

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/50

A61K 38/00 A61K 39/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00800043.3

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1142772C

[22] 申请日 2000.1.14 [21] 申请号 00800043.3

[30] 优先权

[32] 1999.1.18 [33] KR [31] 1232/1999

[32] 1999.12.21 [33] KR [31] 59776/1999

[86] 国际申请 PCT/KR00/00025 2000.1.14

[87] 国际公布 WO00/41682 英 2000.7.20

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.18

[71] 专利权人 株式会社 LG 化学

地址 韩国汉城

[72] 发明人 金明珍 金善镇 权奎灿 金浚

审查员 周静

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

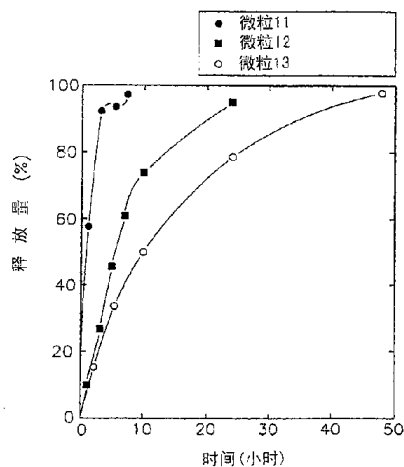
代理人 过晓东

权利要求书 4 页 说明书 34 页 附图 3 页

[54] 发明名称 含有蛋白质药物或抗原的亲脂性微粒以及包含该微粒的制剂

[57] 摘要

一种平均粒径范围为 0.1 - 200 μm 的亲脂性微粒，其含有亲脂性物质以及选自蛋白质或肽类药物和抗原的活性成分，该微粒保留了活性成分的全部活性，而且当配制成油分散液或水包油型乳剂后，其以控释方式在较长时间内释放活性成分到体内环境中。



1、一种平均粒径范围为 0.1—200 μm 的亲脂性微粒，其包括亲脂性物质、透明质酸或其无机盐、以及活性成分，所述亲脂性物质选自于以下组中：脂类、脂类衍生物、脂肪酸、脂肪酸衍生物、蜡、以及它们的混合物，而所述活性成分选自于以下组中：蛋白质药物、肽类药物和抗原。

2、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，平均粒径在 1—50 μm 范围内。

3、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，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、促红细胞生成素、骨形态发生蛋白、干扰素、胰岛素、心房肽激素-III、单克隆抗体、肿瘤坏死因子、巨噬细胞激活因子、白介素、肿瘤降解因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤溶酶原激活物和尿激酶。

4、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，抗原得自于：一种或多种选自 4 和 7 型腺病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、A 和 B 型流感病毒、日本乙型脑炎病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、水痘病毒、黄热病病毒和人免疫缺陷病毒的病原体；一种或多种选自百日咳博德特氏菌、布氏疏螺旋体、产肠毒的大肠杆菌、b 型流感嗜血菌、麻风分

· 枝杆菌、结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌 A 和 C、脑膜炎奈瑟氏球菌 B、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌、伤寒沙门氏菌、志贺氏菌属、肺炎链球菌和霍乱弧菌的病原体；一种或多种选自粗球孢菌、利什曼虫属和疟原虫属的病原体；或者一种或多种导致下类疾病的病原体：牛黑腿病、牛流行性发热、牛炭疽病、牛 Akabane's 病、牛口蹄病、牛乳腺炎、牛感染性鼻呼吸道炎症、牛病毒性腹泻、牛感染性胃肠炎、猪霍乱、猪流行性腹泻、猪萎缩性胃炎、pavovirus 导致的猪病、轮状病毒导致的猪肠炎、鸡新城病、鸡 Marek's 病、鸡脑脊髓炎、狂犬病、犬瘟热、微细小病毒导致的狗肠炎和狗感染性肝炎，抗原是减毒的、灭活的或重组的抗原；或者从病原体中提取出来的 DNA、RNA、质粒、CpG DNA 或寡核苷酸。

5、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，脂类是卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺或磷脂酰丝氨酸，而脂类衍生物是花生四烯酰基磷脂酰胆碱或硬脂酰基磷脂酰胆碱。

6、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，脂肪酸是肉豆蔻酸、棕榈酸或硬脂酸，而脂肪酸衍生物是硬脂酸甘油酯、脱水山梨醇棕榈酸酯、脱水山梨醇硬脂酸酯、脱水山梨醇单油酸酯或聚山梨酸酯。

7、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其中，透明质酸的无机盐是透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸铵、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌或透明质酸钴。

8、如权利要求 1 所述的亲脂性微粒，其进一步含有水溶性赋形剂。

9、如权利要求 8 所述的亲脂性微粒，其中，水溶性赋形剂选自碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂肪酸、无机盐、表面活性剂、聚乙二醇、和它们的混合物。

10、一种分散液，其通过将权利要求 1 的亲脂性微粒分散到亲脂性介质中来制备。

11、如权利要求 10 所述的分散液，其中，亲脂性介质是食用油、矿物油、角鲨烯、角鲨烷、鱼肝油、单-、双-、或三甘油酯、或它们的混合物。

12、如权利要求 11 所述的分散液，其中，食用油是玉米油、橄榄油、大豆油、红花油、棉子油、花生油、芝麻油、葵花子油、或它们的混合物。

13、如权利要求 10 所述的分散液，其中，亲脂性介质进一步含有一种分散剂或一种防腐剂。

14、如权利要求 10-13 之一所述的分散液，其是用于注射或口服给药。

15、一种含有水基注射介质以及如权利要求 10 所述的分散液的水包油型乳剂。

16、如权利要求 15 所述的水包油型乳剂，其中，水基注射介质是蒸馏水或缓冲液。

17、如权利要求 15 所述的水包油型乳剂，其中，活性成分是抗原，水基注射介质进一步含有第二种抗原。

18、一种气雾剂，其含有如权利要求 1 所述的亲脂性微粒。

含有蛋白质药物或抗原的亲脂性微粒以及包含该微粒的制剂

发明领域

本发明涉及用亲脂物质包衣的微粒，其含有蛋白质药物或抗原，以及使所述药物或抗原在体内有效传送的其缓释制剂。

发明背景

众所周知蛋白质药物或抗原存在由于热、有机溶剂和/或不适 pH 导致的变性问题（Weiqi Lu 等，PDA J. Pharm. Sci. Tech., 49, 13-19 (1995)）。它们通常通过注射给药；然而，由于给药后它们的体内活性仅持续很短时间，所以，如果需要长期治疗，必须反复给药。例如，对于治疗垂体缺陷性儿童矮小症，必须每日或每两日注射人生长激素（hGH），持续 6 个月或更长时间。因此，已花费很多努力研制蛋白质药物或抗原的有效缓释制剂。

例如，进行大量研究研制一种缓释微粒制剂，其通过用合成的生物可降解聚合物，例如，聚丙交酯、聚乙交酯、丙交酯-乙交酯共聚物、聚原酯或聚酐，包衣蛋白质药物或抗原制备，其随着聚合物在体内的降解连续释放药物或抗原（M. Chasin 和 R. Langer 编，“作为药物传送系统的生物可降解聚合物”一书，Marcel Dekker (1990)；以及 Heller, J., 药物传送进展综述 (Adv. Drug Del. Rev.) 10, 163 (1993)）。虽然这类制剂具有某些优点，但它存在严重的问题，即在该制剂制备过程中，当药物或抗原与有机溶剂接触时会发生变性（Park, T. G.等，

控释杂志 (J. Control. Rel.) 33, 211-223 (1995))。有机溶剂的应用是不可避免的, 因为生物可降解聚合物只溶解于有机溶剂, 例如, 二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈、氯仿或丙酮。

为了避免药物或抗原与有机溶剂的这类不期望的接触, Lee 等制备了一种微粒, 他用水溶性聚合物包衣抗原得到一种初级颗粒; 然后将初级颗粒分散于含有生物可降解聚合物的有机溶剂中; 最后干燥产生的分散体得到终微粒 (Lee, H.K.等, 控释杂志, 44, 283-294 (1997); 和美国专利 No.5,753,234)。然而, 制备该微粒的过程复杂且不经济。

