

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>  
A61K 9/16  
A61K 9/72



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99806153.0

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423553A

[22] 申请日 1999.4.8 [21] 申请号 99806153.0

[86] 国际申请 PCT/EP99/02385 1999.4.8

[87] 国际公布 WO99/52506 德 1999.10.21

[85] 进入国家阶段日期 2000.11.14

[71] 申请人 阿克西瓦有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 H·本斯 J·格兰德

[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 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 4 页  
按照条约第 19 条的修改 2 页

[54] 发明名称 用于肺部给药的颗粒赋形剂

[57] 摘要

本发明涉及颗粒状的活性物质支持剂的制备及其具有缓释作用的药物组合物。生物相容的、颗粒状活性物质支持剂可以干性形式制备，它可部分或全部由线性的水不溶性多糖，优选聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)，优选通过生物转化方法制成均匀标准大小的颗粒，所述颗粒能形成汇集体和/或附聚体。本发明的颗粒尤其可用于干粉吸入剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种颗粒赋形剂，它含有至少一种线性水不溶性多糖，其平均粒径小于 $10\mu\text{m}$ 。

2、权利要求1的颗粒赋形剂，其中所述颗粒赋形剂形成小于 $60\mu\text{m}$ 的附聚体和/或汇聚体。

3、权利要求1和2的颗粒赋形剂，其中所述颗粒赋形剂以混合物形式存在。

4、前述任一项权利要求的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以生物工程方法制备。

5、前述任一项权利要求的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以生物催化方法制备。

6、前述任一项权利要求的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以酶促方法制备。

7、权利要求1-6中任一项的颗粒赋形剂，其中的线性水不溶性多糖是聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)。

8、权利要求1-7中任一项的颗粒赋形剂，它是生物相容性的和/或药学可接受的。

9、权利要求1-8中任一项的用于肺部给药的颗粒赋形剂用于活性化合物受控释放的用途。

10、权利要求1-8中任一项的颗粒赋形剂，它另外还含有一种或多种活性化合物。

11、权利要求1-9中任一项的颗粒赋形剂用于制备药物组合物的用途。

12、权利要求1-9中任一项的颗粒赋形剂用于制备产生疗效的药物组合物的用途。

13、权利要求1-9中任一项的颗粒赋形剂作为肺部给药形式的用途。

14、权利要求1-9中或者16-17中任一项的颗粒赋形剂通过干性

制剂用于肺部给药的用途。

15、权利要求1-9或者14中任一项的颗粒赋形剂通过借助“干粉吸入器”吸入作为肺部给药形式的用途。

16、一种可分散的干性制剂和/或粉末，它包括权利要求1-9中任一项的颗粒赋形剂。

17、权利要求11的可分散的干性制剂和/或粉末，其水含量低于25%，水含量优选低于15%，尤其优选水含量为5-10%。

18、一种药物组合物，除常规赋形剂、辅剂和/或添加剂之外，还含有如权利要求1-9中任一项的线性水不溶性多糖。

## 用于肺部给药的颗粒赋形剂

本发明涉及由线性水不溶性多糖制备的可干配的颗粒赋形剂，还涉及其制备方法和用途。

在现代制药学技术中，需要其使用形式可少量给药并对生物分布、生物利用度或药物吸收产生特定影响的制剂。

首先，颗粒系统，所谓粒径通常小于100微米的微粒被证明是一种高质量的给药形式或“药物传递系统”，用于使活性化合物，尤其是药物在生物有机体中可被利用。本文中，证明了粒径为1-100微米的微粒尤其适于非胃肠道使用，如皮下注射，其中活性化合物的长期释放可长达数周。为克服血脑屏障的障碍，对粒径小于0.5微米的较小微粒进行了广泛深入的研究。

治疗性物质需要一种满足生理条件的给药形式(如，例如口服给药可使治疗性蛋白和许多其它药物在胃中变性或被酶消化，因此通常仅作为注射剂或以不同的创伤性方式给药)。

一种非创伤性给药的特殊形式，肺部给药形式(本文中的吸入疗法)提供了通过肺部吸收治疗性物质的可能性(同时保持了治疗、诊断或预防特性)(Patton, Chemtech 1997, 27(12), 34-38)，以及进行系统性治疗和局部治疗的可能性，因而导致了较高的患者顺应性。为此，需利用一定大小和质量的颗粒系统，以使它们可渗透进入支气管和肺泡，在支气管和肺泡上由于有敏感性膜，因而可吸收有效量的活性化合物进入机体的血流。

在此之前，肺部给药形式已有市售，基于抛射剂驱动的计量气雾剂也已公知，这些气雾剂几乎都是用于治疗哮喘疾病的。但它们的一个缺点是使用对臭氧不利的抛射剂。

目前，作了大量的努力以通过肺部给药转送治疗其它适应症领域的其它活性化合物。目前关注的焦点是粉末吸入系统，所谓基于药物

干性制剂的“干粉吸入剂”。WO 96/32149描述了这种系统，用于活性化合物的赋形剂是包括添加剂的人血清白蛋白；Langer等在科学（Science）276, 1997, 1868中描述了聚乳酸微粒的用途，在聚乳酸上负荷10-20%的胰岛素，获得了与相应的皮下注射微球相当的结果（Abstract Controlled Release Society Conference, Sweden 1997）。所述颗粒的大小为8-20微米。

在WO 97/35562中，描述了用于肺部给药的负荷了活性化合物的微粒，它们由水性溶液制备，其缺点是仅能吸附水溶性活性化合物。另一篇公告WO 97/44013公开了乳酸乙醇酸共聚物的多孔颗粒，其直径为5-30微米。

在WO 96/32116中，描述了大小为0.5-50微米数量级的微粒，它包括核酸或病毒载体，可由悬浮液通过干燥，尤其是喷雾干燥亲水性寡聚多糖获得。

WO96/32152描述了一种大小为1-50微米的颗粒，其中包含活性化合物 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶，也可含有稀释剂。

WO 97/36574公开文本描述了一种具有光滑表面的中空颗粒；其大小为0.5-7.0微米。

在WO 97/36574、WO 96/36314、WO 96/00127和WO 96/32096中，还描述了其它的颗粒系统，它们包含，不同大小例如部分合成的聚合物或活性化合物。

现有技术存在的问题是颗粒的缓释作用相对受限。此外，这些大多是化学合成方法得到的水溶性产物，化学合成方法限制了它们的生物相容性（残留溶剂、外来物质等）。同样，得到的是大小、表面积和组成不均的非均质颗粒，这限制了生物利用度，尤其是在肺部给药中，例如由于靶位点外沉积的损失和可分散性的副作用。另外，现有技术还存在着与载体负荷能力有关的问题。

因此，本发明的目的是开发一种用于市售喷雾器的特定质量的可干配赋形剂，它克服了上述缺陷。尤其是，应提供建立能在肺部获得缓释作用的颗粒技术。因此，本发明的目的同样是制备分散性颗粒赋

