



## [12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96193437.9

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1133464C

[22] 申请日 1996. 3. 1 [21] 申请号 96193437. 9

[30] 优先权

[32] 1995. 3. 1 [33] IL [31] 112834

[86] 国际申请 PCT/US96/03121 1996. 3. 1

[87] 国际公布 WO96/26738 英 1996. 9. 6

[85] 进入国家阶段日期 1997. 10. 22

[71] 专利权人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

共同专利权人 宾 - 古里安尼格夫大学研究及发  
展部

[72] 发明人 D • 瓦拉赫 J • 科斯特

R • 艾利尔兹

[56] 参考文献

US4929442 1990. 05. 29 A61K37/66

US5114719 1992. 05. 19 A61F13/00

US5330768 1994. 07. 19 A61K9/16

审查员 周 静

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 温宏艳

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称 控制释放可溶性受体的药物组合物

[57] 摘要

一种控制释放药物组合物, 含有已经掺入到可溶性受体中的生物相容性聚合物, 优选的是聚乙烯乙酸乙烯酯或多聚(乳酸 - 羟基乙酸), 所述载体能够结合到配体上, 从而使配体发挥功能。该可溶性受体优选的是可溶性形式的 TNF $\alpha$  受体。所述组合物可用于治疗其中需要中和有害作用的疾病。

1. 一种药物组合物，用于控制能够与配体结合的可溶性受体的释放，从而  
影响配体的功能，该组合物包括一种生物相容性聚合物材料，在其  
5 中掺入了激素或细胞因子的可溶性受体。
2. 根据权利要求1所述的药物组合物，其中所述的聚合物材料是选自  
于下列的生物相容性非降解性聚合物：乙烯乙酸乙烯酯共聚物，硅橡胶，  
多糖，聚酰胺，聚丙烯酸酯，聚乙烯，聚氨酯，聚异丁烯，聚磷腈。
3. 根据权利要求1所述的药物组合物，其中所述的聚合物材料是选自  
10 于下列的生物可降解聚合物：聚酯，聚酐，聚原酸酯，聚己内酯，假多  
氨基酸，多肽，明胶，聚乳酸，聚羟基乙酸，和聚(乳酸-羟基乙酸)共  
聚物。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的药物组合物，其中所述的可溶性受  
体是可溶性形式的TNF $\alpha$ 受体。
- 15 5. 根据权利要求2所述的药物组合物，其中所述的可溶性受体是可溶  
性形式的TNF $\alpha$ 受体。
6. 根据权利要求5所述的药物组合物，其中聚合物是聚乙烯乙酸乙烯  
酯。
7. 根据权利要求3所述的药物组合物，其中所述的可溶性受体是可溶  
20 性形式的TNF $\alpha$ 受体。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物，其中聚合物是聚(乳酸-羟基乙  
酸)。
9. 根据权利要求4所述的药物组合物，其中可溶性TNF $\alpha$ 受体是可溶性  
p55 TNF $\alpha$ 受体。
- 25 10. 根据权利要求4所述的药物组合物，其中可溶性TNF $\alpha$ 受体是可溶  
性p75 TNF $\alpha$ 受体。
11. 根据权利要求4所述的药物组合物，进一步包括抗炎剂。
12. 根据权利要求4所述的药物组合物，包括用于治疗多发性硬化的另  
外的药剂。
- 30 13. 根据权利要求12所述的药物组合物，其中用于治疗多发性硬化的  
另外的药剂是 $\beta$ -干扰素或共聚物-1。
14. 根据权利要求6所述的药物组合物，它是植入剂形式。

- 
15. 根据权利要求 8 所述的药物组合物, 它是植入剂形式。
  16. 根据权利要求 8 所述的药物组合物, 它是注射液形式。
  17. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 用于局部应用。
  18. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 进一步包括  $\text{TNF}\alpha$ 。
  - 5 19. 根据权利要求 18 所述的药物组合物, 用于增强  $\text{TNF}\alpha$  的有利作用。

## 控制释放可溶性受体的药物组合物

5      发明领域

本发明涉及用于从聚合物基质中控制释放可溶性形式的受体的药物组合物。

发明背景

控制释放系统在一定的时期内，以预定的速率释放药物，所述时期  
10      可以是几天到几年。这些系统比常规的药物疗法具有优点。例如，  
在摄入或注射标准剂型之后，血液中药物的水平升高，达到峰值，然后下降。由于各种药物具有一定的治疗范围，高于该范围产生毒性，而低于该范围没有效果。波动的药物水平可以导致产生交替的无效和有毒期。相反，控制释放的制剂通过一次给药将药物维持于所需的治疗范围。控制释放系统的其它优点包括：(i)将药物定位释放到身体的  
15      特定部位，从而降低全身的药物水平；(ii)保存易被身体快速破坏的药物(这对于生物学敏感分子例如蛋白质特别重要)；(iii)减少了对随访治疗的需求；(iv)提高了舒适感；(v)改善了依从性。

通过将药物置于聚合物中可获得对药物释放的最佳控制。通常聚合  
20      物通过扩散，化学反应，或溶剂活化而释放药物。

最普遍的释放机理是扩散，从而药物从其在聚合物系统中的起始位置迁移到聚合物的外表层，然后迁移到身体中。扩散可通过储液囊来实现，其中药物核周围包裹一层聚合物膜，或将药物核包围于基质中，其中药物穿过聚合物系统均一分布。通过化学反应例如降解聚合物或  
25      从聚合物骨架中裂解该药物，也可以将药物释放。

上述机理也可结合。基于聚合物的特性(例如，扩散控制系统的晶格和孔结构，化学控制系统的键的水解不稳定性或单体的疏水性)以及系统的设计(例如，厚度和形状)可以控制从聚合物系统的释放速率。具有不同释放机理的系统的优点是各个系统能够完成不同的目的。

30      多年来，控制释放系统仅能缓慢地释放低分子量的药物(<600)。大分子例如蛋白质不被认为是合适的候选分子，因为，多肽被认为太大

以致于不能穿过聚合物缓慢地扩散, 即使在该聚合物吸胀之后。基于含有粉状大分子的固体疏水聚合物的基质能够在 100 天以上的时间内使几乎任何大小的分子释放的发现, 从而可控制释放各种各样的蛋白质, 多糖和多核苷酸。参见, Langer, 1990。

- 5        至今为止, 为了控制释放而掺入到聚合物中的蛋白质和多肽主要是效应分子, 例如, 胰岛素, 这与控制释放与人体中产生的效应分子结合和中和的分子的组合物相反。

- 10        肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )是有潜效的细胞因子, 可激发广谱的生物学应答。TNF $\alpha$ 对许多肿瘤细胞有细胞毒性, 可用于肿瘤的治疗。TNF $\alpha$ 加强成纤维细胞的生长, 并且起着组织重建剂的作用, 因此适合于伤口愈合。它进一步诱导小鼠的移植肿瘤的出血坏死, 加强多型核的嗜中性粒细胞的吞噬和细胞毒性, 并且调节许多蛋白质的表达, 包括脂蛋白脂酶, 大组织相容性复合物的 I 型抗原, 和细胞因子, 例如白细胞介素 - 1 和白细胞介素 - 6。已经证明 TNF $\alpha$ 具有抗病毒, 细菌和
- 15        多细胞特别是细胞内的寄生虫效应。TNF $\alpha$ 似乎对于正常的免疫应答是必要的, 但是, 量大时, 产生急剧的致病作用。由于 TNF $\alpha$ 是引起与瘤形成疾病和寄生物血症有关的消瘦症(恶病质)的主要因子, 因此将其称为“恶病质素”。由于抗 TNF $\alpha$ 的抗体能够保护受感染的动物, 因此, TNF $\alpha$ 也是一种在革兰氏阴性脓毒症中细胞毒性的主要起作用者。
- 20        已经证明 TNF $\alpha$ 与几种疾病有关, 可列举的例子包括成人呼吸窘迫症, 肺纤维变性, 疟疾, 传染性肝炎, 结核病, 炎性肠疾病, 败血性休克, AIDS, 移植物抗宿主反应, 自体免疫疾病, 例如类风湿性关节炎, 多发性硬化和青年型糖尿病, 和皮肤延迟型过敏疾病。

- 25        由于某些 TNF $\alpha$ 的作用对宿主有害, 使人注意到引起调节 TNF $\alpha$ 功能的机理。由两种不同分子种类的细胞表面受体(本文中称为 TNF - R)提供对 TNF $\alpha$ 的应答的细胞内信号, 而 TNF $\alpha$ 以高亲和力结合到所述受体上。

