

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03142826.6

[51] Int. Cl.

*A61K 38/23 (2006.01)*

*A61P 19/10 (2006.01)*

*A61P 19/08 (2006.01)*

*A61P 5/20 (2006.01)*

*A61P 3/14 (2006.01)*

*A61P 27/12 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008年2月27日

[11] 授权公告号 CN 100371018C

[22] 申请日 2003.6.12 [21] 申请号 03142826.6

[73] 专利权人 刘青松

地址 266071 山东省青岛市香港中路6号  
世贸中心2103室

[72] 发明人 刘艳 邓秋 刘青松

[56] 参考文献

CN1185974A 1998.7.1

WO0213782A1 2002.2.21

CN1055483A 1991.10.23

WO03030865A1 2003.4.17

Promoting Effect of the Ultradeformable Liposomes on Transdermal Delivery. Hu Xin, et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, Vol. 11 No. 1. 2002

审查员 辜学英

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

[54] 发明名称

降钙素组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种降钙素脂质体组合物。该组合物包含降钙素，还含有天然和/或合成磷脂、胆固醇、辅助剂及其它表面活性剂构成的脂质体。该组合物可以使降钙素用于粘膜和皮肤给药的生物利用度大大提高，对粘膜基本无刺激性，并也可用于注射给药。

1. 一种用于粘膜或经皮给药的组合物，其包括降钙素，天然和/或合成磷脂、胆固醇、辅助剂和其它表面活性剂构成的脂质体。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中辅助剂选自荷正电的胆固醇衍生物、十八胺、二甲基溴铵、壳聚糖、阿拉伯胶，以及它们的混合物。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中其它表面活性剂选自胆盐、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯、失水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯甘醇酸化的天然或者氢化植物油、氧化乙烯-氧化丙烯共聚物、带一个含碳原子数为 10 -20 的直链烷基的季铵盐，以及它们的混合物。
4. 一种药物组合物，其包括权利要求 1-3 任一项的组合物和可药用的辅料和添加剂。
5. 如权利要求 1-3 任一项的组合物用于制备治疗骨质疏松症、变形性骨炎、高血钙及高血钙危象、神经性营养不良、急性胰腺炎、甲状旁腺机能亢进、骨骼愈合、骨痛和白内障疾病的药物的用途。
6. 如权利要求 5 所述的用途，其特征在于通过鼻粘膜、口腔粘膜、阴道粘膜、子宫粘膜、肺粘膜、肠粘膜、眼部和皮肤给药。
7. 如权利要求 5 所述的用途，其特征在于通过鼻粘膜和/或口腔粘膜给药。

## 降钙素组合物

**发明领域** 本发明涉及一种经粘膜和皮肤给药的具有更高的生物利用度的降钙素脂质体组合物，该组合物也可用于注射给药。

**背景技术** 随着基因工程药物研究的进展，很有潜力的蛋白和多肽类药物近年来在临床治疗上显得越来越重要。降钙素是甲状腺内的滤泡旁细胞分泌的一种32肽的激素，是具有二硫桥键的多肽，分子量约为3400-3600。目前，降钙素在治疗骨质疏松症、高血钙、甲状旁腺机能亢进、变形性骨炎及骨骼愈合等方面显示了良好的疗效。因此，降钙素有着很好的应用前景。

众所周知，由于胃肠道蛋白酶的水解作用，蛋白和多肽类药物口服基本无效，因此一般采用非胃肠道途径给药，常用的给药方式是注射给药，如静脉注射给药和皮下给药，但此给药方式因血中浓度的急剧升高和随后的下降而带来全身的副作用和引起疼痛，且半衰期较短，病人顺从性差等因素限制了需长期、重复给药的基因工程药物的临床应用。因此选择合适的非注射给药途径，或延长药物的半衰期，已经受到了广大药剂学工作者的关注。经粘膜和皮肤给药，药物可直接透过粘膜和皮肤吸收进入体内而避免肝首过效应及消化道粘膜代谢和胃肠液的降解等优点，因此粘膜和皮肤给药被认为是蛋白和多肽类药物较理想的取代注射给药的全身给药途径。然而，降钙素是大分子水溶性药物，在没有吸收促进剂的情况下，普通水溶液经粘膜和皮肤给药存在着生物利用度非常低的缺点。因此许多研究的方向是寻找效果好且毒性低的吸收促进剂和载体。