形剂。另一个目的是提供一种制备可优选用于本文的肺部给药的干性制剂的尽可能简单及有利的方法。在此，用于吸入的赋形剂大小、表面积和形态的最佳化是本发明的另一个目的。

可利用包含至少一种线性水不溶性多糖的物质制成用于肺部给药的颗粒赋形剂，其平均大小小于10微米，由此实现本发明的目的。

采用本发明的方法还可获得如下优点：

- 由于赋形剂在各种介质中具有良好的悬浮性，由此更易于负荷活性化合物（如，分散方法，喷雾干燥）；

- 由于其天然存在的结构和天然相同产物的用途，所用的赋形剂更易于为人们接受并具有高生物相容性；

- 在活性化合物制剂的制备中，避免了表明活性化合物的加入。

- 对飞行行为具有积极作用的空气动力学直径。与光滑的球相比，这种作用的获得归因于表面多孔性，伴随表面粗糙的汇集和/或附聚形成趋势也有助于这种作用。

在本发明中，颗粒赋形剂被认为是平均大小小于10微米，尤其是1-10微米，优选2-6微米，尤其优选1-3微米的颗粒，其基本成分含有至少一种线性水不溶性多糖。

在本发明中，线性水不溶性多糖是多糖，优选聚葡聚糖（polyglucan），尤其是聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)，其由单糖、二糖及其寡聚物或衍生物组成。

这些糖总是以相同的方式彼此连接。以这种方式定义的每个基本单元恰好有两个连接键，每个键都与另一个单体连接。两个基本单元不包括在内，因为它们形成了多糖的开始端和末端。这些基本单元仅有与另一个单体的一个连接键。一个单体有三个或三个以上连接键（共价键）与另一个基团，优选是糖单元连接的情况，称为是分支化的。在聚合物骨架中每个糖单元上延伸出至少三个糖苷键。

依据本发明，不存在分支化或仅存在很小程度的分支化（存在很小的分支化比例，以常规分析方法通常监测不到的）。在这种情况下，例如如果将对于线性多糖的合成不需要的羟基总数认为是100，

则至多有5个羟基被与其它糖单元的连接键所占有。

如果游离羟基（或存在的其它功能基）与其它糖类中任何糖单元进一步形成糖苷键（或其它键），则分支化程度最大（100%）。如果除了使聚合物产生线性化的羟基以外，糖上没有其它的羟基通过化学反应被修饰，则分支化程度最小（0%）。

优选的水不溶性线性多糖的实例是线性聚-D-葡聚糖，只要是本发明所述的线性的，其连接键的性质无关紧要。具体实例是聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)和聚(1,3- $\beta$ -D-葡聚糖)，聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)是尤其优选的。

如果一个基本单元有三个或三个以上的连接键，这种情况被认为是分支化的。本文所谓的分支化程度由每100个基本单元中不包括在线性聚合物骨架的合成中并且形成了分支的羟基数得出。

依据本发明，线性水不溶性多糖的分支化程度不高于8%，即相对于100个基本单元，它们的分支少于8个。分支化程度优选少于4%，尤其是不高于1.5%。

如果水不溶性线性多糖是聚葡聚糖，如聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)，其在6位的分支化程度小于4%，优选至多2%，尤其是至多0.5%；其它位置上的分支化程度不涉及线性连接键，如2位或3位（在优选的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的情况下），优选在每一情况下，分支化程度都至多2%，尤其是至多1%。

特别优选的是多糖，尤其是聚- $\alpha$ -D-葡聚糖，该多糖没有分支化，或者说其分支化程度低到了常规方法无法检测到的程度。

依据本发明，前缀“ $\alpha$ ”、“ $\beta$ ”或“D”本身涉及形成聚合物骨架的连接键，而不是分支。

本发明中“水不溶性”是指在正常条件（室温25℃和101325帕斯卡的大气压下，或者与所述条件相差至多20%的条件）下，检测不到化合物的溶解度。

本发明使用的多糖，尤其是聚葡聚糖，例如聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)，其用量的至少98%，优选高于99.5%是水不溶性的。在此术语不溶性也可借助下列观察加以解释。在1巴压力下1升去离子水中，观察如果

将1克待测线性多糖加热到130℃，则所得溶液仅保持短暂的数分钟的稳定。在正常条件下冷却，该物质重新产生沉淀。进一步冷却后，离心分离，以这种方式可回收至少66%用量的物质（包括实验性损失）。

本文中，优选使用可借助一般意义下的生物工程或基因工程方法获得的线性水不溶性多糖。本发明描述的特别优选的实施方案是以生物工程方法，尤其是以生物催化方法或酶促方法制备的。

本文中，通过生物催化方法（也称为：生物转化方法）制备的线性多糖是指通过在适宜的条件下，使用所谓生物催化剂（一般是酶）催化单体基本单元（例如寡糖，如单糖和/或二糖）反应制备的线性单体。尤其优选通过多糖合酶和/或淀粉合酶和/或糖基转移酶和/或 $\alpha$ -1,4-葡聚糖转移酶和/或糖原合酶和/或淀粉蔗糖酶和/或磷酸化酶方法制备聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)。

用于本发明的由发酵制备的线性多糖是可使用自然界中存在的生物，例如真菌、藻类或微生物通过酶促方法获得的多糖；或者是使用非自然界中存在的生物（例如可通过对自然生物修饰获得的），如真菌、藻类或微生物通过酶促方法获得的多糖；所述修饰是通过一般意义下的基因工程方法进行。另外，用于制备本发明所述赋形剂的线性多糖可通过用酶处理包含分支的非线性多糖获得，也可通过将非线性多糖分解（通过酶，例如淀粉酶、异淀粉酶、葡糖酸水化酶（gluconohydrolase），尤其是支链淀粉酶）和除去分支获得其线性聚合物。

特别是，还应包括由植物通过生物工程和基因工程方法获得和纯化线性水不溶性多糖。

颗粒赋形剂尤其可通过作为德国专利申请19737481.6的主题的微粒技术制备。

除干性制剂以外，还特别应包括基于赋形剂的分散体和悬浮体的吸入剂。一个特别适合的优选实施方案是基于干性制剂的吸入剂。在此，它是一种可通过干粉吸入器对呼吸道给药分散性干粉。

本发明的一个要点是，微粒可制成德国专利申请19737481.6中所述的干性制剂形式。在此，它们是具有特别适合的空气动力学直径的单颗粒（图1和2），所述直径有益于吸入作用（如，减少在壁上沉积）。由单颗粒形成的汇集体和/或聚集体和/或附聚体尤其表现出有益于本发明目的的空气动力学直径。考虑到肺部的解剖学条件，因为混入了这些颗粒改善了活性化合物的分布和肺的渗透作用（以及：呼吸深度）（参见Andersen Impactor实施例）。