还有人试图研制含有天然聚合物的缓释制剂, 例如明胶、胶原蛋白、脱乙酰壳多糖、羧甲基纤维素、海藻酸盐或透明质酸。天然聚合物容易吸水形成具有高粘度的凝胶, 其缓慢释放药物或抗原。例如, 美国专利 No. 5416017 公开了一种含有 0.01—3%透明质酸凝胶的促红细胞生成素的缓释注射制剂; 日本专利公开 No. 1-287041 (1989) 公开了一种含有 1%透明质酸凝胶的胰岛素缓释注射剂; 日本专利公开 No. 2-213 (1990) 公开了一种含有 5%透明质酸凝胶的降钙素或人生长激素缓释制剂; Meyer, J.等 (控释杂志, 35, 67 (1995)) 公开了一种含有 0.5—4%透明质酸凝胶的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的缓释制剂。

这些透明质酸凝胶制剂具有缓释作用, 因为蛋白质药物缓慢地从高粘度凝胶基质中穿过。然而, 含有浓度为几个%透明质酸的凝胶具有高粘度, 例如, 数量级为 10^5 — 10^7 厘泊, 这使得其注射较为困难。另外, 因为药物和透明质酸均溶解于水, 所以注射后透明质酸制剂容易被体液稀释, 随后药物通常在一天内快速释放。例如, 日本专利公开 No. 1-287041 (1989) 公开到, 当将含有胰岛素的 1%透明质酸凝胶制剂注射兔后, 降低血糖水平的作用持续仅 24 小时; Meyer, J.等 (见

上)和美国专利 No. 5,416,017 公开到,当将含有 G-CSF 的 2%透明质酸凝胶制剂和含有干扰素- α 以及血清蛋白的 1.5%透明质酸凝胶制剂给动物给药后,这些蛋白质药物的血液水平在 24 小时内骤降至初始水平的 1/10 以下。

透明质酸苯甲酯 (HYAFF™, Fidia S.P.A.), 一种通过苯甲醇酯化天然透明质酸制备的合成酯,不溶于水,但溶于有机溶剂,例如二甲亚砜 (DMSO)。已经通过乳液-溶剂提取法制备了含有蛋白质药物的固体透明质酸苯甲酯微粒制剂 (Nightlinger, N.S.等, *Proceed. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 第 22 届,文献号 3205 (1995); 和 Ilum, L.等, *控释杂志*, 29, 133 (1994)), 其通过如下方法操作:将透明质酸苯甲酯溶解于 DMSO 中;使蛋白质药物在得到的溶液中分散;将得到的分散体加到矿物油中形成一种乳剂;然后向乳剂中加入一种与 DMSO 混溶的溶剂,例如,乙酸乙酯,从中提取 DMSO,以得到含有蛋白质药物和透明质酸苯甲酯的固体微粒。

然而,透明质酸苯甲酯制剂的缺点在于制备步骤中用到的有机溶剂容易使蛋白质药物变性,也容易被疏水性透明质酸苯甲酯自身变性。含有粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF) 的透明质酸苯甲酯微粒的体外释放试验表明最初两天仅释放 25% 的 GM-CSF,此后就不再有 GM-CSF 了 (Nightlinger, N.S.等, 见上),表明大多数蛋白质药物变性了。

同时,还有人试图利用,特别是,粒径为 $5\mu\text{m}$ 或更小的含有抗原的微粒能够容易地被巨噬细胞吞噬的事实,来研制蛋白质药物或抗原的口服制剂。因此,期望一种抗原能够被靶向体内的一个特定位置,例如,小肠的 Payer's 斑。

然而，由于抗原的亲水性和高分子量，使 Payer's 斑的 M 细胞很难吸附抗原。为了增强 M 细胞对抗原的吸附力，使用了吸附增强剂例如胆汁盐-脂肪酸混合胶束、螯合剂、脂肪酸、磷脂、丙烯酰基肉毒碱、表面活性剂、中等链甘油酯 (Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 5, 69-97(1988); Yoshioka, S.等, 药学杂志, 71, 593-597 (1982); Scott-Moncrieff, J. C.等, 药学杂志, 83, 1465-1469 (1994); Muranishi, S.等, 化学药学公报, 25, 1159-1163 (1977); Fix, J.A.等, 美国生理学杂志, 251, G332-G340 (1986); Shao, Z.等, 药学研究, 10, 143-250(1993); Contantinides, P.P.等, Proc. Int. Symp. Control. Release Bioactive Mater., 20,184-185(1993); 和 Bjork, E.等, 靶向药物杂志, 2, 501-507 (1995))。另外，曾报道当将牛血清白蛋白包封于卵磷脂-胆固醇脂质体而制备的微粒给动物口服给药后，其唾液腺中 IgA 应答增强 (Genco, R.等, Ann. N. Y. Acad. Sci., 409,650-667(1983))。

然而，成功研制的唯一有效的口服疫苗制剂是存在肠受体的脊髓灰质炎疫苗，而脂质体微粒存在结构上的不稳定性问题。

发明概述

因此，本发明的目的在于提供一种具有改善的稳定性和有效传送蛋白质药物或抗原的微粒。

本发明的另一个目的在于提供一种含有所述微粒的缓释制剂。

按照本发明的一个方面，其提供了一种平均粒径范围为 0.1—200 μm 的亲脂性微粒，该微粒含有亲脂性物质和选自蛋白质或肽类药物和抗原的活性成分。

附图简述

本发明的上述目的和特征将通过下列结合附图的优选实施方式的描述而变得清楚了，其中：

图 1 显示了微粒 11、12 和 13 的体外释放曲线；

图 2A 和 2B 分别复制了测试实施例 3 中得到的微粒 12 的提取液和标准 hGH 水溶液的 RP HPLC 扫描图；以及

图 3A 和 3B 分别图示了测试实施例 3 中得到的微粒 12 的提取液和标准 hGH 水溶液的 SEC 扫描图。

发明详述

本发明的固态亲脂性微粒含有亲脂性物质和活性成分。

本发明中可以应用的活性成分是蛋白质药物、肽类药物或抗原。代表性蛋白质或肽类药物包括人生长激素、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、促红细胞生成素、骨形态发生蛋白、干扰素、胰岛素、心房肽激素-III、单克隆抗体、肿瘤坏死因子、巨噬细胞激活因子、白介素、肿瘤降解因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤溶酶原激活物和尿激酶，但是它们不构成对本发明中可以应用的蛋白质和肽类药物的限制。

代表性抗原包括从下组中的一种或多种病原体中得到的抗原：腺病毒 4 和 7 型、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、A 和 B 型流感病毒、日本乙型脑炎病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、水痘病毒、黄热病病毒和人免疫缺陷病毒；选自下组中的一种或多种病原体的抗原：百日咳博德特氏菌、布氏疏螺旋体、产肠毒的大肠杆菌、b 型流感嗜血菌、麻风

分枝杆菌、结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌 A 和 C、脑膜炎奈瑟氏球菌 B、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌、伤寒沙门氏菌、志贺氏菌属、肺炎链球菌和霍乱弧菌；一种或多种选自下组的病原体：粗球孢菌、利什曼虫属和疟原虫属；一种或多种导致下类疾病的病原体：牛黑腿病、牛流行性发热、牛炭疽病、牛 Akabane's 病、牛口蹄病、牛乳腺炎、牛感染性鼻呼吸道炎症、牛病毒性腹泻、牛感染性胃肠炎、猪霍乱、猪流行性腹泻、猪萎缩性胃炎、pavovirus 导致的猪病、轮状病毒导致的猪肠炎、鸡新城病、鸡 Marek's 病、鸡脑脊髓炎、狂犬病、犬瘟热、微细小病毒导致的狗肠炎和狗感染性肝炎，抗原是减毒的、灭活的或重组的抗原；或者从病原体中提取出来的 DNA、RNA、质粒、CpG DNA 或寡核苷酸，但是它们不能构成对本发明可以应用的抗原的限制。

本发明可以应用的亲脂性物质包括脂类及其衍生物、脂肪酸及其衍生物、蜡及其混合物。代表性的脂类包括卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、和磷脂酰肌醇。代表性的脂类衍生物包括花生四烯酰基磷脂酰胆碱、硬脂酰基磷脂酰胆碱。代表性的脂肪酸包括肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和它们的盐。代表性的脂肪酸衍生物包括硬脂酸甘油酯、脱水山梨醇棕榈酸酯、脱水山梨醇硬脂酸酯、脱水山梨醇油酸酯和聚山梨酸酯。代表性的蜡包括阴离子乳化蜡、巴西棕榈蜡和微晶蜡。其中，优选的是具有表面活性的亲脂性物质，例如卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。

本发明的亲脂性微粒可以含有占微粒总重量 0.001—99%（重量）、优选 0.1—10%（重量）的活性成分和占微粒总重量 1—99.999%、优选 5—50%（重量）的亲脂性物质。

