

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 38/16

A61K 9/51

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98800400.3

[43]公开日 1999年7月14日

[11]公开号 CN 1222857A

[22]申请日 98.3.26 [21]申请号 98800400.3

[30]优先权

[32]97.4.1 [33]KR [31]1997/12046

[86]国际申请 PCT/KR98/00062 98.3.26

[87]国际公布 WO98/43664 英 98.10.8

[85]进入国家阶段日期 98.11.30

[71]申请人 株式会社 LG 化学

地址 韩国汉城

[72]发明人 金明珍 金善镇 权五龙

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

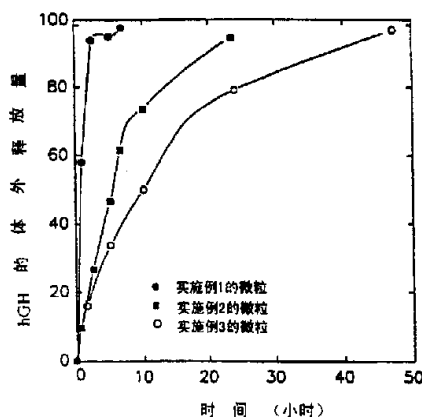
代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图页数 9 页

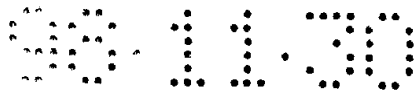
[54]发明名称 包胶在透明质酸微粒中的缓释药物组合物

[57]摘要

一种缓释药物组合物,其包括透明质酸或其无机盐的微粒以及包胶在所述微粒之中的蛋白质或肽药物,其中,所述微粒的平均粒径范围是 0.1—40 μm 。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

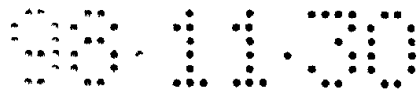
1、一种缓释药物组合物，其包括透明质酸或其无机盐的微粒以及包胶在所述微粒之中的蛋白质或肽药物，其中，所述微粒的平均粒径范围是 $0.1-40\ \mu\text{m}$ 。

2、如权利要求 1 所述的组合物，其进一步包括稳定剂。

3、如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述微粒的平均粒径为 $0.1-10\ \mu\text{m}$ 。

4、如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述药物选自：人生长激素、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、红细胞生成素、骨形态蛋白、干扰素、胰岛素、房肽素-III、单克隆抗体、TNF、巨噬细胞活化因子、白介素、肿瘤变性因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤维蛋白溶解酶原激活素、尿激酶以及它们的混合物。

5、如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述无机盐选自透明质酸的钠、钾、锂、钙、铵、镁、锌、铜和钴盐。



6、如权利要求 2 所述的组合物，其中，所述稳定剂选自多糖、蛋白质、氨基酸、脂质、脂肪酸、聚乙二醇、无机盐、表面活性剂以及它们的混合物。

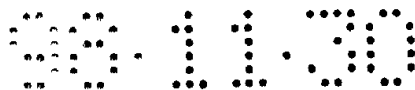
7、一种注射剂，其包括分散在注射介质中的根据权利要求 1 的缓释组合物。

8、如权利要求 7 所述的注射剂，其进一步包括分散剂或防腐剂。

9、如权利要求 7 所述的注射剂，其中，所述注射介质选自经缓冲的水溶液、乙醇、丙二醇、聚乙二醇、植物油、矿物油、角鲨烯、鱼肝油、单一、二-和三甘油酯或它们的混合物。

10、如权利要求 9 所述的注射剂，其中，所述植物油选自玉米油、橄榄油、豆油、葵花油、棉籽油、花生油、芝麻油、椰子油、蓖麻油和它们的混合物。

11、一种气雾剂，其包括根据权利要求 1 的缓释组合物。



说明书

包胶在透明质酸微粒中的缓释药物组合物

发明领域

本发明涉及包胶在透明质酸或其盐之微粒中的蛋白质或肽药物的缓释组合物，还涉及包含该组合物的注射剂。

发明背景

由于口服不易吸收，蛋白质或肽药物通常注射给药。一旦注射后，它们的体内活性仅持续较短的时间，因此，如果需要长期治疗，必须重复注射给药。例如，对患有垂体生长激素缺乏症的儿童进行治疗即是在超过 6 个月的时间中每日注射重组人生长激素。因此，在此方面非常需要无每日给药之烦的缓释制剂。

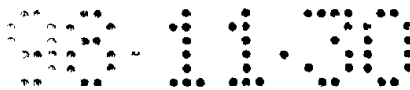
蛋白质或肽药物如人生长激素的典型缓释制剂是如下制备的：将药物包胶在可生物降解的聚合物基质材料中，随着该材料在体内降解而缓慢释放药物。在该领域，为研制出适用于缓释药物制剂的可生物降解聚合物，人们已进行了广泛而深入的研究，并发现如聚丙交酯、聚乙交酯、聚（丙交酯-共-乙交酯）、聚原酸酯和聚酞的聚酯可有效应用于此用途中（M. Chasin 和 R. Langer 等人，作为药物释放系统的可生物降解聚合物(Biodegradable Polymers as Drug Delivery System), Mercel Dekker (1990), 以及 J. Heller, Adv. Drug Del. Rev., 10, 163

(1993))。

还进行了其它的研究，以研制出使用天然聚合物如明胶、胶原、脱乙酰壳多糖、羧甲基纤维素、藻酸盐和透明质酸的缓释药物制剂。在将天然聚合物放于含水环境时通常形成凝胶，而且该类型的凝胶已由于制备缓释药物组合物，但该凝胶粘度大，药物在其中分散缓慢。

例如，第 5, 416, 017 号美国专利公开了一种红细胞生成素缓释注射制剂，该制剂采用包含 0.01—3%透明质酸的凝胶；日本专利公开 1—287041 (1989) 描述了一种胰岛素缓释注射制剂，该制剂采用以 1%透明质酸形成的凝胶；以及日本专利公开 2—00213 (1990) 披露了一种降钙素、依降钙素 (elcanonine) 或人生长激素的缓释制剂，该制剂采用包含 5%透明质酸的凝胶。类似地，Meyer 等人已研制出一种粒细胞集落刺激因子的缓释制剂，该制剂采用包含 0.5—4%透明质酸的凝胶 (James Meyer 等人, J. Controlled Release, 35, 67 (1995))。

但是，注射给药上述制剂需要使用大孔注射针，这是因为包含几个百分数透明质酸的凝胶具有 10^7 厘泊数量级的高粘度。而且，在注射进的凝胶被体液稀释后，其保持药物的能力被很快降低，其结果是，药物的缓慢释放持续不过 1 天。例如，日本专利公开 1—287041 (1989) 披露到，在向兔给药包含 1%透明质酸的胰岛素缓释注射制剂时，抑制血糖浓度的治疗作用持续不超过 24 小时。据报道，向试验动物注射包含 2%透明质酸的粒细胞集落刺激因子制剂时 (James Meyer 等人, J. Controlled Release, 35, 67 (1995))，或者包含 1.5%透明质酸的干扰素 α 和血浆蛋白制剂时 (第 5416017 号美国专利)，血药浓度也在少于