关于空气动力学直径的定义，本发明采用了基于说明书WO 97/36574的定义，该直径通过几何直径（它由通过球结构中心点的一个表面到另一个表面的距离之球形结构的范围）与颗粒密度的根（德文Wulzel）之乘积来决定。

汇集和/或聚集和/或附聚应理解为由于非共价力的作用导致单颗粒产生累积。例如，如附图3和附图4所示，盖子样和/或覆盆子样和/或球形结构可尤其有益地发挥作用。非共价力可以是，例如两极间的相互作用、范得瓦力、氢键或另一种空间相互作用，后者通常也被定义为如钥匙-锁原理所示的作用。

本发明使用的线性多糖的分子量Mw可在 $10^3$ 克/摩尔 -  $10^7$ 克/摩尔间变化，分子量Mw优选在 $10^4$ 克/摩尔 -  $10^5$ 克/摩尔范围，尤其优选在 $5 \times 10^3$ 克/摩尔 -  $5 \times 10^4$ 克/摩尔范围。优选使用相应分子量范围的线性多糖聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)。

本发明中，“生物相容的”是指使用的多糖可经历完全生物降解并且没有明显的浓度存在于机体中。此处生物降解可被认为是体内发生的任何过程，该过程导致聚合物的降解或破坏。水解或酶促过程同样属于生物降解过程。对于多糖及其降解产物(代谢物)的生物相容性，甚至使用相同天然特性的多糖不是最重要的。因此，所述多糖特别适于治疗、诊断或预防应用。

此外，本发明术语“药学可接受的”是指用于活性化合物的载体、辅剂或所谓的赋形剂可被生物吸收而不会对机体产生明显副作用。在肺部给药的情况下，该含义是指辅剂可被肺吸收和降解、溶解

并进一步通过内源性机制转运，或者进行储存，这种储存不会由于累积对机体产生不利的影响。“活性化合物的受控释放”应理解为活性化合物在特定的时间和/或时间段后以有益于生物体的剂量释放(具体情况下的统计学偏差是可接受的)。

该定义还包括极端情况。一方面，制剂中含有的所有活性化合物在一段时间内的自发释放接近零值。另一方面，为获得疗效所需的最小用量/剂量，在较长的时间内或者甚至无限的时间里，释放制剂中含有的所有活性化合物所需的至少一段时间。

因此，本发明的干性制剂的同义词还包括缓释型制剂或延迟释放型制剂。本发明中的“干性制剂”和/或“粉剂”是指由各自药物组分构成的固体细颗粒。这些颗粒整体上是可自由流动和可分散的。

在通过吸入使用的具体情况下，干性制剂和/或粉剂还指在干粉吸入器中使用以产生疗效的制剂。在此，也使用术语“可用于活性化合物的肺部转运的”或者“可吸入的”或“可呼吸的”。

在此，本文中“干”或“干性”应理解为含水量低于25%，优选低于15%。水含量尤其优选为5-10%。

本发明的“疗效”是指治疗有效量的活性化合物到达所需的治疗靶位，在该部位表现出其作用并引起生理反应。包括减轻和/或治愈作用。

本发明的“分散性”是指通过外部机械力的作用所得干性制剂可雾化或流态化，这种状态可稳定预定的短的一段时间(分散于气体中的固体或分散于液体中的固体)，由此引发产生有益效果的后续过程。在本文中，肺部使用，即通过肺部吸收活性化合物作为优选的实例，但也不排除其它的活性化合物转运方式。

低于肺部给药，可使用市售的常用吸入器，尤其可使用专利和公开说明书中已经描述过的所谓“干粉吸入器”(制造商：3M Manufacturing Minnesota Mining, Inc., Inhale Therapeutic Systems, Inc., Dura Pharmaceuticals, Aerogen and Aradigm Corporation, WO 94/16756, WO 96/30068, WO 96/13292, 96/33759, WO 96/13290, WO

96/32978, WO 94/08552, WO 96/09085, WO 95/28192)。

对可以借助所述赋形剂的药物组合物形式通过呼吸道给药的活性化合物没有严格限制。

具体地说, 药物组合物对遗传学引起的或在生命过程中患有的疾病有效。活性化合物的释放可以是系统性地或局部地。可期望镇静性或治疗性作用。

本发明使用的活性化合物可以是水溶性的或水不溶性的。药物组合物中使用的活性物质或活性化合物可以是治疗或诊断性的, 也可以是预防性的。使用的活性化合物可用于所有各种适应症。可提及的适应症, 例如: 哮喘、囊性纤维化、各种肺病、糖尿病(低血糖反应)、恶性肿瘤、胰纤维性囊性病、肾性贫血、血友病、排卵刺激、中性白细胞减少、Gaucher氏病、肾上腺样瘤、毛细胞白血病、癌、多发性硬化、慢性肉芽肿病、心肌梗塞、血栓形成、垂体发育不全、与肝素有关的II型血小板减少症(HAT)的治疗、接种疫苗、乙肝的预防、细胞成分生长的刺激、支气管炎、慢性呼吸道疾病、肺病和胸部感染。

对特定的赋形剂没有严格限制, 只要它们对活性化合物的稳定性没有影响。使用的天然多糖是化学惰性的物质, 因此即使是敏感性活性化合物, 例如肽和蛋白质也可施用。在本文中, 肽和蛋白质是特别令人感兴趣的, 它们由二十种天然氨基酸构成。然而, 用非天然存在的氨基酸对天然氨基酸进行部分置换也不会影响本发明所述的实用性(如, 西曲瑞利克斯)。另外, 也可用于寡核苷酸或病毒载体的给药。

在蛋白质和肽的情况下, 可使用天然化合物或那些可制备的化合物, 尤其是通过生物工程和/或基因工程方法步骤制备的化合物(通常以重组的活性化合物来掺入)。在此, 治疗剂和疫苗是不同的, 例如人DNase (链球菌DNA酶 $\alpha$ )、红细胞生成素 $\alpha$  (epoietin  $\alpha$ )、红细胞生成素 $\beta$  (epoietin  $\beta$ )、第七因子(eptacog  $\alpha$ )、第八因子、 $\alpha$ -促滤泡素、 $\beta$ -促滤泡素、G-CSF、糖基化利诺司啶、G-CSF(菲尔司啶)、GM-CSF(莫拉司丁)、胰高血糖素、葡糖脑苷脂酶(阿糖苷酶)、IL-2 (aldesleukin)、干扰素 $\alpha$ -2a、干扰素 $\alpha$ -2b、干扰素 $\beta$ -1b、干扰素 $\gamma$ -1b、

胰岛素(人胰岛素、lispro)、t-PA (阿太普酶)、r-PA (reteplase)、人生长激素(HGH, 生长激素)、水蛭素、乙肝抗原、甲型乙型肝炎联合疫苗、MPLIF-1(髓样先祖抑制剂因子-1)、KGF-2 (角质细胞生长因子)。