除了活性成分，本发明的微粒可以进一步含有透明质酸或其无机盐。透明质酸的代表性无机盐包括透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸铵、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌和透明质酸钴。透明质酸或其无机酸盐用量可以占微粒总重量的 0.1—99%（重量）范围内。

本发明的微粒可以进一步含有一种为稳定活性成分而添加的水溶性赋形剂。可以在本发明中应用的水溶性赋形剂包括碳水化合物，例如羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、脱乙酰壳多糖、海藻酸盐、葡萄糖、木糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖和硫酸软骨素；蛋白质例如白蛋白和明胶；氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和它们的盐；脂肪酸例如硬脂酸；无机酸盐例如磷酸盐；表面活性剂例如 Tween®（ICI）聚（乙二醇）和它们的混合物。水溶性赋形剂的用量可以占微粒总重量的 0.001—99%（重量），优选 0.1—50%（重量）。

本发明的亲脂性微粒可以按照下述任意一种方法通过用亲脂性物质包衣含有活性成分的固体颗粒来制备。

本发明的亲脂性微粒可以如下制备：将活性成分溶解于含有其他任选成分例如透明质酸和水溶性赋形剂的水溶液中；喷雾干燥或冷冻干燥得到的溶液，以获得含有活性成分的固体颗粒；将固体颗粒分散于含有亲脂性物质的有机溶剂；然后干燥分散体得到固态亲脂性微粒。上述程序可以应用的有机溶剂包括乙醇、二氯甲烷和异丙醇。

或者，本发明的亲脂性微粒可以如下制备：将活性成分溶解于含有其他任选成分例如透明质酸和水溶性赋形剂的水溶液，向其中加入具有表面活性的亲脂性物质例如卵磷脂，使表面活性亲脂性物质水合，然后将得到的溶液喷雾干燥。在喷雾干燥步骤中，表面活性亲脂性物质迁移到液滴的表面，并包被含有活性成分的颗粒。

由此制备的本发明的微粒平均粒径范围为 0.1—200 μm ，优选 1—50 μm ，更优选 1—10 μm 。

本发明的含有活性成分的微粒具有以下几个优点：（1）活性成分不变性，并保留其全部活性；（2）在延长的时间段内完全释放活性成分；（3）容易分散于亲脂性介质例如油中，由此得到的分散体粘度低，并保留活性成分的全部活性；（4）容易与身体的磷脂膜融合，从而有效地将活性成分运输到身体中；（5）当其口服给药后，能够迁移定位到位于小肠中的 Payers's 斑的 M 细胞中。

本发明的微粒可以配制成分散液、乳剂和气雾剂剂型。

因此，本发明进一步提供了一种分散液，其通过将本发明的亲脂性微粒分散于亲脂性介质中制备。本发明可以应用的亲脂性介质包括食用油、矿物油、角鲨烯、角鲨烷、鱼肝油、单-、双-或三-甘油酯、和它们的混合物。代表性的食用油包括玉米油、橄榄油、大豆油、红花油、棉子油、花生油、芝麻油、葵花子油和它们的混合物。亲脂性介质可以进一步含有分散剂或防腐剂。分散体制剂可以用于注射或口服给药。

本发明还提供了含有水基注射介质和分散制剂的水包油型乳剂。水基注射介质包括蒸馏水和缓冲液。在乳剂中，亲脂性微粒用油包衣，并保留在油相中，从而增强了油包水型乳剂的形成和稳定性。乳剂可以用于注射。

如果乳剂的活性成分是抗原时，可以在水基注射介质中进一步包含另一种抗原，由此提供一种混合疫苗制剂。例如，含有分散于食用油中的乙型肝炎表面抗原（HBsAg）微粒的分散体制剂可以与含有吸附于明矾的 DTP 抗原的水溶液型 DTP 疫苗混合，从而得到水包油型乳剂。由此得到的乳剂由含有吸附于明矾的 DTP 抗原的水相和含有

HBsAg 固体颗粒的油相组成。在该乳剂中，HBsAg 和 DTP 抗原分别存在于水相和油相中，由此防止了 HBsAg 和 DTP 抗原之间不期望的相互作用。相反，已经知道通过将几种抗原吸附于明矾而制备的混合疫苗制剂，由于抗原之间不期望的相互作用，而存在接种效果差的问题。

本发明进一步提供了含有本发明微粒的气雾剂。所述气雾剂可以应用常规赋形剂按照常规方法制备。气雾剂可以经鼻或支气管粘膜给药。

下列实施例意在进一步说明本发明，而不是限制其范围。

另外，下面给出的关于固体在固体混合物中，液体在液体中，以及固体在液体中的百分比分别是 wt/wt、vol/vol 和 wt/vol，除非有特别说明。

实施例 1：亲脂性微粒的制备

将卵磷脂加入到 10mM 磷酸缓冲液 (PBS) 中，浓度为 2% (w/v)，并充分水合。将重组乙型肝炎表面抗原 (HBsAg, LG Chemical Ltd.) 加入其中，使浓度为 0.5 mg/ml，然后将得到的溶液在 0.55 ml/分钟的低流动速率下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中，得到固体微粒 (微粒 1)。在该步骤中，流入空气温度为 70°C，流出空气温度为 50°C。由此得到的微粒的粒径在 0.1–5 μ m 之间。

实施例 2：亲脂性微粒的制备

将重组 HBsAg 溶解于 10 mM PBS，使浓度为 0.5 mg/ml，然后向其中加入羧甲基纤维素至浓度为 3% (w/v)。使得到的溶液在 0.55 ml/

分钟的低流动速率下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中, 得到初级颗粒。在该步骤中, 流入空气温度为 70℃, 流出空气温度为 50℃。

制备含 5% (w/v) 卵磷脂的乙醇溶液, 将初级颗粒分散于其中, 使浓度为 5% (w/v)。使得到的分散体在流动速率为 1.0 ml/分钟下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中, 得到固体微粒 (微粒 2)。在该步骤中, 流入空气温度为 85℃, 流出空气温度为 50℃。由此得到的颗粒粒径在 0.1–5 μm 之间。

实施例 3: 制备亲脂性微粒

将羧甲基纤维素溶解于 10 mM PBS, 使浓度为 3% (w/v)。向其中加入卵磷脂, 使浓度为 2% (w/v), 并充分水化。然后向其中加入重组 HBsAg, 使浓度为 0.5 mg/ml。将得到的溶液在 0.55 ml/分钟的流动速率下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中, 得到固体微粒 (微粒 3)。在该步骤中, 流入空气温度为 70℃, 流出空气温度为 50℃。由此得到的颗粒粒径在 0.1-5 μm 之间。

实施例 4-9: 亲脂性微粒的制备

应用表 I 列出的各种成分重复实施例 3 的程序, 得到各种固体微粒 (微粒 4-9)。

表 I

微粒号	活性成分	水溶性赋形剂	亲脂性物质	粒径 (μm)
1	0.5mg/ml HBsAg	-	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5
2	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)羧甲基纤维素	5%(w/v)卵磷脂	0.1-5
3	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)羧甲基纤维素	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5
4	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)羧甲基纤维素	1%(w/v)卵磷脂	0.1-5
5	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)羧甲基纤维素	0.5%(w/v)卵磷脂	0.1-5
6	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)羧甲基纤维素	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5
7	0.5mg/ml HBsAg	3%(w/v)明胶	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5
8	0.5mg/ml HBpreS2Ag ¹⁾	3%(w/v)羧甲基纤维素	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5
9	2.16mg/ml SEC-SER ²⁾	3%(w/v)羧甲基纤维素	2%(w/v)卵磷脂	0.1-5

1) 乙型肝炎 preS2 抗原

2) 葡萄球菌肠毒素 C1 突变蛋白 (LG Chemical Ltd.) (应用量为使蛋白质浓度占成分总重量的 6wt%)

实施例 10: 亲脂性微粒的制备

将羧甲基纤维素溶解于 10 mM PBS 至浓度为 3% (w/v), 过滤灭菌得到的溶液。向其中加入卵磷脂, 使浓度为 2% (w/v), 并充分水合。将大肠杆菌的 DNA 提取物溶解于 10 mM PBS, 使其含量为 1 mg/ml, 将该溶液加入上述混合物, 使浓度为占混合物总重量的 6 wt%, 然后用磁力搅拌器混合。将得到的悬浮液在 0.55 ml/分钟的流动速率下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中, 得到固体微粒 (微粒 10)。