- 30        在身体的几乎所有细胞中表达细胞表面各种 TNF - R。一旦 TNF $\alpha$ 与 TNF 受体结合, 由 TNF 受体以信号形式反映出所有 TNF $\alpha$ 的各种作用, 细胞毒性, 促生长以及其它。这些受体的分子量不同的两种形式, 55 千道尔顿和 75 千道尔顿已经被描述了, 并且在本文中分别被描述为

p55 和 p75 TNF - R。但是，应该注意现有的公开文本将这两种受体也称作 p60 和 p80 TNF - R。

TNF $\alpha$  的两种受体不仅以细胞结合形式而且以可溶性形式存在，包括从细胞表面形式蛋白酶裂解衍生得到的完整受体的裂解细胞外区域。这些可溶性的 TNF $\alpha$  受体(sTNF - Rs)能够保持结合 TNF $\alpha$  的能力，并且与细胞表面受体一起竞争 TNF $\alpha$ ，从而阻止了 TNF $\alpha$  的活性。因此，sTNF - Rs 起着 TNF $\alpha$  活性的生理学减毒作用，保卫其抵抗潜在的有害作用。但是，也已经有报道，sTNF - Rs 也通过稳定其活性，可能是通过阻止其生物活性三聚体结构降解为非活性的单体而影响 TNF $\alpha$  的功能(Aderka 等人, 1992)。因此 sTNF - Rs 以两种不同的途径影响 TNF $\alpha$  的活性：它们与细胞表面受体竞争 TNF $\alpha$  和阻止 TNF $\alpha$  的有害作用，或它们起缓冲剂的作用并且稳定 TNF $\alpha$  的活性。

以前将本文中称为 p55 sTNF - R 和 p75 sTNF - R 的两种 sTNF - Rs 分别命名为 TNF 结合蛋白 I 和 II，或 TBPI 和 TBPII(参见例如 EP398327，EP412486，和 EP 433900)。在本申请中我们利用两种命名：p55 sTNF - R 或 TBPI 和 p75 sTNF - R 或 TBPII；它们分别定义相同的蛋白质。

sTNF - Rs 以在炎性和非炎性疾病状态下显著增高的浓度组成地存在于血清中。这些蛋白质的效果可以不同，但取决于其在 TNF $\alpha$  作用位点的浓度，其浓度与 TNF $\alpha$  局部浓度的关系，以及就 TNF $\alpha$  活性的衰退而言 sTNF - Rs 和 TNF $\alpha$  从 TNF $\alpha$  作用位点清除的速率。依据这些参数，在不同的情形下，sTNF - Rs 以非常不同的方式影响 TNF $\alpha$  的功能，或通过抑制 TNF $\alpha$  的效果或作为 TNF $\alpha$  的载体，或者通过延长其功能扩大 TNF $\alpha$  的效果(Aderka 等人, 1992)。

sTNF - Rs 作为抗 - TNF $\alpha$  药物的效果可能受许多不同因子的影响：与细胞表面受体的亲和力相比的 sTNF - Rs 结合 TNF $\alpha$  的亲和力，可溶性受体进入 TNF $\alpha$  作用位点的难易程度，和可溶性受体和它们与 TNF $\alpha$  形成的复合物从 TNF $\alpha$  形成位点清除的速率。sTNF - Rs 的天然形式可能以最生理相关的方式起作用。但是，其用途受到的大的限制是它们相当快地从血液中清除。已经制定了几种计划以改善这些分子，所述例子是所谓的嵌合“免疫吸附”，其中将 sTNF - Rs 连接到免疫球蛋白分子的 Fc 部分(由 Hoffman La Roche 和 Immune 开发)，和

- “PEGulated” sTNF - Rs, 其中 sTNF - Rs 通过 PEG 分子交联(由 Synergen 研制)。两种途径导致二价 sTNF - R 分子的形成, 该分子有较长的清除时间, 并且能够更有效地与三价 TNF $\alpha$  分子结合。但是, 它们可能比天然可溶性受体更具免疫原性, 并且不会出现它们与 TNF $\alpha$  的复合物以非常高的效率从循环中清除。

由于该细胞因子在身体的某一特定部位的长期形成而造成了 TNF $\alpha$  的许多有害作用。对于在需要的部位维持治疗学上有效的可溶性受体的浓度, 较大预见性地限定使用可溶性形式的 TNF 受体以防止所述病理状态是困难的。

#### 10 发明概述

- 本发明的目的之一是研制治疗学上使用可溶性形式的受体的新方法, 所述治疗学应用可影响它们的配体的功能, 例如保护身体免遭它们的配体的有害作用, 特别是研制以不变的速率, 在较长的时间期间允许可溶性受体在身体中局部释放的系统。这些方法是基于将可溶性受体掺入到生物相容性聚合物中, 并将其植入到或注射到所需的身体部位。含有可溶性受体的聚合物的基质能够局部和控制释放天然形式的可溶性受体。

- 本发明包括能够结合到其配体并且影响其功能的可溶性受体, 所述影响功能的方式是使其配体的毒害作用中和和/或稳定或增强其活性。所述可溶性受体的例子是激素的和细胞因子的可溶性受体, 并且在优选的实施方案中, 可溶性受体是可溶性的 TNF $\alpha$  受体。

因此, 本发明的另一目的是提供了治疗学上使用可溶性 TNF $\alpha$  的受体以影响 TNF $\alpha$  功能, 例如保护身体抵抗 TNF $\alpha$  的有害作用的新方法, 所述新方法包括控制释放系统。

- 因此本发明提供了用于控制释放可溶性受体的药物组合物, 其中所述可溶性受体被掺入到生物相容性聚合体基质中。

- 可用于本发明组合物中的生物相容性聚合体基质的例子包括, 但不限于下列生物相容性非降解性聚合物: 乙烯乙酸乙烯酯共聚物 (EVAc), 硅橡胶, 多糖例如纤维素, 聚酰胺, 聚丙烯酸酯, 聚乙烯, 聚氨酯, 聚异丁烯, 聚磷腈, 和下列生物降解性聚合物: 聚酯, 聚酐, 聚原酸酯, 聚己内酯, 假多氨基酸, 多肽, 明胶, 聚乳酸, 聚羟基乙酸 (polyglycolic acid), 和聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)共聚物。

在一个优选的实施方案中,将可溶性 TNF $\alpha$  受体(sTNF - R)掺入到合适的聚合物中,例如聚乙烯乙酸乙烯酯基质,或掺入到聚(乳酸-羟基乙酸)微球体中。

本发明的药物组合物可含有 p55 sTNF - R 或 p75 s TNF - R。在一个优选的实施方案中,该组合物含有 p55 sTNF - R(TBPI)。

一个实施方案中,本发明的药物组合物适用于治疗疾病,其中需要保护身体抵抗配体例如 TNF $\alpha$  的有害作用。将含有 sTNF - Rs 的该聚集体基质置于所需的身体部位中,从而在体内恒定维持 sTNF - R 并且保持长时间。

在另一个实施方案中,本发明的药物组合物可与配体例如 TNF $\alpha$  一起使用,以便稳定和/或增强 TNF $\alpha$  的活性,用于需要 TNF $\alpha$  的有利作用的任何情况。该实施方案的一个方面,所述组合物包括 TNF $\alpha$ /sTNF - R 复合物,通过肿瘤部位给药, TNF $\alpha$  发挥有效的局部的抗肿瘤功能并且产生较少的全身的不良作用。在该实施例的另一方面,含有 TNF -  $\alpha$ /sTNF - R 复合物的组合物可用于抗病毒,细菌和寄生物 (parasitocidal),特别是细胞内的多细胞寄生物的感染和用于伤口治愈。

在另一个实施方案中,本发明包括对患者进行治疗,保护患者免除配体例如 TNF $\alpha$  的有害作用,包括给患者施用本发明的药物组合物,所述药物组合物含有控制释放形式的有效量的合适的可溶性受体例如 sTNF - R。

在又一实施方案中,本发明涉及癌症的治疗,包括在需要治疗的患者的肿瘤部位施用含有 TNF $\alpha$ /sTNF - R 复合物的控制释放形式的本发明的药物组合物。

## 附图简述

附图 1 显示颗粒大小对 TBPI 的累积释放的影响。将三个大小范围的 TBPI + BSA 粉的颗粒以 30 % 的负载量掺入到乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVAc)基质中: (i)<75 $\mu$ m(实心菱形); (ii)75 - 250 $\mu$ m(空心正方形),和(iii)250 - 425 $\mu$ m(实心圆圈)。

附图 2 显示负载量对 TBPI 累积释放的影响。利用 75 - 250 $\mu$ m 大小范围的颗粒制备具有 TBPI + BSA 负载的 EVAc 基质: (i)10 % 负载量(实心菱形); (ii)30 % 负载量(空心正方形),和(iii)50 % 的负载量(实