总之, 下列各组的活性化合物和所述类别的活性化合物以特别是此处所述的肺部给药技术使用也是有益的: 降钙素、非氨酯、AZT、DDI、GCSF、拉莫三嗪、促性腺激素释放因子(激素)(GNRH、GHRH和GHRH类似物)、黄体激素释放激素(LHRH)和LHRH类似物(包括拮抗剂和激动剂, 如乙酸亮丙瑞林、亮丙瑞林、lupron或lupron缓释剂、布舍瑞林、雷莫瑞克、西曲瑞利克斯)、TRH (促甲状腺素释放激素)、腺苷脱氨酶、阿戈托班、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、舒喘宁、阿米洛利、特布他林、异丙肾上腺素、异丙喘宁、吡布特罗、丙酸氟替卡松、布地奈德、二丙酸倍氯米松、色甘酸、色甘酸二钠、茶多罗米、舒喘灵、倍氯米松、间羟舒喘灵酯、莫米他松、triacetonide、异丙肾上腺素、沙美特罗、沙美特罗 xinetate、福莫特罗、醋酸曲安缩松、9-去氟肤轻松、氟替卡松、沙丁胺醇、非诺特罗、异丙托溴铵、速激肽、tradykinin、吠塞米、那法瑞林、硫酸舒喘宁、硫酸异丙喘宁、促生长素抑制素、催产素、去氨加压素、胰泌素胰高血糖素、可待因、吗啡、地尔硫卓、酮替芬、头孢菌素、戊双肼、氟替卡松、替泼尼旦、诺司卡品、异他林、阿米洛利、异丙托品、氧托铵(oxitropium)、可的松、泼尼松龙、氨茶碱、茶碱、美沙吡林。镇痛药、心绞痛制剂、抗变态反应剂、抗组胺剂、抗炎药、支气管扩张剂、支气管解痉剂、利尿剂、抗胆碱能剂、抗粘附分子、细胞因子调节剂、生物活性的核酸内切酶、重组人DNase、神经递质、白三烯(leukotrine)抑制剂、血管活性肠肽、内皮素拮抗剂、兴奋剂、止痛剂、局部麻醉药、麻醉药、抗癫痫剂、抗惊厥剂、抗帕金森氏病药、止吐剂、调节或刺激激素系统的化合物、调节或刺激心血管系统的化合物、调节或刺激呼吸道系统的化合物、维生素、微量元素、抗氧化剂、细胞抑制剂、抗代谢物、抗感染剂、免疫调节剂、免疫抑制剂、抗生素、蛋白质类、肽、激素、生长激素、生长因子、黄嘌呤、疫苗、类固醇、 $\beta_2$ 模拟物。

可使用这些化合物和这类物质的游离酸和游离碱，或药物活性及药学可接受的盐，以及它们的水解物、片段或其代谢物。类似地，常用辅助剂及添加剂可用于本发明的制剂。

下列实施例用于进一步说明本发明，而不是将本发明限制为实施例所述的产品和实施方案。

## 实施例

下列实施例具体涉及微粒的制备(参考如德国专利申请19737481.6中所述)。另外，WO 95/31553描述了一种聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的特别有益的制备方法。而且，提及了说明肺部给药的实施例，尤其是借助粉末吸入器的干性制剂。

### 实施例1

通过借助淀粉蔗糖酶的生物催化方法体外生产聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)

将10升20%强度的蔗糖溶液加到无菌的(蒸汽灭菌)15升容器中。将通过发酵获得的含淀粉蔗糖酶的酶提取物以一份加到蔗糖溶液中。酶活性为16单位(1单位相当于每分钟每毫克酶的1微摩尔蔗糖的反应)。提供KPG搅拌机，该搅拌机同样是无菌的。将所述容器密封，保持于40℃并搅拌。一段时间后，生成白色沉淀。180小时后结束反应。滤除沉淀，洗涤数次以除去低分子量的糖。将滤器中的残留物在30-40℃的室温下，借助膜泵(Vacuubrand GmbH & Co. CVC 2)在干燥箱中真空干燥。产物为685克(产率 69%)。

### 实施例2

通过凝胶渗透色谱法表征用实施例1的淀粉蔗糖酶合成的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)

在室温下，将2毫克实施例1的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)溶于二甲基亚砜(DMSO, p. a. Riedel-de-Haen)中并过滤(2毫米过滤器)。将一部分该溶液注射到凝胶渗透色谱柱上。用DMSO作为洗脱剂。通过RI检测器测

定信号强度并针对支链淀粉标准进行评估(聚合物标准系统)。流速为1.0毫升/分钟。

测定结果如下：数均分子量(Mn)为3200 g/mol，重均分子量(Mw)为9300 g/mol。相应于2.8的分散度。

### 实施例3

#### 聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)微粒的制备

在40℃下经过1.5小时，将400g聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)溶于2 L二甲基亚砷(DMSO, Riedel-de-Haen)。然后将该溶液在室温搅拌1小时。搅拌下，通过滴液漏斗经2小时将该溶液加到20 L双蒸水中。该混合物在6℃存放40小时。形成细颗粒的悬浮液。通过首先离心上清液分离颗粒。将沉淀浆化并以多个小份离心(超离心RC5C：每分钟5000转下每次离心5分钟)。用双蒸水使固体残留物浆化并再次离心，重复三次。收集固体并将约1000毫升的悬浮液冻干(Christ Delta 1-24KD)。分离出283g白色固体(实施例3a，产率71%)。使收集的上清液在18℃保持过夜。如上述进行后处理。分离到另外的55g白色固体(实施例3b：产率14%)。总产率为85%。

### 实施例4

#### 微粒的脱硫

为除去残留在颗粒中的二甲基亚砷，进行如下方法。将100g实施例9的直链淀粉颗粒加到1000毫升去离子水中。静置混合物约24小时，伴有轻轻涡旋。按照实施例9所述除去颗粒(超离心RC5C：每次15分钟，3000转/分)。冻干后，得到终产物的重量为98.3g(产率98%)。通过元素分析测定硫，得到如下结果(测定方法：燃烧方法和IR测定)：

实施例2颗粒的硫含量： 6% +/- 0.1%

实施例3颗粒的硫含量： < 0.01%

### 实施例5

通过电子显微镜观察实施例3的微粒

为表征颗粒的性质，进行扫描式电镜（SEM）扫描(Camscan S-4)。附图(图1和图2)显示的颗粒点说明颗粒是球形的，其形状、大小及表面粗糙度都十分均一。

### 实施例6

观察实施例3颗粒粒径的分布

为表征实施例1和9的颗粒的粒径分布，用Mastersizer进行观察(Malvern Instruments)。以Fraunhofer模式进行观察(评价：多模式，数量)，密度为 $1.080 \text{ g/cm}^3$ ，体积浓度范围为 $0.012 - 0.014\%$ 。