在该步骤中，流入空气温度为 70℃，流出空气温度为 50℃。由此得到的颗粒粒径在 0.2—3 μm 之间。

实施例 11：亲脂性微粒的制备

将人生长因子 (hGH) 溶解于 5 mM PBS 至浓度为 2 mg/ml，然后向其中加入吐温 80，使其含量占 PBS 总重量的 0.01 wt%。将分子量为 1000000 的透明质酸钠溶解于其中，使其浓度为 0.2% (w/v)。将得到的溶液在 3 ml/分钟的流动速率下送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中，得到初级颗粒。在该步骤中，流入空气温度为 85℃。由此得到的初级颗粒的平均粒径为 3 μm。

将卵磷脂溶解于乙醇，使其浓度为 1% (w/v)，然后将初级颗粒悬浮于其中，使浓度为 1% (w/v)。将得到悬浮液送入喷雾干燥器 (Buchi 191) 中，得到微粒 (微粒 11)。由此得到微粒的平均粒径为 7 μm。

实施例 12-24：亲脂性微粒的制备

应用表 II 中列出的各种成分重复实施例 11 的程序，得到各种固体微粒 (微粒 12-24)。

表 II

微粒号	初级微粒				微粒				
	活性成分	水溶性赋形剂	透明质酸钠(% (w/v)/MW)	流入空气 温度(°C)	平均粒 径(μm)	初级颗粒 (%(w/v))	亲脂性物质	溶剂	平均粒 径(μm)
11	2mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.2%(w/v) /MW:1,000,000	85	3	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
12	1 mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.1%(w/v) /MW:2,000,000	85	2	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	5
13	0.1 mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.09%(w/v) /MW:2,000,000	85	2	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	5
14	2 mg/ml bSTa'	0.01wt%吐温 80	0.2%(w/v) /MW:2,000,000	85	3	2	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
15	2 mg/ml pSTb'	0.01wt%吐温 80	0.2%(w/v) /MW:2,000,000	85	3	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
16	0.4 mg/ml GM- CSFc'	0.01wt%吐温 80	0.16%(w/v) /MW:2,000,000	85	3	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
17	1000 IU/ml EPOd'	0.01wt%吐温 80, 和 0.5mg/ml 血清白蛋白	0.25%(w/v) /MW:2,000,000	85	3.5	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
18	200000 IU/ml 干扰素-α	0.01wt%吐温 80, 0.2mg/ml D-甘露醇, 和 0.2 mg/ml 血清 白蛋白	0.25%(w/v) /MW:2,000,000	105	3.5	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7

19	200000 IU/ml 干扰素- γ	0.01wt%吐温 80, 0.2mg/ml 甘氨酸, 和 0.2 mg/ml 血清白 蛋白	0.25%(w/v) /MW:2,000,000	105	3.5	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
20	20 IU/ml 胰岛素	0.01wt%吐温 80	0.2%(w/v) /MW:2,000,000	85	3	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
21	2 mg/ml IGF- Ie'	0.01wt%吐温 80	0.2%(w/v) /MW:2,000,000	85	3	1	1%(w/v)卵磷脂	乙醇	7
22	1mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.1%(w/v) /MW:2,000,000	85	2	1	0.5%(w/v)硬脂 酸	二氯 甲烷	6
23	1mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.1%(w/v) /MW:2,000,000	85	2	1	0.5%(w/v)脱水 山梨醇单硬脂 酸酯	异丙 醇	7
24	1mg/ml hGH	0.01wt%吐温 80	0.1%(w/v) /MW:2,000,000	85	2	1	0.5%(w/v)脱水 山梨醇单硬脂 酸酯	二氯 甲烷	7

a) 牛生长激素

b) 猪生长激素

c) 粒细胞聚噬细胞-集落刺激因子

d) 促红细胞生成素

e) 胰岛素样生长因子-I

实施例 25：微粒 3 的棉子油分散液的制备

将实施例 3 中制备的微粒 3 加入棉子油中，并用磁力搅拌器分散，得到五种分别含 20、50、100、200 和 500 mg/ml 微粒 3 的棉子油分散液。

实施例 26：微粒 3 的食用油分散液的制备

分别用大豆油、玉米油和芝麻油重复实施例 25 的程序，得到各含 100 mg/ml 微粒 3 的大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 27：微粒 8 的食用油分散液的制备

用微粒 8 重复实施例 25 的程序，得到各含 100 mg/ml 微粒 8 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 28：微粒 9 的食用油分散液的制备

用微粒 9 重复实施例 25 的程序，得到各含 100 mg/ml 微粒 9 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 29：微粒 10 的食用油分散液的制备

用微粒 10 重复实施例 25 的程序，得到各含 100 mg/ml 微粒 10 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 30：微粒 12 的棉子油分散液的制备

用微粒 12 重复实施例 12 的程序，得到五种分别含 50、100、200、360 和 500 mg/ml 微粒 12 的棉子油分散液。

实施例 31：微粒 12 的食用油分散液的制备

用微粒 12 重复实施例 25 的程序，得到各含 100 mg/ml 微粒 12 的大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 32：微粒 14 的食用油分散液的制备

用微粒 14 重复实施例 25 的程序，得到各含 360 mg/ml 微粒 14 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 33：微粒 15 的食用油分散液的制备

用微粒 15 重复实施例 25 的程序，得到各含 360 mg/ml 微粒 15 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 34：微粒 18 的食用油分散液的制备

用微粒 18 重复实施例 25 的程序，得到各含 360 mg/ml 微粒 18 的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液。

实施例 35：微粒 3 的乳剂的制备

将实施例 26 中得到的大豆油、玉米油和芝麻油分散液分别加入 4 倍体积的 0.9% NaCl 溶液，得到油与水的比例为 1:4 的含有 20 mg/ml 微粒 3 的混合物。混合得到的混合物，形成均匀、白色不透明的水包油型乳剂。

实施例 36：微粒 12 的乳剂的制备

用实施例 30 中得到的棉子油分散液重复实施例 35 的程序，得到 5 种分别含有 5、20、50、120 和 200 mg/ml 微粒 12 的均匀、白色不

透明的水包油型乳剂，其油与水的比例分别为 1: 9、1: 4、1: 3、1: 2、和 2: 3。

在这些乳剂中，固体微粒分散在油相中，由于微粒的亲脂性表面，使含有微粒的油滴较稳定。该乳剂在环境温度下在 2 周内是稳定的。

实施例 37：微粒 12 的乳剂的制备

用实施例 31 中得到大豆油、玉米油和芝麻油分散液重复实施例 35 的程序，得到均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。

实施例 38：微粒 22 的乳剂的制备

用微粒 22 和大豆油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 微粒 22 的大豆油分散液。利用得到的分散液，重复实施例 35 的程序，得到均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。

实施例 39：微粒 23 的乳剂的制备

用微粒 23 和大豆油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 微粒 23 的大豆油分散液。利用得到的分散液，重复实施例 35 的程序，得到均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。

实施例 40：微粒 24 的乳剂的制备

用微粒 24 和大豆油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 微粒 24 的大豆油分散液。利用得到的分散液，重复实施例 35 的程序，得到均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。

实施例 41：微粒 14 的乳剂的制备

用实施例 32 中得到的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液和 2 倍体积的 0.9% NaCl 溶液重复实施例 35 的程序，得到四种均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。由此得到的各制剂在油水（1：2）混合物中含有 120 mg/ml 微粒 14。

实施例 42：微粒 15 的乳剂的制备

用实施例 33 中得到的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液和 2 倍体积的 0.9% NaCl 溶液重复实施例 35 的程序，得到四种均匀的、白色不透明的水包油型乳剂。由此得到的各制剂在油水（1：2）混合物中含有 120 mg/ml 微粒 15。

实施例 43：微粒 18 的乳剂的制备

用实施例 34 中得到的棉子油、大豆油、玉米油和芝麻油分散液和 2 倍体积的 0.9% NaCl 溶液重复实施例 35 的程序，得到微粒 18 的均匀、白色不透明的水包油型乳剂。由此得到的各制剂在油水（1：2）混合物中含有 120 mg/ml 微粒 18。

实施例 44：微粒 3 的乳剂的制备

重复实施例 35 的程序，但用明矾代替 0.9% NaCl，得到均匀、白色不透明的水包油型乳剂。

比较例 1：对照微粒 1 的制备

不用卵磷脂重复实施例 2 的程序，得到无亲脂性物质包衣的对照微粒（对照微粒 1）。

比较例 2：对照微粒 1 的分散液的制备

用对照微粒 1 和大豆油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 对照微粒 1 的大豆油分散液（对照分散液 1），其含有聚集的、不均匀的分散微粒。