24 小时的时间内降低至低于初始浓度的十分之一。因此，基于透明质酸凝胶的药物缓释制剂具有以下严重缺陷：药物释放不能持续超过 24 小时。

天然透明质酸或其无机盐仅溶解于水中。另一方面，透明质酸苄基酯 HYAFF™ 不溶于水，但溶于有机溶剂如二甲基亚砜。包括此等疏水性透明质酸衍生物的固体微粒以及包胶在该微粒中的药物的药物组合物可通过常规乳剂-溶剂萃取法来制备 (N.S. Nightlinger 等人, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22nd, Paper No. 3205 (1995); L. Ilum 等人, J. Controlled Rel., 29, 133 (1994))。以上制备方法通常如下进行：将蛋白质药物分散在透明质酸苄基酯的二甲基亚砜溶液中，然后将所得分散液加至矿物油中，以形成溶剂。在该溶剂中加入有机溶剂如乙酸乙酯，以萃取二甲基亚砜；然后从其中回收由药物和透明质酸苄基酯组成的微粒。

但是，该方法的问题在于，蛋白质药物在与有机溶剂或与透明质酸苄基酯接触后会变性。事实上，据报道，使用完全酯化的透明质酸衍生物制备的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 微粒组合物在头几天中仅释放约 25% 的 GM-CSF，而且在 17 后没有药物释放 (N.S. Nightlinger 等人, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22nd, Paper No. 3205 (1995))。在此情况下，大部分蛋白质药物丢失，这最主要的是因为与透明质酸苄基酯和/或有机溶剂的相互作用使其变性。

发明简述

因此，本发明的目的是提供一种经改进的蛋白质或肽药物的缓释组合物。

根据本发明的一方面，所提供的缓释药物组合物包括透明质酸或其无机盐的微粒以及包胶在所述微粒之中的蛋白质或肽药物，其中，所述微粒的平均粒径范围是 0.1—40 μm 。

附图简要说明

通过以下参考附图对本发明的详细描述，本发明的上述目的或其它目的以及特征将更为显而易见，在附图中：

图 1 显示的是人生长激素（hGH）在体外的释放量随时间的变化；

图 2A 和 2B 显示的是在反相高效液相色谱法中包含 hGH 的本发明缓释组合物的稳定性（A：从本发明制剂中释放的 hGH；而 B：hGH 对照水溶液）；

图 3A 和 3B 显示的是在颗粒排阻色谱法中包含 hGH 的本发明缓释组合物的稳定性（A：从本发明制剂中释放的 hGH；而 B：hGH 对照水溶液）；

图 4 比较了用根据本发明之人生长激素缓释制剂治疗的小鼠和用常规制剂治疗的小鼠中体重增加随时间变化的曲线；

图 5 比较了用根据本发明之人生长激素缓释制剂治疗的小鼠和用常规制剂治疗的小鼠中体重增加随时间变化的曲线；

图 6 描绘了人生长激素（hGH）的血液浓度随时间的变化；以及

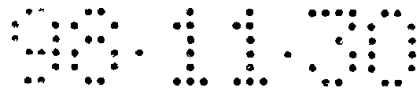


图 7 描绘了用根据本发明之人生长激素缓释制剂治疗的小鼠和用常规制剂治疗的小鼠中体重增加随时间变化的曲线。

发明详细描述

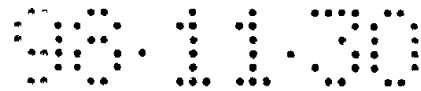
本发明的缓释组合物包括透明质酸或其盐的固体微粒以及包胶在该微粒之中的蛋白质或肽药物。本发明的组合物在释放特性和易处理性方面优于以透明质酸凝胶为基础的常规制剂。也就是说，使用本发明微粒组合物制备的注射剂由于其粘度低而更易于注射，而且该组合物在体内以恒定的速率持续更长的时间释放药物。

而且，本发明的组合物的优点还在于，药物的变性直到 100% 从组合物中释放后也不会发生。

本发明微粒组合物的平均粒径范围是 0.1—40 μm ，优选为 0.1—10 μm ，其可以通过喷雾干燥或冷冻干燥包含蛋白质或肽药物以及透明质酸或其盐的水溶液来制备。如果需要，可在该溶液中添加稳定剂。

可用于制备本发明之固体微粒组合物的药物的例子有：人生长激素、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、红细胞生成素、骨形态蛋白、干扰素、胰岛素、房肽素-III、单克隆抗体、TNF、巨噬细胞活化因子、白介素、肿瘤变性因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤维蛋白溶解酶原激活素和尿激酶。

可用于制备本发明之固体微粒组合物的透明质酸的代表性无机盐



包括钠、钾、锂、钙、铵、镁、锌、铜和钴盐。

一些可用于本发明中的稳定剂包括多糖、蛋白质、氨基酸、脂质、脂肪酸、聚乙二醇、无机盐和表面活性剂。

以组合物的重量计，本发明之微粒缓释组合物可包含 1-90 wt% 的蛋白质或肽药物，并任选地包含 1-90 wt% 的稳定剂。

以注射剂的重量计，将 0.01-10 wt% 的本发明微粒缓释组合物分散在注射介质中，由此制得本发明的缓释注射剂。如果需要，可在其中加入分散剂或防腐剂。可用于本发明之注射剂中的典型注射介质包括经缓冲的水溶液、乙醇、丙二醇、聚乙二醇、植物油、矿物油、角鲨烯、鱼肝油、单一、二-和三甘油酯或它们的混合物。

植物油的例子包括玉米油、橄榄油、豆油、葵花油、棉籽油、花生油、芝麻油和它们的混合物。

而且，还可制备包含本发明之微粒缓释组合物的气雾剂。由此制得的本发明气雾剂可施用于鼻或支气管粘膜，其中，微粒组合物以可控的方式释放药物。

以下实施例和试验例用于进一步说明本发明，而不是限制其范围。

实施例 1：微粒的制备

在包含 2 mg/ml 人生长激素(hGH)的 5 mM 磷酸盐缓冲盐水(PBS)中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 2 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温

度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.0 μm 。

实施例 2: 微粒的制备

在包含 1 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80, 至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 2,000,000 的透明质酸钠, 至浓度为 1 mg/ml。以 2 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 2.0 μm 。

实施例 3: 微粒的制备

在包含 0.1 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80, 至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 2,000,000 的透明质酸钠, 至浓度为 0.9 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 2.0 μm 。

试验例 1: 体外释放试验

分别将实施例 1、2 和 3 中制备的微粒悬浮于缓冲液 (150 mM 氯化钠、10 mM 磷酸盐和 0.05% 叠氮化钠, pH 7.4) 中, 使 hGH 的浓度为 1.0 mg/ml。将如此得到的分散液放入炉中, 然后在 37°C 的搅拌器中测试 hGH 的释放。在预定的取样时间点时, 将所得分散液于 300 g 下离心 10 分钟, 得到上清液, 然后从其中取出相当于整个分散液十分之



一的上清液部分。在该分散液中加入等量的缓冲液，并于 37°C 继续释放试验。通过 Lowry 法和高效液相色谱 (HPLC) 测定上清液部分中 hGH 的浓度，以确定 hGH 相对于时间的释放量。结果见图 1。

图 1 显示了 hGH 体外释放量随时间的变化。如图 1 所示，透明质酸的分子量越大、hGH 的含量越低，hGH 的释放速率则越慢。的确，实施例 3 中制得的微粒显示出最慢的释放速率。这些结果表明，通过调节透明质酸的分子量、hGH 含量等，可控制药物的缓释时间。而且，本发明中制备的微粒表现出恒定的体外释放速率直至 70% 的 hGH 被释放，而没有最初的大量释放。