降钙素鼻粘膜给药是研究的较早及较为成功的一种给药途径，但在没有吸收促进剂的情况下，普通溶液鼻腔给药存在着生物利用度低的缺点，与静脉注射相比，国外已经上市的鲑鱼降钙素鼻喷雾剂（密钙息）的生物利用度仅为3%。Kagatani等[Seiya Kagatani, Tatsuki Shinoda, Muneo Fukui, et al., Enhancement of nasal salmon calcitonin absorption by lauroylcarnitine chloride in rats. *Pharmaceutical Research* 13(1996), 739~743]采用降血钙法对肉毒碱盐酸盐类促渗剂促鲑鱼降钙素鼻腔吸收的效果进行了研究。结果显示具有十二个碳原子链的月桂酰肉毒碱（LCC）促渗效果最好，显著地增加了鲑鱼降钙素经鼻吸收。LCC

与鲑鱼降钙素的比例为 5:1 促渗效果最佳, 且不受渗透压的影响, 但其促渗效果与 pH 值相关, 当 pH 为 3.1—4.0 时促渗效果最好, 但此时对鼻粘膜的刺激性却很大, 限制了其应用。Morimoto 等 [Kazuhiro Morimoto, Hideyuki Katsumata, et al., Evaluation of gelatin microspheres for nasal and intramuscular administrations of salmon calcitonin, *European Journal of Pharmaceutical Science* 13(2001), 179-185] 用带不同电荷的鲑鱼降钙素明胶微球鼻腔给药。研究发现, 鲑鱼降钙素经鼻给药后的降血钙效果与微球的粘膜粘附能力和所带电荷有关。由于带正电荷明胶微球的粘膜粘附作用明显高于带负电荷组, 相应地, 带正电荷的鲑鱼降钙素明胶微球的降血钙效应更为有效。但无论是带正电荷或是带负电荷的明胶微球由于具有粘膜粘附性, 因此鲑鱼降钙素明胶微球的吸收均要比 PBS (pH7.0) 溶液组的高, 但鲑鱼降钙素明胶微球很易被当作异物清除。Yamamoto 等 [Akira Yamamoto, Tomoya Iseki, et al., Absorption of water-soluble compounds with different molecular weights and [<sup>125</sup>I]-eel calcitonin from various mucosal administration sites, *Journal of controlled Release* 76(2001) 363-374] 将鳗鱼降钙素溶液进行不同粘膜给药, 结果显示肺部的吸收最高, 以下依次为鼻腔、大肠、小肠和口腔。研究表明鲑鱼和人降钙素经大鼠气管内给药后能获得 17% 的绝对生物利用度; 与皮下注射相比, 人降钙素肺部给药的绝对生物利用度为 68% [J.S. Patton, P. Trinchero, R.M. Plats, Bioavailability of pulmonary delivery of peptides and proteins: alpha-interferon, calcitonins, and parathyroid hormone, *J Control. Release* 28(1994)79~85]。Deffos 等 [L.J.Deffos, J.J. Nolan, B.L. Seely et al., Intrapulmonary drug delivery of salmon calcitonin, *Calcif. Tissue Int.* 61(1997)345~347] 评价了不同鲑鱼降钙素粉末制剂, 与注射相比, 肺部吸入实验显示 66% 的生物活性和 28% 的生物利用度, 但病人不能方便地自主用药。

Richardson 等 [Juie L. Richardson, Piera Angela Ramires, et al., Novel vaginal delivery systems for calcitonin: I. Evaluation of HYAFF/calcitonin microspheres in rats, *International Journal of Pharmaceutics* 115(1995)9-15] 对鲑鱼降钙素水溶液和鲑鱼降钙素 HYAFF 微球经大鼠阴道给药后的吸收进行了研究。结果表明鲑鱼降钙素 HYAFF 微球显示了良好的粘附性并能显著地降低血清钙离子浓度, 阴道给药 100IU/kg 鲑鱼降钙素 HYAFF 微球后降血钙效果与皮下注射鲑鱼降钙素溶液