心圆圈)。

附图 3 显示单独的可溶性 TNF $\alpha$  受体 I(TBPI)或与牛血清白蛋白 (BSA)一起掺入到下列成份的微球体中的累积的释放百分数: (i)聚乳酸 - 羟基乙酸(PLGA)75: 25(分别是空心或实心的圆圈); (ii)PLGA 50: 50(分别是空心 and 实心的正方形); (iii)聚 - L - 乳酸(PLLA)(分别是空心 and 实心的三角形)。

附图 4a-c 显示用产生 TNF 的中国仓鼠卵(CHO)细胞(CHO/TNF)接种的 Balb 裸鼠用 TBPI 或用鼠抗 - TNF 单克隆抗体 TNF - 1(Ab)治疗获得的体内结果, 其中:

附图 4a 图示用如下药剂处理后 Balb 裸鼠的平均组重量(gr)(i)皮下植入 EVAc 基质中的 TBPI(实心圆圈); (ii)TBPI/PLGA 的 75: 25 的植入剂(空心圆圈); (iii)用 CHO/TNF 细胞接种鼠(Ab 一次)后五天, 注射一次抗 - TNF 抗体(实心正方形); (iv)用 CHO/TNF 细胞接种鼠五天以后和一星期之后(Ab 两次)注射两次抗 - TNF 抗体(空心正方形); 和(v)对照, 没有任何治疗(实心三角形);

附图 4b 表示在鼠血清中生物活性 TNF $\alpha$  的水平进行体内评价的结果。在将 EVAc 基质中的 TBPI(实心圆圈)或 75: 25 的 TBPI/PLGA(空心圆圈)植入之后或用抗 TNF $\alpha$  抗体注射一次(实心正方形)或两次(空心正方形)(如在附图 4a 所示), 从携带产生 TNF $\alpha$  的中国仓鼠卵(CHO)细胞的鼠中收集血清, 以及从非治疗的鼠中收集血清(实心三角形), 通过在环己酰亚胺(25 微克/毫升)存在下将其 1: 100 的稀释液加入到经培养的 MHA2 细胞(Hela 细胞的衍生物, 将其以  $3 \times 10^4$  细胞/9mm 的浓度播种微孔之后 24 小时)中保持 10 小时, 测定血清中 TNF $\alpha$  的生物活性, 随后通过中性红摄取方法评估细胞的存活力(Wallach 等人, 1984), 和

附图 4c 表示用如下药剂处理后的小鼠的生存曲线: (i)TBPI/EVAc 植入剂(空心正方形); (ii)TBPI/PLGA 75: 25 植入剂(实心圆圈); (iii)抗 - TNF 抗体一次(空心三角形); (iv)抗 - TNF 抗体两次(实心三角形); 和(v)对照, 没有任何治疗(空心圆圈);

附图 5 显示含有 TBPI 的 EVAc 基质在鼠体的不同部位植入对 TBPI 浓度释放的影响: 颈(实心圆圈), 背(空心圆圈), 和胃(实心正方形)。

附图 6 是图形表示踝关节的肿胀(mm), 显示用含有 TBPI 的

EVAc(黑柱), 单独的 EAVc(灰色柱)植入治疗的或未治疗(对照)(白色柱)的转基因 Tg197 关节炎鼠子代的不同发育阶段的关节炎的进展。

附图 7 是图形表示的踝关节的肿胀(mm), 显示用抗 -  $\text{TNF}\alpha$  抗体每星期一次持续整个试验期(65 天)(黑柱)和一星期一次持续两星期(灰色柱)治疗的和未治疗(对照)(白色柱)的转基因 Tg197 关节炎鼠子代的不同发育阶段的关节炎的进展。

附图 8 图形表示在 T 细胞中表达人  $\text{TNF}\alpha$  mRNA 的转基因 Tg211 鼠的平均组重量(gr), 所述鼠用含有 TBPI 的 EVAc(实心圆圈), 单独的 EAVc(空心圆圈)植入治疗或未治疗(对照)(实心正方形)。

附图 9 图形表示用抗 -  $\text{TNF}\alpha$  抗体每星期一次持续整个试验期(50 天)(实心三角形)和一星期一次持续两星期(空心三角形)治疗的和未治疗(对照)(实心正方形)的转基因 Tg211 鼠的平均组重量(gr)。

附图 10 表示用含有 TBPI 的 EVAc(实心圆圈), 单独的 EAVc(空心圆圈)移植治疗的或未治疗(对照)(实心正方形)的转基因 Tg211 鼠的生存曲线。

附图 11 表示用抗 -  $\text{TNF}\alpha$  抗体每星期一次持续整个试验期(65 天)(实心圆圈)和一星期一次持续两星期(空心圆圈)治疗的和未治疗(对照)(实心正方形)的转基因 Tg211 鼠的生存曲线。

#### 优选的实施方案的详述

本发明提供可溶性受体的控制释放, 所述受体能够结合到配体上并且影响其配体的活性, 例如中和具有害作用的配体或稳定/增强配体的活性。所述可溶性受体的例子是细胞因子例如  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-6}$  等的可溶性受体。

在优选的实施方案中, 本发明的组合物包括从天然源例如人尿获得的 sTNF - Rs (Engelmann 等人, 1989; Engelmann 等人, 1990; Olson 等人, 1990, Loetscher 等人, 1990), 和利用重组技术 (EP433900; Nophar 等人, 1990; Schall 等人, 1990; 和 Loetscher 等人, 1990) 并然后如文献例如 EP308378 和 EP398327 中所述进一步纯化所得的 sTNF - Rs。

如本文所述, 术语 “sTNF - Rs”, “p55 sTNF - R”, “p75 sTNF - R”, 是指天然来源的或通过重组技术获得的所有 sTNF - Rs, 包括但不限于在 EP308378 和 EP398327 中描述的 TNF 结合蛋白质 I 和

## II.

可用于本发明中的聚合物包括但不限于选自于下列的生物相容性不可降解性聚合物：乙烯乙酸乙烯酯共聚物，硅橡胶，多糖例如纤维素，聚酰胺，聚丙烯酸酯，聚乙烯，聚异丁烯，聚氨酯，和聚磷腈，  
5 和选自于下列的生物可降解性聚合物：聚酯，聚原酸酯，聚己内酯，多肽，假聚（氨基酸），明胶，聚酐，聚-L-乳酸，聚-D-乳酸，聚-D，L-乳酸，聚羟基乙酸，和选自于下列的共聚物：聚-L-乳酸-羟基乙酸，聚-D-乳酸-羟基乙酸，聚-D，L-乳酸-羟基乙酸，，聚-L-乳酸-D-乳酸，和聚-L-乳酸-D，L-乳  
10 酸。

用于本发明中优选的聚合物是乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVAc)，聚-L-乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和聚-L-乳酸(PLLA)。

从商品 EVAc，如果必要，在纯化之后，例如通过 Rhine 等人，1980 描述的溶剂浇铸方法，可以制备含有掺入到 EVAc 基质中的 sTNF - R  
15 的药物组合物。这些基质构成了扩散控制的系统，所述系统允许蛋白质均一分布，可重现的动力学以及在几星期或几个月的期间内生物学活性的 sTNF - R 的延缓释放。如果 EVAc 是生物相容性的并且不可降解的聚合物，那么 EVAc 基质适合于需要或期望药物释放延长的应用。

10 当活性要素借助于通过基质中的通道扩散而从不可降解的聚合物例如 EVAc 中释放时，通过较高的蛋白质负载量加强扩散。因此，在优选的实施方案中，将活性蛋白质与不影响对活性蛋白质的生物应答的中性蛋白质结合，以便提高总蛋白质的负载量。所述中性蛋白质的例子是牛血清白蛋白(虽然对于人使用来说不是优选的)，人白蛋白，肌  
25 红蛋白，血红蛋白等等。

在本发明的药物组合物中，包含掺入到选自于下列的生物可降解聚合物中的 sTNF - R：聚-L-乳酸，聚羟基乙酸，和其共聚物，商品乳酸和/或羟基乙酸的同聚物或共聚物，所述组合物配制成微球体形式，适合用于植入或注射应用。按照 Cohen et al 所述利用例如改性的  
10 溶剂蒸发方法，利用双乳化可以制备微球体。当这些聚合物是生物可降解时，植入剂易于被注射，避免使用手术和在药物被消耗之后去除装置。活性剂通过可控制的和预定的释放动力学释放。该系统允许活

性成份在几星期或几个月的期间内延缓释放。

含有 sTNF - R 的本发明的药物组合物可用于中和急性疾病例如败血性休克, 移植物抗宿主反应(GVHD), 疟疾, 传染性肝炎, 结核病, 或慢性疾病, 例如癌症相关的恶病质, 慢性 GVHD, 或自体免疫疾病, 例如类风湿性关节炎, 多发性硬化和青年型糖尿病, 全身红斑狼疮和皮肤延迟型过敏疾病中 TNF $\alpha$  的有害作用。