试验例 2：微粒中 hGH 的稳定性

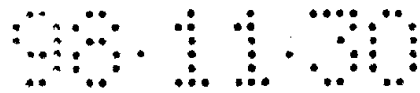
为确认本发明微粒中 hGH 是否与用于制备微粒的含水 hGH 一致，用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 和颗粒排阻色谱法 (SEC) 分析从体外释放试验的微粒中释放出的 hGH。

由于氧化和脱酰氨基作用导致的 hGH 变性可通过 RP-HPLC 来证实，结果见图 2A 和 2B。

图 2A 和 2B 证明了在 RP-HPLC 中本发明包含 hGH 的缓释组合物的稳定性，其中，图 2A 是从本发明制剂中释放的 hGH 的 RP-HPLC 曲线，而图 2B 是 hGH 对照水溶液的。

由于聚集作用导致的 hGH 变性可通过 SEC 来证实，结果见图 3A 和 3B。

图 3A 和 3B 证明了在 SEC 中本发明包含 hGH 的缓释组合物的稳



定性，其中，图 3A 是从本发明制剂中释放的 hGH 的 SEC 曲线，而图 3B 是 hGH 对照水溶液的。

如图 2A、2B、3A 和 3B 所示，从本发明组合物中释放的 hGH 与 hGH 对照水溶液一致，而且 hGH 单体的含量超过 95%。这些结果表明，在制备本发明微粒组合物和其 37°C 释放的过程中没有发生 hGH 的变性。

试验例 3：体内释放试验

在该试验中使用具有低生长激素分泌之遗传的小鼠，以检查本发明微粒的缓释性质。

将实施例 1 中制备的缓释微粒分散于丙二醇和乙醇（7：3 体积比）的混合物中，使 hGH 的浓度为 5 mg/ml。用缓冲水溶液（150 mM 氯化钠和 10 mM 磷酸盐，pH 7.4）稀释所得分散液，使 hGH 的浓度为 0.5 mg/ml。

将 18 只平均体重为 103 g 的七周龄小鼠分为 3 组，每组 6 只。第 1 组的小鼠经皮下注射每日给药 0.1 ml 如上制得的微粒分散液（相当于 50 μ g hGH），共 2 周（试验组）。第 2 组小鼠在相同条件下给药 Eutropin[®]——一种市售注射水溶液用的 hGH 制剂（比较组）。第 3 组小鼠不给药 hGH（未经治疗的对照组）。每日称量小鼠，以检查它们体重的变化。

图 4 比较了试验组、比较组和对照组之小鼠体重增加随时间的变化。

如图 4 所示，试验组的小鼠在 2 周的时间内体重持续增加，大于比较组和对照组的增加。这些结果表明，本发明微粒制剂由于其缓释性质而比常规制剂更有效。

试验例 4：体内释放试验

将实施例 2 中制得的缓释微粒分散于棉籽油中，使 hGH 的浓度为 1.5 mg/ml。

将 24 只平均体重为 105 g 的七周龄小鼠分为 4 组，每组 6 只。第 1 组的小鼠经皮下注射每三天给药 0.1 ml 如上制得的微粒分散液（相当于 150 μ g hGH），共 2 周（试验组）。第 2 组小鼠在相同条件下给药 Eutropin[®]（比较组 1）。第 3 组小鼠每日给药相当于 50 μ g hGH 的 Eutropin[®]，共 2 周（比较组 2）。第 4 组小鼠不给药 hGH（未经治疗的对照组）。每日称量小鼠，以检查它们体重的变化。

图 5 比较了试验组、比较组和对照组之小鼠体重增加随时间的变化。

如图 5 所示，试验组的小鼠显示出与比较组和对照组相比更大的体重增加。比较组 1 的小鼠在第 1 天表现出明显的体重增加，但在给药后的第 2 和 3 天，该组的小鼠与对照组相比体重增加较慢。试验组和比较组 2 的小鼠表现出连续的体重增加。这些结果表明，本发明微粒制剂至少可以保持 3 天的有效缓释性质。

试验例 5: 体内释放试验

将实施例 2 中制得的缓释微粒分散于棉籽油中, 使 hGH 的浓度为 1.5 mg/ml。将 8 只平均体重为 2.5 kg 的兔分为 2 组, 每组 4 只。第 1 组的兔注射给药相当于 3700 μ g hGH 的如上制得的微粒分散液 (试验组)。第 2 组兔不给药 hGH (对照组)。

给药后, 在 6 天的时间内从兔中采取血样。

用 RIA (放射免疫分析) 定量血样中的 hGH 量。

图 6 描绘了人生长激素的血液浓度随时间的变化。

如图 6 所示, 血液中 hGH 的量在给药后的 4 天时间内维持在 0—11 ng/ml 的范围内, 然后在第 5 天后逐渐降低。该结果表明, 本发明的微粒组合物在 4 天的时间内具有恒定的释放速率, 其后释放速率逐渐降低。该结果与试验例 1 的结果一致, 其中, hGH 的体内释放速率呈线性, 直至 70% 的 hGH 被释放。相反地, 对照组中 hGH 的血液浓度在 RIA 法可检测出的浓度 (1 ng/ml) 以下, 因而可以忽略。

实施例 4: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 2 mg/ml 牛生长激素 (bST) 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80, 至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠, 至浓度为 2 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.0 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之 bST 的稳定性。

用 SEC 对所释放的 bST 进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 85% 的 bST，而且 bST 的变性没有发生。

实施例 5: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 2 mg/ml 猪生长激素 (pST) 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 2 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.0 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之 pST 的稳定性。

用 SEC 对所释放的 pST 进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 90% 的 pST，而且 pST 的变性没有发生。

实施例 6: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 0.4 mg/ml 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80, 至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠, 至浓度为 1.6 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.0 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验, 并根据试验例 2 的方法测试所释放之 GM-CSF 的稳定性。

用 SEC 对所释放的 GM-CSF 进行定量和定性。其结果是, 在 72 小时释放了超过 92% 的 GM-CSF, 而且 GM-CSF 的变性没有发生。

实施例 7: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 1000 IU/ml 红细胞生成素 (EPO) 和 0.5 mg/ml 血清白蛋白的 5 mM PBS 中加入 Tween 80, 至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠, 至浓度为 2.5 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.5 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之 EPO 的稳定性。

用 SEC 对所释放的 EPO 进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 70% 的 EPO，而且 EPO 的变性没有发生。

实施例 8: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 2×10^5 IU/ml 干扰素- α 、0.2 mg/ml D-甘露醇和 0.2 mg/ml 血清白蛋白的 5 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 2.5 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 105°C。如此制得的微粒的平均直径为 3.5 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之干扰素- α 的稳定性。

用 RP-HPLC 对所释放的干扰素- α 进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 90% 的干扰素- α ，而且干扰素- α 的变性没有发生。

实施例 9：微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 2×10^5 IU/ml 干扰素- γ 、0.2 mg/ml 甘氨酸和 0.2 mg/ml 血清白蛋白的 5 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 2.5 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 105℃。如此制得的微粒的平均直径为 3.5 μ m。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之干扰素- γ 的稳定性。

用 RP-HPLC 对所释放的干扰素- γ 进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 85% 的干扰素- γ ，而且干扰素- γ 的变性没有发生。

实施例 10：微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 20 IU/ml 胰岛素的 10 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入分子量为 1,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 2 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85℃。如此制得的微

粒的平均直径为 $3.0\ \mu\text{m}$ 。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之胰岛素的稳定性。

用 RP-HPLC 对所释放的胰岛素进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 95% 的胰岛素，而且胰岛素的变性没有发生。