表1:

实施例3的微粒粒径表征:

实施例	直径			颗粒分布			
	No.	$dn^{*1}$ (mm)	$dw^{*2}$ (mm)	$dw / dn^{*3}$	$d(10\%)^{*4}$ (mm)	$d(50\%)^{*5}$ (mm)	$d(90\%)^{*6}$ (mm)
3a		1.664	4.184	2.541	0.873	1.504	2.624
3b		0.945	2.345	2.481	0.587	0.871	1.399

\*<sup>1</sup> dn: 数均直径

\*<sup>2</sup> dw: 重均直径

\*<sup>3</sup> dw/dn: 颗粒直径的分散度

\*<sup>4</sup> d(10%): 总数10%的颗粒直径小于所示值

\*<sup>5</sup> d(50%): 总数50%的颗粒直径小于所示值

\*<sup>6</sup> d(90%): 总数90%的颗粒直径小于所示值

### 实施例7

测定聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)微粒的飞行距离

Anderson撞击仪(Andersen Samplers Inc., 4215 Wendell Drive, Atlanta, GA, 美国和参见: Pharmacepoeia Europaeum, Stuttgart, Deutsche Apothekerverlag 1997, Chap. 2.9.18; 在此: 适用D)包括彼此分离的级联板, 板上安装有连续变小的小洞(孔)。根据空气动力学颗粒大小, 颗粒在各个板上积存。

表2: Andersen撞击仪的特性:

过滤板架	孔径(英寸)	孔径 [ $\mu\text{m}$ ] <sup>*1</sup>	孔数
0	0.1004	2550	96
1	0.0743	1887	96
2	0.0360	914	400
3	0.0280	711	400
4	0.0210	533	400
5	0.0135	342	400
6	0.0100	254	400
7	0.0100	254	201

\*<sup>1</sup>以“ $\mu\text{m}$ ”表示的数据通过制造商的“英寸”数据转换获得。

Andersen撞击仪实验如下进行: 将100mg物质(在此是按照实施例3和4制备的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的三种不同微粒样品和聚集物(汇集物))

加到撞击仪的混合物入口处并用属于该仪器的泵(泵输出: 35L/分)将其吸入级联过滤板。一分钟后, 该仪器停止工作并测定各过滤板(或撞击板)的质量。后面的附图中图示出了微粒的质量。在此, 使用低输出的泵情况下, 其良好的飞行行为尤其清楚, 反映为在较高的撞击板(过滤板)上沉积的质量也较高。在撞击仪的混合物入口处借助机械振动使颗粒以悬浮形式保持可使残留在起始点的物质最小化(参见, 样品2)。

附图5显示聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的各种样品在Anderson撞击仪中的行为。

### 实施例8

其它多糖、常规(小孔)吸入器中的物质和合成聚合物微粒的飞行距离测定(对比实施例)

以类似于实施例8的方法对其它部分水溶性多糖、常规吸入器中的物质和合成的但可生物降解的聚合物微粒(对比实施例)进行对比实验。所述多糖是粒径最高为100 $\mu$ m, 约为4 $\mu$ m的Toffena型的马铃薯淀粉(Sudstarke)和Remygel类型(REMY)的稻米淀粉。吸入器是Aerolizer(吸入器1, Ciba Geigy)和Atemur Diskus(吸入器2, Cascan)。乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)微粒通过喷雾干燥(原料: Medisorb的PLGA 65:35-d,l)制备, 其直径约为2 - 15 $\mu$ m。

图6显示了其它部分水溶性多糖在Andersen撞击仪中的行为(对比实施例)。

图7显示了常规吸入器中的物质和合成的但可生物降解的聚合物微粒在Andersen撞击仪中的行为(对比实施例)。

### 实施例9

聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)及其聚集物的各种几何形状微粒的飞行距离测定

在弯曲管中观察各种大小和表面粗糙度的微粒的飞行或积存行为。该实验构成了颗粒光学形态学和干粉吸入器中用于给药的附聚

物的评估基础。该模型基于下列设想：气流通过路径 $d=20\text{mm}$ ；气流密度 $r_{fl}=1.2\text{ kg/m}^3$ ；气流粘度 $h=1.81\times 10^{-5}\text{ Pa s}$ ；流速 $v_{fl}=5\text{ m/s}$ ；曲率半径 $R=20(200)\text{ mm}$ ；曲率角 $a=45^\circ$ ；粒径 $x=1-5\text{ mm}$ ；固体密度 $r_s=1550\text{ kg/m}^3$ ；形状因数 $Y=1+\text{偏差}$ 。

首先，将球形和非球形颗粒的行为彼此进行比较。对于非球形颗粒，预先规定结构的几何学描述。当这种颗粒流过管的弯曲部位时，探索到其在空气动力场的沉降速度及发生径向偏转。借助偏转计算值，可估计当颗粒流过管的弯曲部位时，有多少颗粒触壁并保持附着，即发生沉积。

颗粒形状与球形的偏差可借助形状因数 $\Psi$ 描述。该因数被定义为具有等体积的球形表面与颗粒实际表面的比率。对于球形， $\Psi=1$ ，对于非球形 $\Psi<1$ 。形状因数越小，跟随空气流流动的颗粒数越多，在管的弯曲处由于壁附着沉积的颗粒数越少。空气动力学直径行为与形状因数成反比。 $\Psi$ 值=0.8时，例如相应地固体密度从 $1550\text{ kg/m}^3$ 降到 $1400\text{ kg/m}^3$ 。

在首先的观察中，将光滑的球与表面粗糙的球进行比较。通过架设在基础球上的相对小的球形部分（球盖）估测粗糙度。球形部分一面朝外（覆盆子结构），另一面朝内（火山口样）。朝外的部分，计算得出的形状因数为 $\Psi=0.958$ ，朝内部分 $\Psi=0.946$ 。另外，还观察到了颗粒的附聚物。观察到的附聚物（附聚体）理想地以非常紧密的球形堆积排列方式形成了下面的排列（对于四面体，还参见附图2）。附聚体以各个球的附聚物为模型，具有下列特性：a)由4层球构建的四面体。各边都由4个球形成。总之，四面体包括20个球；b)附聚体由具有3、7和3个球的3层球形成（小双锥）；c)附聚体由每层分别具有1、3、7、3和1个球的5层球形成（大双锥）。

下表总结了计算结果。为具有可比性，在与预先规定体积相当的粒径为5微米的情况下只有与球形的偏差被认为是参数。应该说明的是单个球的上述几何学直径相应地较低。沉降速度随与球形的偏差增大而降低。因此，当流过管的弯曲处时，沉积度也减弱。与直径为5