比较例 3：对照微粒 1 的乳剂的制备

用对照分散液 1 和注射用生理盐水重复实施例 35 的程序，得到一种乳剂（对照乳剂 1），它不是均匀乳剂，而显示是一种聚集微粒的分离体。

比较例 4：对照微粒 2 的制备

用 1 mg/ml hGH 和 0.1% (w/v) 透明质酸钠（分子量为 2,000,000）重复实施例 11 的程序，得到无亲脂性包衣的对照微粒（对照微粒 2）。

比较例 5：对照微粒 2 的分散液的制备

用对照微粒 2 和棉子油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 比较微粒 2 的棉子油分散液（对照分散液 2）。

比较例 6：对照微粒 2 的乳剂的制备

用对照分散液 2 重复实施例 35 的程序。得到的混合物（对照乳剂 2）不形成均匀溶剂，而表现为一种微粒分散于油和水相的相分离体。

比较例 7：比较微粒 3 的制备

用 2×10^5 IU/ml 干扰素- α 、0.2 mg/ml D-甘露醇、0.2 mg/ml 血清白蛋白和 0.25% (w/v) 透明质酸钠（分子量为 2,000,000），在流入空气温度 105℃ 下重复实施例 11 的程序，得到无亲脂性包衣的对照微粒（对照微粒 3），其平均粒径为 3.5 μ m。

比较例 8：对照微粒 3 的油分散液的制备

用对照微粒 3 和棉子油重复实施例 25 的程序，得到含有 100 mg/ml 对照微粒 3 的棉子油分散液（对照分散液 3）。

对照例 9：对照微粒 3 的乳剂的制备

用对照分散液 3 重复实施例 35 的程序。得到的混合物（对照乳剂 3）不形成均匀乳剂，而表现为一种微粒既分散于油相又分散于水相的相分离体。

试验例 1：微粒 1 和 3 的稳定性试验

为了检查微粒中包含的抗原是否保留其活性，将微粒 1 和 3 分别溶解于水，并用 1000-100000 倍体积的水稀释，用 AUZYME 试剂盒（Abbott, USA）检查 HBsAb 的抗原性。结果如表 III 所示。

表 III

微粒号	制剂前的抗原性 (%)	制剂后的抗原性 (%)
1	89.5	86.7
3	88.6	82.3

如表 III 中可以看到的那样，本发明微粒中含有的 HBsAg 的抗原性在制剂前和制剂后大部分没有改变。因此，本发明的微粒中含有的抗原保留了其抗原性。

试验例 2：微粒 11、12 和 13 的体外释放试验

分别将微粒 11、12 和 13 分散于缓冲液（150 mM NaCl，10 mM 磷酸盐，0.05% 叠氮化钠，pH 7.4）中，使 hGH 浓度为 1.0 mg/ml。在 37°C 预定时间点搅拌得到的分散物，由此进行体外释放试验。800 g 离心分散物 10 分钟，取分散物 1/10 体积的上清液样品，与等体积的上述缓冲液混合。采用 Lowry 法，用高效液相色谱（HPLC）定量上清液中含有的 hGH。

图 1 显示了由此确定的微粒 11、12 和 13 的释放曲线。如图 1 中可以看到，透明质酸的分子量越大，并随着 hGH 的含量降低，hGH 的释放速率越慢。因此，可以通过调整透明质酸的分子量和蛋白质药物的含量控制蛋白质药物的释放速率。另外，体外释放试验结果表明，蛋白质药物的最初爆发性释放不会发生，释放速率维持稳定直到释放出 70% 的蛋白质。

试验例 3：微粒 12 的稳定性试验

为了检查微粒 12 中含有的 hGH 是否保持其活性，重复试验例 1 的程序，用反相（RP）HPLC 和尺寸排阻色谱（SEC）确定 12 小时和 48 小时从微粒中释放出的 hGH 的量。RP HPLC 用于评价蛋白质的氧化变性和脱氨基变性的程度；而 SEC 用于评价蛋白质聚集造成的变性。

图 2A 和 2B 分别代表微粒 12 的提取液和制备微粒 12 中用到的 hGH 水溶液的 RP HPLC 结果。

图 3A 和 3B 分别提供了微粒 12 提取液和制备微粒 12 中用到的 hGH 水溶液的 SEC 结果。

如图 2 和图 3 可以看到的，按照 RP HPLC 的结果，从本发明微粒中释放出来的 hGH 的量与原始 hGH 水溶液中的量相同；SEC 结果表明单体 hGH 含量为 95% 或更高。这些结果表明在本发明微粒的制备过程中 hGH 没有变性。

试验例 4：微粒 14-21 的体外释放试验

分别用微粒 14—21 重复试验例 2 的程序，测定 10 和 72 小时释放的药物的累积量，以及 72 小时样品中单体蛋白质的含量。结果如表 IV 所示。

表 IV

微粒号	10 小时的释放量(%)	72 小时的释放量 (%)	单体含量 (%)
14	45	92	94
15	47	87	89
16	44	89	97
17	32	76	95
18	54	92	94
19	49	88	95
20	60	95	95
21	38	93	97

如表 IV 可以看到的，本发明的微粒在 3 天内释放蛋白质药物，蛋白质药物没有变性的迹象。

试验例 5：注射性能试验 1

为了检查本发明的微粒是否均匀分散于油分散液或油水乳剂，进行注射性能试验。注射性能定义为以 80 mm/分钟的速度推装有试验样品的注射器所需的外力。使用 23 号注射针头。这些试验中应用的样品是将明矾用 20 倍 PBS 稀释后制备的明矾分散液；大豆油；实施例 26 的大豆油分散液；实施例 44 的乳剂；对照分散液 1 和对照乳剂 1，结果如表 V 所示。

表 V

制剂	微粒含量 (mg/ml)	注射性能 (kg _f)
明矾分散液	0	0.1
大豆油	0	0.5
实施例 26 的分散液	50	0.1
实施例 44 的乳剂	20	0.5
对照分散液 1	50	不能注射
对照乳剂 1	20	不能注射

如表 V 可以看到的，实施例 26 的分散液容易注射，表明本发明的微粒 3 与无卵磷脂包衣的对照微粒 1 相比，在油中分散良好。具体而言，因为本发明的乳剂具有优良的注射性能，它可以用于制备混合制剂。

试验例 6：注射性能试验 2

用 26 号注射针头，对 0.9% NaCl 水溶液、棉子油、实施例 30 的棉子油分散液、实施例 36 的乳剂、对照分散液 2、和对照乳剂 2 重复试验例 5 的程序。结果如表 VI 所示。

表 VI

制剂	微粒的含量 (mg/ml)	注射性能 (kg _r)
0.9% NaCl 水溶液	0	0.1
棉子油	0	1.6
实施例 30 的分散液	100	1.7
实施例 36 的乳剂	120	0.8
对照分散液 2	100	10.5
对照乳剂 2	20	23.3

如表 VI 可以看到的，本发明的微粒 12 由于有亲脂性卵磷脂包衣，在棉子油中具有良好的分散性能，本发明的棉子油分散液的注射性能与棉子油相同。另外，实施例 36 的乳剂比棉子油注射性能低，尽管微粒 12 的浓度较高。

相比较而言，对照微粒 2 由于没有亲脂性包衣，在棉子油中分散能力较差，导致对照分散液 2 的注射性能较差。另外，当对照微粒 2 的亲水表面导致对照乳剂 2 相分离时，透明质酸钠成分连续浸出到水相中，增加了水层的粘度。因此，对照乳剂 2 比对照分散液 2 具有更差的注射性能。

试验例 7: 注射性能试验 3

对实施例 38—40 中得到的乳剂, 和作为对照的大豆油, 重复试验例 5 的程序。大豆油的注射性能为 1.4 kg_r, 实施例 38—40 中得到的乳剂的注射性能在 0.3—0.5 kg_r 范围内, 类似于 0.9% NaCl 水溶液的注射性能。本发明微粒的亲脂性表面被大豆油包覆, 形成均匀的水包油型乳剂, 其注射性能等于水的注射性能。

试验例 8: 制剂对动物注射

为了检查本发明制剂注射后的生物活性, 将微粒 3 加入至大豆油中, 制备四种重组 HBsAg 的负载量分别为 0.5、0.125、0.03125 和 0.0078 μg 蛋白质/ml 的分散液。作为对照制剂, 含有作为免疫佐剂的明矾的乙型肝炎疫苗 (LG Chemical Ltd., Korea) 用 PBS 稀释, 制备 HBsAg 的负载量分别为 0.5、0.125、0.03125、和 0.0078 μg 蛋白质/ml 的样品。

