



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103933552 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410189221. 8 *A61K 47/34* (2006. 01)
(22) 申请日 2007. 01. 29 *A61K 9/16* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 17/02* (2006. 01)
2006-0021 2006. 01. 31 CU *A61P 9/14* (2006. 01)
A61P 3/10 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据
200780009034. 5 2007. 01. 29
(71) 申请人 遗传工程与生物技术中心
地址 古巴哈瓦那
(72) 发明人 B·Y·贝坦克特罗德里格斯
V·M·赛斯马丁内斯
R·佩斯梅雷莱斯
J·A·贝兰加阿科斯塔
J·A·拉蒙埃尔南德斯
(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 11038
代理人 袁志明
(51) Int. Cl.
A61K 38/18 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

用于预防糖尿病足截除的微球体药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于预防糖尿病足截除的微球体药物组合物, 具体涉及含有微球体的药物组合物, 该微球体载有表皮生长因子 (EGF), 该药物组合物肠胃外给予患有慢性局部缺血皮肤损伤的糖尿病患者的下肢。由于与给予溶液中游离的等量所述因子相比本发明的组合物减少了治疗过程中的给药频率并且使损伤愈合得更快, 所以与现有技术相比它特别有用。

1. 由表皮生长因子和共聚物组成、不含任何赋形剂的微球体在制备可注射的药物组合物中的用途,所述共聚物衍生于乙醇酸和乳酸(聚(丙交酯-共-乙交酯)),所述微球体通过双重乳化-溶剂蒸发法制得,其中表皮生长因子被包囊在所述微球体中并且占所述微球体总重量的1.6~2.4%,所述微球体的直径为1微米至100微米,并且其中在第一天后,表皮生长因子的释放速率为5~10微克/天,所述可注射的药物组合物用于治疗糖尿病患者的糖尿病性足部溃疡或下肢慢性局部缺血性皮肤创伤和防止所述肢体的截除,其中在包括创伤的边缘及底部的组织内通过局部浸润给予所述可注射的药物组合物。

2. 根据权利要求1的用途,其中将所述微球体悬浮于PEG-PLGA-PEG型的热敏性水凝胶,或壳聚糖或葡聚糖的衍生物中。

3. 可注射的药物组合物,其包含由表皮生长因子和共聚物组成、不含任何赋形剂的微球体,所述共聚物衍生于乙醇酸和乳酸(聚(丙交酯-共-乙交酯)),所述微球体通过双重乳化-溶剂蒸发法制得,其中表皮生长因子被包囊在所述微球体中并且占所述微球体总重量的1.6~2.4%,所述微球体的直径为1微米至100微米,并且其中在第一天后,表皮生长因子的释放速率为5~10微克/天,其中在糖尿病患者的包括糖尿病性足部溃疡或下肢慢性局部缺血性皮肤创伤的边缘及底部的组织内通过局部浸润给予所述可注射的药物组合物以防止所述肢体的截除。

用于预防糖尿病足截除的微球体药物组合物

[0001] 本申请是申请号为 200780009034.5、2007 年 1 月 29 日、发明名称为“用于预防糖尿病足截除的微球体药物组合物”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含聚合物微球体的药物组合物,该微球体含有表皮生长因子 (EGF),其通过肠胃外途径应用到患有慢性局部缺血皮肤溃疡性创伤的糖尿病患者的下肢中用于预防糖尿病肢截除。

背景技术

[0003] 糖尿病是下肢截除的主要非外伤性危险因素。作为糖尿病主要并发症,足部溃疡每年的发病率略高于 2% (Abbott C. A., 等人 (2002) *The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort.* *Diabet. Med.* 第 19 卷, 第 5 期: 第 377 — 384 页)。至少有 15% 的糖尿病患者在其一生中患有足部慢性溃疡 (Reiber G. E. (1996) *The epidemiology of diabetic foot problems.* *Diabet. Med.* 第 13 卷增刊 1: 第 S6 — 11 页), 并且在这些患者中估计约有 10% — 30% 需要下肢截除 (Lipsky B. A. (2004) *Medical treatment of diabetic foot infections.* *Clin. Infect. Dis.* 第 39 卷, 增刊 2: 第 S104 — 114 页)。进行下肢截除的患者 5 年死亡率约为 50% — 60% (Reiber G. E. (1996) *The epidemiology of diabetic foot problems.* *Diabet. Med.* 第 13 卷, 增刊 1: 第 S6 — 11 页)。有很多种方法用于治疗患有慢性局部缺血皮肤溃疡性创伤的糖尿病患者。这些方法包括严格的代谢控制, 预防可缓和的危险因素, 手术清创术, 使用敷料, 抗微生物剂治疗感染, 减轻受伤处的压力, 使用皮肤移植物, 生长因子, 以及有指征时采用换血管方法。

[0004] 控制新陈代谢后, 手术清创术是治愈糖尿病溃疡的最重要的治疗, 应在任意其他局部治疗模式之前进行。手术清创术包括清除所有受损伤区的坏死和感染组织 (包括骨) 及周围胼胝状组织。

[0005] 敷料用于糖尿病足部溃疡的用途已被充分建立, 尽管已有几种敷料被研究, 但每种敷料相对于其他敷料的优点是未知的。另外, 由于对敷料应用的研究很少, 并且它们主要涉及低等级溃疡, 所以还需要更多的临床试验证据证明其功效。已在临床试验中得到研究的新型敷料包括以半透聚合膜, promogran (胶原基质), 藻酸盐, 羧甲基纤维素, 透明质素为基础的敷料, 以及采用亚大气压的 (sub-atmospheric) 敷料 (Eldor R., 等人 (2004) *New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies.* *Diabet Med.* 第 21 卷, 第 11 期: 第 1161 — 1173 页)。

[0006] 已建立好几种方法, 产生置于溃疡处的皮肤替代物。例如, 将人真皮的成纤维细胞种在生物可吸收材料的合成支架上, 产生皮肤移植物。这种装置显示在低等级溃疡中有效, 在较小的时间间隔内就有较高的治愈率 (Marston W. A., 等人 (2003) *Dermagraft Diabetic*

Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 第 26 卷: 第 1701 – 1705 页)。Apligraf 由两层组成, 一层为由在 I 型牛胶原基质中的人成纤维细胞构成的真皮层, 另一层为由人角质形成细胞形成的表皮层。类似地, 在将这种皮肤替代物用于神经病性低等级和未感染的溃疡时, 其显示产生显著较大和较快的损伤愈合 (Veves A., 等人 (2001) *Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of non-infected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. Diabetes Care* 第 24 卷: 第 290 – 295 页)。

[0007] 在随机, 双盲, 以安慰剂为参照的 III 期临床试验中显示, 血小板衍生生长因子 (PDGF) 的凝胶制剂可有效安全地治疗患有神经病性溃疡且具有良好血灌流的糖尿病患者 (Wieman T. J., 等人 (1998) *Clinical efficacy of beclaplerin (rhPDGF-BB) gel. Diabetes Care* 第 21 卷, 第 5 期: 第 822 – 827 页)。经测面积法评价, 本研究中包括的大部分患者 (95%) 的溃疡面积 $\leq 10\text{cm}^2$ 。与安慰剂相比, 贝卡普勒明凝胶 $100\ \mu\text{g/g}$ 显著增加创伤的完全愈合 43% (50 vs. 35%, $p = 0.007$) 并且减少了达到该效应所需时间 32% (86 vs 127 天, $p = 0.013$)。使用 PDGF α 贝卡普勒明 (Regranex) 的令人满意的结果使其被批准用于治疗位于糖尿病患者下肢的神经病性溃疡, 该溃疡可扩展直到皮下组织或更深并具有合适的血流量 (Brem H., Sheehan P., Boulton A. J. (2004) *Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. Am. J. Surg.* 第 187 卷, 第 5A 期: 第 1S–10S 页)。

[0008] 最近, 公布了一种愈合剂诸如表皮生长因子 (EGF) 的给药方法, 其包括通过几次注射使 EGF 溶液浸润至创伤中 (W003/053458)。但该方法有一个明显缺点: 因为在损伤处进行注射特别疼痛, 所以它对患者来说是非常创伤性的。在每次治疗中必须进行几次注射并且患者必须在几周内间隔几天接受治疗。鉴于该方法的缺点, 采用 EGF 的缓释制剂可降低给药频率, 这将大大加强患者的方便及顺从。

[0009] 在专利 (U. S. 6. 086. 863) 中, 将调节生长因子 (即表皮生长因子) 包入含有聚苯乙烯或其他非降解型聚合物的微球体的预防或治疗性组合物中, 通过局部应用这些微球体在适当介质中的悬浮液, 改善创伤诸如糖尿病足部溃疡的修复过程。由于很多因素可干扰药物吸收, 很难控制到达作用位点的剂量, 因此药物的局部应用具有与此有关的限制。在所述影响因素中可提及的有: 存在坏死组织和局部渗出液, 受损的血液流量, 降解 EGF 的酶。

[0010] 因此, 治疗糖尿病足部溃疡中的重要问题是确定刺激局部缺血组织的再生及预防糖尿病肢截除的药物的有效剂量。

[0011] 很多其他专利将注意力集中在为加速治愈速率而设计的其它方法。但是, 这些方法中没有一个方法证明是广泛有效的。

发明内容

[0012] 总体上, 本发明涉及含有微球体的药物组合物, 该微球体载有表皮生长因子, 该药物组合物通过在患有慢性局部缺血性皮肤创伤的糖尿病患者下肢经肠胃外途径给药, 目的是预防这些肢体的截除。在本发明中, 术语“微球体”包括微球体和纳球体。

[0013] 将 EGF 包囊于微球体中: (i) 可以缓释药物, 以及 (ii) 保护 EGF 不被降解处理, 诸

如位于作用位点的蛋白酶产生的蛋白消化作用。

[0014] 在本发明中,可将微球体描述如多聚球体,药物均匀分散在其全部容积中,以受控的方式释放。

[0015] 在本发明的背景中,术语“控释”包括持续,不持续,线性或非线性形式的释放药物。这通过使用单独或联合由聚合物基质,包含调节释放性质的赋形剂,和/或加入聚合物降解加强剂或其他调节剂而制成的不同组合物来实现,在组合物的性质方面产生预期效果。

[0016] 采用 Okada 等人 (US4, 652, 441) 描述的双重乳化/溶剂蒸发法制得微球体。

[0017] 开发本发明优选的聚合物是生物兼容的和生物可降解的聚合物。生物可降解性很重要,因为通过其在创伤处的浸润允许肠胃外应用所述制剂。特别优选乙醇酸或乳酸的均聚物和由聚(丙交酯-共-乙交酯)(缩写为 PLGA) 衍生的共聚物。这些聚合物具有的特性使其可作为优秀的生物材料,用于制备缝合线,整形外科的固定装置以及药物递送系统的聚合物基质 (Ashammakhi N., 等人 (2001) *Developments in Craniomaxillofacial Surgery: Use of Self-Reinforced Bioabsorbable Osteofixation Devices*. *Plast. Reconstr. Surg. Special Topic*: 第 167 — 180 页; Eppley B. L. (2005) *Use of resorbable plates and screws in pediatric facial fractures*. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 第 63 卷, 第 3 期: 第 385 — 391 页)。关于其性质,除了提供改变以聚合物基质的组合物为基础的药物释放性质,聚合物的分子量及向颗粒中加入其他赋形剂的可能性,它们还具生物兼容性和生物可降解性。

[0018] 除了 PLGAs,也可采用其他具有类似性质,诸如生物兼容性和生物降解性的多聚物。它们包括聚己内酯,聚羟基丁酸酯-聚羟基戊酸酯共聚体,聚乳酸-聚己内酯共聚体,聚原酸酯和聚酸酐。