微米的球相比，构建附聚物形成的颗粒形式的沉积度降至66%。这些模型实验的结果证实了本发明就表面粗糙度方面的优点，并且附聚物也是以非常紧密的球形堆积方式排列的。尤其可以看出随着形状因数 $\Psi$ 降低，即趋于零，空气动力学直径改善。空气动力学直径越好，肺部渗透（呼吸深度）也越深入。

表2: 上述颗粒形式的计算结果

	形状因数 $\Psi$	附聚物密度[kg/m <sup>3</sup> ]	引力场的沉降速度[m/s]	径向偏转[mm]	沉积度[%]
球	1	1550	0.001165	0.466	2.33
球（内侧盖）	0.946	1550	0.001134	0.453	2.26
球（外侧盖）	0.958	1550	0.001141	0.456	2.28
附聚四面体	0.49	1430	0.000753	0.301	1.50
3层双锥附聚体	0.56	1390	0.000782	0.313	1.56
5层双锥附聚体	0.52	1405	0.000762	0.305	1.52

### 实施例10

通过悬浮方法在颗粒上负载活性化合物

通过悬浮方法在聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的微粒或附聚体（实施例3和4中制备的）上负载活性化合物。将250mg布舍瑞林\*溶于10ml蒸馏水中。加入100mg颗粒。将该悬浮液搅拌3小时。将悬浮液离心。将离心液用水洗涤。通过离心（3000 rpm）分离出颗粒固体并将离心液冻干。通过将一定量的颗粒溶于水-二甲基亚砜中，在紫外-可见光分光光度计中测定光谱，基于颗粒的总质量，可通过校准曲线计算出布舍瑞林的负载为3.28%。通过改变活性化合物的溶剂，例如醇类，可影响活性化合物的溶解性和颗粒的负载。

(\* 5-氧代-L-脯氨酸-L-组氨酸-L-色氨酸-L-丝氨酸-L-酪氨酸-O-叔丁基-D-丝氨酸-L-亮氨酸-L-精氨酸-N-乙基-L-脯氨酸胺)

### 实施例11

#### 通过喷雾干燥在颗粒上负载活性化合物

将微粒悬浮在蒸馏水中，或者悬浮在水和易挥发成分，例如丙酮或乙醇的混合液中。将10g固体悬浮在1000ml溶剂中。预先将0.5g茶碱溶于所述溶剂中。如下进行喷雾干燥（Buchi的Mini Spray Dryer 191）：

雾化气流700升/小时，进口温度200℃，接通喷嘴冷却、喷嘴直径0.5mm，吸气器70%，泵10%。分光镜观察负载（见上面的实施例描述），显示出负载度为4.8%。该值与5.0%的理论可实现值一致（在误差限度范围内）。

### 实施例12

#### 多糖溶解度的测定

将100mg聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)加到5ml双蒸水中。该反应容器在搅拌（磁力搅拌器）下缓慢地加热。以20℃间隔的分步程序加热并用肉眼观察。在40℃、60℃、80℃和100℃温度下没有观察到变化。根据这些观察，可认为本发明的化合物是“水不溶性的”。

### 实施例13

#### 多糖溶解度的测定并按照德国药典（GP）分类

在高压灭菌器中，在1.3巴和130℃下，将564mg聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)在约0.5L双蒸水中加热1.5小时（Certoclav设备）。预先称量了反应容器的重量。然后使仪器降压并降至室温。将内容物称重。其重量为501.74g。再过24小时后，将该混合物离心并弃去上清液。将固体残留物干燥并称重：468mg。由此计算溶解的部分为96mg。根据使用的溶剂计算出：对于1mg聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)，需要5226mg水。根据德国药典分类，该类属于“溶解性极差”的物质，即为使1份物质溶解，需要1000至10,000份的溶剂。在7类溶解度分类中（从“极易溶”（第1类）到“实际上不溶”（第7类）），该类是第6类。

#### 实施例14

多糖溶解度的测定并按照德国药典（GP）分类

按实施例13进行实验。唯一的差异是在高压灭菌处理后插入冷却过程，冷却到室温。将物质混合物在5℃贮存3小时。

称重526mg聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)并将其加到约480ml双蒸水中。加热处理后，终重为468.09g。干燥的沉淀量为488mg。因此，有38mg聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)溶解。该结果与溶解1mg物质需要12318份溶剂的比率相一致。因此，按照该处理方法，该物质被认为是GP规定的第7类物质，即“实际上不溶”类，因为要溶解1份物质需要10000份以上的溶剂。

#### 实施例15

由高压灭菌的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)悬浮液制备微粒

将3.5g 聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)粉末用60℃的水洗涤三次。然后悬浮在200mg去离子水中。该悬浮液放入实验室高压灭菌器(压力容器：452 HCT 316型；Parr Instruments Deutschland GmbH制造)中。该容器室用氮气冲洗以使压力达到1.5巴。在搅拌下，将高压灭菌器加热至130℃。在该温度下湿热灭菌30分钟。产生约5巴的压力。待高压灭菌器冷却后，取出悬浮液并立即在喷雾干燥机中喷雾。喷雾期间，借助磁力搅拌器持续搅拌该悬浮液。

如下操作喷雾干燥器（瑞士Buchi制造的Mini Spray Dryer 191）：雾化氮气流700L/小时，进口温度220℃，打开喷嘴冷却，喷嘴直径0.5 mm，吸气器70%，泵70%。

从旋流收集容器中取出喷雾干燥的物质并贮存在干燥处。90%以上的微粒大小小于10 $\mu$ m（电子显微照片的分析）。

#### 实施例16

由聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)制备微粒

研究用由生物转化直接得到的聚葡聚糖制备可呼吸颗粒的可能性。研究通过将500g实施例1的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)悬浮在2.5L水中制成20%强度的悬浮液进行。将该悬浮液喷雾干燥。如下操作喷雾干燥(瑞士Buchi制造的Mini Spray Dryer 191): 雾化气流650L/小时, 进口温度140℃, 无喷嘴冷却, 喷嘴直径0.7 mm, 吸气器70%, 泵30%。从产物收集容器中取出197.5g白色固体, 产率40%。90%以上的颗粒直径在1-10 $\mu$ m范围。

使用实施例7中描述的Andersen撞击仪测定在活性物质通过吸入给药中是否可用作干粉形式给药的赋形剂。结果显示于附图8, 表明通过喷雾干燥获得了原则上可呼吸的颗粒(还参见与实施例7和8相关的附图5-7)。

### 实施例17

测定聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)的微粒和粉末的流动特性(按照List等, *Arzneiformenlehre*, WVG, Stuttgart, 1985; section 2.10.1.)