实施例 11: 微粒的制备和体外释放试验

(步骤 1) 微粒的制备

在包含 $2\ \text{mg/ml}$ 胰岛素样生长因子的 $5\ \text{mM}$ PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 $0.01\ \text{wt}\%$ 。在其中加入分子量为 $1,000,000$ 的透明质酸钠，至浓度为 $2\ \text{mg/ml}$ 。以 $3\ \text{ml/min}$ 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 $85\ ^\circ\text{C}$ 。如此制得的微粒的平均直径为 $3.0\ \mu\text{m}$ 。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的微粒进行体外释放试验，并根据试验例 2 的方法测试所释放之胰岛素样生长因子的稳定性。

用 RP-HPLC 对所释放的胰岛素样生长因子进行定量和定性。其结果是，在 72 小时释放了超过 90% 的胰岛素样生长因子，而且胰岛素样生长因子的变性没有发生。

比较例 1：凝胶制剂的制备和体外释放试验

(步骤 1) 凝胶制剂的制备

在包含 2.3 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入分子量为 2,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 20 mg/ml，制得包含 hGH 的 2%透明质酸钠凝胶制剂。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的方法用上述步骤 1 制得的凝胶制剂进行体外释放试验。其结果是，在 1 小时内释放了 100%的 hGH。该结果表明，因为很容易被水稀释，凝胶制剂在比本发明微粒更短的时间内释放出药物。

比较例 2：凝胶制剂的制备和体内释放试验

(步骤 1) 凝胶制剂的制备

在包含 1.5 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入分子量为 2,000,000 的透明质酸钠，至浓度为 20 mg/ml，制得包含 hGH 的非流体透明质酸钠凝胶制剂。

将 1 ml 以上制得的凝胶制剂分散在 2 ml 棉籽油中，然后均化该混合物，以形成乳剂。

(步骤 2) 体内释放试验

将 24 只平均体重为 95 g 的七周龄小鼠分为 4 组，每组 6 只。第 1 组的小鼠经皮下注射给药 0.3 ml 步骤 1 制得的乳剂（相当于 150 μ g hGH）（组 1）。

为比较该乳剂制剂与其它制剂的效用，其它两个组的小鼠分别给药以下物质：包含在实施例 2 中制得的缓释微粒的分散液，该微粒分散在棉籽油中，使 hGH 的浓度为 150 μ g（组 2）；相当于 150 μ g hGH 的 Eutropin[®]（组 3）。最后一组小鼠不给药 hGH 制剂（对照组）。给药后，每日观察小鼠体重增加的变化，共 6 天。

图 7 描绘了用本发明之人生长激素缓释制剂治疗的小鼠与用常规制剂治疗的小鼠相比体重增加随时间变化的曲线。其结果是，用透明质酸凝胶制剂治疗的小鼠的体重增加随时间变化的曲线与 Eutropin[®]组类似。也就是说，用透明质酸凝胶制剂治疗的小鼠的体重在给药后 2 或 3 天降低，与对照组小鼠的类似。但是，用本发明制剂治疗的小鼠组表现出连续的体重增加，在 6 天的时间内高于其它组 150%。

比较例 3：使用羧甲基纤维素钠制备微粒制剂以及体内和体外释放试验

(步骤 1) 制备微粒制剂

在包含 0.2 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。在其中加入羧甲基纤维素钠（Na-CMC，中等粘度级别），至浓度为 1.8 mg/ml。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机（Buchi 190）中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85 $^{\circ}$ C。如此制得

的微粒的平均直径为 $3.0\ \mu\text{m}$ 。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的步骤测试在上述步骤 1 中制得的微粒制剂，结果见表 1。

表 1

时间 (小时)	0	1	3	5	7	24	48	72	144
HGH 的释放量 (%)	0	32	40	48	52	57	63	65	65

如表 1 所示，步骤 1 中制得的微粒制剂的体外释放随时间变化的曲线与本发明的微粒不同。也就是说，该制剂表现出不平衡的释放模式，在最开始的 1 小时内释放了超过 30% 的 hGH，到 48 小时才又释放了 30%，而且之后几乎没有释放任何 hGH。这些结果表明，药物的释放模式由于蛋白质药物与基质之间的相互作用而变得不平衡，而且在使用比透明质酸具有更强疏水性的天然糖类聚合物作为基质材料时，药物变性的可能性非常大。

(步骤 3) 体内释放试验

将步骤 1 中制得的微粒制剂分散在棉籽油中。以每只 $300\ \mu\text{g}$ hGH 的量向 7 周龄小鼠给药所得分散液，而未给药组作为对照组。在 7 天的时间内观察小鼠体重增加，累积体重增加的结果见表 2。

表 2

时间 (天)	1	2	3	4	5	6	7
对照组	0.6	0.8	3.3	5.5	7.6	6.7	7.4
Na-CMC 制剂组	5.2	3.3	6.4	8.3	10.5	9.4	9.0

如表 2 所示，用步骤 1 中制得的微粒治疗的小鼠表现出与用比较例 2 中制得的透明质酸凝胶制剂治疗的小鼠类似的体重增加模式。也就是说，它们仅在第 1 天表现出体重增加，而且其体重在第 2 天降低。另外，在此之后，它们的体重增加速率低于对照组的，并最终在第 7 天具有与对照组类似的体重增加。这些结果表明，虽然 Na-CMC 与透明质酸一样也是天然糖类聚合物，但 Na-CMC 制剂具有较差的释放性质，并且低于本发明透明质酸微粒。

比较例 4：使用透明质酸苄基酯制备微粒制剂以及体内和体外释放试验

(步骤 1) 制备微粒制剂

使天然透明质酸和苯甲醇进行化学反应，以制备透明质酸苄基酯，然后如下所述制备包含 hGH 的微粒。

在包含 2 mg/ml hGH 的 5 mM PBS 中加入 Tween 80，至浓度为 0.01 wt%。以 3 ml/min 的速率将所得溶液送入喷雾干燥机 (Buchi 190) 中以制备微粒。流入喷雾干燥机中的空气温度是 85℃。如此制得的微粒的平均直径为 2.5 μm。

将如此制得的颗粒分散在包含 6%透明质酸苄基酯的二甲基亚砷 (DMSO) 中, 将所得分散液加至包含表面活性剂——Aracel ATM (ICI, USA) 的矿物油中, 然后均化该混合物, 以形成微乳剂。所得微乳剂由矿物油的连续相和在其中分散有 hGH 的透明质酸苄基酯/DMSO 溶液分散相组成。

在如此制得的微乳剂中加入乙酸乙酯, 并搅拌, 用乙酸乙酯萃取 DMSO, 使透明质酸苄基酯硬化, 产生包含 hGH 颗粒的透明质酸苄基酯颗粒。如此制得的最终颗粒的平均直径为 5.5 μ m, hGH 含量为 45%。

(步骤 2) 体外释放试验

根据试验例 1 的步骤测试在上述步骤 1 中制得的微粒制剂, 结果见表 3。

表 3

时间 (小时)	0	1	3	5	7	24	48	72	144
hGH 的释放量 (%)	0	15	21	23	25	27	28	30	30

如表 3 所示, 在使用透明质酸苄基酯而使天然透明质酸具有疏水性时, 由此制得的微粒在开始 5 小时几乎不释放 hGH。不释放 hGH 的原因是由于蛋白质药物 (hGH) 和透明质酸苄基酯基质之间的相互作用太强。

