

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580038571.3

[51] Int. Cl.

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月17日

[11] 公开号 CN 101056650A

[22] 申请日 2005.11.14

[21] 申请号 200580038571.3

[30] 优先权

[32] 2004.11.12 [33] DK [31] PA200401753

[32] 2004.12.8 [33] DK [31] PA200401906

[32] 2005.5.13 [33] EP [31] 05104050.9

[32] 2005.5.18 [33] EP [31] 05104172.1

[32] 2005.11.11 [33] EP [31] PCT/EP2005/055916

[86] 国际申请 PCT/EP2005/055946 2005.11.14

[87] 国际公布 WO2006/051110 英 2006.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.11

[71] 申请人 诺和诺德公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 S·路德维希森 M·施莱因

T·E·G·博芬 C·邦德

A-M·利莱奥雷

D·K·恩格伦德 B·R·尼尔森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李华英

权利要求书 8 页 说明书 33 页 附图 20 页

[54] 发明名称

促胰岛素肽的稳定制剂

[57] 摘要

包含促胰岛素肽的稳定的药物组合物。

1. 包含促胰岛素肽、药学可接受防腐剂、约 10mg/L 至约 400mg/L 浓度的泊洛沙姆或聚山梨醇酯 20 表面活性剂以及选择性的药学可接受张力调节剂的储存-稳定的药物组合物，其中所述组合物具有约 7.0 至约 8.5 范围的 pH。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其中表面活性剂的浓度为约 20mg/L 至约 300mg/L。

3. 权利要求 1-2 任何一项的药物组合物，其中表面活性剂的浓度为约 50mg/L 至约 200mg/L。

4. 权利要求 1-3 任何一项的药物组合物，其中表面活性剂为泊洛沙姆 188。

5. 权利要求 1-3 任何一项的药物组合物，其中表面活性剂选自泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 124、泊洛沙姆 181、泊洛沙姆 182、泊洛沙姆 237、泊洛沙姆 331 和泊洛沙姆 338。

6. 权利要求 1-3 任何一项的药物组合物，其中表面活性剂为聚山梨醇酯 20。

7. 组合物，其包含促胰岛素肽和烷基-多聚葡糖苷，以及选择性的药学可接受张力调节剂。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述组合物具有约 7.0 至约 8.5 的 pH。

9. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约

10mg/L 的浓度存在。

10. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 1000mg/L 的浓度存在。

11. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 10mg/L 至约 15000mg/L 的浓度存在。

12. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 1000mg/L 至约 10000mg/L 的浓度存在。

13. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 2000mg/L 至约 5000mg/L 的浓度存在。

14. 权利要求 7-8 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷为 C₆₋₁₈-烷基-多聚葡糖苷。

15. 权利要求 7-14 任何一项的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷选自十二烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷、十二烷基 β-D-麦芽糖苷、十四烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷、癸基 β-D-麦芽糖苷、十二烷基 β-D-麦芽糖苷、十四烷基 β-D-麦芽糖苷、十六基 β-D-麦芽糖苷、癸基 β-D-麦芽三糖苷、十二烷基 β-D-麦芽三糖苷、十四烷基 β-D-麦芽三糖苷、十六基 β-D-麦芽三糖苷、n-十二烷基-蔗糖、n-癸基-蔗糖。

16. 权利要求 1-15 任何一项的药物组合物，其包含两种不同的表面活性剂。

17. 权利要求 16 的药物组合物，其中至少一种表面活性剂为非离子型表面活性剂。

18. 权利要求 16 的药物组合物, 其中两种不同的表面活性剂均为非离子型表面活性剂。

19. 权利要求 16-18 任何一项的药物组合物, 其中所有表面活性剂为非离子型表面活性剂。

20. 权利要求 16-19 任何一项的药物组合物, 其包含泊洛沙姆 188 和聚山梨醇酯 20。

21. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中 pH 为约 7.7 至约 8.2 的范围。

22. 权利要求 1-21 任何一项的药物组合物, 其包含磷酸盐缓冲液。

23. 权利要求 1-21 任何一项的药物组合物, 其包含两性离子缓冲液。

24. 权利要求 23 的药物组合物, 其中缓冲液选自甘氨酸-甘氨酸、TRIS、N-二(羟乙基)甘氨酸、HEPES、MOBS、MOPS、TES 和其混合物。

25. 权利要求 1-24 任何一项的药物组合物, 其中张力调节剂选自甘油、丙二醇和甘露糖醇。

26. 权利要求 1-25 任何一项的药物组合物, 其中防腐剂选自苯酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯丁醇、硫柳汞和其混合物。

27. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中所述促胰岛素肽为 DPP-IV 保护的肽。

28. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中所述促胰岛素肽包含亲脂取代基, 其选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n 为 4 至 38, 以及 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, 其中 m 为 4 至 38。

29. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中所述促胰岛素肽为酰化的 GLP-1 或酰化的 GLP-1 类似物。

30. 权利要求 29 的药物组合物, 其中所述 GLP-1 类似物选自 $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Gly}^8\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Gly}^8\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Aib}^8\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Aib}^8\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Asp}^{22}\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{Asp}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Lys}^{22}\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{Lys}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Arg}^{22}\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{Arg}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{His}^{22}\text{-GLP-1 (7-36)-酰胺}$ 、 $\text{Val}^8\text{His}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Trp}^{19}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Tyr}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Leu}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Tyr}^{18}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{His}^{37}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1 (7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{-GLP-1 (7-37)}$, 和其类似物。

31. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中所述促胰岛素肽为 Arg^{34} , $\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon-(\gamma\text{-Glu}(\text{N}^\alpha\text{-十二烷酰基})))-\text{GLP-1 (7-37)}$ 。

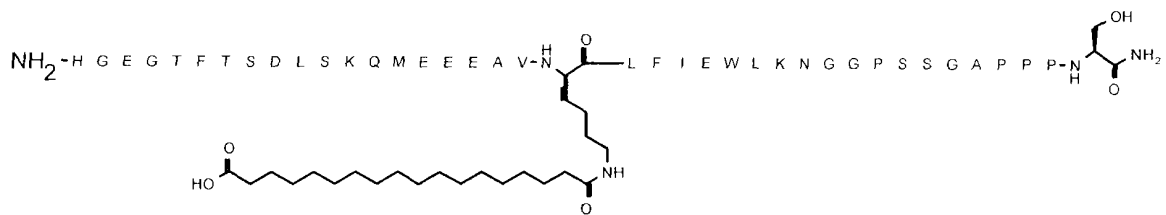
32. 前述权利要求任何一项的药物组合物, 其中所述促胰岛素肽的

浓度为约 0.1mg/ml 至约 25mg/ml、约 1mg/ml 至约 25mg/ml、约 2mg/ml 至约 15mg/ml、约 3mg/ml 约 10mg/ml 或约 5mg/ml 至约 8mg/ml。

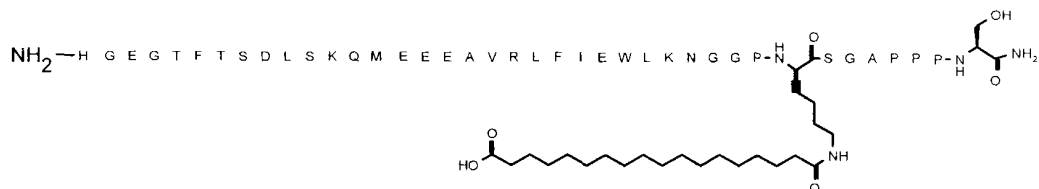
33. 权利要求 1-26 任何一项的药物组合物，其中所述促胰岛素肽为 exendin-4 或 ZP-10，即 HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGA PPSKKKKKK-NH₂。

34. 权利要求 1-28 任何一项的药物组合物，其中所述促胰岛素肽为酰化的 exendin-4 或酰化的 exendin-4 类似物。

35. 权利要求 34 的药物组合物，其中所述促胰岛素肽为 [N-ε (17-羧基十七烷酸) 20 exendin-4 (1-39) -酰胺



或 N-ε 32- (17-羧基-十七烷酰基) [Lys32] exendin-4 (1-39) 酰胺



36. 权利要求 33-35 任何一项的药物组合物，其中药物组合物中所述促胰岛素肽的浓度为约 5 μg/mL 至约 10mg/mL、约 5 μg/mL 至约 5mg/mL、约 5 μg/mL 至约 5mg/mL、约 0.1mg/mL 至约 3mg/mL 或约 0.2mg/mL 至约 1mg/mL。

37. 制备权利要求 1-36 任何一项的药物组合物的方法，其包括将所述促胰岛素肽溶解并且混合防腐剂和张力调节剂。

38. 治疗高血糖症的方法，包括将有效量的权利要求 1-36 任何一项的药物组合物肠胃外给药至需要所述治疗的哺乳动物。

39. 治疗肥胖、 β -细胞缺陷、IGT 或血脂障碍的方法，包括将有效量的权利要求 1-36 任何一项的药物组合物肠胃外给药至需要所述治疗的哺乳动物。

40. 制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，其包括加热所述 GLP-1 化合物的溶液。

41. 权利要求 40 的方法，其中温度在 50°C 和 95°C 之间。

42. 权利要求 40 的方法，其中温度在 60°C 和 95°C 之间。

43. 权利要求 40 的方法，其中温度在 50°C 和 80°C 之间。

44. 权利要求 40 的方法，其中温度在 70°C 和 80°C 之间。

45. 权利要求 40 的方法，其中温度在 60°C 和 80°C 之间。

46. 权利要求 40-45 任何一项的方法，其中 pH 在约 8.0 至 10.5 之间。

47. 权利要求 40-45 任何一项的方法，其中 pH 在约 8.0 至 10.0 之间。

48. 权利要求 40-45 任何一项的方法，其中 pH 在约 7.5 至 8.5 之间。

49. 权利要求 40-45 任何一项的方法，其中 pH 为约 7.7。

50. 权利要求 40-45 任何一项的方法，其中 pH 为约 8.15。

51. 权利要求 40-50 任何一项的方法，其中加热持续 3 分钟至 180 分钟。

52. 权利要求 40-50 任何一项的方法，其中加热持续 15 分钟至 120 分钟。

53. 权利要求 40-50 任何一项的方法，其中加热持续 10 分钟至 90 分钟。

54. 权利要求 40-50 任何一项的方法，其中加热持续 3 分钟至 30 分钟。

55. 权利要求 40-50 任何一项的方法，其中加热持续 5 分钟至 15 分钟。

56. 制备稳定的 GLP-1 化合物的方法，其包括通过权利要求 40-55 任何一项的方法产生大量的肽产品，随后将所述胰高血糖素 - 样肽的溶液或悬浮液冷冻干燥。

57. 制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，其包括从权利要求 56 的冻干产品制备药物组合物，随后进行权利要求 40-55 任何一项的一种或多种方法。

58. 权利要求 57 的方法，其在装入最终的输送系统之前或装入最终的输送系统之后或两种情况下进行。

59. 制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，其包括权利要求 40-58 任何一项的方法，随后加入另外的药学可接受赋形剂。

60. 权利要求 40-59 任何一项的方法，其中所述 GLP-1 化合物为 Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε- (γ-Glu (N^α-十六酰烷基))) -GLP-1 (7-37)。

61. 可通过权利要求 40-60 的方法获得的 GLP-1 化合物的稳定溶液。

62. 权利要求 61 的 GLP-1 化合物的稳定溶液用于制备储存-稳定的药物组合物的用途。

63. 通过权利要求 40-60 的方法可获得的 GLP-1 化合物的储存-稳定的药物组合物。

促胰岛素肽的稳定制剂

技术领域

本发明涉及药物制剂领域。更具体地说，本发明涉及包含促胰岛素肽的储存稳定（shelf-stable）的药物制剂。

背景技术

治疗性肽广泛用于医学实践中。这样的治疗性肽的药物组合物要求具有数年的储存期限以适于常见的用途。然而，肽组合物由于对化学和物理降解的敏感性而具有内在的不稳定性。化学降解包括共价键的变化，如氧化、水解、消旋化或交联作用。物理降解包括相对于肽天然结构的构象变化，其可引起聚集、沉淀或吸附至表面。

胰高血糖素已经用于糖尿病医学实践中数十年，并且正在开发数个胰高血糖素-样肽用于各种治疗指征。前胰高血糖素原基因编码胰高血糖素以及胰高血糖素-样肽 1（GLP-1）和胰高血糖素-样肽 2（GLP-2）。GLP-1 类似物和衍生物以及同源的蜥蜴肽 exendin-4，正被开发用于 2 型糖尿病中的高血糖症治疗。GLP-2 在胃肠疾病的治疗中可能有效。然而，包括 29-39 个氨基酸的所有这些肽具有高度同源性并且其共有许多特性，值得注意的是其聚集的趋向和不溶性原纤维的形成。该特性似乎包括从主要的 α -螺旋构象至 β -折叠的转变（Blundell T. L. (1983) The conformation of glucagon. In: Lefébvre P. J. (Ed) Glucagon I. Springer Verlag, pp 37-55, Senderoff R. I. 等., J. Pharm. Sci. 87 (1998) 183-189, W001/55213)。胰高血糖素-样肽的聚集主要在搅拌或振荡肽溶液时、在溶液和气相（空气）的

接触面之间以及在与疏水表面（如 Teflon®）接触时看到。

W001/77141 公开了 Arg³⁴-GLP-1 (7-37) 在高温加热处理少于 30 秒。W004/55213 公开了 Arg³⁴-GLP-1 (7-37) 在 pH9.5 的微量过滤。W001/55213 公开了 Val⁸-GLP-1(7-37)在室温下 pH12.3 处理 10 分钟。W003/35099 公开了在碱性 pH 时 GLP-1 锌晶体的制备。