[0019] 在一个优选的实施方案中,药物组合物的微球体直径为 1 — 100 μ m, EGF 占微球体总重量的 1.6 — 2.4%。

[0020] 在另一个优选的实施方案中,微球体包含的 EGF 在其第一天浸润后,每天释放 5 — 10 μ g, 在 14 天期间维持其物化和生物性质。

[0021] 本发明另一方面是指通过在包括创伤边缘和底部的局部组织中局部浸润给予上述药物组合物,治疗糖尿病患者的局部缺血创伤。

[0022] 在微包囊过程后,蛋白药物微包囊需要特别注意这些生物分子的活性。这是因为大部分蛋白对微包囊过程中经常产生的高温和溶解聚合物所用的有机溶剂敏感。另一方面,在微包囊过程中,每种蛋白都表现出自己的行为。考虑到这些方面,建立用于制备载有蛋白并且其活性不变的微球体的方法需要进行额外的研究,以选择适合的方法,聚合物,溶剂,添加剂等。

[0023] 作为活性剂,药物组合物中可包含的 EGF 可以通过化学合成,也可以通过重组 DNA 技术从天然源中获得。

[0024] 药物组合物可包含下列类型的某些附加药物作为赋形剂的一部分: 抗微生物剂 (青霉素类, 头孢菌素类, 喹诺酮类, 甲硝唑, 克林霉素, 万古霉素, 大环内酯类, 四环素类, 氨基糖苷类和亚胺培南), 麻醉剂, 非甾体抗炎药类的止痛剂, 具有生血管作用的药物 (血管内皮生长因子, 成纤维细胞生长因子), 其他生长因子 (粒细胞集落刺激因子) 或红细胞生成素。

[0025] 糖尿病患者下肢的慢性局部缺血溃疡性皮肤创伤是采用为本发明的目的药物组合物治疗的病理变化。根据创伤的情况和被治疗患者的特征,药物组合物包含的微球体可能需要共同包囊另一种分子。这些附加治疗剂属于如下组:抗微生物剂,麻醉剂,非甾体抗炎药类的止痛剂,具有生血管作用的药物和其他生长因子。

[0026] 在给予患者前,药物组合物应悬浮于适当的载体中,该载体可以是盐水溶液,其含有诸如羧甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素等增粘剂和诸如聚山梨酯或 PEG-PLGA-PEG 类的热敏水凝胶或壳聚糖或右旋糖酐的衍生物等洗涤剂。

[0027] 本发明的目标药物组合物使得能降低治疗过程中的给药频率并通过减少治疗总时间意外地增加了治疗益处,因为创伤的愈合比采用等量非包囊 EGF 治疗的创伤的愈合更快。因为所获得的缓释特性产生低的 EGF 浓度,本发明制剂的改善的治疗效果是出人意料的。同样出人意料的是,其他为加快 EGF 释放并因此获得较大药物浓度而使用某些赋形剂的另一制剂没有本发明制剂的治疗效果。

附图说明

[0028] 图 1 为表示动物模型中诱发的溃疡的位置的图解。

[0029] 图 2 表示采用双重乳化-溶剂蒸发法制备载有 EGF 的微球体的方法图

[0030] 图 3 显示了载有 EGF 的微球体的电子扫描图

[0031] 图 4 显示了 PLGA 微球体释放 EGF 的性质。X 轴显示用天数表示的时间, Y 轴表示用本实验用的微球体中包含的总 EGF 的百分比表示的释放的 EGF 的量, (◆) 快速释放制剂和 (●) 缓释制剂。

[0032] 图 5 显示了在不同条件下,被胰蛋白酶消化的 EGF 的反相高效液相色谱法。A:对照, B:游离 EGF, C:PLGA 微球体包囊的 EGF, D:与空 PLGA 微球体混合的 EGF。

具体实施方式

[0033] 实施例

[0034] 为给本发明提供更完整的描述,描述下列实施例:

[0035] 实施例 1. 制备包含载有 EGF 的 PLGA 的微球体的药物组合物

[0036] 制备载有 EGF 的微球体

[0037] 将 1g 聚合物溶于二氯甲烷 (DCM) 制成聚合物溶液 (PLGA50:50 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 10% (w/v))。将 1ml PLGA 溶液加入玻璃容器中,再加入 200 μ l 浓度为 20mg/ml 的 EGF 水溶液。用超声探头 (IKASONIC U200S 控制 (IKA Labortechnik, 德国) 将上述混合物超声 30 秒。将第一乳液加入 40ml 的 1% 聚乙烯醇中,并且采用 T8Ultraturrax (IKA Labortechnik, 德国) 通过对相进行 14000rpm 的强烈搅拌得到第二乳液。将双重乳液加入 140ml 浓度为 0.1% 的聚乙烯醇 30000 - 70000 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 并且用匀浆机 (IKA Labortechnik, 德国) 按 300rpm 搅拌 1 小时,以蒸发二氯甲烷。最终,经过滤收集微球体,用 50ml 蒸馏水洗 5 遍,并且在冷冻干燥器 (Edwards, UK) 中冷冻干燥。干燥的微球体保存在 4°C 直至使用 (图 2)。

[0038] 含有辅料的 EGF 微球体按相同方法制得,但是在内部水相中添加 Pluronic F-127 (10mg) 和氯化钠 (0.5mg)。

[0039] 含 EGF 的微球体的表征

[0040] 用 1N 盐酸中和,通过采用微 BCA 测试法测定用 1N 氢氧化钠消化颗粒得到的溶液(测定前先用 1N HCl 中和)中 EGF 的浓度以计算微包裹过程的效率和颗粒的蛋白负荷。

[0041] 通过微包裹过程制备球形微颗粒。其具有常规表面和孔(图 3)。制备这些微球体的收率约为 85%。将包裹过程中引入的总蛋白重量的 40-60%包入微球体是可能的。颗粒表现出的蛋白负荷为 1.6-2.4%。该微球体的尺寸小于 25 μm 。

[0042] 表 1. 含有 EGF 的微球体的特征

[0043]