(步骤3) 体内释放试验

将步骤1中制得的微粒制剂分散在棉籽油中。以每只 $300\mu\text{g}$ hGH 的量向7周龄小鼠给药所得分散液，而未给药组作为对照组。在7天的时间内观察小鼠体重增加，累积体重增加的结果见表4。

表4

时间(天)	1	2	3	4	5	6	7
A	1.2	2.3	3.6	5.7	6.6	7.3	8.2
B	3.6	2.7	5.4	6.3	7.1	8.4	8.0

A: 对照组

B: 透明质酸苄基酯微粒制剂组

如表4所示，透明质酸苄基酯微粒制剂在第1天后几乎没有效用。

虽然根据上述具体实施方案对本发明进行了描述，但应认识到，还可对本发明进行各种修改和改进，而且这些修改和改进仍在以下权利要求书所限定的本发明范围之内。

说明书附图

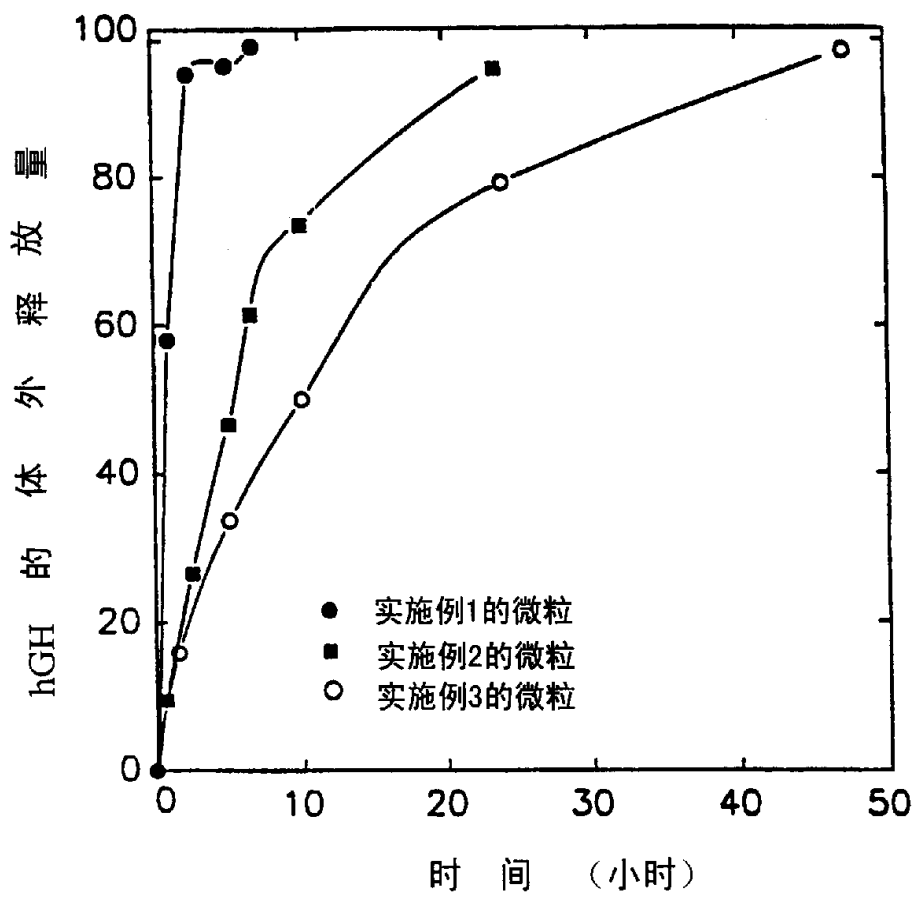


图 1

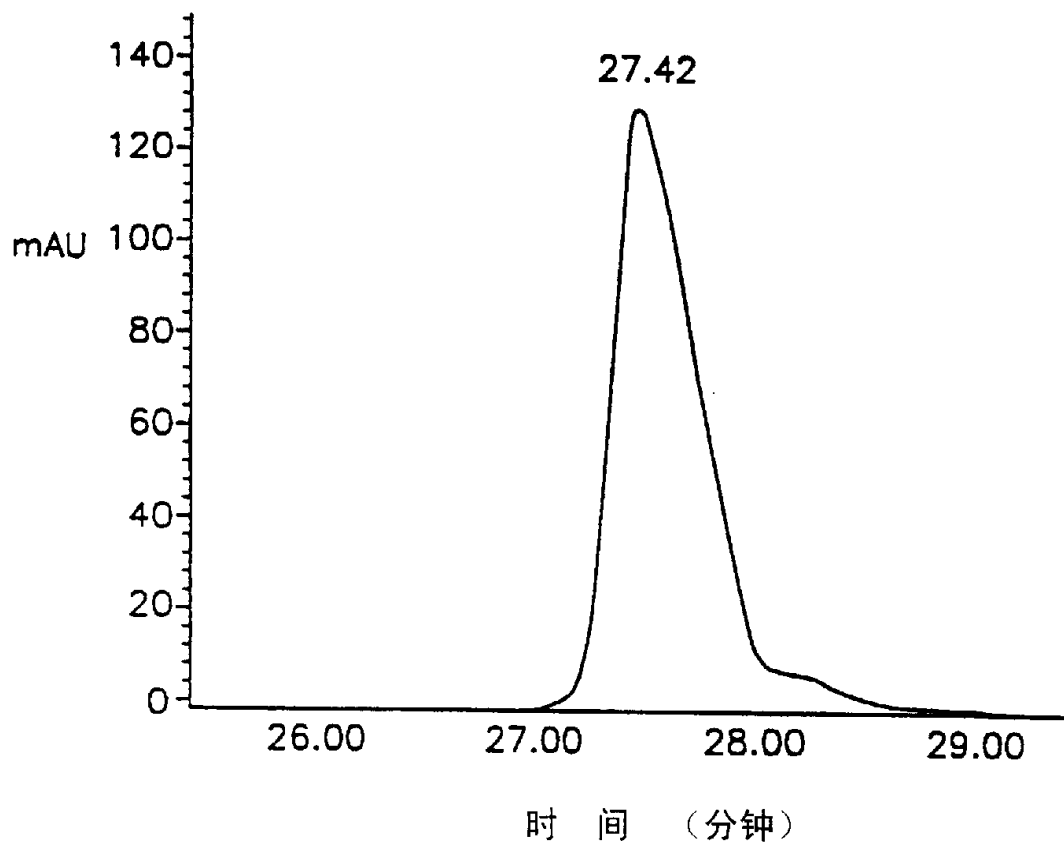


图 2A

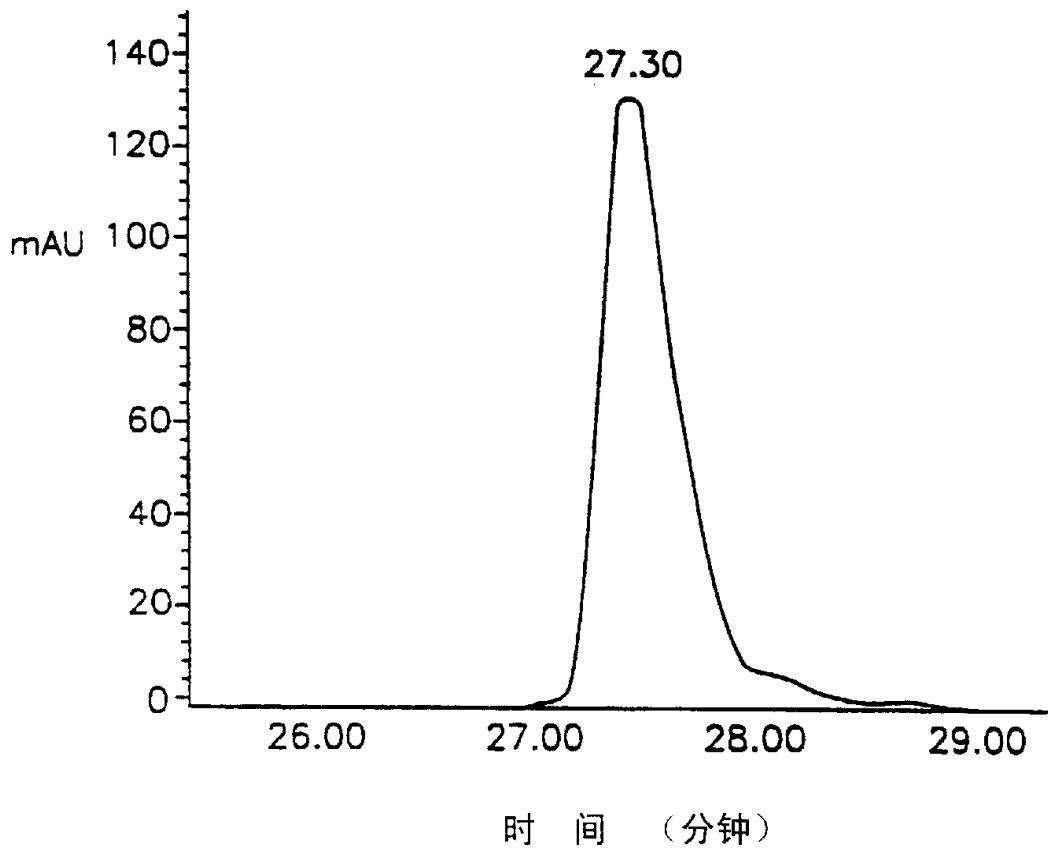
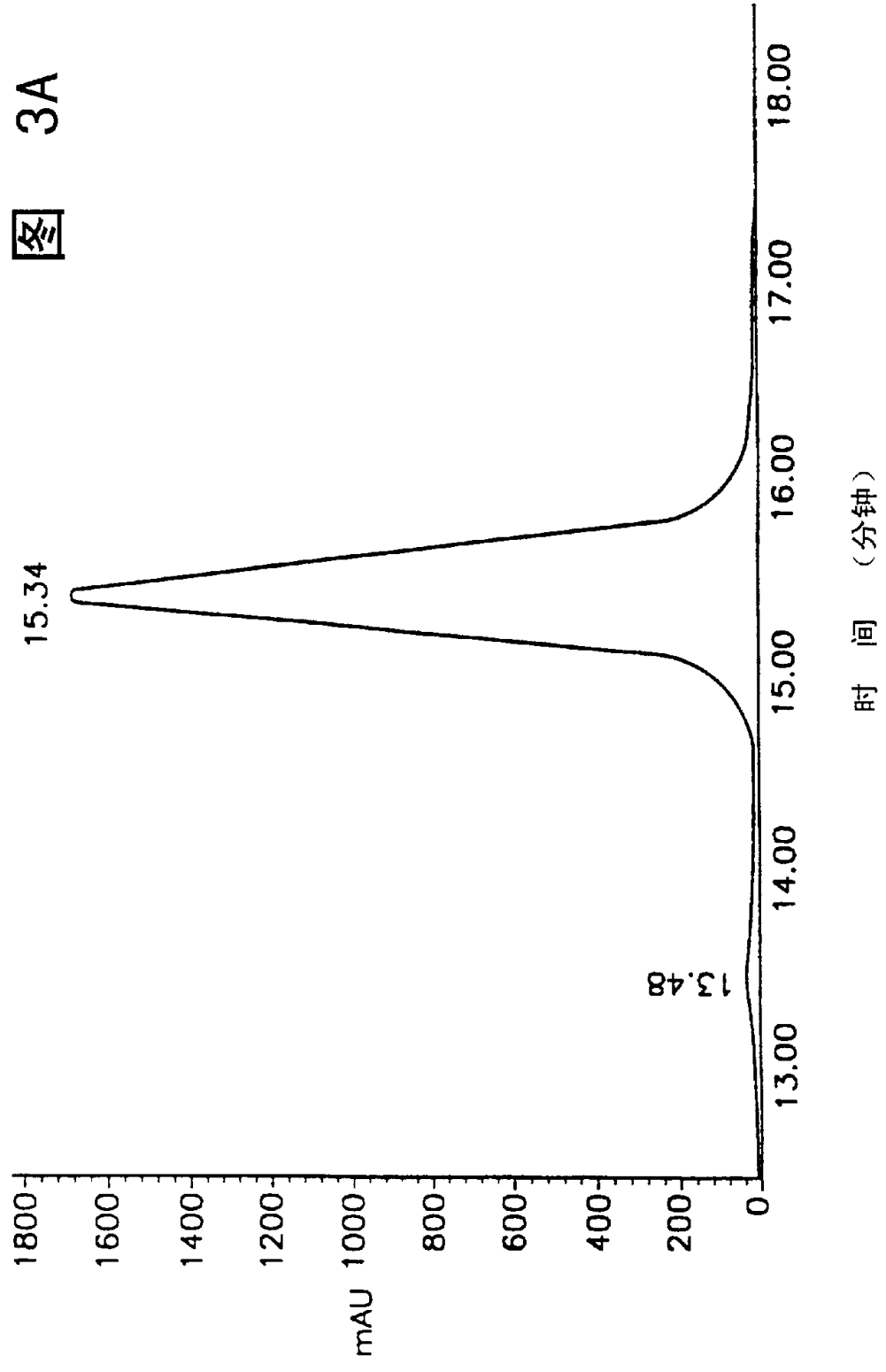