因此，不同的处理和赋形剂的添加常常应用于胰高血糖素 - 样肽药物组合物以改善其稳定性。这些肽的液态肠胃外制剂的储存期限必须至少为一年，优选更长。其中该产物可能日常在室温运输和振荡的使用期间优选应为数周。因此，存在对具有改善稳定性的胰高血糖素 - 样肽药物组合物的需求。

附图说明

图 1. 两种样品均包含 1.2mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、10mM NaCl 的制剂，pH7.7。在一种样品中加泊洛沙姆-188 至终浓度 200ppm。

图 2. 所有样品包含 1.67mM Liraglutide、58mM 苯酚、14mg/ml 丙二醇、8mM 磷酸钠，pH7.7。将泊洛沙姆 188 加至两种样品。

图 3. 两种样品均包含 1.2mM Liraglutide、40mM 苯酚、14mg/ml 丙二醇、10mM NaCl，pH7.7。将聚山梨醇酯 20 加至一种样品。

图 4. 无表面活性剂(F1)和有表面活性剂(F2和F3)的 liraglutide 组合物的旋转试验期间 NTU 随时间的测量。

图 5. 无表面活性剂(F1)和有表面活性剂(F2)的 liraglutide 组合物的旋转试验期间 ThT 荧光随时间的测量。较低的曲线为 F2 的插图。

图 6. 原纤维形成的时间过程。

图 7. 通过在 60°C 加热处理制备的 liraglutide 的物理稳定性。

图 8. liraglutide 在 60℃加热处理后的纯度。

图 9. 通过在 80℃加热处理制备的 liraglutide 的物理稳定性。

图 10. liraglutide 在 80℃加热处理后的纯度。

图 11. 通过在 22、40、60 和 80℃的 15 min 加热处理制备的 liraglutide 的物理稳定性。

图 12. 通过在 pH10 时 50 和 80℃加热处理制备的 liraglutide 的物理稳定性。

图 13. liraglutide 在 pH10 时在 50 和 80℃加热处理后的纯度。

图 14. 通过在 pH9 和 10 时在 60 和 80℃加热处理制备的 liraglutide 的物理稳定性。

图 15. 该图显示 5 种不同的制剂。4 种不同的制剂在磷酸盐或 tricine (两性离子缓冲剂) 缓冲液中包含不同量的 Solutol HS-15。一种制剂 (参考制剂) 为无表面活性剂的磷酸盐缓冲液中的 liraglutide。

图 16. 该图显示 5 种不同的制剂。4 种不同的制剂在磷酸盐或 tricine 缓冲液中包含不同量的 Pluronic F-127。一种制剂 (参考制剂) 为无表面活性剂的磷酸盐缓冲液中的 liraglutide。

图 17. liraglutide 在 50-70℃加热处理 60-120 分钟后的物理稳定性。

图 18. 以不同时间和温度加热处理的 Penfill®，其随后经旋转。

图 19. 包含不同赋形剂的制剂的稳定性。

图 20. 包含不同赋形剂的制剂的 Penfill®旋转试验。

发明内容

以下为说明书中所用术语的详细定义。此处所用的术语“有效量”指与未治疗的相比足以使得患者的治疗有效的剂量。

此处所用的术语“药物”指适于将药学活性化合物施于患者的药物组合物。

此处所用的术语“药物组合物”指包含活性化合物或其盐以及药物赋形剂如 (缓冲液、防腐剂和张力调节剂) 的产品，通过将所述药

物组合物施于人，所述药物组合物可用于治疗、预防或降低疾病或病症的严重程度。因此药物组合物也已知在本领域中作为药物制剂。可理解的是重制的药物组合物的 pH 为在室温下对通过在规定的重制液体中重制而产生的重制组合物进行测量的 pH 值。

此处所用的术语“储存-稳定的药物组合物”指其至少在与治疗性蛋白质有关的管理机构所要求的期间稳定的药物组合物。优选，储存-稳定的药物组合物在 5℃ 稳定至少一年。稳定性包括化学稳定性以及物理稳定性。

此处所用的术语“稳定溶液”指在如上所述储存-稳定的药物组合物制备中用作中间体的化合物制品。

此处所用的术语“药学可接受的”指适于正常的药物应用，即在患者中不产生有害事件等等。

此处所用的术语“缓冲液”指药物组合物中的化合物，其降低组合物的 pH 随时间而改变的趋势，否则将由于化学反应而发生 pH 改变。缓冲液包括化学试剂如磷酸钠、TRIS、甘氨酸和柠檬酸钠。

此处所用的术语“防腐剂”指加至药物组合物以预防或延缓微生物活性（生长和代谢）的化合物。药学可接受防腐剂的实例为苯酚、间甲酚以及苯酚和间甲酚的混合物。

所用的术语“等渗剂”指在药物组合物中用来改变药物组合物的渗透压以使渗透压接近人血浆的渗透压的化合物。等渗剂包括 NaCl、甘油、甘露糖醇等等。

此处所用的术语“稳定剂”指加至包含肽的药物组合物中以稳定肽的化学试剂，即提高所述组合物的储存期限和/或使用时间。用于药物制剂中的稳定剂的实例为 L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、聚乙二醇和羧甲基纤维素。

此处所用的术语“表面活性剂”指由水溶性（亲水的）部分、头部和脂溶性（亲脂性的）片段组成的任何分子或离子。表面活性剂优选在界面积蓄，其亲水部分朝向水（亲水相）并且亲脂性部分朝向油或疏水相（即玻璃、空气、油等等）。表面活性剂开始形成胶束的浓

度称为临界胶束浓度或 CMC。此外，表面活性剂降低液体的表面张力。表面活性剂亦称两亲化合物。术语“去污剂”为常用的表面活性剂的同义词。

阴离子表面活性剂可选自：鹅去氧胆酸、鹅去氧胆酸钠盐、胆(汁)酸、脱氢胆酸、去氧胆酸、去氧胆酸甲酯、毛地黄皂苷、毛地黄毒苷配基、N, N-十二烷基二甲基叔胺 N-氧化物、琥珀辛酯钠、甘鹅去氧胆酸钠、甘氨胆酸水合物、甘氨去氧胆酸一水合物、甘氨去氧胆酸钠盐、甘氨去氧胆酸钠盐、甘石胆酸 3-硫酸二钠盐、甘石胆酸 (Glycolithocholic acid) 乙酯、N-月桂酰基肌氨酸钠盐、N-月桂酰基肌氨酸、十二烷基硫酸锂盐、路戈酸、1-辛磺酸钠盐、1-辛磺酸钠盐、1-丁磺酸钠盐、1-癸磺酸钠盐、1-十四磺酸钠盐、1-庚磺酸钠盐、1-庚磺酸钠盐、1-壬磺酸钠盐、1-丙磺酸一水合物、2-溴乙磺酸钠盐、胆酸钠水合物、牛或绵羊胆汁、胆酸钠水合物、络胆酸钠盐、去氧胆酸钠盐、十二烷基磺酸钠、牛磺去氧胆酸钠盐一水合物、牛磺石胆酸 3-硫酸二钠盐、牛磺熊去氧胆酸钠盐、氨基丁三醇[®]十二烷基硫酸盐、DSS (琥珀辛酯钠、CAS 登记号 no [577-11-7])、琥珀辛酯钙、CAS 登记号 no [128-49-4])、琥珀辛酯钾、CAS 登记号 [7491-09-0])、SDS (十二烷基磺酸钠或十二烷基硫酸钠)、十二烷基胆碱磷酸 (FOS-胆碱-12)、癸烷基胆碱磷酸 (FOS-胆碱-10)、壬基胆碱磷酸 (FOS-胆碱-9)、二棕榈酰基磷脂酸、辛酸钠和/或熊去氧胆酸。

阳离子表面活性剂可选自：溴化烷基三甲基铵、氯化苯甲烃铵、氯化苯甲烃铵、氯化苯甲基二甲基十六烷基铵、氯化苯甲基二甲基十四烷基铵、四氯碘酸苯甲基三甲基铵、溴化二甲基二十八烷基铵、溴化十二烷基乙基二甲基铵、溴化十二烷基三甲基铵、溴化十二烷基三甲基铵、溴化乙基十六烷基二甲基铵、溴化十六烷基三甲基铵、溴化十六烷基三甲基铵、聚氧乙烯(10)-N-牛脂-1, 3-二氨基丙烷、溴苄嘧啶胺和/或三甲基(十四烷基)溴化铵。非离子型表面活性剂可选自：BigCHAP、双(聚乙二醇双[咪唑基羰基])、嵌段共聚物如聚乙烯氧化物/聚丙烯氧化物嵌段共聚物如泊洛沙姆、泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆

407、Brij[®]35、Brij[®]56、Brij[®]72、Brij[®]76、Brij[®]92V、Brij[®]97、Brij[®]58P、Cremophor[®]EL、癸乙烯乙二醇单十二烷基醚、N-癸酰基-N-甲葡糖胺、n-十二烷基-N-甲葡糖酰胺、烷基-多聚葡糖苷、乙氧基化蓖麻油、十七烷乙烯乙二醇单癸基醚、十七烷乙烯乙二醇单十二烷基醚、十七烷乙烯乙二醇单十四烷基醚、六乙烯乙二醇单十二烷基醚、六乙烯乙二醇单十六烷基醚、六乙烯乙二醇单十八烷基醚、六乙烯乙二醇单十四烷基醚、Igepal CA-630、Igepal CA-630、甲基-6-0-(N-庚基氨基甲酰基)-β-D-吡喃葡糖苷、壬乙烯乙二醇单十二烷基醚、N-壬酰-N-甲葡糖胺、N-壬酰-N-甲葡糖胺、辛乙烯乙二醇单癸基醚、辛乙烯乙二醇单十二烷基醚、辛乙烯乙二醇单十六烷基醚、辛乙烯乙二醇单十八烷基醚、辛乙烯乙二醇单十四烷基醚、辛基-β-D-吡喃葡糖苷、五乙烯乙二醇单癸基醚、五乙烯乙二醇单十二烷基醚、五乙烯乙二醇单十六烷基醚、五乙烯乙二醇单己基醚、五乙烯乙二醇单十八烷基醚、五乙烯乙二醇单辛基醚、聚乙二醇二环氧甘油醚、聚乙二醇醚 W-1、聚氧乙烯 10 十三烷基醚、聚氧乙烯 100 硬脂酸盐、聚氧乙烯 20 异十六烷基醚、聚氧乙烯 20 油烯基醚、聚氧乙烯 40 硬脂酸盐、聚氧乙烯 50 硬脂酸盐、聚氧乙烯 8 硬脂酸盐、聚氧乙烯双(咪唑基羰基)、聚氧乙烯 25 丙二醇硬脂酸盐、来自皂树树皮的皂苷、Span[®]20、Span[®]40、Span[®]60、Span[®]65、Span[®]80、Span[®]85、Tergitol, 15-S-12 型、Tergitol, 15-S-30 型、Tergitol, 15-S-5 型、Tergitol, 15-S-7 型、Tergitol, 15-S-9 型、Tergitol, NP-10 型、Tergitol, NP-4 型、Tergitol, NP-40 型、Tergitol, NP-7 型、Tergitol, NP-9 型、十四烷基-β-D-麦芽糖苷、四甘醇单癸基醚、四甘醇单十二烷基醚、四甘醇单十四烷基醚、三甘醇单癸基醚、三甘醇单十二烷基醚、三甘醇单十六烷基醚、三甘醇单辛基醚、三甘醇单十四烷基醚、Triton CF-21、Triton CF-32、Triton DF-12、Triton DF-16、Triton GR-5M、Triton QS-15、Triton QS-44、Triton X-100、Triton X-102、Triton X-15、Triton X-151、Triton X-200、Triton X-207、Triton[®]X-100、Triton[®]X-114、Triton[®]X-165 溶液、Triton[®]X-305

溶液、Triton®X-405、Triton®X-45、Triton®X-705-70、TWEEN®20、TWEEN®40、TWEEN®60、TWEEN®6、TWEEN®65、TWEEN®80、TWEEN®81、TWEEN®85、泰洛沙泊、鞘磷脂（神经鞘磷脂）和鞘糖脂（神经酰胺、神经节苷脂）、磷脂和/或 n-十一基 β-D-吡喃葡萄糖苷。

两性离子表面活性剂可选自：CHAPS、CHAPSO、3-(癸基二甲基铵)丙基磺酸酯内盐、3-(十二烷基二甲基铵)丙基磺酸酯内盐、3-(十二烷基二甲基铵)丙基磺酸酯内盐、3-(N,N-二甲基十四烷基铵)丙基磺酸酯、3-(N,N-二甲基十八烷基铵)丙基磺酸酯、3-(N,N-二甲基辛基铵)丙基磺酸酯内盐、3-(N,N-二甲基十六烷基铵)丙基磺酸酯、N-烷基-N,N-二甲基铵-1-丙基磺酸酯、3-胆酰胺-1-丙基二甲基铵-1-丙烷磺酸盐、十二烷基胆碱磷酸、十四酰溶血磷脂酰胆碱、Zwittergent 3-12 (N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙基磺酸酯)、Zwittergent 3-10 (3-(癸基二甲基铵)丙烷磺酸盐内盐)、Zwittergent 3-08 (3-(辛基二甲基铵)丙烷磺酸盐)、甘油磷脂（卵磷脂、脑磷脂、磷脂酰丝氨酸）、甘油糖脂（吡喃乳糖苷）、溶血磷脂酰和卵磷脂的烷基、烷氧基（烷酯）、烷氧基（烷基醚）-衍生物，例如溶血磷脂酰胆碱、二十六烷酰磷脂酰胆碱的十二酰和十四酰衍生物和极性头基团，其为胆碱、乙醇胺、磷脂酸、丝氨酸、苏氨酸、甘油、肌醇、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸、酰肉碱及其衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^β-酰化的衍生物或赖氨酸或精氨酸的侧-链酰化的衍生物、包含赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸任何组合的二肽的 N^β-酰化的衍生物、包含中性氨基酸和两种带电氨基酸任何组合的三肽的 N^β-酰化的衍生物，或者表面活性剂可选自咪唑啉衍生物、C₆-C₁₂ 的长-链脂肪酸和其盐（例如，油酸和辛酸）、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙烷磺酸盐、阴离子（烷基-芳基-磺酸盐）单价表面活性剂、棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸、溶血磷脂（例如，乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的 1-酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯）或其混合物。