	EGF 的微球体	含 F127 和氯化钠的 EGF 的微球体
收率 (%)	83 \pm 2	83 \pm 3
包裹效率 (%)	54 \pm 3	48 \pm 4
蛋白负荷 (%)	1.98 \pm 0.05	1.72 \pm 0.06
粒径 (μm)	19 \pm 3	24 \pm 4

[0044] 赋形剂的包含未有意义地改变含有 EGF 的微球体的特征。

[0045] 包裹 EGF 的体外释放

[0046] 将 50mg 载有 EGF 的微球体悬浮在 1ml 接收流体(含 0.001%吐温 80 和 0.1%叠氮化钠的 PBS,其 PH 为 7.2)中。在柔和搅拌下在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育悬浮液。以特定的时间间隔(0.25(6h),0.5(12h),1,3,7 和 14 天),用 Hettich 台式离心机(Tuttlingen,德国)按 5000rpm 将样品离心 5 分钟,收集上清液并加入等体积的新鲜接收流体。采用微 BCA 测定法评价了各抽取样品中 EGF 的浓度。

[0047] PLGA 微球体包裹的 EGF 的释放性质在第一天表现出突释,并在随后的 14 天即另一阶段连续发生 EGF 释放。在第一阶段,两种制剂均释放出包裹蛋白总量的约 20%,但在剩余的评价时间内,释放性质是不同的:含赋形剂的微球体释放的 EGF 几乎达到 65%(速率约为每天 28 μg),而不含赋形剂的微粒释放的 EGF 至多 30%(速率约为每天 7 μg)(图 4)。

[0048] 体外释放的 EGF 的表征

[0049] 本实验的目的是证实包裹的 EGF 保留了它们的物化性质及生物性质。评价了在孵育期(14 天)释放的 EGF 的性质。

[0050] 通过下列几种分析技术表征了第 1 天直到第 7 天和第 14 天释放的 EGF:反相高效液相色谱法(RP-HPLC),板一十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),酶联免疫吸附测定法(ELISA)和体外抗病毒活性生物测定法。结果如表 2 所示。

[0051] 表 2 体外释放的 EGF 的物化及生物性质

[0052]

分析	释放的 EGF			参照 ^d
	第 1 天	第 7 天	第 14 天	
ELISA(%) ^a	89	83	87	88
SDS-PAGE(%) ^b	98	100	99	100
RP-HPLC(%) ^c	95	94	94	95
比活性(UI/mg)	7.0×10^5	7.1×10^5	6.8×10^5	7.2×10^5

[0053] ^a 微 BCA 测定法量化的免疫识别的 EGF 的质量百分比

[0054] ^b 在 6000Da 检测的对应于主带的百分比

[0055] ^c 对应于主成分的百分比

[0056] ^d 用于制备微球体的 EGF

[0057] 上述结果证实了释放的 EGF 具有与制备微球体所用的 EGF 相似的物化及生物特性。

[0058] 微胶囊对 EGF 抗蛋白酶作用的稳定性的影响

[0059] 在三种不同条件下独立制备 1mg EGF : (i) 溶于 1ml4% 的碳酸氢钠 (NaHCO₃) 溶液中, (ii) 包裹在 PLGA 微球体 (以重量计 2%) 并悬浮于 1ml4% NaHCO₃ 溶液中 (iii) 与 50mg 空的 PLGA 微球体混合并悬浮于 1ml4% NaHCO₃ 溶液中。然后, 将 100 μl 溶于 4% NaHCO₃ 的 200 μg/ml 胰蛋白酶加入每种制剂中, 将制剂在 37°C, 柔和搅拌下, 孵育 4 小时。将 1mg EGF 溶于 1.1ml4% NaHCO₃, 用作对照。加入 10 μl 三氟乙酸, 终止反应。将含微球体的样品以 6000g 离心 10 分钟, 从粒状沉淀分离出上清液。采用二氯甲烷 / 醋酸提取从聚合物中分离微胶囊的 EGF 或吸附在微球体上的 EGF (Ruiz J.M., 等 (1989) Microencapsulation peptide : a study of the phase separation of poly(D, L-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 by silicone oil. J. Pharm. Sci. 第 49 卷 : 第 69 — 77 页)。采用 Han 等描述的方法后通过 RP-HPLC 分析所有的样品 (Han K., 等人 (1998) Site-specific degradation and transport of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) in the rat gastrointestinal mucosa. Int. J. Pharm. 第 168 卷 : 第 189 — 197 页)。结果 (图 5) 显示非包裹 EGF 和与空微球体混合的 EGF 均完全降解。但是, 包裹的 EGF 受到保护免受蛋白酶解, 并其色谱特征和对照的 EGF 相似。

[0060] 实施例 2. 与游离的 EGF 相比包裹 EGF 的体内效果 (在动物模型中)

[0061] 受控急性创伤的试验模型

[0062] 这里所述试验的目的是评价含 EGF 微球体的新药物制剂对具有令人满意的预后的急性创伤的愈合效果, 该制剂用于在伤口边缘及底部浸润或通过注射肠胃外给予。

[0063] 试验生物模型: 体重为 225 — 250 克的雄性 Wistar 大鼠。将动物饲养在 CIGB 的动物设施的受控区, 饲养条件是 12×12 小时的恒定光照模式, 保空气交换循环, 自由进食。大鼠被单独饲养在 T3 箱中, 每 48 小时换一次垫料 (预先消过毒的)。

[0064] 诱发溃疡: 腹膜内注射氯胺酮 / 赛拉嗪, 麻醉动物。将大鼠背部包括从肩胛后间隙至骶骨的部位经机械和化学除毛。将该区域用聚维酮碘和异丙醇的溶液杀菌。将选定用于

诱发溃疡的皮肤部位用墨做标记,以便在 9mm 直径生物解剖器 (AcuDrem, FI, USA) 的辅助下产生圆形、全宽度的创伤。

[0065] 如图 1 所示,每个动物诱发六个对称和等距的创伤。创伤用无菌盐水溶液洗涤,其内部边缘用永久性墨水描绘,用于以后计算零时间时的创伤面积。每天应用任何处理前,用 70%酒精和无菌盐水溶液清洁所有动物的创伤。