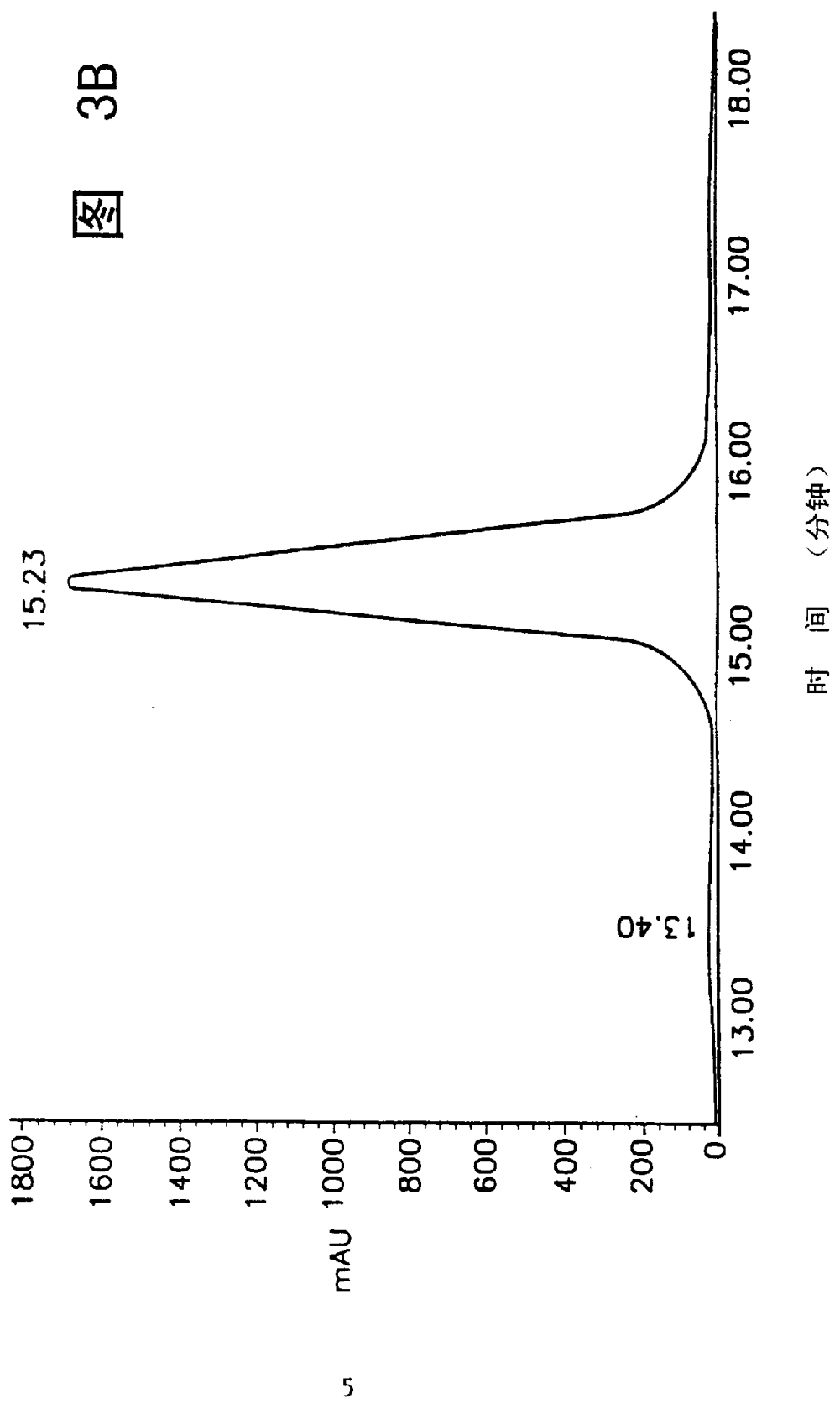
图 2B

13



3A

3.3.3



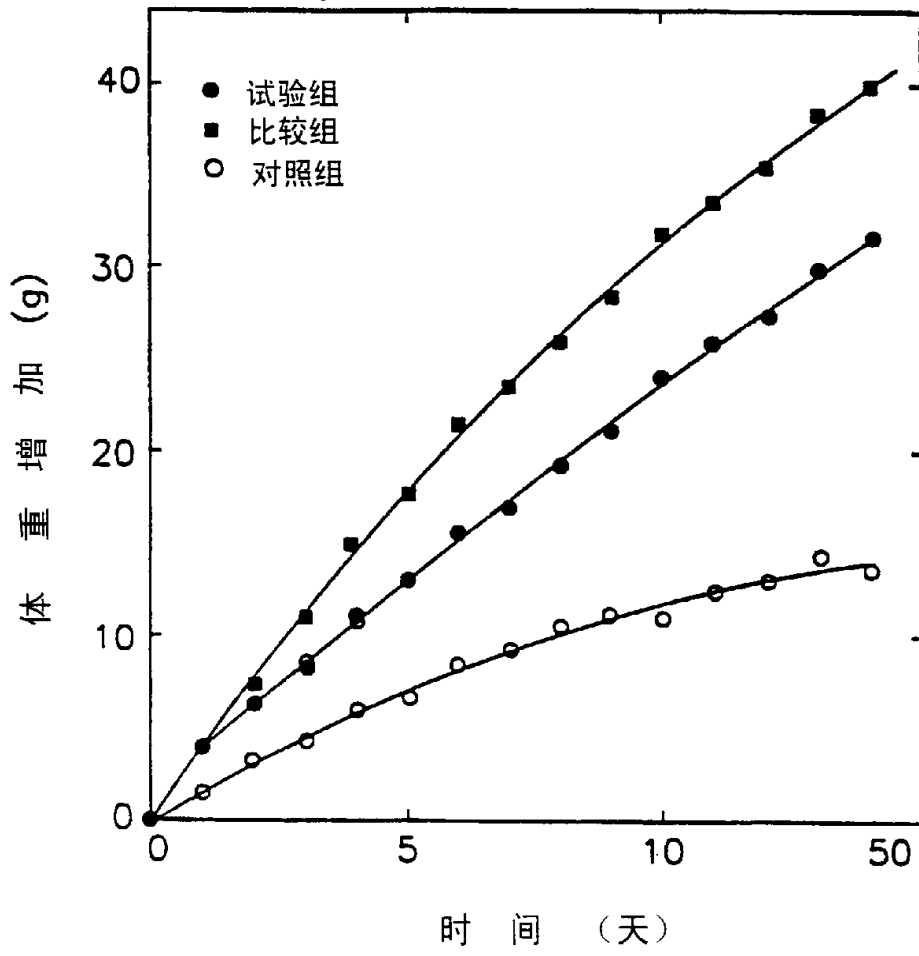


图 4