本发明的药物组合物可以以适合于 sTNF - R 的控制释放的方式给药, 例如植入, 或局部注射, 例如在治疗类风湿性关节炎时关节内注射到关节腔的关节液中, 或在治疗多发性硬化时鞘内注射到脑脊髓液中, 或以局部用药剂形式给药, 例如用于治疗皮肤疾病的洗剂。用于治疗类风湿性关节炎的组合物可包括其它的消炎剂, 和用于治疗多发性硬化的组合物可包括抗多发性硬化的其它药剂例如  $\beta$  - 干扰素和共聚物1 (Copolymer - 1, Cop-1)

将本发明的含有 sTNF - R 的组合物设计为可以在体内释放足于阻止 TNF $\alpha$  的作用的量的 sTNF - R。在自体免疫疾病的情况下, 将该组合物设计成例如释放的 sTNF - R 的量足于影响自体免疫疾病的进程和严重性以及提高患者的状态, 导致疾病减弱或缓解。有效量取决于给药途径, 待治疗的疾病和患者的状态。在中和 TNF $\alpha$  的有害作用方面, 考虑到外源性给药的 sTNF - R 可以补充内源性形成的 sTNF - R, 采用已知的方法(ELISA, 参见 Aderka 等人, 1991)对患者的血清中或其它合适的体液中 p55 sTNF - R 或 p75 sTNF - R 的水平进行测定, 可以帮助建立适合所述患者的剂量。

当期望稳定 TNF $\alpha$  的活性时, 该组合物含有 TNF $\alpha$  和 sTNF - R 的复合物例如 1:1 的比例的复合物, 以便在治疗部位给药。

通过下面的实施例和附图以非限制性的方式阐述本发明。

## 实施例

### 材料和方法

材料。使用 PLGA, 50:50, 固有的粘度(i.v.)为 0.51dl/g, 和 75:25 i.v.为 0.48dl/g, 以及 PLLA(聚 - L - 乳酸), i.v.为 0.64dl/g(两者都是从 PURAC Biochem BV, Holland 购买)。使用乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVAc), (40 % 乙酸乙烯酯)(杜邦), 牛血清白蛋白(BSA)(Sigma Chemical



验。对于体外试验,该盘含有 4.47, 13.41, 或 22.35 $\mu$ g TBPI(10 %, 30 % 和 50 % 负载量)。采用 ELISA 方法,测定 TBPI 与时间的函数关系,检测 TBPI 的释放(Aderka 等人,1991)。

附图 1 和 2 显示药物颗粒大小和负载量对从 EVAc 基质释放的动力学的影响。颗粒大小显著影响药物释放速率。颗粒大小的增加导致释放速率的提高(附图 1)。药物负载量的提高均一地提高药物释放速率(附图 2)。不仅释放的总药物量增加,而且释放速率提高。

药物颗粒大小和负载量显著影响大分子聚合物释放系统的释放动力学。因为大分子太大以致于不能穿过聚合膜扩散,通过基质中的通道扩散可能出现持续的释放。在浇铸期间大分子的掺入可引入这样的通道,通过该通道可扩散溶解的药物。颗粒直径的增加所引起释放速率的提高,可能是由于在聚合物基质中孔的大通道的形成。类似地,提高的负载量可提供较简单的途径(较低的弯曲)和用于扩散的较大的孔径,两者都有利于水和 PBS 移动到基质,而蛋白质从基质中排出。

## 15 实施例 2

### 从 PLGA 和 PLLA 微球体中控制释放 p55 sTNF - R ( TBPI )

如 Cohen 等人, 1991 描述, 利用双乳化以及修饰的溶剂蒸发方法, 制备聚(乳酸-羟基乙酸)(PLGA), 聚-L-乳酸(PLLA)微球体。简单地说, 将 TBPI 溶液或 TBPI 和 BSA 粉末(按照上述实施例 1 描述制备)溶解于双蒸馏水中, 倾倒入溶解于二氯甲烷中的 PLGA 或 PLLA 中。利用超声波检测该混合物 30 秒(VC - 250 型, Sonic& Materials Inc.), 形成第一惰性乳液(W1/O)。利用磁棒剧烈搅拌混合。将该乳液倾到 2 毫升的用二氯甲烷饱和的含水 1 % 聚乙烯醇(PVA)以形成第二乳液((W1/O)W2)。将得到的双重乳化液倾到 200 毫升的 0.1 % PVA 并且在室温下连续搅拌 3 小时, 直到大多数的二氯甲烷被蒸发, 留下固体的微球体。通过离心收集微球体(1000g, 10 分钟), 利用 100 微米的孔径的筛过筛, 并且冷冻干燥成粉末(16 小时, Freeze Dryer, Lab Conco)。除非另有说明, 否则研究工作是用比例为 75:25 和 50:50(L/G)的 PLGA 和 PLLA 完成的。

30 将聚合物释放系统浸于 PBS 介质中。在每个试验中评估含有 18.2 微克的 TBPI 的 0.04 克 PLGA 或 PLLA 微球体, 采用 ELISA 方法, 检测 TBPI 释放与时间的函数关系。

附图 3 显示从不同的 PLGA 共聚物(50:50 或 75:25)或 PLLA 微球体中 TBPI 的累积释放百分数。在 2200 小时之后可以看到, 掺入到微球体中的 TBPI 只有 10 % 被释放。在该图中也证明了当 TBPI 与 BSA 一起加入(TBP + BSA)时聚合物的 TBPI 的累积的释放百分数(实心圆 5 圈, 正方形和三角形)高于当没有 BSA 而仅加入 TBPI 时从样品释放的量(空心圆圈, 正方形和三角形)。

### 实施例 3

在用 CHO/TNF $\alpha$  细胞接种后的小鼠体内, 从聚合物基质中释放的 TBPI 保持其生物活性

10 对于下面的 TNF $\alpha$  的慢性有害作用, 在本实施中使用公知的用于 TNF $\alpha$  的恶病质效应的动物模型, 即按照 Oliff 等人, 1987 描述, 用产生 TNF $\alpha$  的肿瘤细胞(CHO/TNF $\alpha$ )植入的 balb 裸鼠。

给 balb 裸鼠皮下接种 CHO/TNF $\alpha$  细胞(Korn 等人, 1988), 以便得到恶病质。利用该细胞系的新鲜的胰蛋白胍化的悬浮液以  $1 \times 10^7$  细胞 15 /毫升(1 毫升/鼠)接种。利用塑料的 3cc 注射器的 23 号针进行注射。将细胞皮下注射到背, 颈或腹区。通过尾部取血每周采集几次血清样品。根据血液中 TBPI 和 TNF $\alpha$  的水平, 重量的降低以及死亡情况, 对在用 CHO/TNF $\alpha$  细胞接种五天之后植入的聚合物系统的性能进行评估。

在所述小鼠已经接种了产生 TNF $\alpha$  的 CHO 细胞以获得恶病质的五 20 天后, 将上述实施例 1 和 2 的聚合物基质植入或注射到 balb 裸鼠, 根据血液中 TBPI 和 TNF $\alpha$  的水平, 对聚合物系统的性能进行评估 (ELISA)。检测的参数是: (1)TBPI 的生物学活性与时间的函数关系; (2)将 TBPI 治疗与用抗人 TNF $\alpha$  的小鼠抗体(在发明人的实验室制备并且命名为 TNF - 1)注射一次(用 CHO/TNF $\alpha$  细胞接种小鼠五天之后, 25 标记为 Ab-一次)或以互相一星期的间隔注射两次(CHO/TNF $\alpha$  细胞接种五天之后, 以及一星期之后, 标记为 Ab - 两次)治疗进行比较; (3)根据小鼠平均组重量和小鼠死亡率评价恶病质的进展; (4)移植的部位 (颈, 背或胃的皮下)。

TNF $\alpha$  可能引起恶病质, 并且能够诱导携带肿瘤的动物的重量逐渐 30 损失。在植入了产生 TNF $\alpha$  的肿瘤细胞的小鼠中检查基质的体内效果。以高水平组成型产生 TNF $\alpha$  的  $1 \times 10^7$  CHO/TNF $\alpha$  细胞注射的小鼠显示严重的恶病质并且重量损失, 导致死亡。另外, 植入了含有 TBPI 的聚

合物的基质的小鼠其体重增加, 而没有死亡, 表明基质释放的 TBPI 提供了持久的抗  $\text{TNF}\alpha$  的效果。

为了对携带肿瘤的小鼠中 TBPI 生物学活性进行评估, 在不同的时间点收集血清样品并且通过测定其对 MHA2 细胞 (对  $\text{TNF}\alpha$  敏感的 HeLa 细胞的衍生物) 的细胞毒性而对其中的  $\text{TNF}\alpha$  的生物学活性进行评估。如附图 4b 所述, 接种含有 TBPI 的基质导致血清的  $\text{TNF}\alpha$  生物学活性延长和显著降低, 表明基质释放的 TBPI 强烈地抑制  $\text{TNF}\alpha$  与 MHA2 细胞的细胞表面  $\text{TNF}\alpha$  受体的结合。