此处所用的术语“烷基多聚葡萄糖苷”涉及直链或分支的 C₅₋₂₀-烷基、

-烯基或-炔基链，其由一种或多种糖苷体如麦芽糖苷、糖类等取代。这些烷基-多聚葡糖苷的实施方案包括 C₆₋₁₈-烷基-多聚葡糖苷。这些烷基-多聚葡糖苷的具体实施方案包括偶数碳-链如 C₆、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₄、C₁₆、C₁₈ 和 C₂₀ 的烷基链。糖苷体的具体实施方案包括吡喃糖苷、吡喃葡糖苷、麦芽糖苷、麦芽三糖苷和蔗糖。本发明的实施方案中少于 6 个糖苷体附着于烷基。本发明的实施方案中少于 5 个糖苷体附着于烷基。本发明的实施方案中少于 4 个糖苷体附着于烷基。本发明的实施方案中少于 3 个糖苷体附着于烷基。本发明的实施方案中少于 2 个糖苷体附着于烷基。烷基-多聚葡糖苷的具体实施方案为烷基糖苷如 n-癸基 β-D-吡喃葡糖苷、癸基 β-D-吡喃麦芽糖、十二烷基 β-D-吡喃葡糖苷、n-十二烷基 β-D-麦芽糖苷、n-十二烷基 β-D-麦芽糖苷、n-十二烷基 β-D-麦芽糖苷、十四烷基 β-D-吡喃葡糖苷、癸基 β-D-麦芽糖苷、十六烷基 β-D-麦芽糖苷、癸基 β-D-麦芽三糖苷、十二烷基 β-D-麦芽三糖苷、十四烷基 β-D-麦芽三糖苷、十六烷基 β-D-麦芽三糖苷、n-十二烷基-蔗糖、n-癸基-蔗糖、单癸酸蔗糖、单月桂酸蔗糖、单十四酸蔗糖和单棕榈酸蔗糖。

此处所用的术语“疾病的治疗”指对疾病、病情或病症发展的患者的控制和护理。治疗的目的是对抗疾病、病情或病症的发展。治疗包括施与活性化合物以消除或控制疾病、病情或病症以及减轻与疾病、病情或病症有关的症状或并发症，以及对疾病、病情或病症的预防。

此处所用的术语“疾病的预防”定义为对在疾病的临床发作之前处于发展疾病的风险中的个体的控制和护理。预防的目的是对抗疾病、病情或病症的发展，并且包括施与活性化合物以预防或延缓症状或并发症的发作以及预防或延缓相关疾病、病情或病症的发展。

此处所用涉及肽的术语“类似物”指经修饰的肽，其中该肽的一个或多个氨基酸残基已经被其他的氨基酸残基取代和/或其中该肽已缺失一个或多个氨基酸残基和/或其中该肽已缺失一个或多个氨基酸残基和/或其中该肽已添加一个或多个氨基酸残基。所述氨基酸残基的添加或缺失可在肽的 N-末端和/或肽的 C-末端进行。在一个实施方案

中类似物包括相对于天然的肽少于 6 个修饰（取代、缺失、添加）。在另一实施方案中类似物包括相对于天然的肽少于 5 个修饰（取代、缺失、添加）。在另一实施方案中类似物包括相对于天然的肽少于 4 个修饰（取代、缺失、添加）。在另一实施方案中类似物包括相对于天然的肽少于 3 个修饰（取代、缺失、添加）。在另一实施方案中类似物包括相对于天然的肽少于 2 个修饰（取代、缺失、添加）。在另一实施方案中类似物包括相对于天然的肽仅有单个修饰（取代、缺失、添加）。

此处所用涉及亲本肽的术语“衍生物”指化学修饰的亲本蛋白质或其类似物，其中亲本蛋白质或其类似物中存在至少一个取代基，即亲本蛋白质已经被共价修饰的。典型的变体为酰胺、糖类、烷基、酰基、酯、聚乙二醇化等等。

此处所用的术语“GLP-1 化合物”指 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO.1)、其促胰岛素类似物和其促胰岛素衍生物。GLP-1 类似物非-限制性的实例为 GLP-1(7-36)酰胺、Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Gly⁸-GLP-1(7-37)、Val⁸-GLP-1(7-36)-酰胺和 Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37)。GLP-1 衍生物非-限制性的实例为脱氨基-His⁷、Arg²⁶、Lys³⁴(N^ε-(γ-Glu(N^α-十六烷酰基))) -GLP-1(7-37)、脱氨基-His⁷、Arg²⁶、Lys³⁴(N^ε-辛酰基)-GLP-1(7-37)、Arg^{26, 34}、Lys³⁸(N^ε-(ω-羧基十五烷酰基))-GLP-1(7-38)、Arg^{26, 34}、Lys³⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-十六烷酰基))) -GLP-1(7-36)和 Arg³⁴、Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-十六烷酰基))) -GLP-1(7-37)。

此处所用的术语“二肽基氨肽酶 IV 保护的”指化合物(例如 GLP-1 类似物)，其对二肽基氨肽酶 IV(DPP-IV)比天然化合物(例如 GLP-1(7-37))更耐受。GLP-1 化合物对二肽基氨肽酶 IV 的降解的抗性通过下列降解分析测定：

将 GLP-1 化合物的等分试样(5nmol)在 37°C 与对应于 5 mU 酶活性的 1 μl 纯化的二肽基氨肽酶 IV 在 pH 7.4 的 100 μl 的 0.1M 三乙胺-HCl 缓冲液中温育 10-180 分钟。通过添加 5 μl 的 10% 三氟乙酸终止酶促反应，

并且利用HPLC分析分离和定量肽降解产物。进行该分析的一种方法为：根据 Siegel 等，Regul. Pept. 1999；79：93-102 和 Mentlein 等 Eur. J. Biochem. 1993；214：829-35，将混合物加至Vydac C18 widepore（30 nm孔，5 μ M颗粒）250 x4.6mm柱上并且以1ml/min的流速用0.1%三氟乙酸中线性分级梯度的乙腈洗脱（0%乙腈3min、0-24%乙腈17 min、24-48%乙腈1min）。肽和其降解产物可通过其在220 nm（肽键）或280 nm（芳香族氨基酸）的吸光度监测，并且通过其与标准品的那些相关的峰面积的积分而定量。在产生少于10%水解的GLP-1化合物的温育期间评估GLP-1化合物通过二肽基氨肽酶IV的水解率。

此处所用涉及肽或化合物的术语“促胰岛素的”指响应提高的血浆葡萄糖水平而刺激胰岛素分泌的能力。促胰岛素肽和化合物为GLP-1 受体的激动剂。化合物的促胰岛素性质可通过本领域已知的体外或体内分析测定。下列体外分析可用于测定化合物（如肽）的促胰岛素性质。优选促胰岛素化合物在以下分析中呈现少于 5 nM 的 EC_{50} 值，更优选少于 500 pM 的 EC_{50} 值。

表达克隆的人 GLP-1 受体的婴儿仓鼠肾(BHK)细胞(BHK 467-12A)在添加 100IU/mL 青霉素、100 μ L/mL 链霉素、10%胎牛血清和 1mg/ml 遗传霉素 G-418 (Life Technologies) 的 DMEM 培养基中培养。通过在缓冲液（10mM Tris-HCl, 30mM NaCl 和 1mM 二硫苏糖醇, pH7.4, 此外包含 5mg/ml 亮肽素 (Sigma)、5mg/L 抑胃肽 (Sigma)、100mg/L 杆菌肽 (Sigma) 和 16mg/L 抑肽酶 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)）中匀浆制备原生质膜。在 41% W7v 蔗糖层的上部离心匀浆物。在缓冲液中稀释两层之间的白色条带并且离心。原生质膜在-80 $^{\circ}$ C 储存直至使用。

通过测量作为对促胰岛素肽或促胰岛素化合物刺激的应答的 cAMP 而进行功能性受体的分析。以总体积 140 mL 并且用下列终浓度：50mM Tris-HCl, 1mM EGTA, 1.5mM $MgSO_4$, 1.7mM ATP, 20mM GTP, 2mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX), 0.01% w/v Tween-20, pH7.4 在 96-孔微量滴定板中进行温育。在缓冲液中溶解和稀释化合物。对于每

一实验新鲜制备 GTP: 将 2.5 μ g 膜加至每一孔并且将混合物在室温下暗处振荡温育 90 分钟。通过加入 25mL 0.5M HCl 终止反应。通过闪烁亲近测定法 (RPA 542, Amersham, UK) 测定形成的 cAMP。对化合物绘制剂量反应曲线并且利用 GraphPad Prism 软件计算 EC₅₀ 值。

此处所用的术语“促胰岛素化合物的前药”指化学修饰的化合物, 其在施与患者之后转化为促胰岛素化合物。所述前药通常为促胰岛素化合物的氨基酸延伸型或酯。

此处所用的术语“exendin-4 化合物”定义为 exendin-4 (1-39) (SEQ ID NO. 2)、其促胰岛素片段、其促胰岛素类似物和其促胰岛素衍生物。exendin-4 的促胰岛素片段为其全长序列可在 exendin-4 序列 (SEQ ID NO. 2) 中找到并且其中至少一端氨基酸已缺失的促胰岛素肽。exendin-4 促胰岛素片段 (1-39) 的实例为 exendin-4 (1-38) 和 exendin-4 (1-31)。化合物的促胰岛素性质可通过本领域熟知的体内或体外分析测定。例如, 可将化合物施与动物并且监测随时间的胰岛素浓度。exendin-4 (1-39) 的促胰岛素类似物指其中一个或多个氨基酸残基已用其他的氨基酸残基交换和/或已缺失一个或多个氨基酸残基和/或已添加一个或多个氨基酸残基的各个分子, 条件是所述类似物为为促胰岛素的或促胰岛素化合物的前药。exendin-4 (1-39) 的促胰岛素类似物的实例为 Ser²Asp³-exendin-4 (1-39), 其中位点 2 和 3 的氨基酸残基已分别由丝氨酸和天冬氨酸取代 (该具体的类似物在本领域中也被称为 exendin-3)。exendin-4 (1-39) 的促胰岛素衍生物和其类似物被本领域技术人员认为是这些肽的衍生物, 即具有在母体肽分子中不存在的至少一个取代基, 条件是所述衍生物为促胰岛素的或为促胰岛素化合物的前药。取代基的实例为酰胺、糖类、烷基、酯和亲脂性取代基。exendin-4 (1-39) 的促胰岛素衍生物和其类似物的实例为 Tyr₃₁-exendin-4 (1-31)-酰胺。

此处所用的术语“稳定的 exendin-4 化合物”指化学修饰的 exendin-4 (1-39), 即如通过在“稳定的 GLP-1 化合物”的定义中描述的方法测定的, 在人中呈现至少 10 小时体内血浆消除半衰期的类似

物或衍生物。

此处所用的术语“二肽基氨肽酶 IV 保护的 exendin-4 化合物”指如通过在二肽基氨肽酶 IV 保护的 GLP-1 化合物定义中所述的分析测定的，比 exendin-4 (SEQ ID NO. 2) 更耐受血浆肽酶二肽基氨肽酶 IV (DPP-IV) 的 exendin-4 化合物。

此处所用的术语“等电点”指大分子（如肽）的总净电荷为零时的 pH 值。肽中可能有数个带电基团，而在等电点，所有这些电荷的总和为零。在等电点以上的 pH 时肽的总净电荷为负的，而在等电点以下的 pH 值时肽的总净电荷为正的。

此处所用涉及药物组合物的术语“重制的”指通过将水添加至包含活性药物成分的固体材料而形成的水性组合物。用于重制的药物组合物被用于不能产生具有可接受的储存期限的液体组合物的情况。重制药物组合物的实例为当将水添加至冻干组合物时得到的溶液。该溶液常用于肠胃外给药并且因此通常利用注射用水用于重制固体材料。

此处所用的术语“约”指所述数值适当的接近，如加减 10%。

在第一个方面，本发明涉及包含促胰岛素肽、药学可接受防腐剂、约 10mg/L 至约 400mg/L 浓度的泊洛沙姆或聚山梨醇酯 20 表面活性剂以及选择性的药学可接受的张力调节剂的储存-稳定的药物组合物，其中所述组合物具有约 7.0 至约 8.5 的 pH。

在一个实施方案中表面活性剂的浓度为约 20mg/L 至约 300mg/L。

在另一实施方案中表面活性剂的浓度为约 50mg/L 至约 200mg/L。

在另一实施方案中表面活性剂的浓度为约 10mg/L 至约 200mg/L。

在另一实施方案中表面活性剂的浓度为约 50mg/L 至约 400mg/L。

在另一实施方案中表面活性剂的浓度为约 50mg/L 至约 300mg/L。

在另一实施方案中表面活性剂为泊洛沙姆 188。

在另一实施方案中表面活性剂选自泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 124、泊洛沙姆 181、泊洛沙姆 182、泊洛沙姆 237、泊洛沙姆 331 和泊洛沙姆 338。