[0066] 实验分组:

[0067] 采用输入顺序 / 组交叉匹配表将动物中产生的溃疡随机分配给下列实验处理组:

[0068] 组 I —没有处理。作为自发演变的对照。

[0069] 组 II —安慰剂 (用于悬浮微球体的载体:0.3%羧甲基纤维素,0.1%吐温 20 和 0.9%氯化钠,该载体用于局部浸润)

[0070] 组 III—浸润给予含 675 毫克 EGF 的但不含赋形剂的微球体,EGF 悬浮于 1ml 为本制剂设计的载体中。在创伤边缘及底部进行浸润。

[0071] 组 IV—浸润给予含 675 毫克 EGF 的微球体 (含赋形剂),EGF 悬浮于 1ml 为本制剂设计的载体中。在创伤边缘及底部进行浸润。

[0072] 组 V—溶于 0.9%盐水溶液的游离 EGF (75mg/ml)。

[0073] 每组由 10 只大鼠组成;因此每组研究 60 处创伤。每天进行处理,对给予不含微球体的制剂的动物,在创伤的边缘和底部插入针 (271/2)。在每次处理前,腹膜内途径注射安定镇静动物。将用载体或包含载有 EGF 的微球体的制剂处理的动物只浸润一次。

[0074] 测定创伤闭合程度。组织学处理:

[0075] 将损伤映描在透明薄片上,以计算在下列时间创伤收缩的动力学:时间 0—表示 100%开放性创伤区和 0%创伤收缩,时间 1—诱发创伤后 72 小时,时间 2—诱发创伤后 5 天,时间 3—诱发创伤后 7 天,时间 4—诱发创伤后 9 天。根据之前关于这些创伤自发愈合动力学的经验,将第 9 天设定为本研究的结束,当天,处死动物。数字化创伤边界的图像。采用图像分析软件 DIGIPAT 计算创伤的面积和收缩的百分比。采用 SPSS 软件包通过使用非参数 Mann Whitney U 检验对每个参数进行统计学分析,假定 $p < 0.05$ 是显著水平。

[0076] 腹膜内注射过量的戊巴比妥钠 (250mg/kg),处死动物。从肉膜取下创伤,干燥并固定在 10%中性福尔马林溶液中,然后用石蜡包埋。采用苏木精—伊红、van Giesson's 和 Masson's trichromic 染色。对每个组,测定损伤 100%上皮化,以及表皮分化和分层的动物数目。

[0077] 创伤收缩动力学数值如表 3 所示 (以毫米为单位的收缩数值以创伤尺寸与时间 0 时创伤尺寸的百分比变化表示)。

[0078] 表 3. 溃疡收缩的数值

[0079]

受控急性溃疡的收缩动力学 (%)					
组	时间 0	时间 1	时间 2	时间 3	时间 4
组 I	0	6.1±2.1	9.3±2.2	37.6±3.3	56.7±3.8
组 II	0	8.3±2.2	11.4±2.4	41.5±2.7	67.4±4.5
组 III	0	11.4±3.3*	22.5±3.8*	69.8±4.8*	86.8±3.5*
组 IV	0	9.9±1.1	12.8±1.4	52.4±3.1	69.6±4.9
组 V	0	9.6±1.2	11.6±1.5	51.5±2.7	67.4±4.5

[0080] (*) 表示与其他组相比有统计学差异, $p < 0.05$ 。Mann Whitney U 检验。

[0081] 出人意料地, 具有较慢释放性质的含 EGF 的微球体且不含共包囊赋形剂的制剂显示最强的收缩创伤边缘的效果, 即意指其显示最有利的加速总体愈合的效果。收缩代表多个使创伤接近重塑阶段的巩固事件的综合。

[0082] 各试验组的溃疡中成熟和有组织的肉芽组织所占面积的百分比如表 4 所示。同时用 van Giesson's 和 Masson's trichromic 反应定量每个样品中的阳性显微区域的数目, 对在时间 4 时收集的样品进行计算。两位病理学家以盲模式并独立地进行评价。

[0083] 表 4. 每个实验组中在时间 4 时的粒化面积的百分比。

[0084] 通过对胶原纤维的阳性反应, 研究每组中 60 处创伤。

[0085]

	成熟肉芽组织所占面积 (%)
组 I	48.7±5.7
组 II	62.4±3.9
组 III	84.5±4.3
组 IV	64.7±2.7
组 V	61.3±2.6

[0086] 出人意料地, 具有较慢释放性质的基于含 EGF 的微球体的制剂 (不含共包囊赋形剂) 显示对肉芽组织建立及成熟过程最强的效果, 其与上述创伤收缩过程的描述一致。

[0087] 也研究了所述处理对创伤的上皮形成过程的效果。鉴于溃疡的再上皮形成, 分层上皮细胞的出现和总角蛋白层的存在, 评价了上皮细胞的显微观察方面。为了显微研究, 对创伤进行中央纵向半切片, 将所得切片包含在相同的石蜡块中。共研究了代表 60 处创伤的 120 组织学切片。结果如表 5 所示。

[0088] 表 5. 所述处理对创伤的上皮形成的效果

[0089]

	100%上皮形成的创伤数目	有成熟上皮细胞的创伤数目
组 I	32	28
组 II	56	45
组 III	81*	73*
组 IV	64	56
组 V	60	51

[0090] * 代表与其他组相比具统计学差异, $p < 0.05$ 。Mann Whitney U 检测

[0091] 用较慢释放性质的基于 EGF 微球体的制剂 (不含共包囊赋形剂) 处理的组 III 出人意料地显示最好的上皮应答的指标, 这得到了总上皮再形成和上皮细胞的成熟的支持。