将各种分散液样品腹腔内注射给 4 周龄的雄性 Balb/c(H-2d) 小鼠 (10 只), 注射后 4 个月采集血样。从血样制备血清, 用 AUSAB EIA 试剂盒 (Abbott, USA) 测定其中抗体的效价和抗体形成 (%), 并用统计学方法 (probit 分析法) 计算微粒的 ED₅₀ (μg)。结果如表 VII 所示。

表 VII

剂量(mIU/ml)	0.5	0.125	0.0312	0.0078	ED ₅₀ (μg)
制剂					
微粒 3	106.35	38.98	13.32	4.68	0.0121
对照制剂	12.43	6.1	4.32	3.15	0.1504

如表 VII 可以看到的，本发明的微粒比对照制剂具有较低的 ED_{50} 量，如果注射同样量的抗原，本发明的微粒比对照制剂具有较高的抗体效价。因此，本发明的微粒可以作为形成高级抗体的佐剂。

试验例 9: 制剂对动物的口服给药

为了检查本发明的制剂口服给药的生物活性，将微粒 3 加入至大豆油中，制备重组 HBsAg 的负载量为 $5 \mu\text{g}$ 蛋白质/ml 的分散液。作为对照制剂，用 PBS 稀释乙型肝炎疫苗 (LG Chemical Ltd., Korea)，得到相同负载量的 $5 \mu\text{g}$ 蛋白质/ml 的分散液。

将每种分散液样品给 4 周龄的雄性 Balb/c (H-2d) 小鼠 (10 只) 口服给药，之后的第 2 周和第 4 周再给药两次。8 周后从小鼠体内采集血样。从血样制备血清，用 AUSAB IEA 试剂盒 (Abbott, USA) 测定抗体的效价和抗体形成 (%)。结果如表 VIII 所示。

表 VIII

制剂	抗体形成 (%)	抗体效价 (mIU/ml)
微粒 3	80	10.1
对照制剂	0	0

如表 VIII 中可以看到，给药本发明微粒的小鼠具有 80% 的抗体形成，而对照制剂给药的小鼠没有形成抗体。因此，即使是口服给药，本发明的微粒仍具有优越地在体内形成抗体的能力。这表明本发明的微粒可以方便地应用于口服给药制剂

试验例 10: 细胞毒性淋巴细胞试验

为了检查本发明的微粒是否诱导细胞介导的免疫应答, 将微粒 3 加到大豆油中, 得到含有 10 μg 蛋白质/ml 的分散物。作为对照制剂, 用 PBS 将乙型肝炎疫苗 (LG Chemical Ltd., Korea) 稀释到同样 10 μg 蛋白质/ml。

将每种分散液给 4 周龄的雄性 Balb/c (H-2d) 小鼠 (10 只) 皮下给药, 之后以 2 个月的间隔再给药两次。最后一次给药后两周, 从免疫的小鼠体内收集前细胞毒性淋巴细胞 (CTL), 并培养它们, 得到效应 (effector, E) 细胞。将 E 细胞与靶 (T) 细胞在改变二者比例的条件下共培养, 然后按照下面的公式确定被 E 细胞溶解的 T 细胞数 (特异性溶解 (%)) :

$$\text{特异性溶解 (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{样品}} - \text{cpm}_{\text{自然释放}}}{\text{cpm}_{\text{最大释放}} - \text{cpm}_{\text{自然释放}}} \times 100$$

最大特异性溶解值意味着细胞介导的免疫应答被主动诱导。结果如表 IX 所示。

表 IX

E:T 制剂	20:1	5:1	1:1
微粒 3	20%	8%	2%
对照制剂	2%	1%	2%

如表 IX 中可以看到，本发明的微粒诱导出细胞介导的免疫应答，而对照制剂没有。

试验例 11：动物试验

为了检查本发明微粒的免疫增强作用，将微粒 9 加到大豆油中，得到 SEC-SER 含量为 4.0 mg 蛋白质/ml 的分散液。最为对照制剂，按照生产商的指示，将 SEC-SER 抗原与商品佐剂 ISA 混合，然后稀释到同样 4.0 mg 蛋白质/ml。作为对照，重复实施例 9 的程序，但不加抗原，制备微粒，将该微粒分散于大豆油。

将各种分散液肌内注射给第二或第三泌乳期的具有大量体细胞的母牛（5 只），之后第 2 周和第 4 周再注射两次。2、6、10 和 14 周后，从母牛体内采集血样，然后测定抗体效价。表示为 ELISA 读数的结果如表 X 所示。

表 X

	注射前	2 周	6 周	10 周	14 周
对照制剂	1	2.552	2.667	2.466	2.322
微粒 9	1	4.472	5.123	5.911	4.522
对照	1	1.335	1.486	2.002	2.278

如表 X 中可以看到，本发明的制剂诱导高水平抗体的形成，该高水平抗体在第一次注射后持续了 14 周。因此，本发明的制剂可以方便地用作动物疫苗。

试验例 12：动物试验

用 7 周龄雌性遗传性生长激素分泌低下发育障碍大鼠（体重：约 100g）检查含有 hGH 的本发明制剂的给药作用。

实施例 30 的分散液、实施例 36 的乳剂、对照分散液 2、对照乳剂 2、和 Utroprin[®]（LG Chemical Ltd., Korea）被选择用于该试验，它们各自以每只大鼠 350 μ g hGH 的剂量给每组 10 只发育障碍大鼠给药。作为对照，使用没有接受 hGH 的大鼠。平均累积净重增加如表 XI 所示。

表 XI

天	1	2	3	4	5	6
对照	0.9	2.7	3.6	4.7	6.3	7.5
Utroprin [®]	4.7	4.2	5.3	6.4	7.1	8.5
对照分散液 2	5.0	5.7	7.2	8.5	10.2	11.5
对照乳剂 2	4.3	4.9	3.6	5.4	6.7	7.8
实施例 30 的分散液	5.5	6.6	7.3	8.7	11.4	12.3
实施例 36 的乳剂	5.3	6.8	8.1	9.2	11.3	13.0

单位：g

如表 XI 中可以看到，在 Utroprin[®]组中大鼠的平均重量在第一天增加，但在第二天降低。此后增加的重量类似于对照组的速率。

在对照分散液 2 组中，大鼠的平均重量连续增长，而对照乳剂 2 组大鼠的重量在第三天降低。因为对照乳剂 2 中的微粒具有亲水表面，药物能够溶解，因此，其重量增加作用等于水基制剂——Utroprin[®]的作用。

相比较而言，用实施例 30 的分散液和实施例 36 的乳剂给药的大鼠的平均重量，以比对照分散液 2 或对照乳剂 2 组更高的速率增长 6 天。本发明的具有卵磷脂包衣的微粒甚至在注射后仍被棉子油包覆，并且仅缓慢吸收水分，因此以恒定速率释放药物。

试验例 13：动物试验

将实施例 32 的分散液和实施例 41 的乳剂分别对 7 周龄雌性发育障碍大鼠给药（体重：约 100g），剂量为每只大鼠 12.5 mg bST，然后检查它们的体重增加。作为对照，使用没有接受 bST 的大鼠。平均累积净重增加如表 XII 所示。

表 XII

天	1	2	3	4	5	6	8	10
对照	1.4	2.9	4.6	6.1	6.5	7.2	8.8	10.4
实施例 32 的分散液	10.3	10.8	14.9	18.1	19.4	20.6	22.2	22.7
实施例 41 的乳剂	9.7	11.5	14.6	17.7	19.9	20.8	22.5	22.9

单位：g

如表 XII 中可以看到，用实施例 32 的分散液或实施例 41 的乳剂给药的大鼠的平均重量连续增长 6 天，每日重量增加速率高于对照组。8 天后，重量增加变得不明显，表明这两种情况下药物释放时间均约为 8 天。

试验例 14：细胞致病作用抑制试验

将实施例 43 的乳剂、对照分散液 3、干扰素- α 水基制剂分别以 300 μ g 干扰素- α 的剂量给 5 月龄的兔（体重：2.5 kg）给药。

应用细胞致病作用抑制试验确定药物的血液水平，该试验如下进行：用干扰素- α 处理细胞，向其中加入病毒，然后确定细胞病理学的抑制作用。该试验中使用雄性小牛肾细胞（MDBO CATCC CCF-22）和小泡性口腔炎病毒（ATCC VR 158）。连续 5 天测量血液中干扰素- α 的效价，结果如表 XIII 所示。