为了进行比较, 用抗  $\text{TNF}\alpha$  的抗体注射小鼠一次(用 CHO/ $\text{TNF}\alpha$  细胞接种小鼠五天之后, 标记为 Ab-一次)或以一星期的间隔注射小鼠两次(CHO/ $\text{TNF}\alpha$  细胞接种五天之后, 以及一星期之后, 标记为 Ab - 两次)。如附图 4a 所示, 抗体仅在注射之后几天影响鼠的重量(小鼠保持其体重), 然后它们发展为进展性的消瘦, 而当掺入到聚合物中时 TBPI 在体内长期存在。

在抗体注射的小鼠的血清中  $\text{TNF}\alpha$  的生物活性情况表明注射的抗  $\text{TNF}\alpha$  的抗体( $\text{TNF} - 1$ )的效果持续时间短, 如在附图 4b。

在附图 4c 中可以看到, 用允许 TBPI 控制和定位释放的聚合物系统治疗的小鼠生存了 50 天以上, 这与用  $\text{TNF} - 1$  抗体治疗的小鼠不同, 当停止注射抗体时后者不能生存并且发展为恶病质。

这些结果表明基于聚合物控制释放的 TBPI 的治疗阻止了消瘦症的发展, 并且优选的是注射抗  $\text{TNF}\alpha$  的抗体, 因为它不用每星期注射, 并提供了抵抗  $\text{TNF}\alpha$  的持久的保护作用。而且由于是天然分子, 可溶性的  $\text{TNF}\alpha$  受体更适用于延长使用。抗  $\text{TNF}\alpha$  的抗体迟早将产生抗它们的抗体, 这将阻止它们的作用, 因此不适用于延长使用。对于人或人性化的抗体这也是正确的, 将会产生抑制其功能的抗个体基因型抗体。

从植入到小鼠的颈背, 背部或胃部的 EVAc 基质释放 TBPI 的动力学与基质植入部位的函数关系没有显著的差异(附图 5)。在整个释放期间 TBPI 的释放动力学保持不变。

#### 实施例 4

在转基因的 Tg197 小鼠中从聚合物基质释放的 TBPI 保留其体内生物学活性

根据踝关节肿胀水平, 对转基因的 Tg197 小鼠中实施例 1 制备的 EVAc 基质(出生后 14 天通过基本手术皮下植入)的性能进行评估。在约 4 - 6 周龄时出现病症, 为踝关节肿胀。在 9 - 10 周龄时进一步的踝关节肿胀和后腿运动损伤发展为后腿完全失去运动功能。而且在这些小鼠中重量的逐步损失是共同的特征。但是用含有 TBPI 的 EVAc 基质治疗这些关节炎小鼠完全阻止了踝关节肿胀(附图 6)。而且, 被治疗的动物正常地发育, 甚至在 10 周龄时没有显示关节炎迹象或重量的损失。

为了进行比较, 在出生后 14 天用 TNF - 1 抗体每周注射小鼠一次, 持续整个治疗期(65 天)或一星期注射小鼠一次, 共两周。如附图 7 所示, 仅当每周注射一次维持整个试验期间时抗体影响肿胀(黑色柱)。每周注射的小鼠显示发育正常并且甚至在 10 周龄时没有显示关节炎迹象或重量的损失, 而在这些小鼠中运动的损伤是共同的可见的特征。但是, 一星期注射小鼠一次, 共两周的小鼠发展为踝关节肿胀和在 9 - 10 周龄时后腿运动损伤发展为后腿完全失去运动功能, 逐渐重量损失。

这些结果表明基于聚合物控制释放的 TBPI 的治疗完全阻止了小鼠关节炎的发展, 并且优选的是注射抗 hTNF $\alpha$  的抗体, 因为它提供了抵抗 TNF $\alpha$  持久保护作用并无需每星期注射。

#### 20 实施例 5

##### 在转基因的 Tg211 小鼠中从聚合物基质释放的 TBPI 保留其体内生物学活性

在 T 细胞中表达人 TNF mRNA 的转基因 Tg211 小鼠发展为明显的组织学变化以及致死的消瘦症。根据重量的降低和死亡率对出生 14 天后植入的含有 TBPI 的聚合物系统的性能进行评估。每周对动物逐个称重几次。通过基本手术将 EVAc 基质皮下植入。

如附图 8 和 10 所示, 未治疗的小鼠(对照组: 实心正方形)发展为严重的进展性重量损失, 导致死亡, 而植入了含有 TBPI 的 EVAc 基质的小鼠(实心圆圈), 增加了体重和在整个试验期间存活。

30 为了进行比较, 小鼠在出生后 14 天用 TNF - 1 抗体每周注射一次, 持续整个治疗期或一星期注射一次, 共两周。如附图 9 所示, 以抗 TNF $\alpha$  的抗体给药完全阻止了消瘦症的发展, 如果从出生开始每周

给药。但是，如果仅每周给药一次，共给药两周，这些抗体是不起作用的，小鼠发展为消瘦症，导致死亡，如附图 11 所示。

这些结果表明基于聚合物控制释放的 TBPI 的治疗完全阻止了小鼠消瘦症的发展，并且优选的是注射抗 hTNF $\alpha$  的抗体。

- 5 体内结果显示释放的 TBPI 保留了其生物学活性，如平均组重量变化所证明(附图 4a)和对 TNF $\alpha$  敏感的 MHA2 活细胞的高百分数所证明(附图 4b)。

本文中公开的所有参考文献包括杂志文章或摘要，公开的或对应的美国或外国专利申请，授权的美国或外国专利，或其它任何参考文献  
10 整个引入作为参考，包括所记载的参考文献中的数据，表，图和正文。另外，在本文中记载的参考文献中记载的文献的所有内容也全部引入本文作为参考。

对已知的方法步骤，常规的方法步骤，已知的方法或常规的方法的引用不是以任何方式承认在相关领域内公开，教导或暗示了本发明的  
15 任何方面，说明书或实施方案。

前面的特定实施方案的描述已经充分显示本发明的一般特性，以致于通过应用本领域内技术人员知识(包括参考文献中记载的内容)容易修饰和/或适用于各种应用例如特定的实施方案，不需要过度的实验，不会脱离本发明的一般概念。因此，基于本文提供的教导和指导，  
20 所述的适应和修改包括在本文公开的实施方案的等同物的含义和范围内。应该明白，本文中的短语或术语是为了描述的目的，不是为了限制，因此根据本文提供的教导和指导，结合本领域内技术人员的知识，本领域内技术人员可以理解本发明说明书的术语或短语。

## 参考文献：

1. Aderka D. 等人 , Cancer Res., 51:5602-5607 (1991).
2. Aderka D. 等人 , J. Exp. Med., 175:323-329 (1992).
3. Cohen S. 等人 , Pharm. Res., 8:713-720 (1991).
4. Engelmann H. 等人 , J. Biol. Chem., 264:11974-80 (1989).
5. Engelmann H. 等人 , J. Biol. Chem., 265:1531-36 (1990).
6. Korn J.H. 等人 , Lymphokine Res., 7:349-358 (1988).
7. Langer R., Science, 249:1527-1533 (1990).
8. Loetscher H. 等人 , Cell, 61:351-359 (1990).
9. Nophar Y. 等人 , EMBO J., 9:3269-78 (1990).
10. Oliff A. 等人 , Cell, 50:555-563 (1987).
11. Olson I. 等人 , Eur. J. Haematol., 42:270-75 (1989).
12. Probert L. 等人 , J. Immunol., 151:1894-1906 (1993).
13. Rhine W.D. 等人 , J. Pharm. Sci., 69:265-270 (1980).
14. Schall T.J. 等人 , Cell, 61:361-370 (1990).
15. Seckinger P. 等人 , J. Biol. Chem., 264:11966-973 (1989).
16. Wallach D. 等人 , J. Immunol., 132:2464-69 (1984).