将100g实施例3和4及实施例1的粉末装入流动漏斗(流动性测试仪, Engelsmann, Ludwigshafen制造), 装入期间使流出孔保持封闭。打开流出孔通过转动曲柄用搅拌叶片使粉末混合, 粉末同时流出。粉末静止2分钟后, 测量粉末锥的直径和高度, 并由此测定静止角。如果堆体积太大, 可用50g粉末代替100g粉末。

表: 按照List(出处同上, 53页和之后):  $\tan \alpha = h/r$

干粘合剂	锥的高度	锥的半径	静止角
单位	h (cm)	r (cm)	$\alpha$ (°)
实施例3、4的微粒	6.4	8.50	37.0
实施例1的粉末	3.6	6.25	29.9
实施例1的粉末	4.1	6.75	31.3

粉末的静止角 $\leq 30^\circ$ 是特别适宜的。对已知流动性良好的物质, 例

如EMDEX®, Avicel®, Toffena®进行了相应的对照测量, 揭示了它们的静止角都在30°左右(参见 Bauer, Froming, Fuhrer, Pharmazeutische Technologie, Stuttgart, 1989, p.345)。

### 实施例18

由高压灭菌的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)悬浮液制备的微粒的负载

将3.5g 聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)粉末用60℃的水洗涤三次。然后悬浮在200mg去离子水中。该悬浮液放入实验室高压灭菌器(压力容器: 452 HCT 316型; Parr Instruments Deutschland GmbH制造)中。该容器室用氮气冲洗以使压力达到1.5巴。在搅拌下, 将高压灭菌器加热至130℃。在该温度下高压灭菌30分钟。使其产生约5巴的压力。待高压灭菌器冷却后, 取出悬浮液并将175mg茶碱(相应于5%的负载)溶于其中, 将含活性物质的悬浮液立即在喷雾干燥机中喷雾。喷雾干燥期间, 借助磁力搅拌器持续搅拌该悬浮液。

如下操作喷雾干燥器(瑞士Buchi制造的Mini Spray Dryer 191): 雾化氮气流700L/小时, 进口温度220℃, 打开喷嘴冷却, 喷嘴直径0.5 mm, 吸气器70%, 泵70%。

从旋流收集容器中取出喷雾干燥的物质(基于高压灭菌器中使用的固体的量, 产率至少为50%)并贮存在干燥处。90%以上的微粒大小小于10 $\mu$ m(电子显微照片的分析)。

通过光度测定法检测微粒对茶碱的负载。通过将50mg样品60℃下溶于100ml二甲基亚砷中并在271nm处测定进行检测(Lambda 20 Photometer, Perkin Elmer)。负载度为至少95%。将20mg负载了活性物质的微粒装入市售干粉吸入剂(Ciba-Geigy的Aerolizer®)的计量室中, 如实施例7所述, 用Andersen撞击仪测定其飞行距离。

### 表3和4:

负载了活性物质的聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)微粒在Andersen撞击仪中的行为  
(所有值均以mg表示)

表 3

	旋风分离器	旋风分离器	过滤板	过滤板	初始重量:19.82
孔板0	初始重量:20.27	初始重量:20.31	初始重量:20.56	初始重量:20.17	初始重量:20.26
	4.30	4.5	3.3	2.8	6.7
孔板 I	0	0.33	1.48	1.35	2.44
	0.30	0.27	0.7	0.6	1.1
1	0.10	0.18	0.23	0.23	1.24
2	0.14	0.12	0.18	0.13	0.97
3	0.20	0.23	0.08	0.08	0.81
4	0.04	0.03	0.09	0.07	0.69
5	0.02	0.02	0.09	0.05	0.17
6	0.01	0.02	0.04	0.02	0.12
7	0.00	0.01	0.02	0.01	0.12
产率	5.45	5.71	6.21	5.34	14.36
					13.63

表 4

	旋风分离器	旋风分离器	过滤器	过滤器	过滤器	初始重量: 20.27	初始重量: 20.31	初始重量: 20.56	初始重量: 20.17	初始重量: 20.26	初始重量: 19.82
孔板 0	78.90	78.81	53.14	52.43	46.66	38.15					
孔板 I	6.24	5.78	23.83	25.28	16.99	22.74					
	5.50	4.73	11.27	11.24	7.66	9.54					
1	1.83	3.15	3.70	4.31	8.64	9.17					
2	2.57	2.10	2.90	2.43	6.75	6.68					
3	3.67	4.03	1.29	1.50	5.64	5.80					
4	0.73	0.53	1.45	1.31	4.81	4.77					
5	0.37	0.35	1.45	0.94	1.18	1.39					
6	0.18	0.35	0.64	0.37	0.84	1.03					
7	0.00	0.18	0.32	0.19	0.84	0.73					
产率	100	100	100	100	100	100					