表 XIII

	7 小时	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
水基制剂	1.4×10^3	1.2×10^3	ND*	ND	ND	ND
对照分散液 3	2.1×10^3	2.6×10^3	9.1×10^2	3.4×10^2	1.7×10^2	1.5×10^2
实施例 43 的乳剂	1.7×10^3	2.2×10^3	1.1×10^3	4.6×10^2	2.8×10^2	8.7×10^1

*没有检测到

如表 XIII 中可以看到，给药实施例 43 分散液的大鼠的干扰素- α 的效价在全部 5 天试验期内较高，显示从第 2 天起，与对照分散液 3 组相比干扰素- α 的水平较高。因此，本发明的分散液由于微粒的亲脂性表面具有延长释放的特征。

比较试验例 1

hGH 溶解于 5 mM PBS 至浓度为 2.3 mg/ml，然后将分子量为 2000000 的透明质酸钠溶解于其中，至浓度为 2% (w/v)，得到透明质酸凝胶制剂。

应用凝胶制剂重复试验例 2 的程序，进行体外释放试验。结果是，在 1 小时内，100% 的 hGH 释放到上清液中。因此，该凝胶制剂的药物释放时间远远短于本发明微粒的药物释放时间。

比较试验例 2: 动物试验

应用 1.5 mg/ml hGH 重复对照试验例 1 中制备透明质酸凝胶的程序, 得到不具有流动性的透明质酸凝胶制剂。

以每只大鼠 150 μ g hGH 的剂量给发育障碍大鼠给药上面得到的凝胶制剂, 然后检查 6 天的平均体重增加。作为对照制剂, 给大鼠给药同样 hGH 剂量的水溶液制剂——Utropin[®]。作为对照, 使用没有接受 hGH 的大鼠。以累积体重增加表示的结果如表 XIV 所示。

表 XIV

组 天	1	2	3	4	5	6
对照	1.6	2.4	4.1	4.8	6.2	8.1
凝胶制剂	3.2	3.6	3.0	6.1	6.7	7.7
Utropin [®]	3.3	2.6	4.2	6.4	7.8	8.3

如表 XIV 中可以看到, 凝胶制剂给药的大鼠的平均体重增加类似于 Utropin[®]组。2 天后 3 组之间体重增加速率没有明显不同, 表明药物从凝胶制剂中的释放持续不超过 1 天。

比较试验例 3

将 hGH 溶解于 5 mM PBS, 使浓度为 2 mg/ml, 然后向其中加入吐温 80, 使浓度为 0.01wt%。将得到的溶液以 3 ml/分钟的流动速率加入喷雾干燥器 (Buchi 190) 中, 得到微粒。在该步骤中, 流入空气的温度为 85 $^{\circ}$ C。由此制备的微粒的平均粒径为 2.5 μ m。

将透明质酸苯甲酯溶解于二甲亚砜 (DMSO), 浓度为 6%, 然后将微粒分散于其中。将得到的分散物加入含有 Aracel A[™] (Atlas

Chemical Ind.)的矿物油。混匀混合物得到微乳剂。微乳剂由作为连续相的矿物油和作为分散相的透明质酸苯甲酯/DMSO 溶液组成。

将乙酸乙酯加入微乳剂，同时搅拌，从分散相中提取 DMSO，得到含有 hGH 的透明质酸苯甲酯的微粒。微粒的平均粒径为 $5.5 \mu\text{m}$ ，hGH 的含量为 45 wt%。

用上述获得的透明质酸苯甲酯，重复试验例 2 的程序，进行体外释放试验，释放的 hGH 的累积量如表 XV 所示。

表 XV

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

如表 XV 中可以看到，透明质酸苯甲酯制剂仅在 5 小时后少量释放 hGH，到 144 小时，仅释放约 30% 加入的 hGH。因此，透明质酸苯甲酯制剂中大部分 hGH 结合在透明质酸苯甲酯基质中，没有释放。

将上述透明质酸苯甲酯制剂分散于棉子油，并将得到的分散液给发育障碍大鼠给药，剂量为每只大鼠 $300 \mu\text{g}$ hGH。测定平均重量增加，以累积体重增加表示的结果如表 XVI 所示。

表 XVI

制剂	天	1	2	3	4	5	6	7
对照		1.2	2.3	3.6	5.7	6.6	7.3	8.2
透明质酸苯甲酯制剂		3.6	2.7	5.4	6.3	7.1	8.4	8.0