图 1

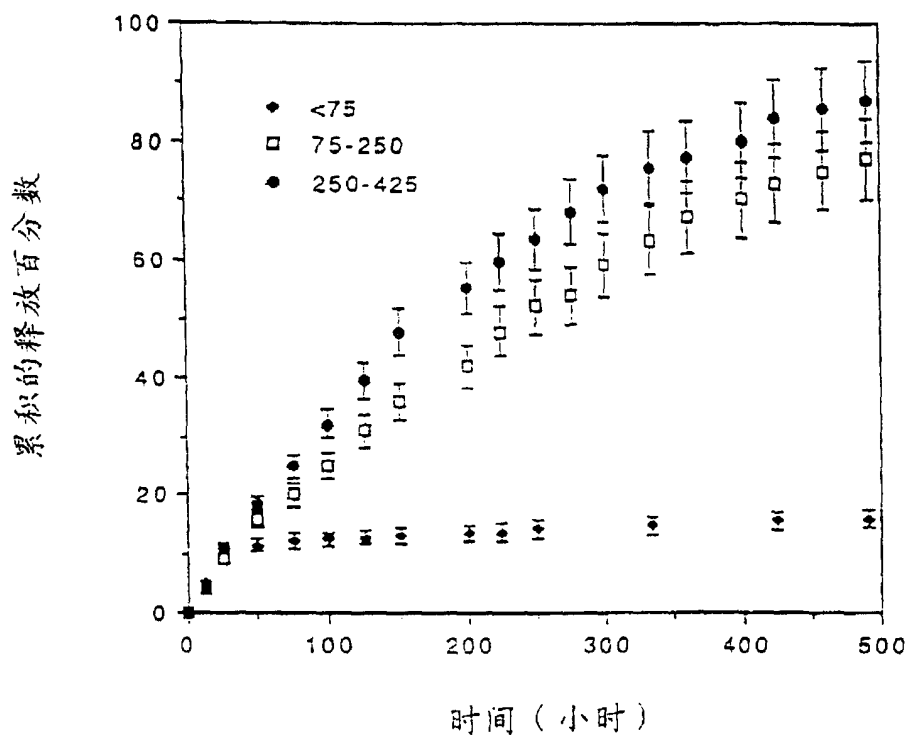


图 2

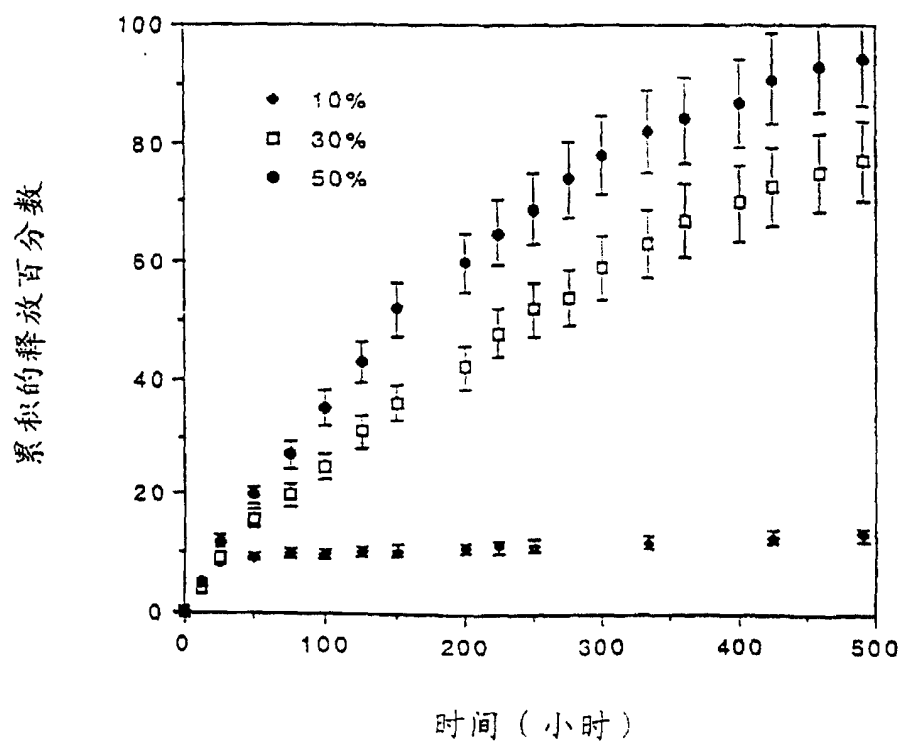


图 3

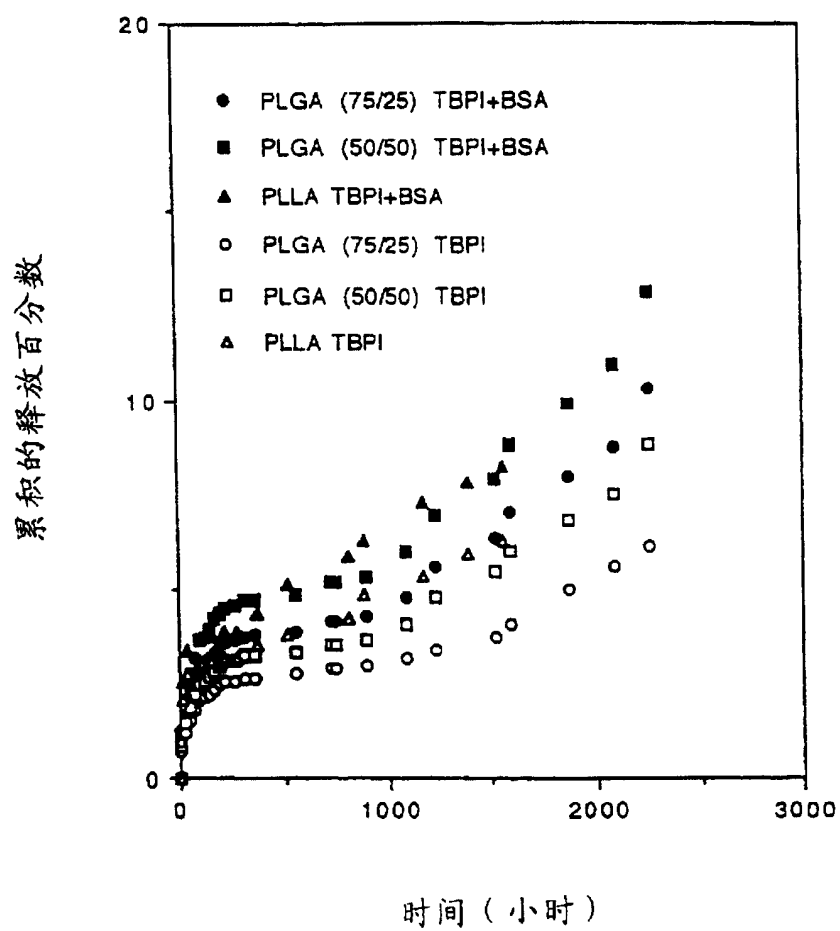


图 4a

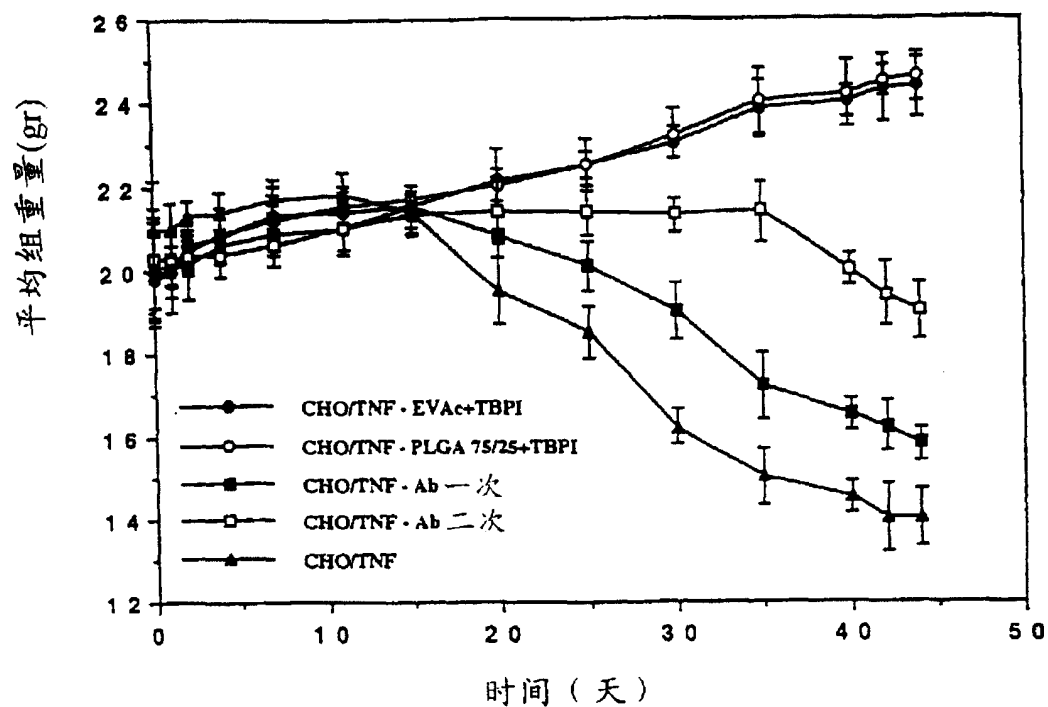