[0092] 慢性皮肤溃疡的试验模型

[0093] 下列试验目的是评价用于浸润的基于含 EGF 的微球体的新型药物制剂在模拟糖尿病患者中损伤的不良预后慢性损伤中的治愈效果。

[0094] 试验生物模型: 体重为 225 — 250 克的雄性 Wistar 大鼠。将动物饲养在 CIGB 的动物设施的受控区, 饲养条件是 12×12 小时的恒定光照, 空气交换循环, 自由进食。大鼠被单独饲养在 T3 箱中, 每 48 小时换一次垫料 (预先消过毒的)。预先对动物用 0.01% 甲基乙二醛溶液处理两个月, 以制造与长期发展的糖尿病患者中发生的相似的糖基化环境。除了其他有机损伤外, 该环境导致创伤的颗粒化及重塑减慢 (Berlanga J., Cibrian D., 等 (2005) Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. Clin Sci (Lond). 第 109 卷第 1 期: 第 83 — 95 页)。

[0095] 诱发溃疡: 腹膜内注射氯胺酮 / 赛拉嗪, 麻醉动物。将大鼠背部包括从肩胛后间隙至骶骨的部位经机械和化学除毛。将该区域用聚维酮碘和异丙醇的溶液杀菌。将选择用于诱发溃疡的皮肤上的部位用墨做标记, 以便在 9mm 直径生物解剖器 (AcuDrem, FI, USA) 的辅助下诱导圆形、全宽度的创伤。每个动物诱发六个对称和等距的创伤。创伤用无菌盐水溶液洗涤, 其内部边界用永久性墨水描绘, 用于以后计算零时间时的创伤面积。每天在应用任何治疗前, 用 70% 酒精和无菌盐水溶液清洁所有动物的创伤。

[0096] 实验分组:

[0097] 采用输入顺序 / 组交叉匹配表将动物中产生的溃疡随机分配给下列实验处理组:

[0098] 组 I — 无处理。作为自发演变的对照。

[0099] 组 II — 安慰剂 (用于悬浮微球体的载体: 0.3% 羧甲基纤维素, 0.1% 吐温 20 和 0.9% 氯化钠, 该载体用于局部浸润)。

[0100] 组 III — 浸润含 1 毫克 EGF 的微球体 (不含赋形剂), EGF 悬浮于 1ml 为本制剂而设计的载体中在创伤边缘及底部进行浸润。

[0101] 组 IV — 浸润含 1 毫克 EGF 的微球体 (含赋形剂), EGF 悬浮于 1ml 为本制剂而设计的载体中。在创伤边缘及底部进行浸润。

[0102] 组 V —溶于 0.9% 盐水溶液的游离 EGF (75mg/ml)。

[0103] 每组由 10 只大鼠组成；因此每组研究 60 处创伤。在用不含微球体的制剂处理的动物中每天进行处理。在每次处理前，通过腹内途径注射安定镇静动物。将用载体或包含载有 EGF 的微球体的制剂处理的动物只浸润一次。

[0104] 测定创伤闭合程度。组织学处理：

[0105] 将损伤映描在透明薄片上，以计算在下列时间创伤收缩的动力学：时间 0 —表示 100% 开放性创伤区和 0% 创伤收缩，时间 1 —诱发创伤后 72 小时，时间 2 —诱发创伤后 5 天，时间 3 —诱发创伤后 7 天，时间 4 —诱发创伤后 9 天以及时间 5 —诱发创伤后 14 天。根据先前对上述创伤自发愈合动力学的经验，将第 14 天设定为本研究的结束，当天，处死动物。数字化创伤边界的图像。采用图像分析软件 DIGIPAT 计算创伤的面积和收缩的百分比。采用 SPSS 软件包通过非参数 Mann Whitney U 检验对每个参数进行统计学分析，将 $p < 0.05$ 假定是显著水平。

[0106] 腹膜内注射过量的戊巴比妥钠 (250mg/kg)，处死动物。从肉膜取下创伤，干燥并固定在 10% 中性福尔马林中，然后用石蜡包埋。采用苏木精—伊红、van Giesson's 和 Masson's trichromic 染色法。对每个组，测定损伤 100% 上皮生成，以及表皮分化和分层的动物数目。

[0107] 创伤收缩动力学的数值如表 6 所示。

[0108] 表 6 评价阶段创伤的收缩动力学数值

[0109]

慢性溃疡的收缩动力学 (%)					
组	时间 1	时间 2	时间 3	时间 4	时间 5
组 I	3.18±1.1	5.31±1.15	15.8±1.37	21.8±1.54	40.82±4.41
组 II	4.14±2.2	7.63±1.12	17.3±1.81	23.81±1.53	39.75±3.63
组 III	6.55±1.14*	25.33±4.1**	35±3.51**	43.15±3.66**	67.2±3.44**
组 IV	6.25±1.5	17.3±1.51	19.7±2.1	29.9±2.85	48.16±3.14
组 V	6.67±1.8	15.4±1.63	16.8±3.8	28.1±3.31	45.72±3.55

[0110] (*) 表示与其他组相比有统计学差异， $p < 0.05$ ，(**) 表示与其他组相比有统计学差异， $p < 0.01$ 。Mann Whitney U 检验。

[0111] 以毫米为单位的收缩数值以创伤尺寸与时间 0 时的创伤尺寸的百分比变化表示。

[0112] 出人意料地，具有较慢释放性质的含 EGF 微球体的制剂（不含共包囊赋形剂）显示最强的创伤边缘收缩效果，即意指其显示最有利的加速总体愈合的效果。收缩代表多个使创伤接近重塑阶段的巩固事件的综合。值得注意的是，上述创伤模拟了糖尿病创伤的生化微环境，其中收缩机理在病理学上被部分或全部废除了。

[0113] 各试验组中慢性溃疡的成熟和有组织的肉芽组织所占面积的百分比如表 7 所示。同时采用 van Giesson's 和 Masson's trichromic 反应量化阳性显微区域的数目,对在时间 5 时收集的样品进行计算。几位病理学家和一位顾问以盲模式并独立地进行评价。

[0114] 表 7. 每个实验组中时间 5 时的颗粒化面积的百分比。

[0115] 通过对胶原纤维的阳性反应,研究每组中 60 处创伤。

[0116]

	成熟肉芽组织所占的面积 (%)
组 I	31.78±3.25
组 II	29.85±2.28
组 III	81.6±3.55**
组 IV	68.12±2.55
组 V	65.72±2.98