在另一实施方案中表面活性剂为聚山梨醇酯 20。

一个实施方案中本发明提供包含促胰岛素肽和烷基-多聚葡糖苷，以及选择性的药学可接受张力调节剂的组合物。

一个实施方案中本发明提供根据以上实施方案的组合物，其中所述组合物具有约 7.0 至约 8.5 的 pH。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 10mg/L 的浓度存在。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 1000mg/L 的浓度存在。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 10mg/L 至约 15000mg/L 的浓度存在。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 1000mg/L 至约 10000mg/L 的浓度存在。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷以约 2000mg/L 至约 5000mg/L 的浓度存在。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何一个实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷为 C₁₀₋₂₀-烷基-多聚葡糖苷。

一个实施方案中本发明提供根据以上任何一个实施方案的组合物，其中烷基-多聚葡糖苷选自十二烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷、十二烷基 β-D-麦芽糖苷、十四烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷、癸基 β-D-麦芽糖苷、十二烷基 β-D-麦芽糖苷、十四烷基 β-D-麦芽糖苷、十六基 β-D-麦芽糖苷、癸基 β-D-麦芽三糖苷、十二烷基 β-D-麦芽三糖苷、十四烷基 β-D-麦芽三糖苷、十六基 β-D-麦芽三糖苷、n-十二烷基-蔗糖、n-癸基-蔗糖。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含两种不同的表面活性剂。本发明的另一实施方案中药物组合物包含两种不同的表面活性剂，其中至少一种表面活性剂为非离子型表面活性剂。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含两种不同的表面活性剂，其中两种不同的表面活性剂均为非离子型表面活性剂。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含两种不同的表面活性剂，其中所有的表面活性剂均为非离子型表面活性剂。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含泊洛沙姆 188 和聚山梨醇酯 20。

本发明的另一实施方案中药物组合物具有约 7.4 至约 8.0 的 pH。

本发明的另一实施方案中药物组合物具有约 7.4 至约 8.5 的 pH。

本发明的另一实施方案中药物组合物具有约 7.7 至约 8.2 的 pH。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含缓冲液，其为磷酸盐缓冲液。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含缓冲液，其为两性离子缓冲液。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含缓冲液，其选自甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸、TRIS、N-二(羟乙基)甘氨酸、HEPES、MOBS、MOPS、TES 和其混合物。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含选自甘油、丙二醇和甘露糖醇的张力调节剂。

本发明药物组合物的另一实施方案中防腐剂选自苯酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯丁醇、硫柳汞(thiomerosal)和其混合物。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含促胰岛素肽，其为 DPP-IV 保护的肽。

本发明药物组合物的另一实施方案中促胰岛素肽包含亲脂取代基，选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ ，其中 n 为 4 至 38，以及 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ，其中 m 为 4 至 38。

本发明药物组合物的另一实施方案中促胰岛素肽为酰化的 GLP-1 或酰化的 GLP-1 类似物。

本发明的另一实施方案中药物组合物包含促胰岛素肽，其为酰化的 GLP-1 类似物，其中所述 GLP-1 类似物选自 $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1}(7\text{-}37)$ 、

Gly⁸-GLP-1 (7-36)-酰胺、Gly⁸-GLP-1 (7-37)、Val⁸-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸-GLP-1 (7-37)、Aib⁸-GLP-1 (7-36)-酰胺、Aib⁸-GLP-1 (7-37)、Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Arg²²-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸Arg²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸His²²-GLP-1 (7-36)-酰胺、Val⁸His²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37)、Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1 (7-37)、Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1 (7-37)、Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37)，和其类似物。

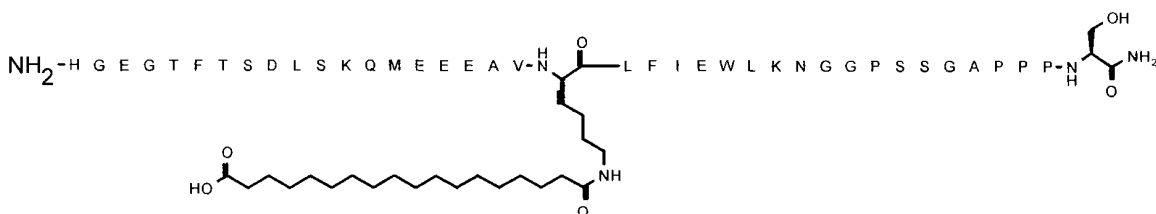
本发明药物组合物的另一实施方案中促胰岛素肽为 Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε- (γ-Glu (N^α-十六烷酰基))) -GLP-1 (7-37)。

本发明的另一实施方案中所述促胰岛素肽的浓度为约 0.1mg/ml 至约 25mg/ml、约 1mg/ml 至约 25mg/ml、约 2mg/ml 至约 15mg/ml、约 3mg/ml 约 10mg/ml 或约 5mg/ml 至约 8mg/ml。

本发明的另一实施方案中促胰岛素肽为 exendin-4 或 ZP-10，即 HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-NH₂。

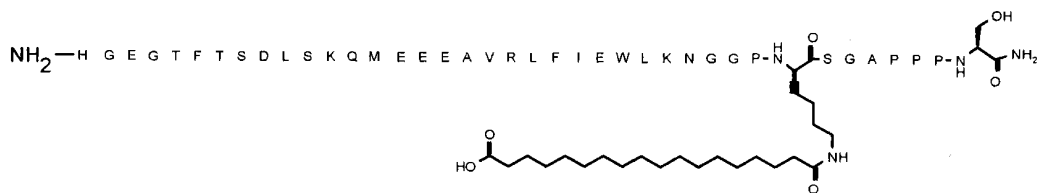
本发明药物组合物的另一实施方案中促胰岛素肽为酰化的 exendin-4 或酰化的 exendin-4 类似物。

本发明药物组合物的另一实施方案中促胰岛素肽为 [N-ε (17-羧基十七烷酸) 20 exendin-4 (1-39) -酰胺



或

N-ε 32- (17-羧基-十七烷酰基) [Lys32] exendin-4 (1-39) 酰胺。



本发明药物组合物的另一实施方案中药物组合合物中促胰岛素肽的浓度为约 $5 \mu\text{g/ml}$ 至约 10mg/mL 、约 $5 \mu\text{g/ml}$ 至约 5mg/mL 、约 $5 \mu\text{g/mL}$ 至约 5mg/mL 、约 0.1mg/mL 至约 3mg/mL 或约 0.2mg/mL 至约 1mg/mL 。

另一方面本发明涉及制备本发明药物组合物的方法，所述方法包括将所述促胰岛素肽溶解并且混合防腐剂和张力调节剂。

本发明还涉制备及 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，所述方法包括在碱性 pH 加热所述 GLP-1 化合物溶液至 40°C 以上的温度至少 5 分钟。加热处理期间 GLP-1 化合物的浓度通常优选为 10g/L 至 100g/L 的范围。GLP-1 化合物可溶于具有最终温度的水溶液中，或可溶于具有室温的水溶液中，随后加热至合适的温度指定的时间。

已表明 GLP-1 化合物，liraglutide 的物理稳定性在加热处理的温度提高时 (22 至 80°C) 明显改善。对于 60 和 80°C 的温度，显示加热处理的时间对 liraglutide 的物理稳定性具有强的影响，如与加热处理 1 分钟相比，加热处理 120 分钟显示明显改善物理稳定性。还显示 liraglutide 的物理稳定性通过在 pH9-10 将温度从 22°C 提高至 50 - 80°C 而明显改善 (cn. f. 实施例)。对于所有的温度，显示加热处理的时间对 liraglutide 的物理稳定性有影响，如与加热处理 1 分钟相比，加热处理 15 至 20 分钟显示明显改善物理稳定性。

加热处理以溶解原纤维种的最佳条件似乎为在 pH9-10.5 以及 70 - 85°C ，时间为 3-20 分钟。大规模生产中，可利用经热交换器的用于大体积的快速加热和冷却的常用方法而进行。

另一方面本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.5 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 50°C 和 80°C 之间的温度，时间为 3 分钟和 180 分钟之间。

在一个实施方案中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 50℃ 和 80℃ 之间的温度，时间为 3 分钟和 180 分钟之间。

在另一实施方案中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 50℃ 和 80℃ 之间的温度，时间为 3 分钟和 120 分钟之间。

在另一实施方案中温度在 60℃ 和 80℃ 之间，时间为 5 分钟和 15 分钟之间。

在另一实施方案中温度在 60℃ 和 80℃ 之间，时间为 1 分钟和 15 分钟之间。

在另一实施方案中温度在 60℃ 和 80℃ 之间，时间为 3 分钟和 30 分钟之间。

在另一实施方案中温度在 60℃ 和 80℃ 之间，时间为 5 分钟和 30 分钟之间。

在另一实施方案中本发明涉及制备 exendin-4 稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的 exendin-4 溶液至 50℃ 和 80℃ 之间的温度，时间为 3 分钟和 120 分钟之间。

在另一实施方案中本发明涉及制备 Aib^{8, 35}-GLP-1 (7-36)-酰胺稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的 Aib^{8, 35}-GLP-1 (7-36)-酰胺溶液至 50℃ 和 80℃ 之间的温度，时间为 3 分钟和 120 分钟之间。

在另一实施方案中 GLP-1 化合物为 Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε- (γ-Glu (N^α-十六烷酰基)))-GLP-1 (7-37)。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热所述 GLP-1 化合物的溶液。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中温度在 50℃ 和 95℃ 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中温度在 60℃ 和 95℃ 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中温度在 50°C 和 80°C 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中温度在 70°C 和 80°C 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中温度在 60°C 和 80°C 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 在约 8.0 至 10.5 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 在约 8.0 至 10.0 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 在约 8.0 至约 9.7 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 在约 7.5 至 8.5 之间。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 为约 7.7。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 为约 8.15。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中加热持续 3 分钟至 180 分钟。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中加热持续 10 分钟至 90 分钟。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中加热持续 3 分钟至 30 分钟。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中加热持续 5 分钟至 15 分钟。

一个方面中本发明涉及如上的方法，其中 pH 在 pH8.0 至 pH10.5 之间并且该方法包括加热至 50°C 和 85°C 之间的温度，时间为 3 分钟和 180 分钟之间。

另一方面本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 50°C 和 80°C 之间的温度，时间为 3 分钟和 180 分钟之间。

在一个实施方案中本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 50°C 和 80°C 之间的温度，时间为 3 分钟和 120 分钟之间。一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 70°C 和 80°C 之间的温度，时间为 3 分钟和 30 分钟之间。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热具有 pH8.0 至 pH10.0 之间 pH 的所述 GLP-1 化合物溶液至 60°C 和 80°C 之间的温度，时间为 5 分钟和 15 分钟之间。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物稳定溶液的方法，该方法包括加热所述 GLP-1 化合物溶液至 60°C 和 95°C 之间的温度，时间为 10 分钟和 90 分钟之间。

上述方面包括约 7.5 至约 8.5 的溶液的 pH 值。本发明的一个方面中 pH 为约 7.7。本发明的一个方面中 pH 值为约 8.15。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括上述方面任何一项的一种或多种方法，随后为加入药学可接受赋形剂。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括通过任何以上方面的方法产生大量的肽产品，随后将所述胰高血糖素-样肽的溶液或悬浮液冷冻干燥。

一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括从以上方面的冻干产品制备药物组合物，随后进行任何以上方面的处理。一个方面中本发明涉及制备 GLP-1 化合物储存-稳定的药物组合物的方法，该方法包括如之前方面所述制备药物组合物以及随后经历任何以上方面的处理，其在装入最终的输送系统之前或装入最终的输送系统后或两种情况下进行。

一个方面中本发明涉及任何以上方面的方法，其中所述 GLP-1 化合物为 Arg³⁴, Lys²⁶ (N^E-(γ -Glu(N ^{α} -十六烷酰基))) -GLP-1(7-37)。

另一方面中本发明涉及治疗高血糖症的方法，该方法包括将本发

明有效量的药物组合物肠胃外给药至需要所述治疗的哺乳动物。

另一方面中本发明涉及治疗肥胖、 β -细胞缺陷、IGT 或血脂障碍的方法，包括将本发明有效量的药物组合物肠胃外给药至需要所述治疗的哺乳动物。

实施例

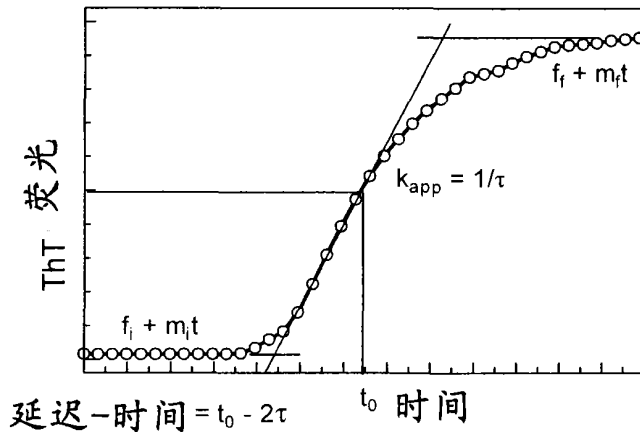
常规方法

硫黄素 (Thioflavin) T (ThT) 原纤维形成分析：原理和实施例
肽的低物理稳定性可能导致淀粉样蛋白的原纤维形成，观察到其在样品中为良好-排序的，丝状大分子结构，最终产生凝胶形成。此通常通过样品的肉眼检查测量。然而，那种测量非常主观并且取决于观察者。因此，小分子指示剂探针的应用更加有利。硫黄素 T (ThT) 为这样的探针并且当结合原纤维时具有清楚的荧光标记 [Naiki 等. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine(1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284]。