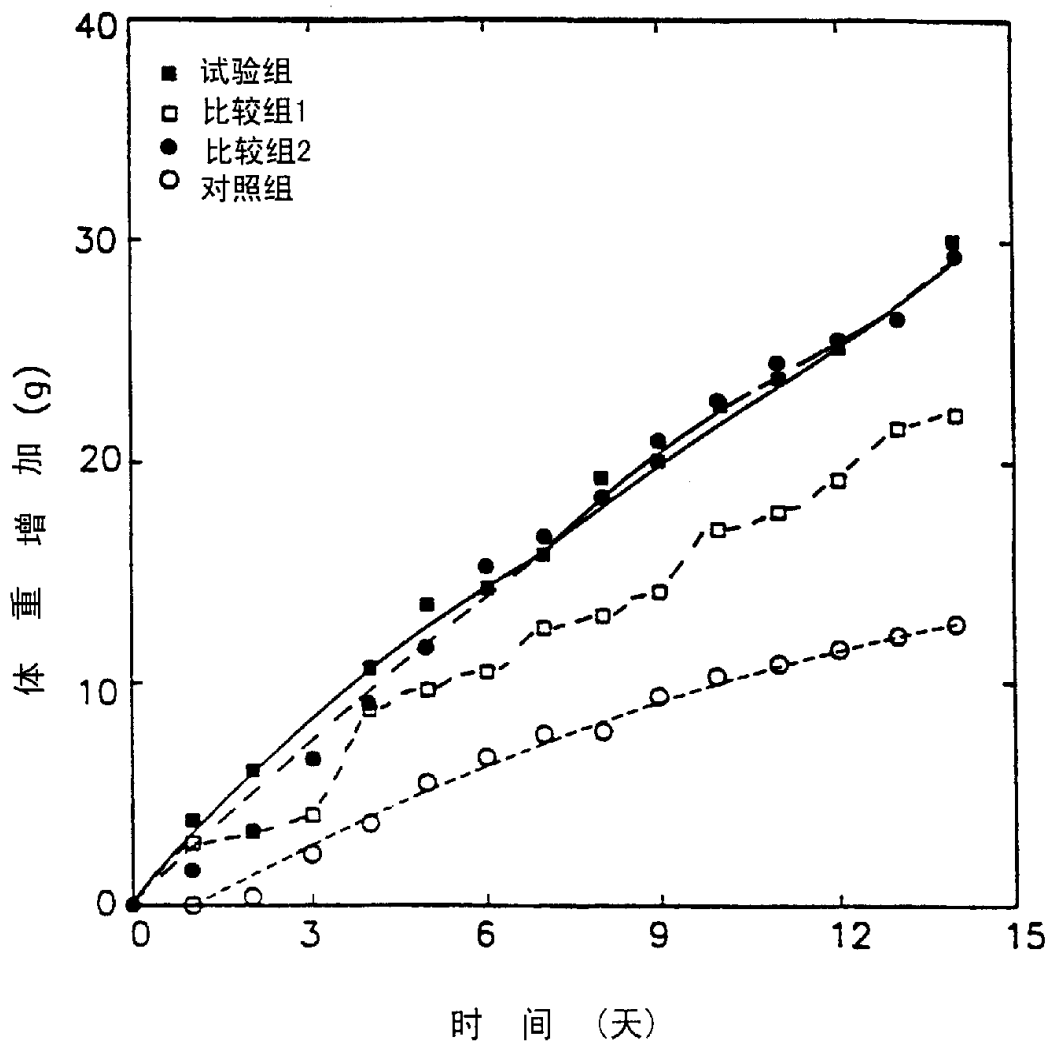


图 5

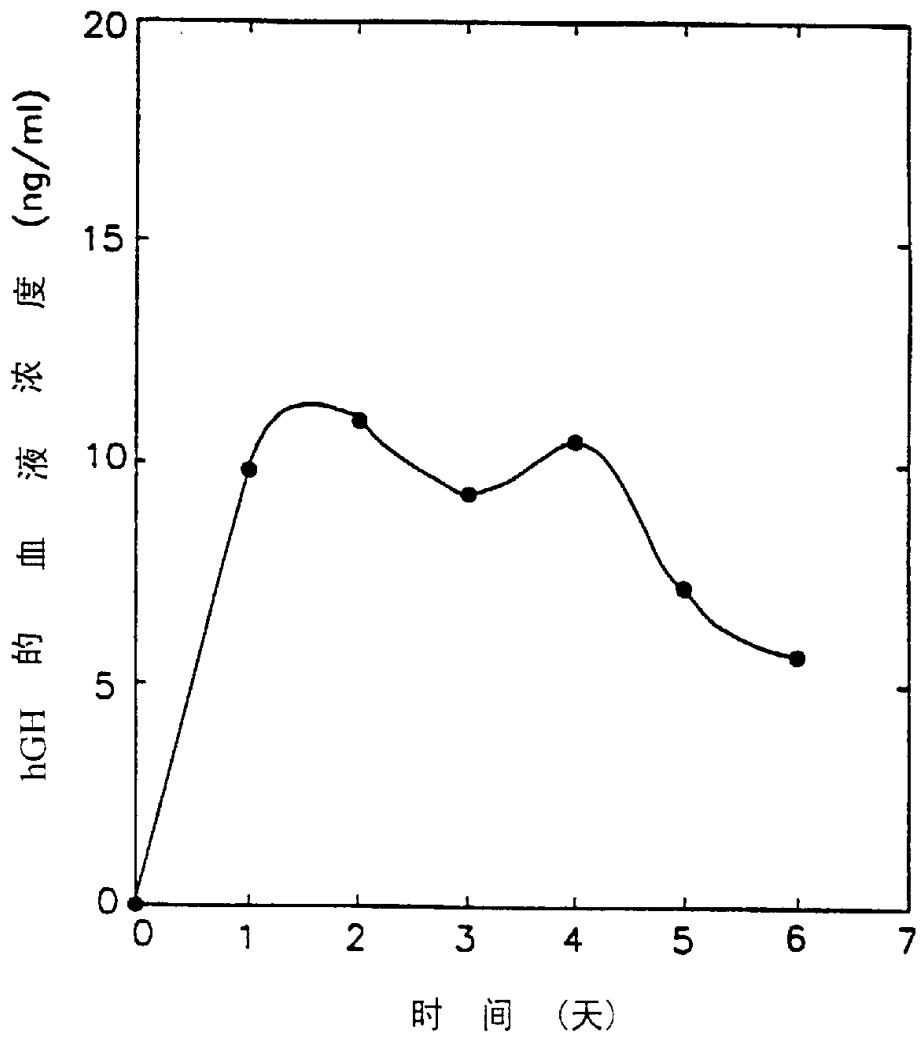


图 6

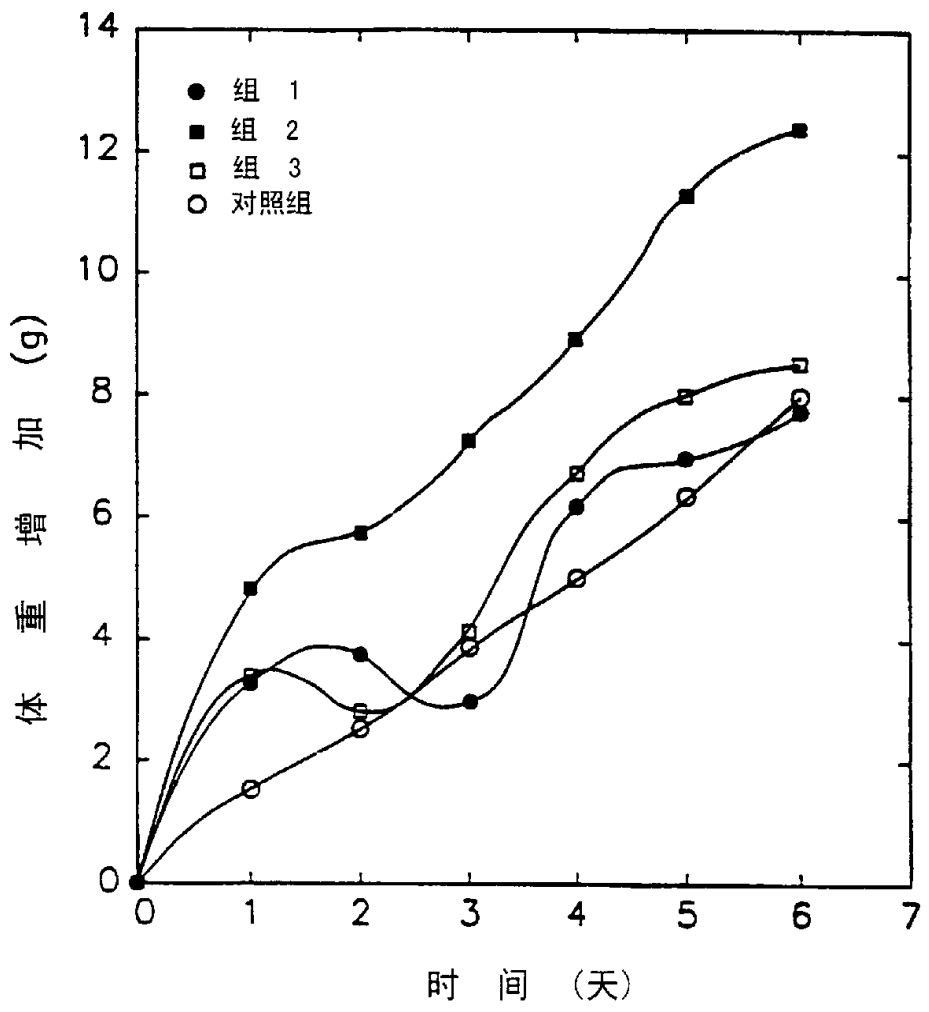


图 7