如表 XVI 中可以看到,第 1 天后透明质酸苯甲酯制剂没有表现明显的作用。

已经就上述具体实施方式描述了本发明,应当认识到本领域技术人员可以对本发明作出各种修改和变动,它们也落入本发明所附权利要求书限定的范围内。

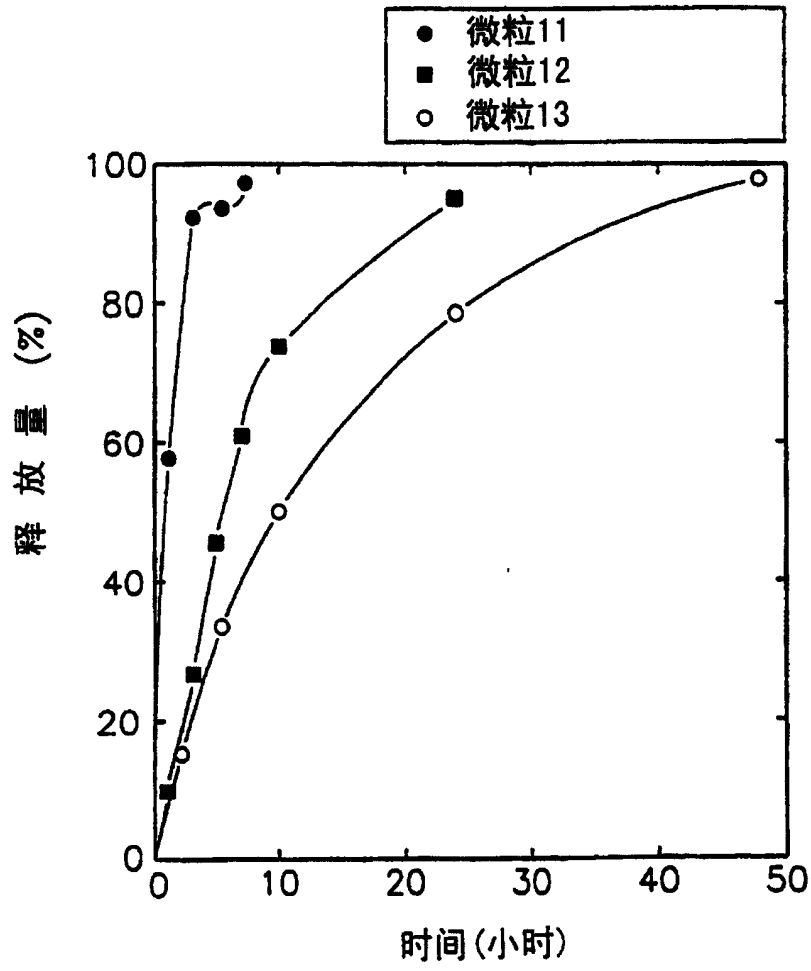


图1

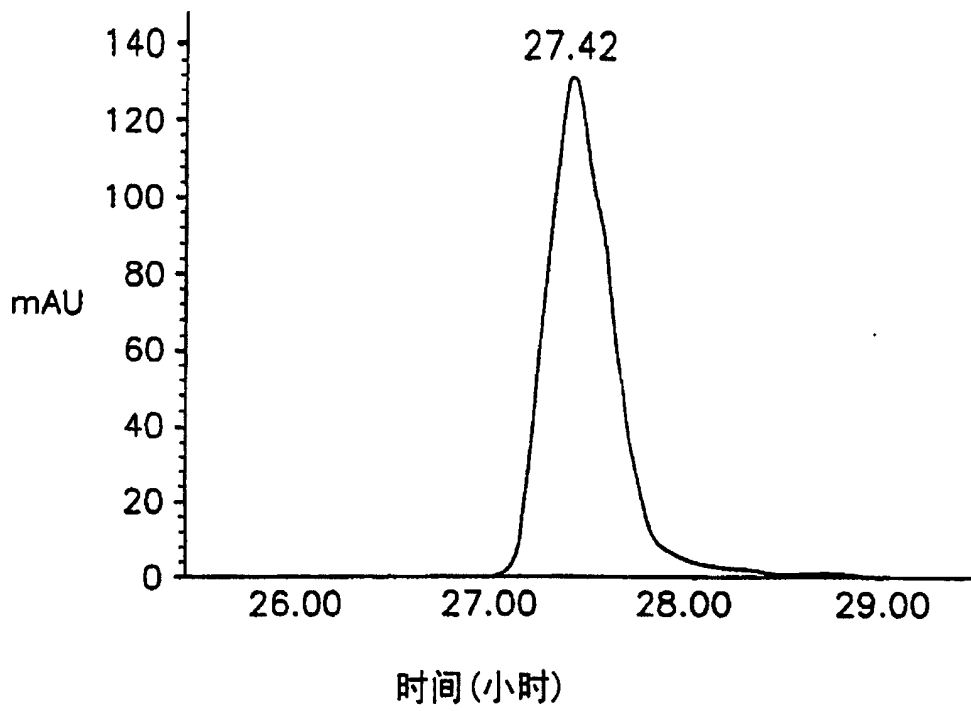


图2A

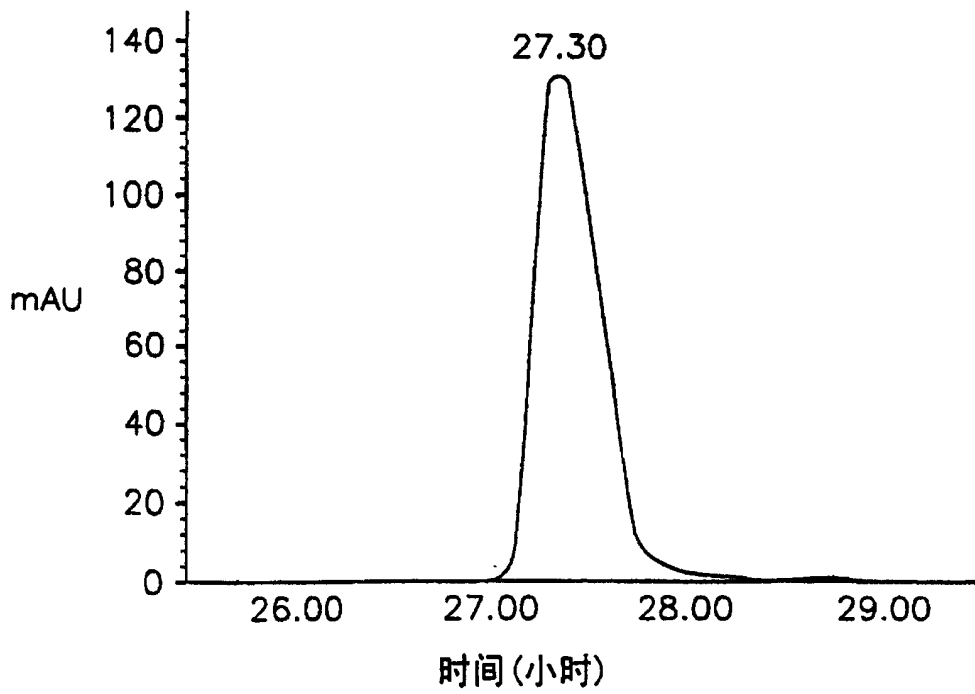


图2B

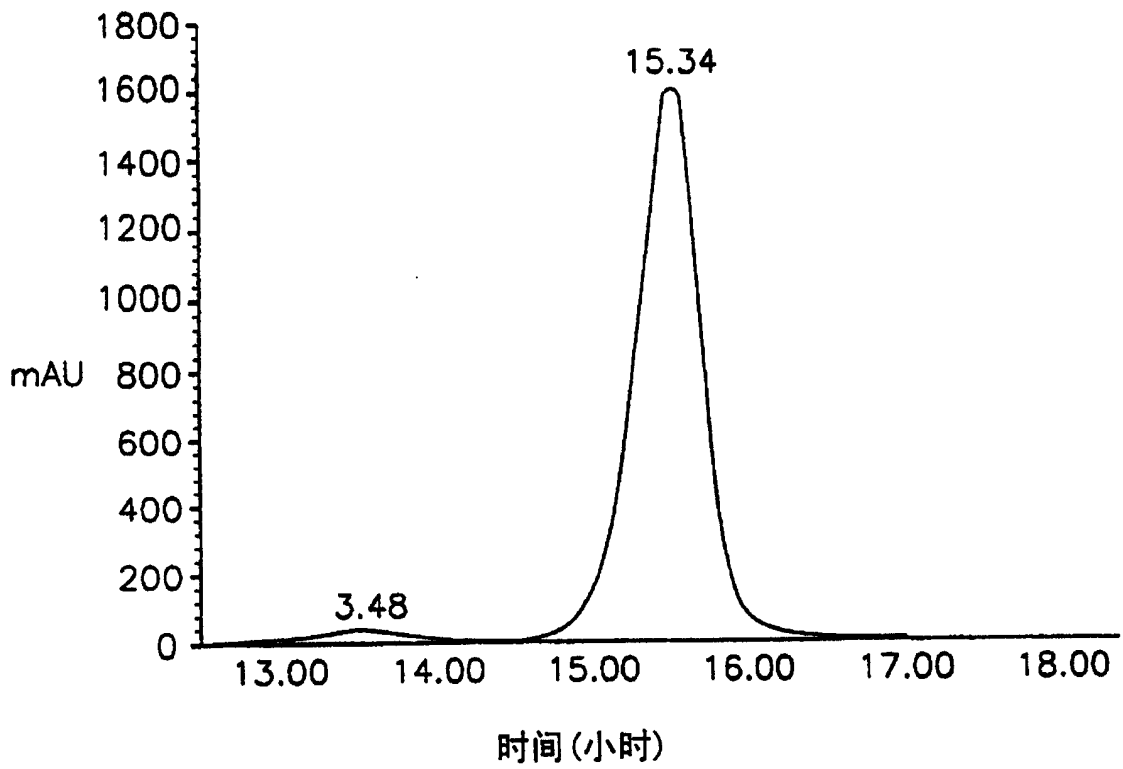


图3A

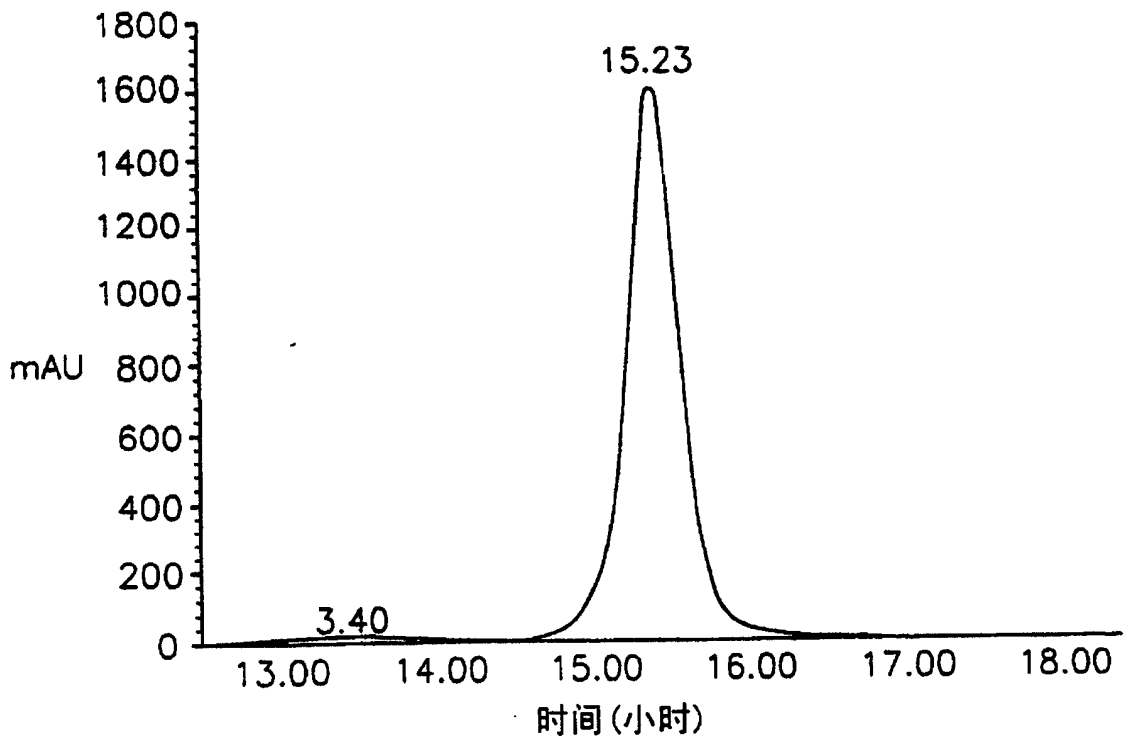


图3B