原纤维形成的时间过程可通过具有下列表达式的 S 形曲线描述 [Nielsen 等. (2001) Biochemistry 40, 6036-6046], cn.f 图 6:

$$F = f_i + m_f t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq. (1)}$$

这里，F 为在时间 t 时的 ThT 荧光。常数 t_0 为达到 50%最大荧光需要的时间。描述原纤维形成的两个重要的参数为通过 $t_0 - 2\tau$ 计算的延迟-时间和表观速率常数 $k_{app} = 1/\tau$ 。



肽的部分折叠中间体的形成被认为是原纤维形成的常规起始机制。极少的那些中间体成核以形成支架，在其上另外的中间体可以组装并且进行原纤维形成。延迟-时间与时间间隔对应，其中核的临界质量增长并且表观速率常数为原纤维本身形成的速率。

样品制备

样品在每一分析之前新鲜制备。在图例中描述每一样品组合物。样品的 pH 利用合适量的浓缩 NaOH 和 HClO₄ 调节至期望值。将硫黄素 T 加至样品，样品浓度为从在 H₂O 中的原液至 1 μM 终浓度。

将 200 μl 样品等分试样置于 96 孔微量滴定板中 (Packard OptiPlate™-96, 白色聚苯乙烯)。通常，每一样品的八个副本 (对应于一种检测条件) 置于一列孔中。平板用 Scotch Pad (Qiagen) 密封。

温育和荧光测量

在给定温度的温育、振荡和 ThT 荧光发射的测量在 Fluoroskan Ascent FL 荧光平板读数器 (Thermo LabSystems) 中完成。温度调节至 37°C。所有呈现的数据中用 1mm 的振幅调节轨道振荡至 960rpm。利用 444nm 滤光器的激发和 485nm 滤光器的发射测量完成荧光测量。

通过在分析温度温育平板 10 分钟起始每次运行。每 20 分钟测量平板，通常进行 45 小时。在每次测量之间如上所述振荡和加热平板。

数据处理

测量点以 Microsoft Excel 格式保存用于进一步的处理和曲线绘图并且利用 GraphPad Prism 进行调整。ThT 无原纤维时的背景发射可以忽略。数据点通常为八个样品的平均值并且以标准偏差误差棒显示。仅在同一实验（即同一平板上的样品）中获得的数据呈现在同一图中以确保一个分析的单个样品之间原纤维形成的相对测量而不是不同分析之间的比较。

数据集可适于 Eq. (1)。然而，由于在这种情况下在测量期间通常未获得全部 S 形曲线，原纤维形成的程度表示为作为八个样品的平均值计算的不同时间点的 ThT 荧光并且以标准偏差显示。

实施例 1

酰化的 GLP-1 类似物 liraglutide 的药物组合物的 ThT 原纤维形成分析在图 1 中显示（根据“常规方法”中所述的方法进行实验）。大约 10 小时后 ThT 荧光发射提高，表明原纤维形成的开始。该信号稳定提高并且在分析终止前达到平台期。然而存在 200ppm 泊洛沙姆 188 时，ThT 荧光信号维持在背景水平。此表明无原纤维形成发生并且因此药物组合物在这些条件下为物理稳定的。实施例 1 中所用的药物组合物（图 1）未添加缓冲液。

实施例 2

包含磷酸钠作为缓冲液的 liraglutide 药物组合物中泊洛沙姆 188 的作用在图 2 中显示（以“常规方法”中所述的方法进行实验）。这里 50ppm 泊洛沙姆 188 的存在延长了原纤维形成开始之前的延迟时间，而 100ppm 泊洛沙姆 188 完全抑制分析期间的原纤维形成。

实施例 3

聚山梨醇酯 20 也稳定 liraglutide 的制剂。一个这样的实例在图

3 中显示（按“常规方法”中所述的方法进行实验）。200ppm 聚山梨醇酯 20 的存在减弱原纤维形成，其以 ThT 荧光信号的较慢生长速率观察到。因此，40 小时温育后在聚山梨醇酯 20 样品中观察到比参照中明显更少的 ThT 荧光信号。

实施例 4

制备两种药物组合物：

F1. 1.2mM liraglutide, 14mg/ml 丙二醇, 40mM 苯酚, 3 Zn/六聚体, aspart 0.6mM, 8mM N-二(羟乙基)甘氨酸, 50ppm 泊洛沙姆 188, pH7.7。

F2. 1.2mM liraglutide, 14mg/ml 丙二醇, 40mM 苯酚, 3 Zn/六聚体, aspart 0.6mM, 8mM N-二(羟乙基)甘氨酸, pH7.7。

通过加速的应力检测评估药物组合物的物理稳定性。应力检测以旋转检测进行。将 50 μ l 空气加至每种制剂的 5 个筒（玻璃管）。筒以每分钟 30 转的频率每天旋转 4 小时。在旋转 22 天后终止检测。每天或根据需要进行筒的检查。药物组合物的混浊度以 HACH Turbidimeter 2100AN 上混浊度的比浊测量进行表征。液体的浊度测量指定在“Nephelometric Turbidity Unit”（NTU）中进行。蛋白质的物理不稳定性通过高浊度测量表征。

实验表明与 F1 组合物的相比，组合物 F2 具有 NTU 更快速的提高。

实施例 5

制备三种药物组合物：F1. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠，pH7.7。

F2. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、100 μ g/ml 泊洛沙姆 188，pH7.7。

F3. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、200 μ g/ml 泊洛沙姆 188，pH7.7。

药物组合物 F1-F3 经受实施例 4 中所述的旋转检测。得到的对时间的 NTU 测量结果在图 4 中显示。

实施例 6

制备两种药物组合物:

F1. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、0 μ g/ml 泊洛沙姆 407 (Pluronic F-127), pH7.7。

F2. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、200 μ g/ml 泊洛沙姆 407 (Pluronic F-127), pH7.7。

用硫黄素 T 试验检测制剂的物理稳定性。将样品在 96-孔平板 (Black NUNC) 上铺平板, 在 37°C 温育达 72 小时, 采用下列程序在 BMG FLUO star 微量滴定板荧光计上进行: [300rpm 15min, 5min 静止]_n=72。所得测量结果在图 5 中显示 (低曲线为 F2)。

实施例 7

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备, 调节 pH 至 7.3 在。另一个容器中制备溶液 2: 将 liraglutide 溶于 60°C 热水并且在 60°C 水浴保持 1、20 和 120 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 和 10 pH 的溶液中进行。加热处理后溶液 2 冷却至 22°C, 其中混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 7.7。最后, 将制剂滤过 0.22 μ m 的过滤器。

liraglutide 制剂的物理稳定性利用荧光方法; 硫黄素 T-检测评估, 其中组织噻唑染料硫黄素 T (ThT) 用作原纤维形成的指示剂。通过利用硫黄素 T-检测可以测定不同制剂中原纤维的存在。该方法以 ThT 的荧光特征为基础。原纤维存在时, ThT 的荧光呈现 450 nm 处的最大激发以及 482 nm 处增强的发射。ThT 荧光强度已表明与原纤维浓度的增加成线性关系。

ThT 用于应力检测, 不同制剂在 35°C 施加至具有 ThT 的微量滴定板中并且以 350 rpm 振荡直至制剂形成原纤维。获得作为时间函数

(sec) 的荧光强度 (FI) 的图。反应变量为: 达到荧光强度 400 的时间 (秒), 例如达到 $FI = 400$ 的时间越长, 制剂越稳定。

liraglutide 制剂的纯度通过 RP-HPLC 测量。

实验结果在图 7 和 8 中描述。

下列实验没有表面活性剂-加热处理 3。

实施例 7a

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备, 调节 pH 至 7.9。在另一个容器中制备溶液 2: 将 liraglutide 溶于 60°C 热水并且在 60°C 水浴保持 1、20 和 120 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 至 10 的 pH 的溶液中进行。混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。最后, 制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

liraglutide 制剂的物理稳定性利用荧光方法; 硫黄素 T-检测评估, 其中组织噻唑染料硫黄素 T (ThT) 用作原纤维形成的指示剂。通过利用硫黄素 T-检测可以测定不同制剂中原纤维的存在。该方法以 ThT 的荧光特征为基础。原纤维存在时, ThT 的荧光呈现 450nm 处的最大激发以及 482nm 处增强的发射。ThT 荧光强度已表明与原纤维浓度的增加成线性关系。

实施例 8

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备, 调节 pH 至 7.3。在另一个容器中制备溶液 2: 将 liraglutide 溶于 80°C 热水并且在 80°C 水浴保持 1、30 和 120 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 和 10 的 pH 的溶液中进行。加热处理后溶液 2 冷却至 22°C, 其中混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 7.7。最后, 制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

制剂的物理稳定性和纯度如实施例 7 中所述而测量。

实验结果在图 9 和 10 中描述。

实施例 8a

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备，将 pH 调节至 7.9。在另一个容器中制备溶液 2：将 liraglutide 溶于 80℃ 热水并且在 80℃ 水浴保持 1、20 和 120 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 至 10 的 pH 的溶液中进行。混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。最后，制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

liraglutide 制剂的物理稳定性利用荧光方法；硫黄素 T-检测评估，其中组织噻唑染料硫黄素 T (ThT) 用作原纤维形成的指示剂。通过利用硫黄素 T-检测可以测定不同制剂中原纤维的存在。该方法以 ThT 的荧光特征为基础。原纤维存在时，ThT 的荧光呈现 450nm 处的最大激发以及 482nm 处增强的发射。ThT 荧光强度已表明与原纤维浓度的增加成线性关系。

实施例 9

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备，将 pH 调节至 7.3。在另一个容器中制备溶液 2：将 liraglutide 溶于不同的温度：22、40、60 和 80℃ 热水并且在所有所研究温度的水浴保持 15 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 10 的 pH 的溶液中进行。加热处理后溶液 2 冷却至 22℃，其中混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 7.7。最后，制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

制剂的物理稳定性和纯度如实施例 7 中所述而测量。

实验结果在图 11 中描述。

实施例 10

冻干之前 liraglutide 药物材料以 10-100g/L 浓度在 pH 约 8.0-10.0 溶于 70-80℃ 热水。加热处理进行 3-30 分钟。此后冻干 DS。随后，冻干的药物材料溶于水。浓度为约 10-100g/L 并且溶液（溶液

2) 的 pH 为约 8-10。另一种溶液 (溶液 1) 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备。将 pH 调节至 7.9。混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。

实施例 10a

实施例 10a 的主要处理在冷冻干燥之前有或无所述的实施例 10 的加热处理的情况下进行。特定的实施方案中, 实施例 10a 中药物材料的处理可在冷冻干燥之前在 75°C 进行 8 分钟。

实施例 10b

冻干之前 liraglutide 药物材料以 10-100g/L 浓度在 pH 约 8.0-10.0 溶于 70-80°C 的热水。加热处理进行 3-30 分钟。此后冻干 DS。随后, 冻干的药物材料溶于水。浓度为约 10-100g/L 并且溶液 (溶液 2) 的 pH 为约 8-10。另一种溶液 (溶液 1) 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备。调节 pH 至 7.3。混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 7.7。

实施例 10c

实施例 10c 的主要处理在冷冻干燥之前有或无所述的实施例 10b 的加热处理的情况下进行。特定的实施方案中, 实施例 10c 中药物材料的处理可在冷冻干燥之前在 75°C 进行 8 分钟。

实施例 11

Liraglutide 在室温下溶于水并且将 pH 调节至 pH10。溶液在水浴上 50 和 80°C 加热 1、3、5 和 20 分钟。加热处理后, 溶液在水浴上冷却至 22°C。溶液随后滤过 0.22 μm 的过滤器并且冻干。将粉末溶于包含防腐剂、等渗剂以及缓冲液组分的溶液中并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 pH7.7。

热处理 liraglutide 制剂的物理稳定性通过利用实施例 7 中所述的硫黄素 T 方法评估。利用反相 HPLC 测量制剂的化学稳定性。

结果在图 12 和 13 中描述。

实施例 12

Liraglutide 在室温下溶于水并且调节 pH 至 pH9 和 10。溶液在水浴上 60 和 80℃ 加热 1 和 15 分钟。加热处理后，溶液在水浴上冷却至 22℃。溶液随后滤过 0.22 μm 的过滤器并且冻干。粉剂溶于包含防腐剂、等渗剂以及缓冲液组分的溶液中并且调节 pH 至 pH7.7。

热处理 liraglutide 制剂的物理稳定性通过利用实施例 7 中所述的硫黄素 T 方法评估。利用反相 HPLC 测量制剂的化学稳定性。

结果在图 14 中描述。

实施例 13

根据表 1 和 2 混合制剂。

表 1. 赋形剂保持不变

参数	浓度
Liraglutide	6.25mg/ml
丙二醇	14.0mg/ml
苯酚	5.50mg/ml
硫黄素 T	1mM

pH= 7.7

表 2. 具体的赋形剂.