[0117] (**) 表示与其他组相比有统计学差异, $p < 0.01$ 。Mann WhitneyU 检验

[0118] 出人意料地,具有较慢释放性质的基于 EGF 的微球体的制剂(不含共包囊赋形剂)显示对肉芽组织建立及成熟过程的最强效果,其与上述创伤收缩过程的描述一致。

[0119] 也研究了所述处理对创伤的上皮形成过程的效果。鉴于慢性溃疡的再上皮形成,分层上皮细胞的出现和角蛋白层的存在,评价了上皮细胞的显微观察方面。为了显微研究,对创伤进行中央纵向半切片,将所得切片包含在相同的石蜡块中。共研究了代表 60 处创伤的实验组的 120 个组织学切片。没有排除受到细菌污染的损伤。结果如表 8 所示。

[0120] 表 8. 所述处理对慢性溃疡的上皮形成的效果

[0121]

	100% 上皮形成的创伤数目	有成熟的上皮细胞的创伤数目
组 I	18	13
组 II	16	12
组 III	74	69
组 IV	62	44
组 V	59	42

[0122] 用具有较慢性质的基于 EGF 微球体的制剂(不含赋形剂)处理的组 III 出人意料地显示最好的上皮应答的指标,这得到了总再上皮形成和上皮细胞的成熟的支持。

[0123] 实施例 3. 与游离的 EGF 相比包囊 EGF 的体内效果(在患有慢性局部缺血皮肤溃疡性创伤的患者中)

[0124] 将具有缓释特性的基于 EGF 微球体的制剂(不包含赋形剂)给予患有糖尿病足部

溃疡并有严重截肢危险的患者。用本发明的目标制剂处理 58 岁女性糖尿病患者,其右足有 30.5cm² 的慢性溃疡并证明所影响的下肢有局部缺血。损伤清创后,在一个月中,每 15 天一次,在伤口边缘和底部浸润给予具缓释特性的 EGF 微球体的制剂。从开始治疗后第一周起,观察到有益肉芽组织的快速形成,到第三周该组织达到覆盖了受影响部位的 100%。患者显示出令人满意的发展,伤口完全闭合,避免了表示截肢的需要。该药物组合物有很好的耐受性且没有检测到不良作用。

[0125] 通过损伤周围和损伤内给予本发明制剂有利于肉芽组织的形成和伤口闭合,与治疗前相比,令人意外地在更短的时间间隔内促进溃疡愈合过程发生,避免了截肢的需要。由于实质上减少了注射,这种治疗模式结果有更好的耐受性。