图 1

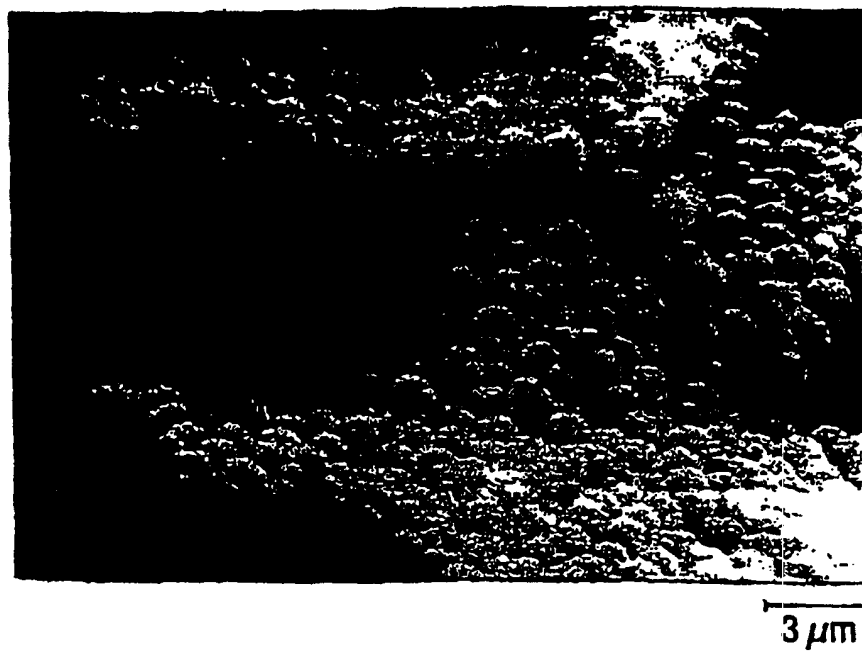


图 2



图 3



图 4



图 5

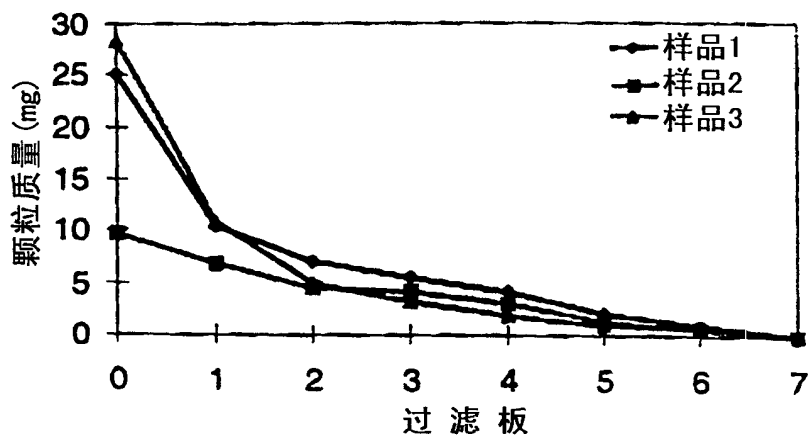


图 6

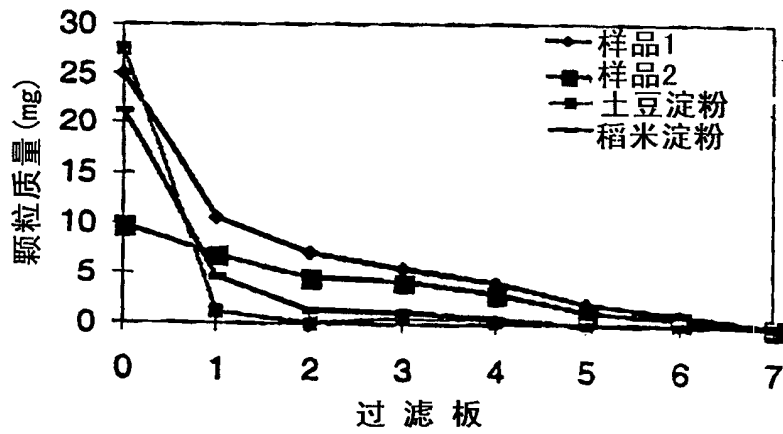


图 7

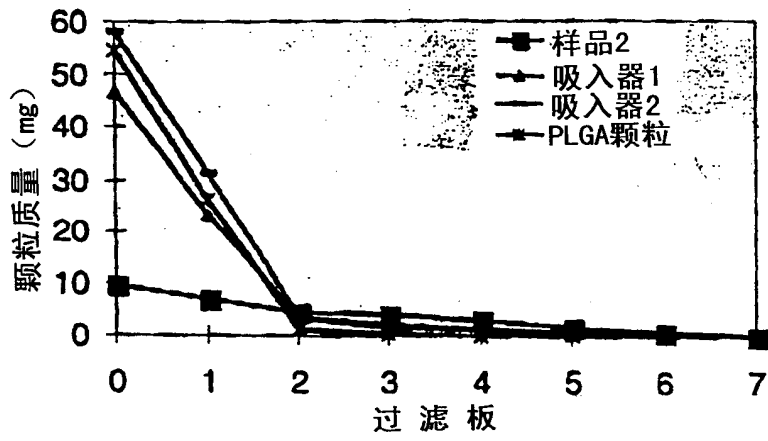
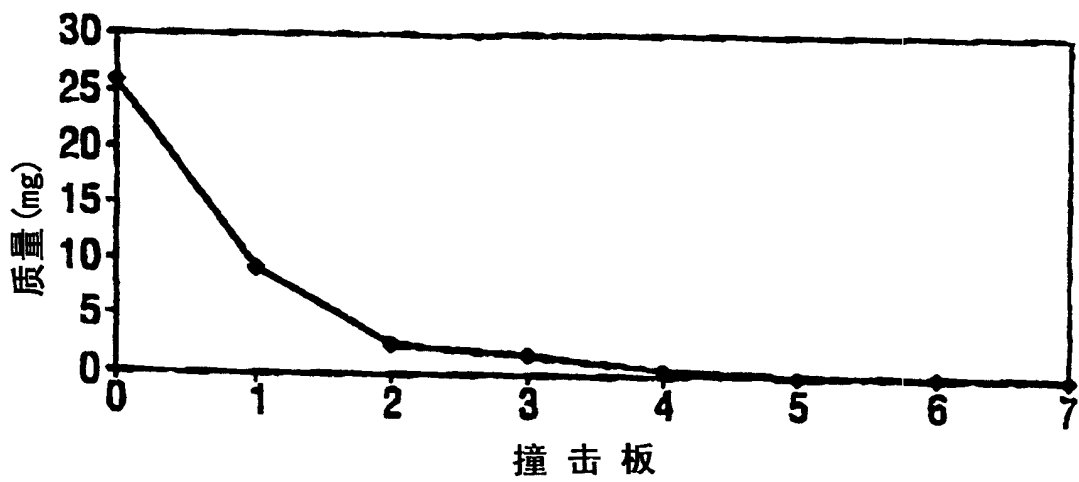


图 8



1、一种用于肺部给药的颗粒赋形剂，它含有至少一种线性水不溶性多糖，其平均粒径小于 $10\mu\text{m}$ 。

2、权利要求1的颗粒赋形剂，其中所述颗粒赋形剂形成小于 $60\mu\text{m}$ 的附聚体和/或汇聚体。

3、权利要求1和2的颗粒赋形剂，其中所述颗粒赋形剂以混合物形式存在并能使活性物质有效分布并渗透进入肺部。

4、前述任一项权利要求的用于肺部给药的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以生物工程方法制备。

5、前述任一项权利要求的用于肺部给药的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以生物催化方法制备。

6、前述任一项权利要求的用于肺部给药的颗粒赋形剂，基本上完全或者部分由至少一种水不溶性线性多糖组成，它以酶促方法制备。

7、权利要求1-6中任一项的用于肺部给药的颗粒赋形剂，其中的线性水不溶性多糖是聚(1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖)。

8、权利要求1-7中任一项的用于肺部给药的颗粒赋形剂，它是生物相容性的和/或药学可接受的。

9、权利要求1-8中任一项的用于肺部给药的颗粒赋形剂用于活性化合物受控释放入肺泡的用途。

10、权利要求1-8中任一项中用于肺部给药的颗粒赋形剂，它另外还含有一种或多种活性化合物。

11、权利要求1-10中任一项中用于肺部给药的颗粒赋形剂通过借助“干粉吸入器”吸入的用途。

12、一种可分散的干性制剂和/或粉末，它包括权利要求1-10中任一项用于肺部给药的颗粒赋形剂。

13、权利要求12的可分散的干性制剂和/或粉末，其水含量低于25%，水含量优选低于15%，尤其优选水含量为5-10%。

14、权利要求12和13中的可分散的干性制剂和/或粉末，其具有 $\leq 30$ 度的静止角。

15、一种药物组合物，除常规赋形剂、辅剂和/或添加剂之外，还含有如权利要求1-8和10中任一项的线性水不溶性多糖。