赋形剂	浓度
Solutol HS-15	100 或 200 μ g/ml
Pluronic F-127 (泊洛沙姆 407)	100 或 200 μ g/ml
二-磷酸氢二钠, 二-水合物	8mM
Tricine	10mM

将 8x250 μ l 的每种制剂(8 个重复)移入 96-孔平板(Black NUNC)。随后, 平板利用“Sealing tape for plates, NUNC”密封。

将平板插入 BMG FLUOstar 微量滴定板荧光计中。在 440 ± 10 nm 测量激发并且在 480 ± 10 nm 测量发射。数据采集 72h(约 260,000 秒)。BMG FLUOstar 微量滴定板荧光计如此处所示设定程序: 利用双轨道旋转[600 rpm 300 秒, 静止 100 秒]_{n=72}。

从图 1 和 2 所见到的, 包含在磷酸盐缓冲液中的 Solutol HS-15 的制剂比参照制剂仅稍稍更稳定。包含在磷酸盐缓冲液中的 100 或 200 μ g/ml Pluronic F-127 的制剂更稳定。有趣的是, 包含在 tricine 缓冲液中的 Solutol HS-15 或 Pluronic F-127 的制剂格外稳定, 尤其后者。

实施例 14

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备，将 pH 调节至 7.9。在另一个容器中制备溶液 2：将 liraglutide 溶于 60-70 °C 热水并且在 50、60 和 70 °C 水浴保持 60、90 和 120 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 和 10 的 pH 的溶液中进行。加热处理后溶液 2 冷却至 22 °C，其中混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。最后，制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

liraglutide 制剂的物理稳定性利用荧光方法；硫黄素 T-检测评估，其中组织噻唑染料硫黄素 T (ThT) 用作原纤维形成的指示剂。通过利用硫黄素 T-检测可以测定不同制剂中原纤维的存在。该方法以 ThT 的荧光特征为基础。原纤维存在时，ThT 的荧光呈现 450nm 处的最大激发以及 482nm 处增强的发射。ThT 荧光强度已表明与原纤维浓度的增加成线性关系。

ThT 用于应力检测，不同制剂在 35 °C 施加至具有 ThT 的微量滴定板中并且以 350 rpm 振荡直至制剂形成原纤维。获得作为时间函数(秒)的荧光强度 (FI) 的图。反应变量为：达到荧光强度 400 的时间(秒)，例如达到 FI=400 的时间越长，制剂越稳定。

结果在图 17 中描述。

实施例 15

溶液 1 通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备，将 pH 调节至 7.9。在另一个容器中制备溶液 2：将 liraglutide 溶于 60-70 °C 热水并且在 50、60、65 和 70 °C 的水浴保持 30、45、150 和 180 分钟。liraglutide 的加热处理在具有约 8 和 10 的 pH 的溶液中进行。加热处理后溶液 2 冷却至 22 °C，其中混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。最后，制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。

liraglutide 制剂的物理稳定性通过利用实施例 14 中所述的荧光方法评估。

如上所述的制剂可都包括表面活性剂，如之前在实施例 8 - 15 中所述的表面活性剂以及如上所述的表面活性剂。将表面活性剂溶于溶液 1 并且随后与溶液 2 混合而产生最终的制剂。本发明的一个方面中表面活性剂可为 0-50mg/ml 的浓度。

实施例 16

表 1.

将含有形成原纤维的 liraglutide 的 Penfill®在 85℃加热处理 30 分钟。新产生的 liraglutide 药物产品具有近似 0.2-1.0 NTU 的浊度。因此，高度原纤维形成的 liraglutide 药物产品的加热处理可溶解原先很稳定的原纤维结构。

加热处理之前的 Penfill (NTU)	加热处理后的 Penfill (NTU)
约 50 (含有形成原纤维的 liraglutide DP 的 10 个 penfill 的平均值)	0.382
	0.182
	0.275
	0.174
	0.284
	0.356
	0.24
	0.326
	0.19
	0.836

图 18 显示了以不同时间和温度加热处理的 Penfill®, 其随后经旋转。

以上实施例可分别或组合进行。

本发明的一个方面中方法如下：

冻干之前将 liraglutide 药物材料以 10-100g/L 浓度在 pH 约 8.0-10.0 溶于 70-80℃ 的热水。加热处理进行 3-30 分钟。此后冻干药物材料。随后，冻干的药物材料溶于 50-80℃ 热水 30-180 分钟。浓度为约 10-100g/L 并且溶液（溶液 2）的 pH 为约 8-10。另一种溶液（溶液 1）通过将防腐剂、等渗剂和缓冲液溶解于水中而制备。将 pH 调节至 7.9。混合两种溶液并且利用氢氧化钠和/或盐酸调节 pH 至 8.15。最后，制剂滤过 0.22 μm 的过滤器。无论装入容器-闭合系统之前或之后，得到的 liraglutide 药物产品可经 60-95℃ 的加热处理 10-90 分钟。

实施例 17

n-十二烷基-β-D-麦芽糖苷（DDM）和 Zwittergent 3-10 在包含 liraglutide 的制剂中的作用：检测制剂 F1、F2 和 F3。

通过加速的应力检测评估制剂的物理稳定性。应力检测在 37℃ 以旋转检测进行。将 50 μl 空气加至每种制剂的 5 个筒（3 ml 玻璃管）。筒以每分钟 30 转的频率每天旋转 4 小时。在旋转 37 天后终止检测。每天或根据需要进行筒的检查。制剂的浊度以 HACH Turbidimeter 2100AN 上浊度的比浊测量进行表征。液体的浊度测定指定在“Nephelometric Turbidity Unit”（NTU）中进行。蛋白质的物理不稳定性通过高浊度测量表征。

进行下列实验：

参照：6mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠，pH7.7。

F1.1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、10mM Zwittergent 3-10，pH7.7。

F2.1.6mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、10mM DDM，pH7.7。

F3. 1.6mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、25mM DDM, pH7.7。

结果在图 19 中描述。

实施例 18

37℃旋转 37 天后,分析每种制剂(F1、F2 和 F3)的一种 Penfill® 的 liraglutide 总量(含量, mg/ml)、纯度(%)并且测量杂质总量(%)。进行下列实验:

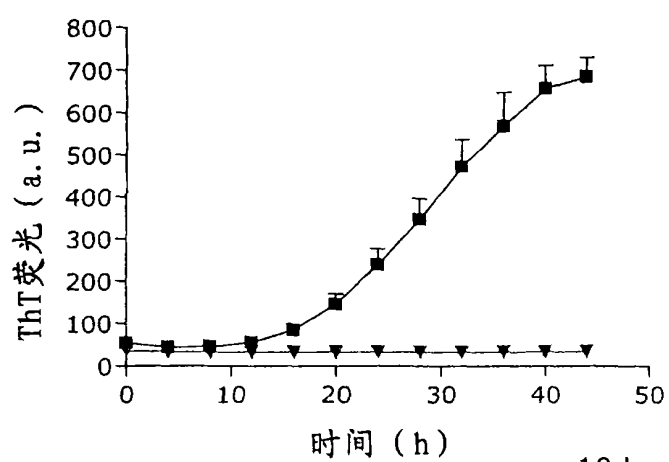
F1. 1.6mM liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、10mM Zwittergent 3-10, pH7.7。

F2. 1.6mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、10mM DDM, pH7.7。

F3. 1.6mM Liraglutide、14mg/ml 丙二醇、40mM 苯酚、8mM 磷酸钠、25mM DDM, pH7.7。

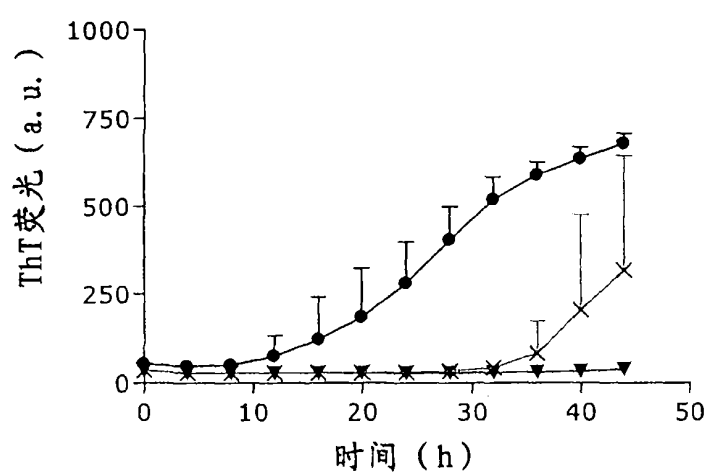
结果在图 20 中描述。

图1



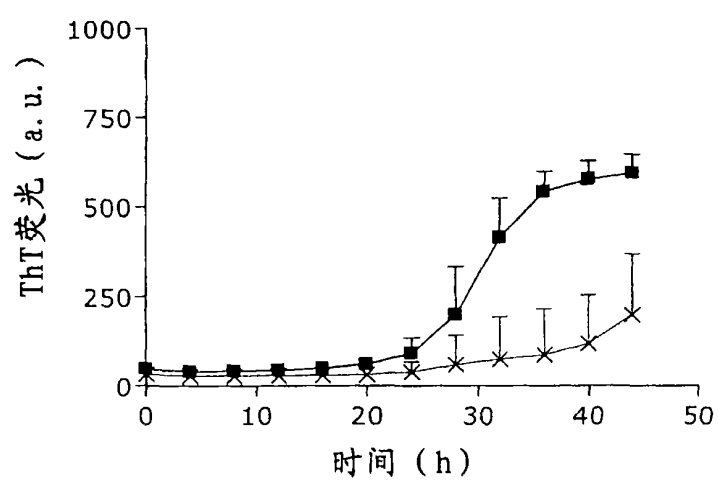
	10 h	SD	40 h	SD
—■— 参照	49	4	658	54
—▼— +200ppm 泊洛沙姆-188	33	0	34	1

图2



	20 h	SD	40 h	SD
—●— 参照	185	139	635	33
—×— +50ppm泊洛沙姆-188	29	1	204	272
—▼— +100ppm泊洛沙姆-188	28	1	32	3