图 4b

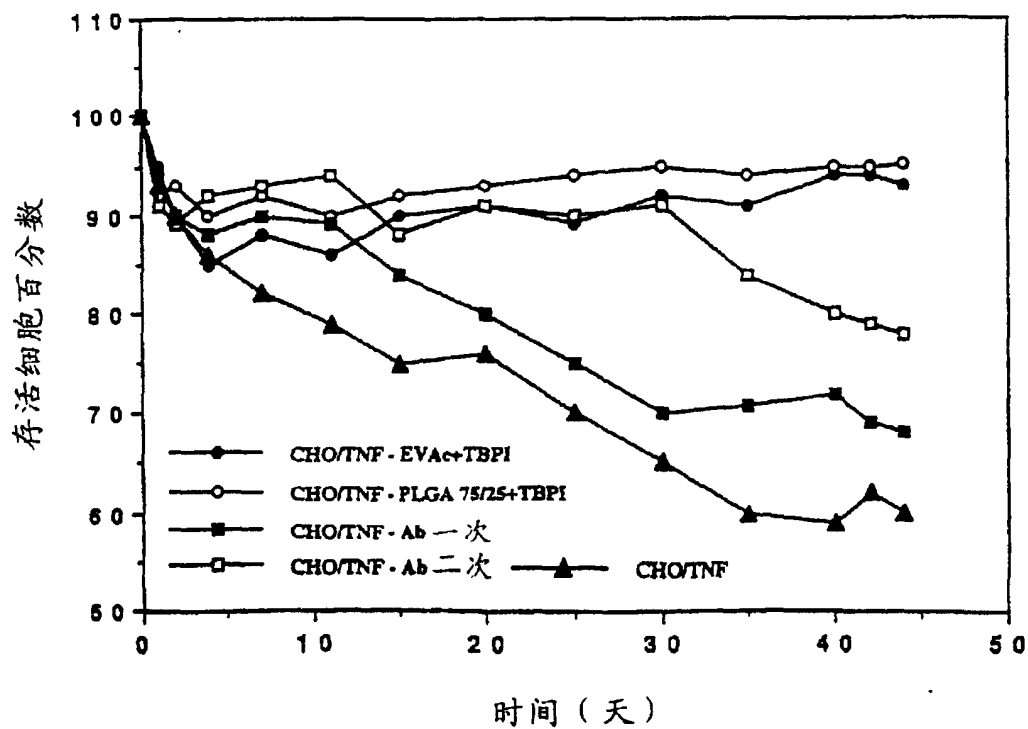


图 4c

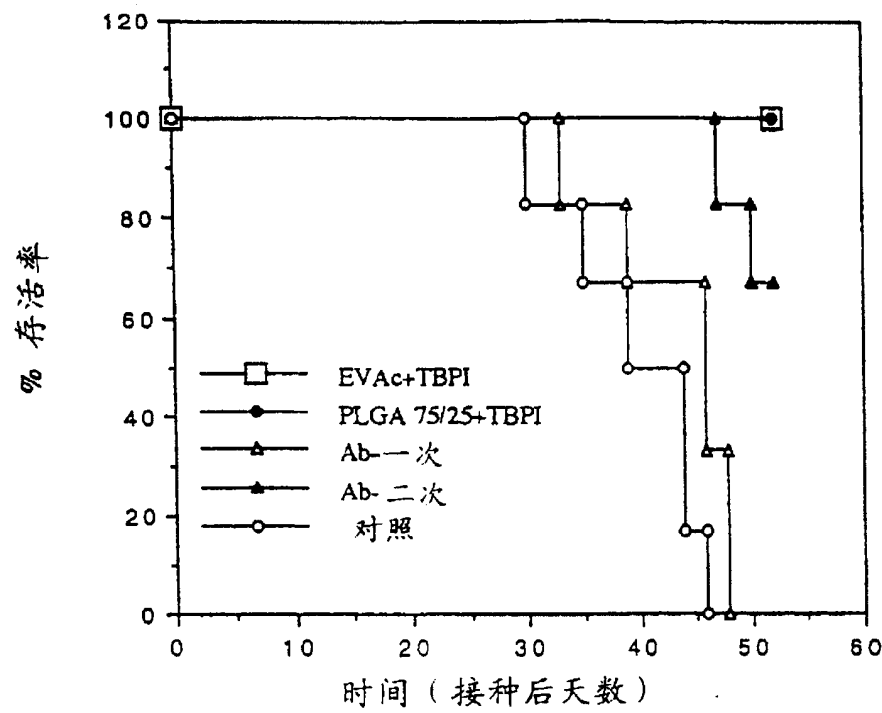


图 5

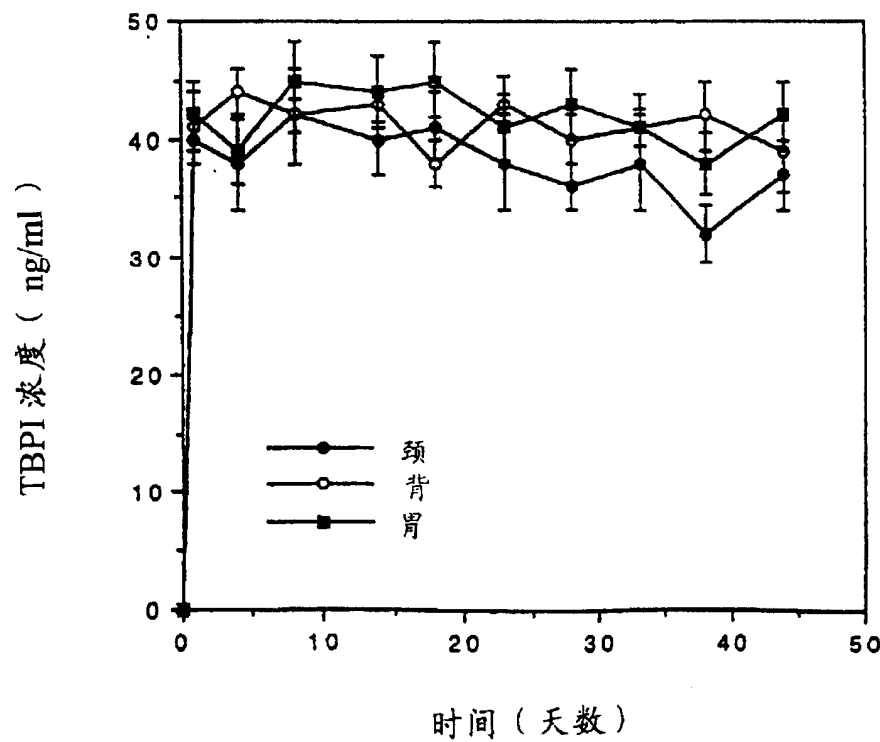


图 6

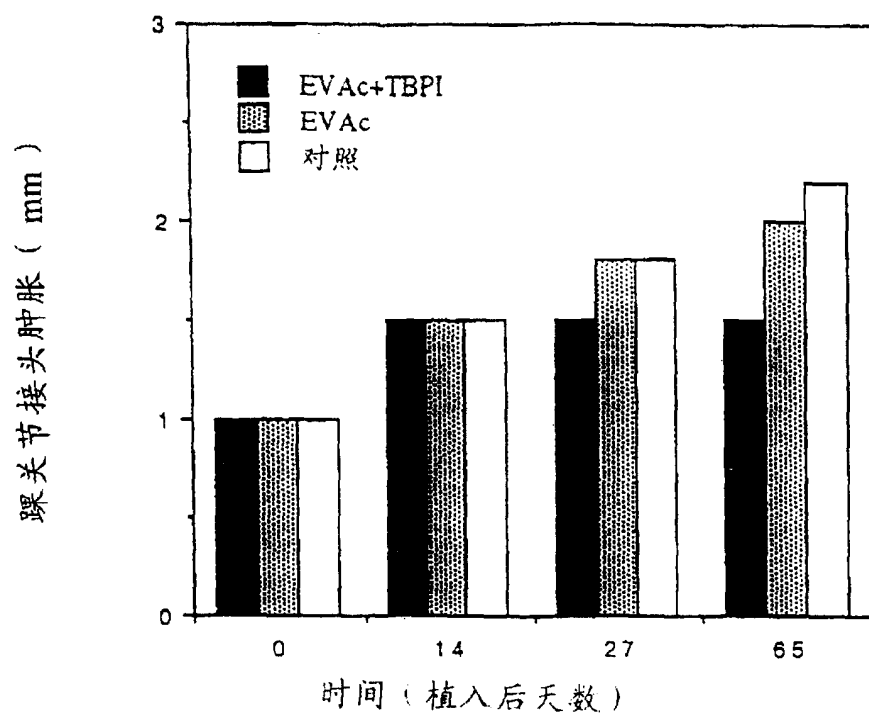


图 7

