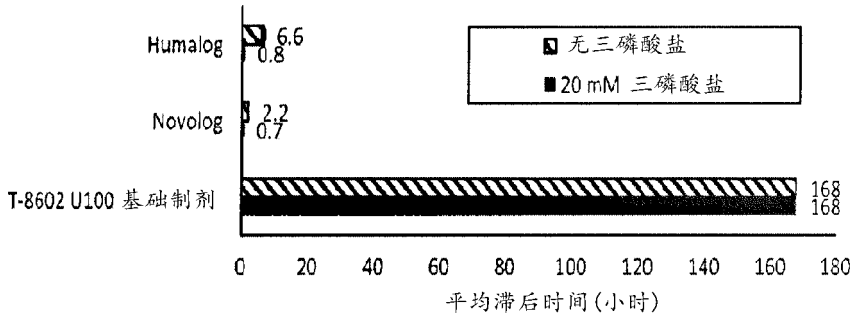


图 11B

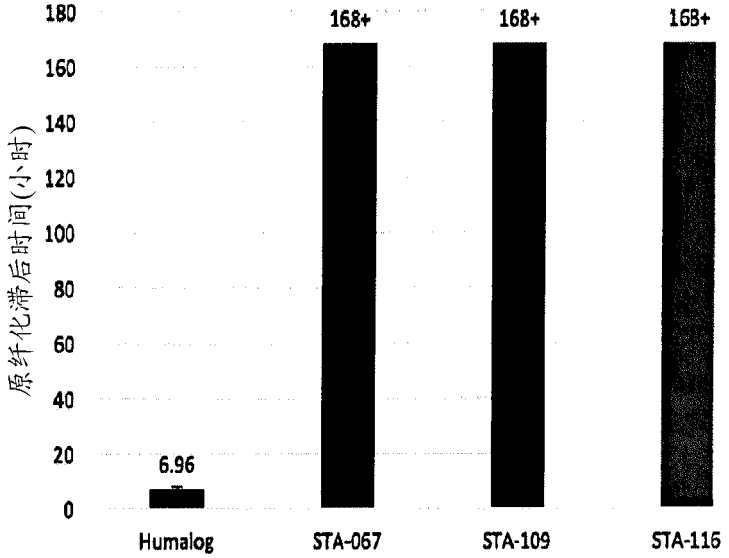


图 11C

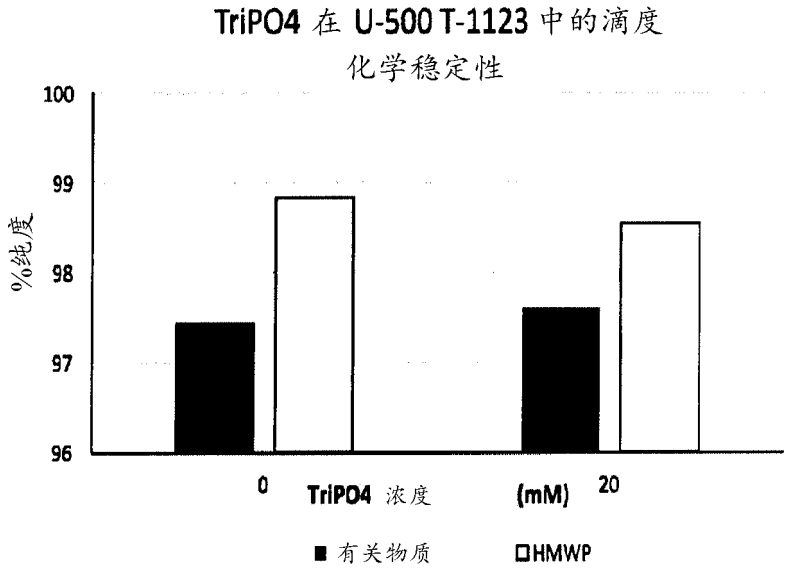

TriPO4 在 U-500 T-1123 中的滴度
化学稳定性
100
99
98
97
96
%纯度
0
TriPO4 浓度
(mM)
20
■ 有关物质
□HMWP

图 12