图3



	20 h	SD	40 h	SD
■ 参照	61	8	577	52
× +200ppm聚山梨醇酯20	31	8	118	136

图 4

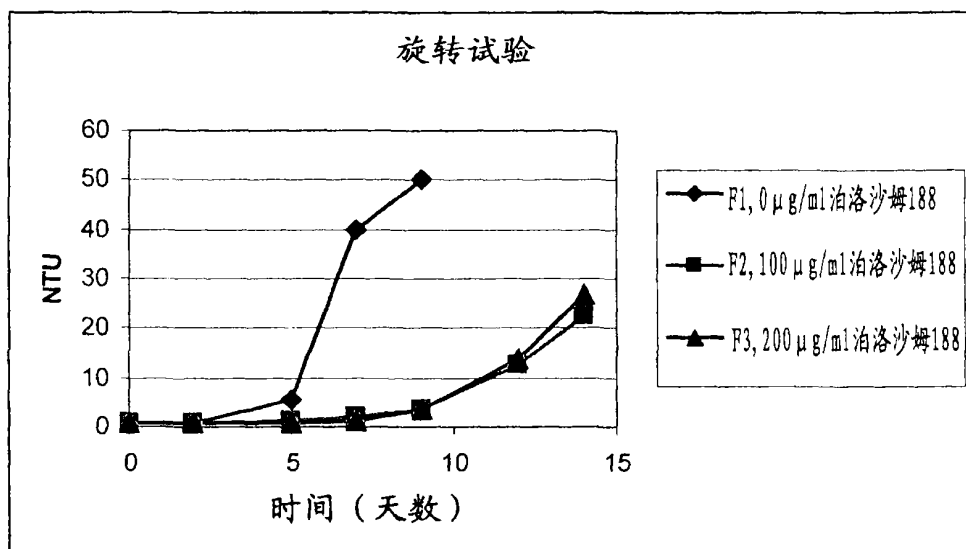


图5

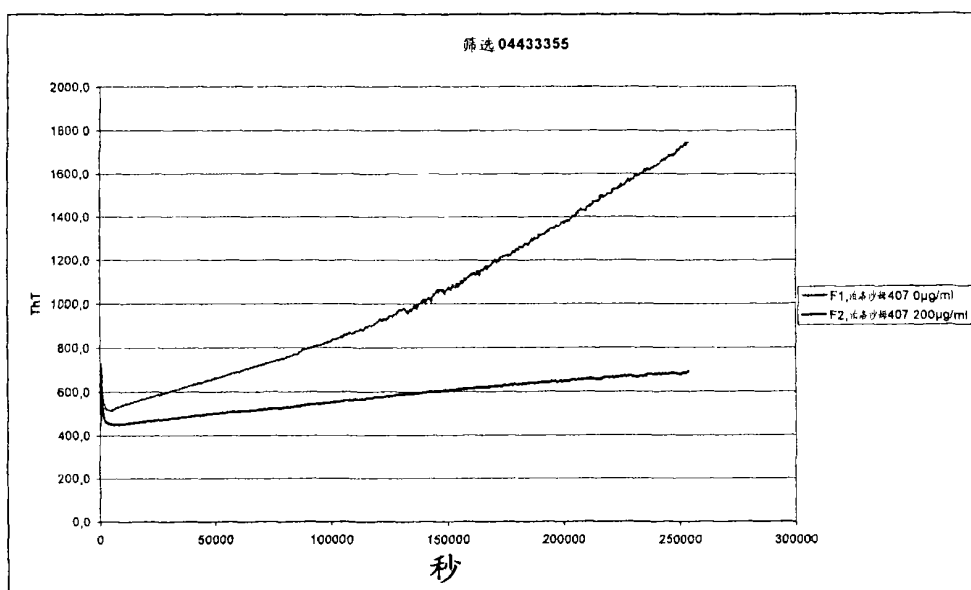


图6

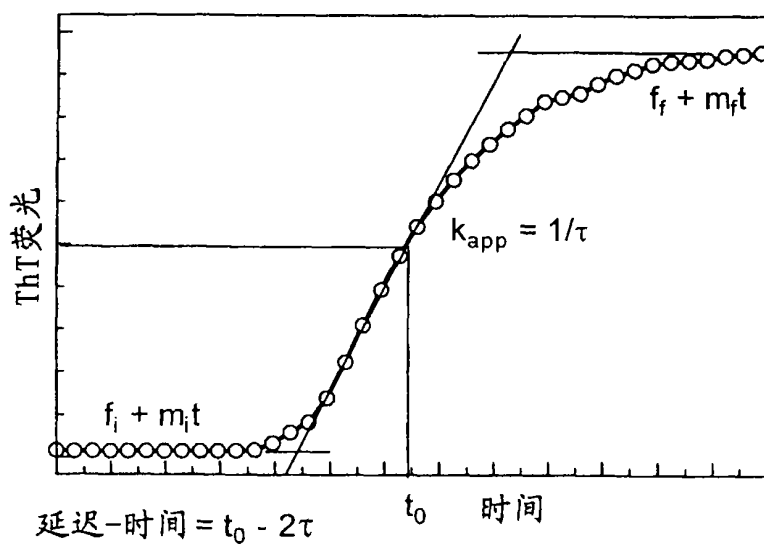


图7

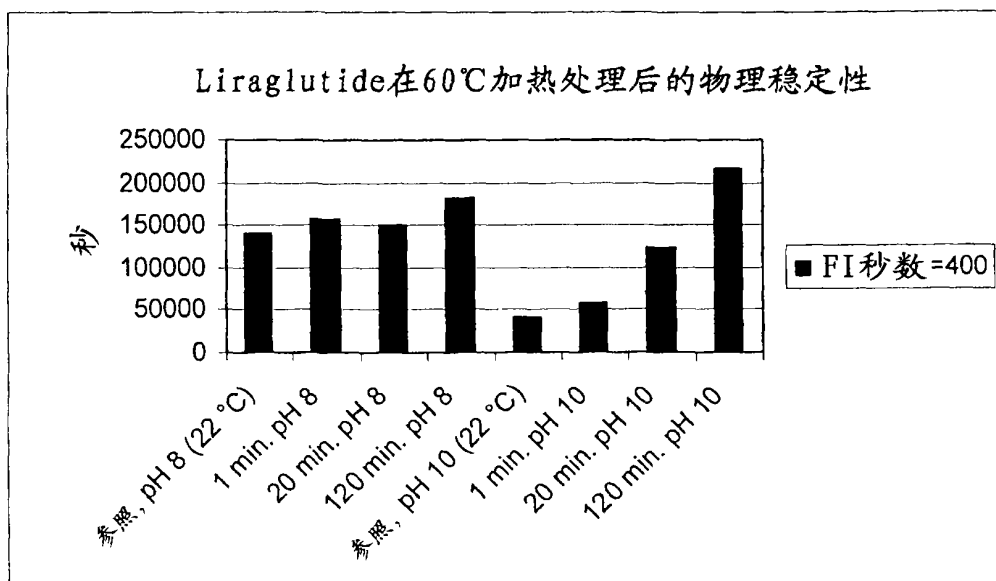


图8

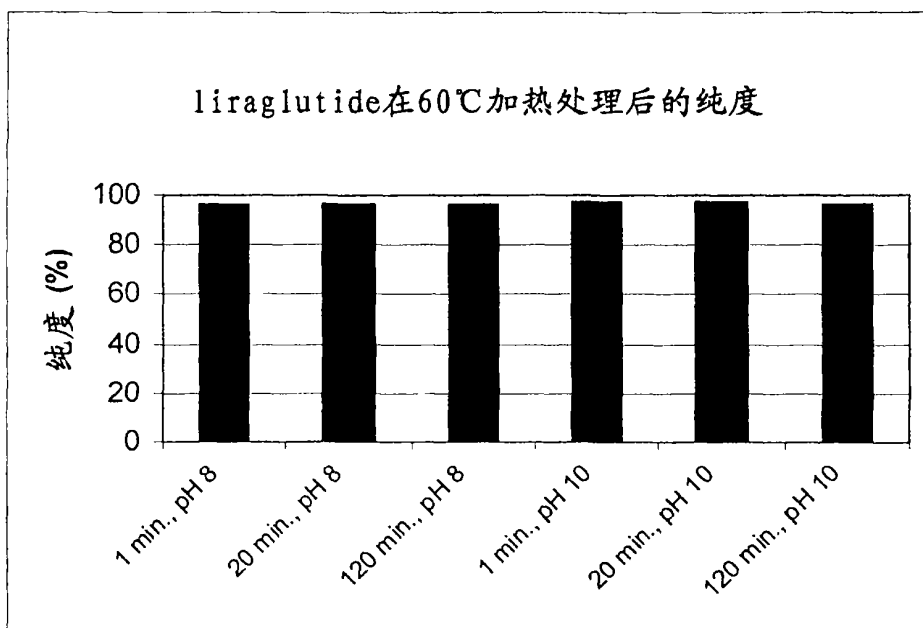


图9

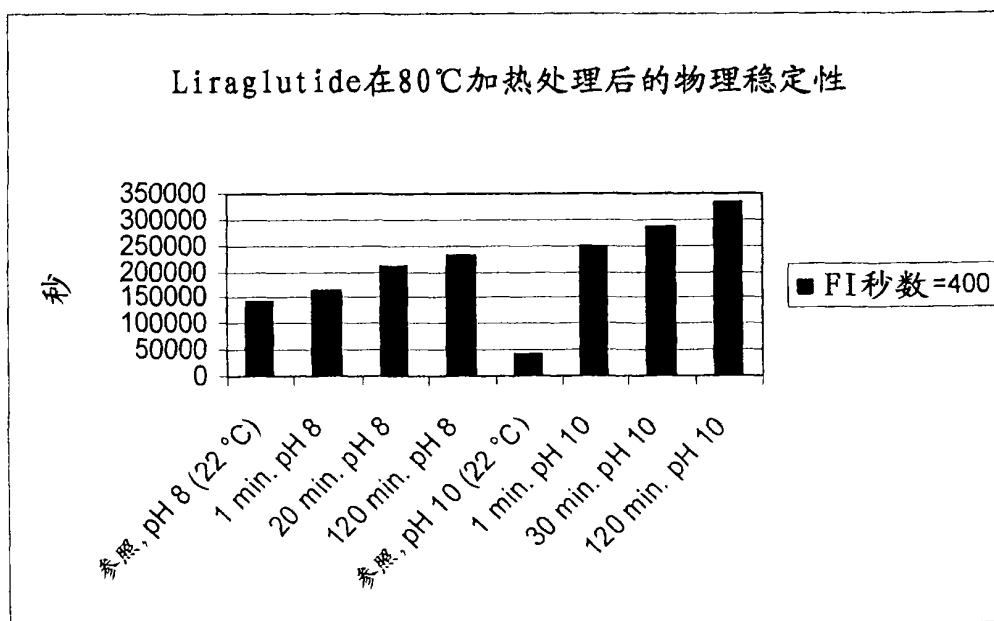


图10

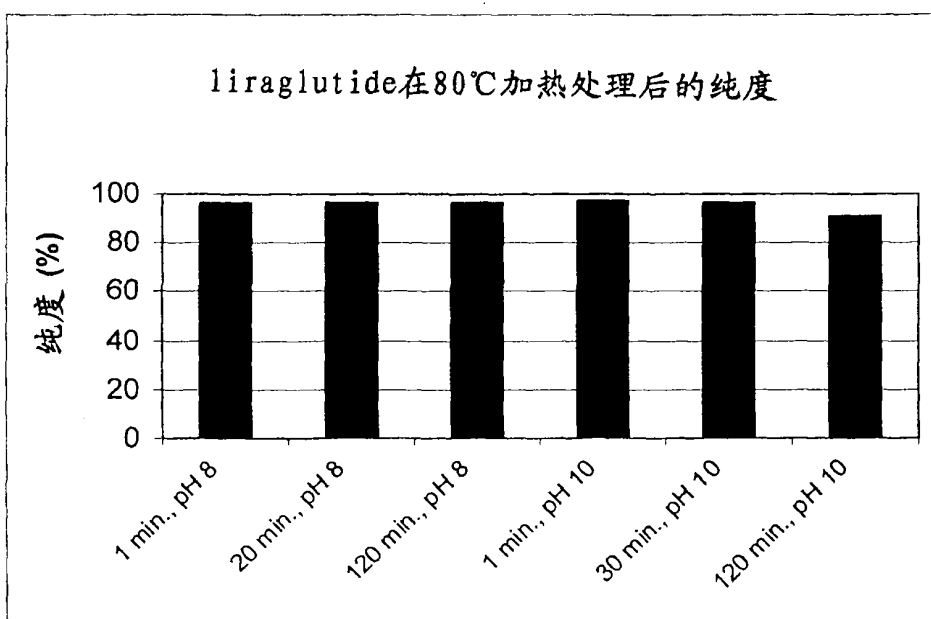


图11