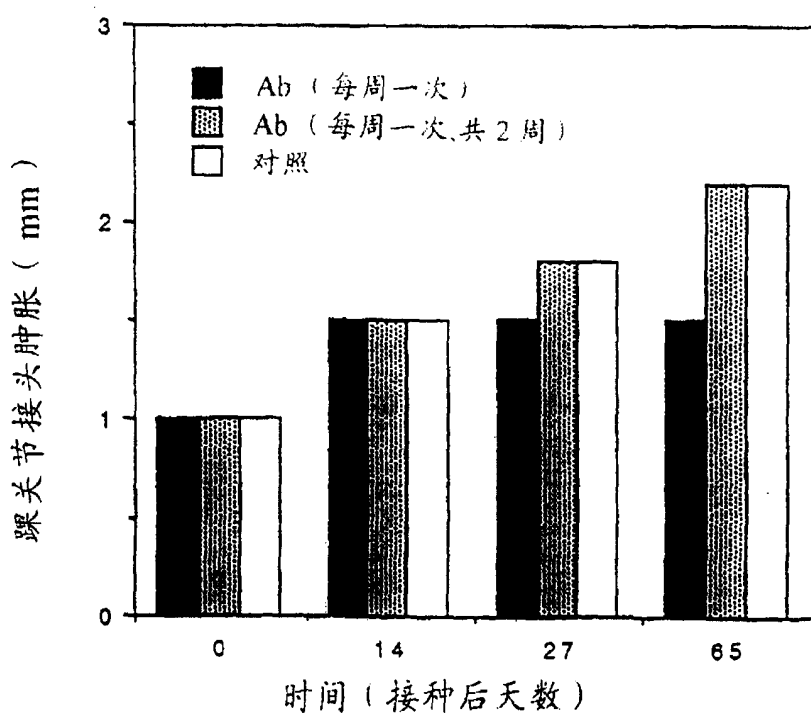


图 8

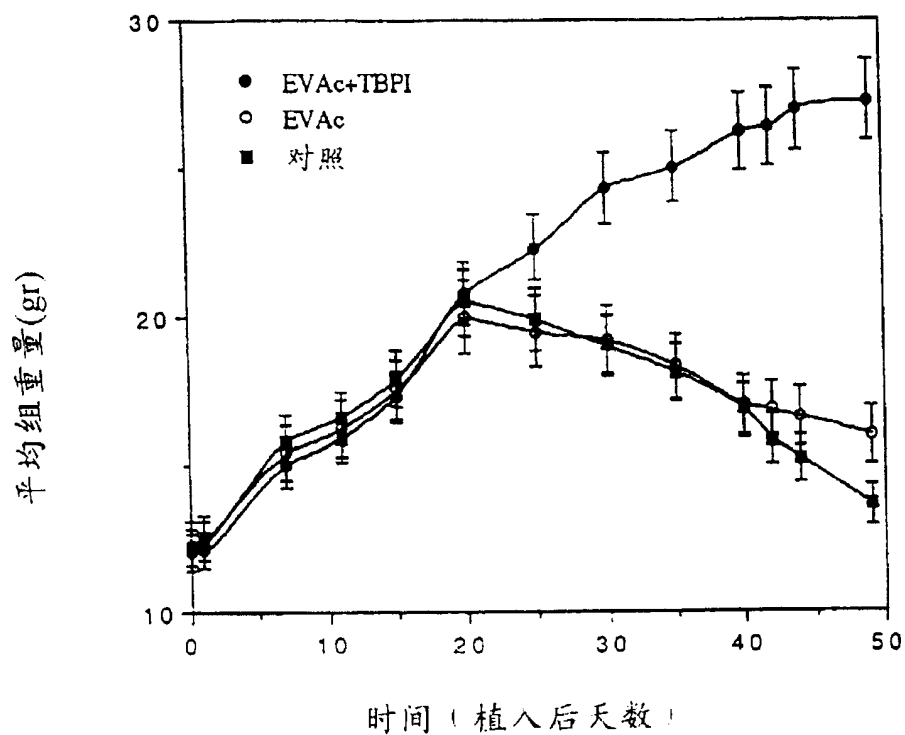


图 9

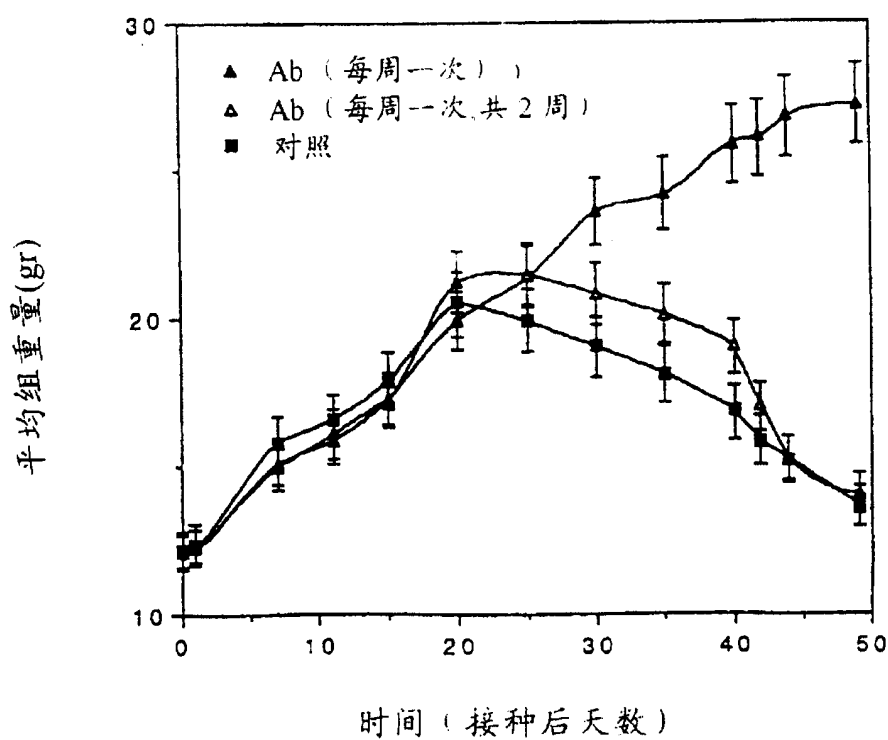


图 10

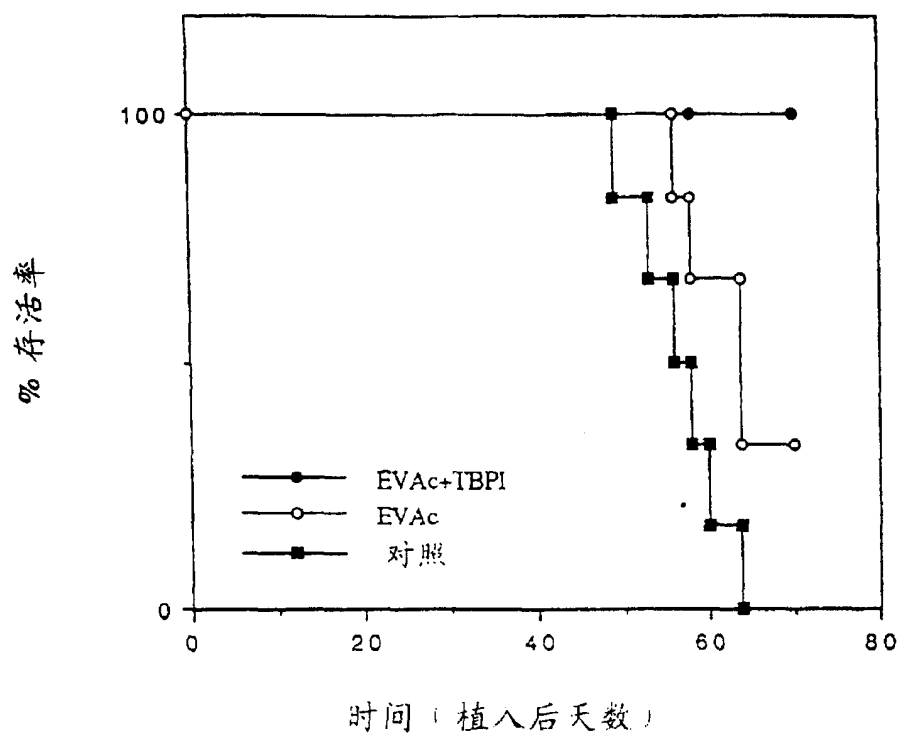


图 11