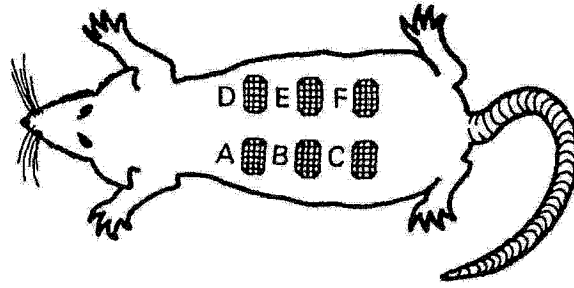


图 1

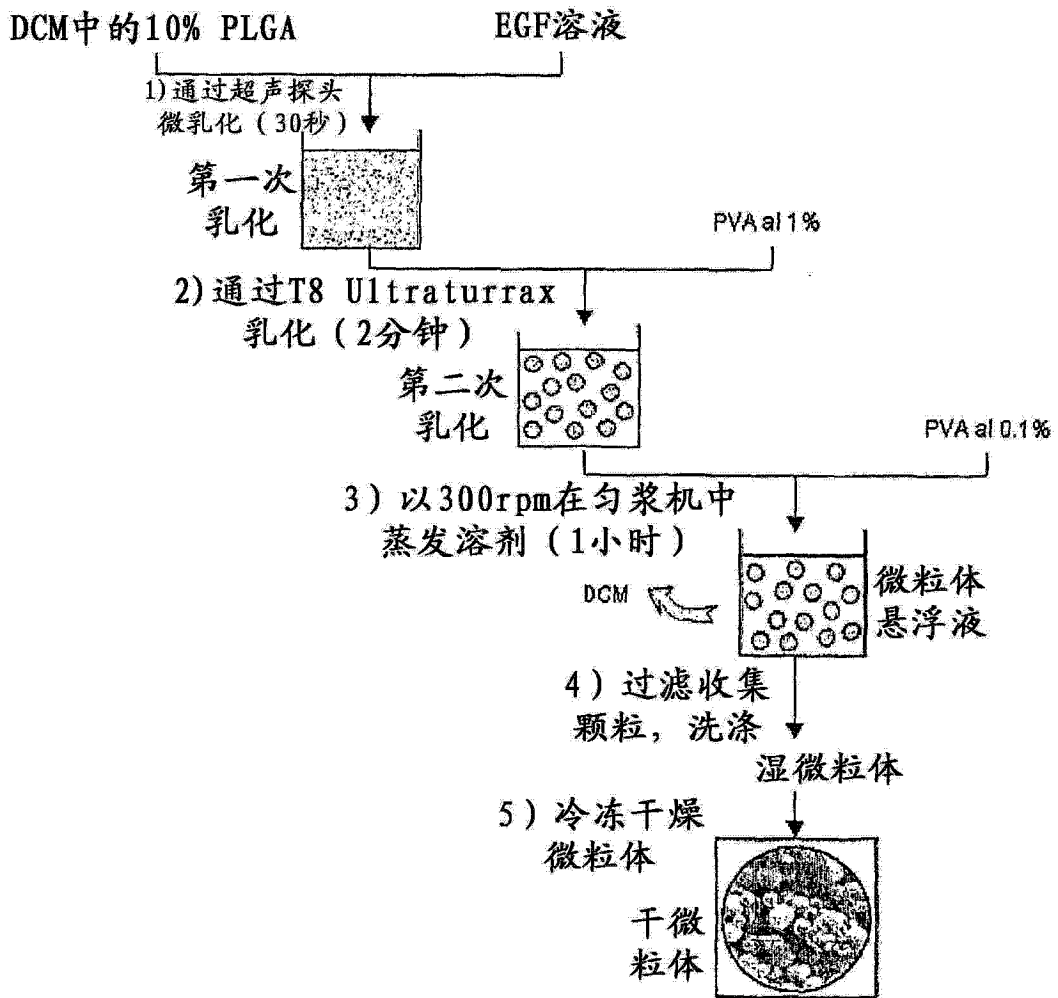


图 2

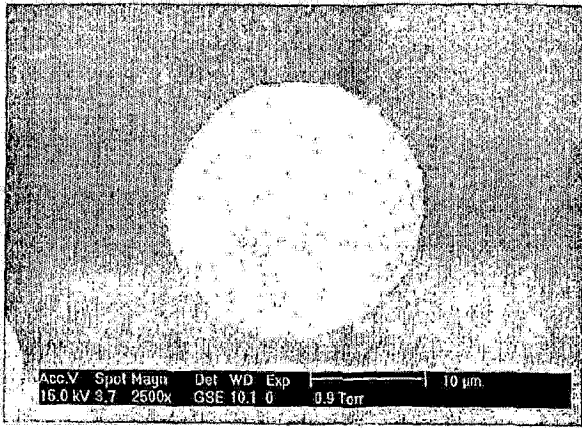


图 3

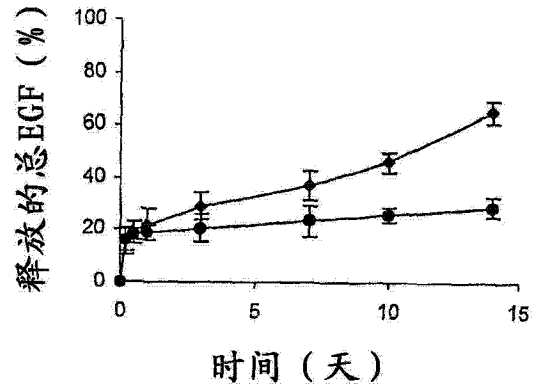


图 4

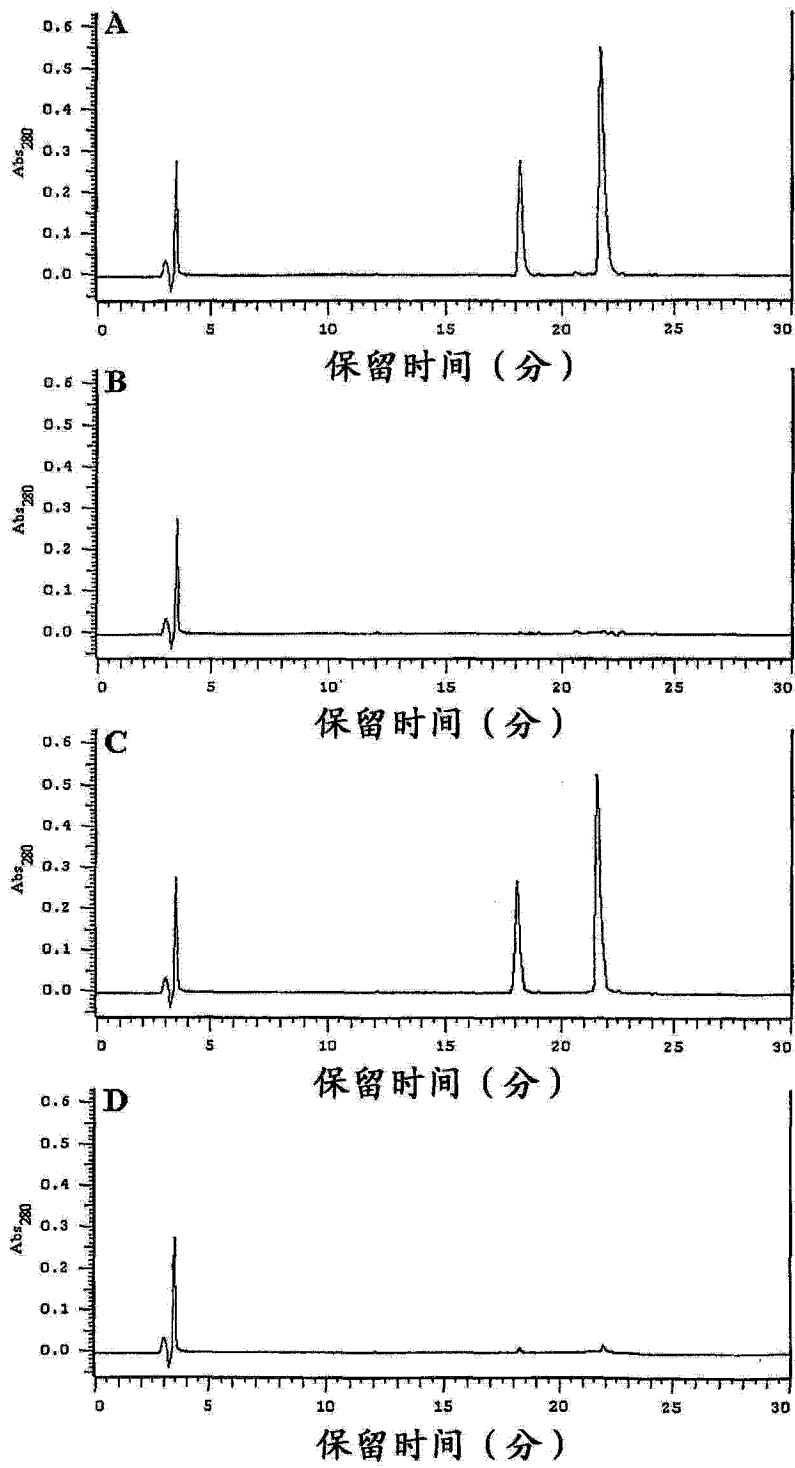


图 5