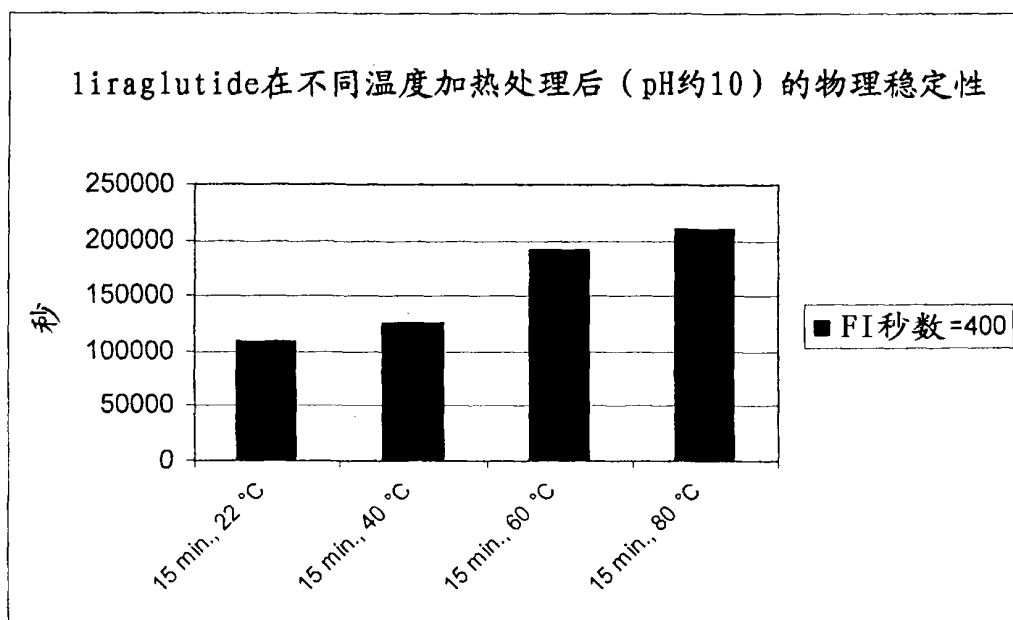


图 12

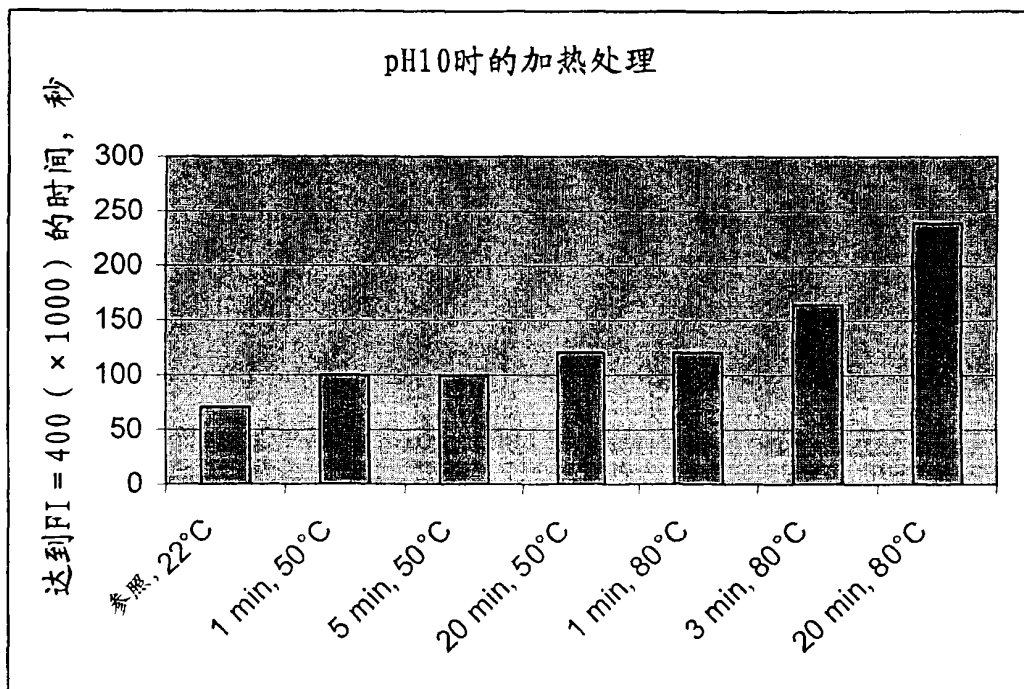


图13

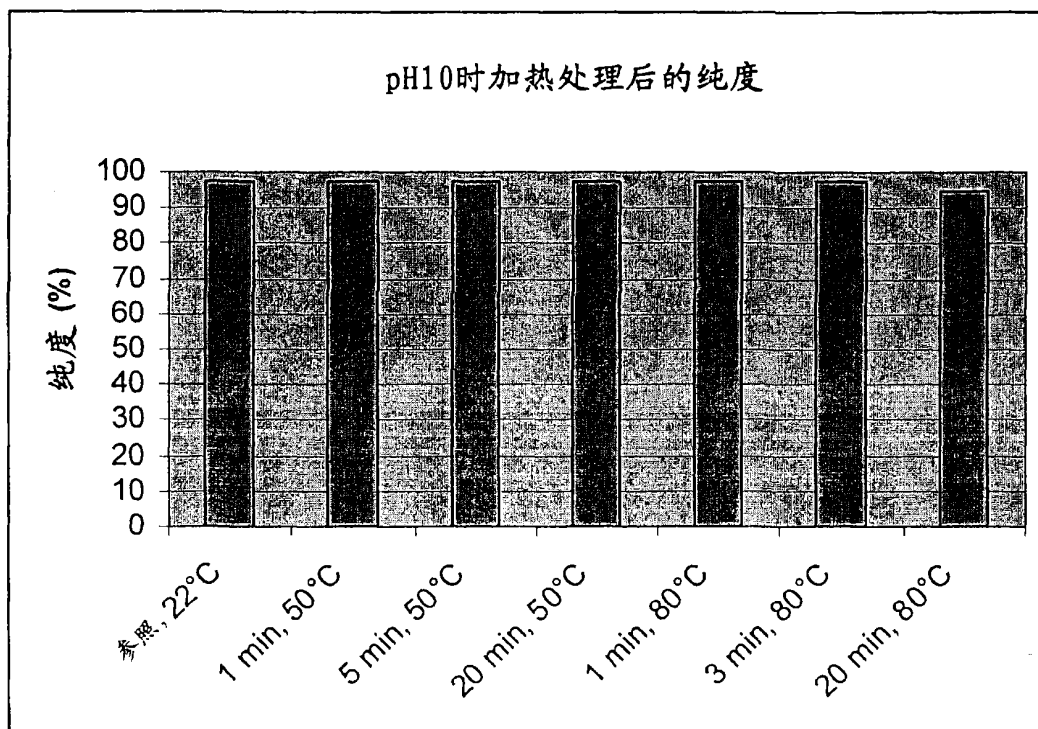


图14

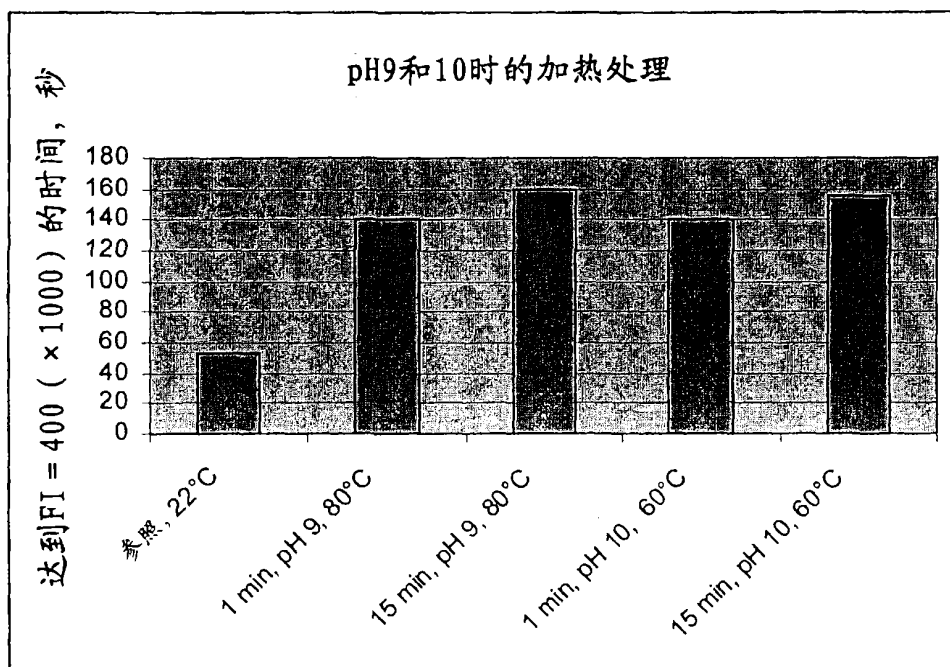


图15

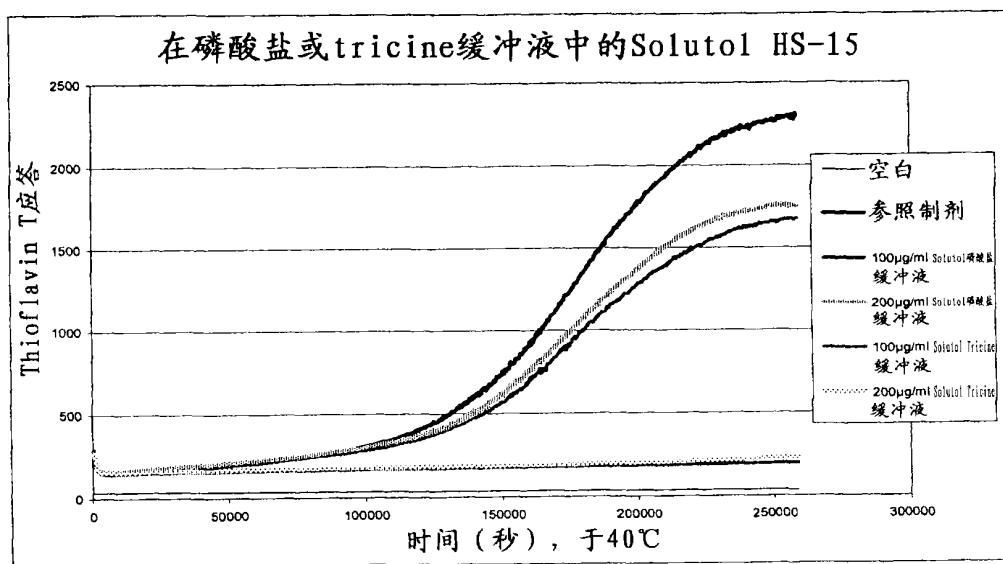


图16

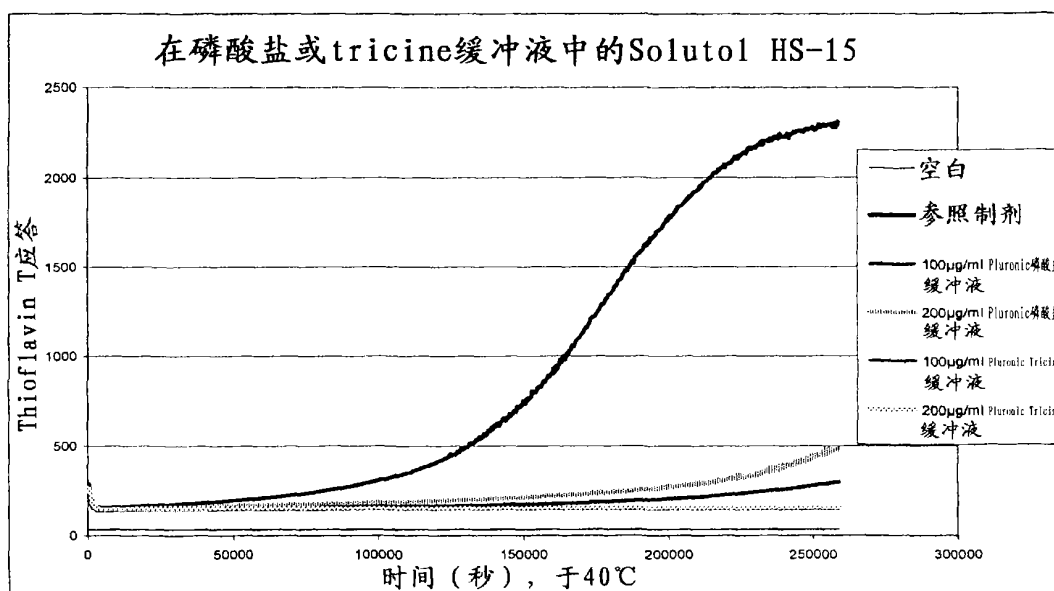


图17

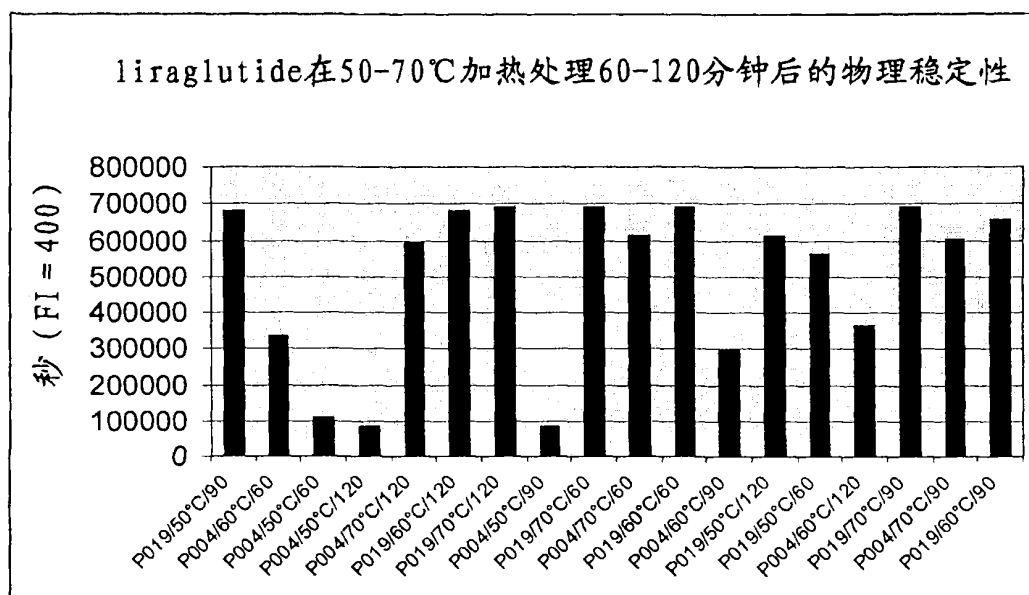


图18

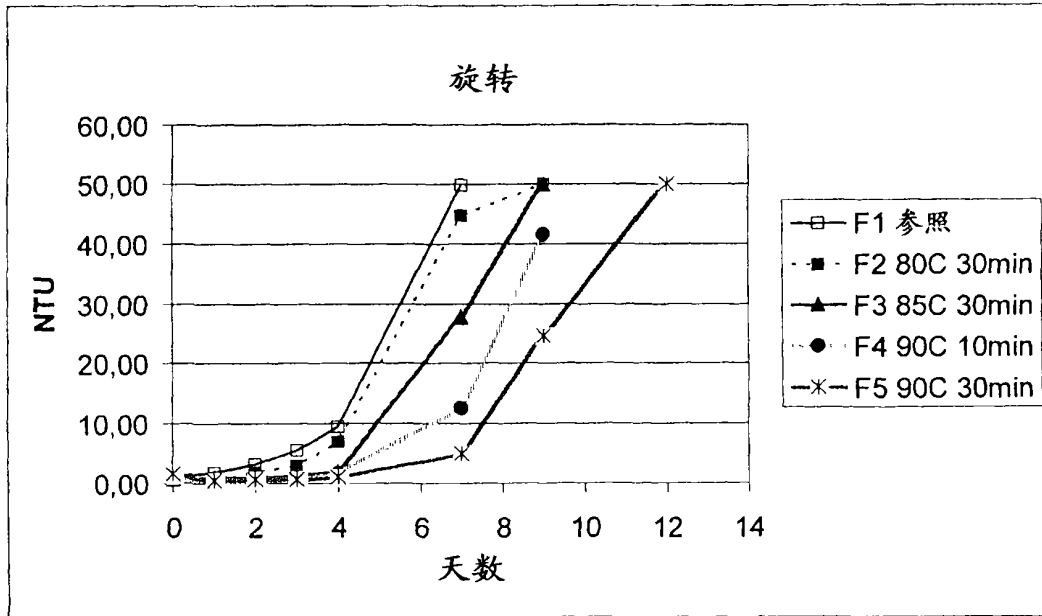


图19

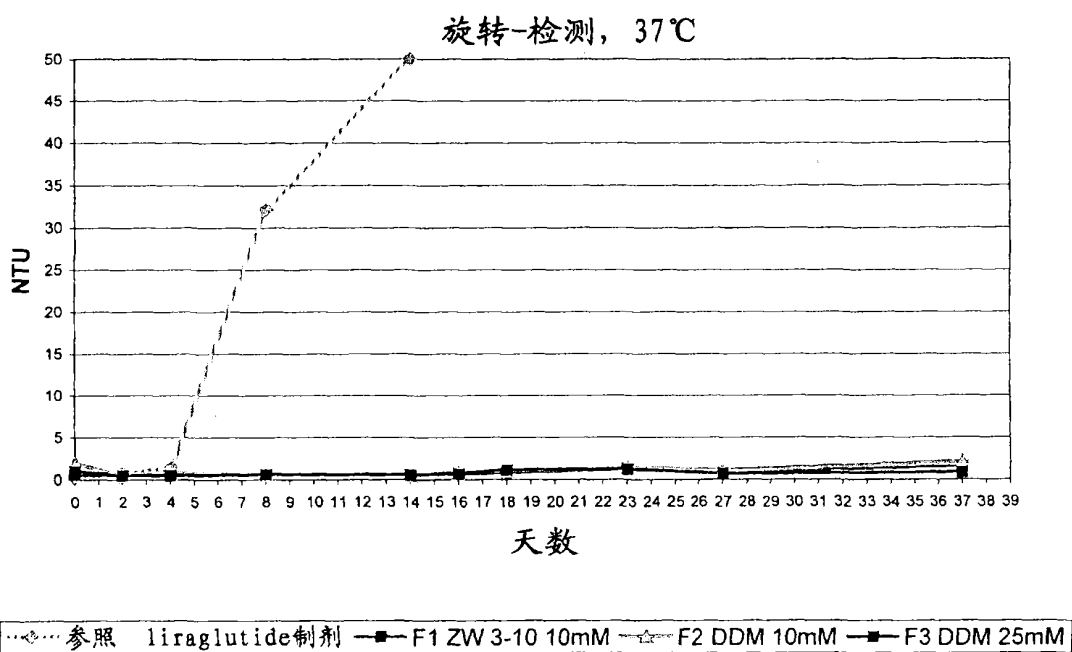


图 20