(10IU/kg) 效果相当。Nakada 等[Nakada Y, Miyake M, Awata N, Some factors affecting the vaginal absorption of human calcitonin in rats, *International Journal of Pharmaceutics* 89(1993) 169-175]对人降钙素经大鼠阴道给药研究发现, 人降钙素的吸收受 pH 的影响而与渗透压无关。人降钙素不加任何附加剂在 pH7.4 条件下阴道给药后生物利用度很低, 当溶液中加入去氧胆酸钠, 蛋白酶抑制剂贝它定、良肽素和胃酶抑素 A 时, 人降钙素的吸收得以提高, 且人降钙素经阴道给药后吸收的促进作用与蛋白酶抑制剂的抑制作用相关。Golomb 等 [Golomb G, Avramoff A, Hoffman A, A new route of drug administration: Intrauterine delivery of insulin and calcitonin. *Pharmaceutical Research* 10(1993)828~833] 将卵巢切除一个月后的健康大鼠随机分成鲑鱼降钙素皮下注射组、宫内滴入给药组和生理盐水宫内滴入三组。剂量均为 0.8IU/kg (0.2ml)。结果宫内和皮下注射给药后, 得到相似的钙离子浓度-时间曲线; 血清钙离子浓度均显著降低。低血钙反应在两种途径给药后 4hr 内达到最低值, 分别降低 29%和 28.3%, 两种途径的 AUC 平均值差异不明显, 证明了降钙素宫内给药与皮下注射给药同样有效。

Byran 等[Byran H.P.Li, George C Y Chiou, Systemic administration of calcitonin through ocular route. *Life of Science*, 50:359-354]对降钙素经眼部途径给药进行全身治疗的可行性作了研究。当只将简单降钙素水溶液 (0.05%) 眼部给药时, 所得的血药浓度峰值与静脉注射相比非常的低 (约 1%); 而在滴眼液中加入 0.5%BL-9 后, 将降钙素溶液 (0.5%) 经眼吸收的血药浓度峰值提高了 16 倍; Brij-78 的促吸收效果更佳, 将血药浓度的峰值提高了 24 倍, 其血药浓度在 45min 达到峰值, 在 30min 时的血药浓度已经高于 0.05%降钙素溶液静脉注射的血药浓度。研究结果表明, 在促进剂 BL-9 和 Brij-78 存在的条件下, 降钙素溶液经眼部给药后, 降钙素能被吸收进入全身循环系统, 并获得达到治疗水平的血药浓度, 但促进剂对眼睛的刺激性太大, 不适于应用。

降钙素本身为大分子多肽、水溶性药物, 不可能自发穿透皮肤进入体内, 而需借助其他活性促进机制来完成经皮给药。目前主要是通过离子导入法将降钙素经皮导入体内。Santi 等 [Patrizia Santi, Paolo Colombo, et al., Drug reservoir composition and transport of salmon calcitonin in transdermal Iontophoresis, *Pharmaceutical Research* 14(1997) 63-66] 通过比较鲑鱼降钙素在 pH4.2 和 pH7.4

条件下离子导入经皮转运能力大小,证明了鲑鱼降钙素溶液在 pH4.2 条件下因所带正电较多,离子导入引起的降血钙效应要显著得多。人们在应用中为了消除皮肤极化现象,降低对皮肤的刺激性,较多地采用了具有一定频率和占空比的脉冲电流。Nakamura 等 [Katsuhiko Nakamura, Kazuya Katagai, et al., Transdermal administration of salmon calcitonin by pulse depolarization-iontophoresis in rats, International Journal of Pharmaceutics 218(2001)93-102] 使用去极化脉冲离子导入法 (PDP-IP)。研究表明频率为 30kHz、占空比为 30%时,最佳导入鲑鱼降钙素的电流为 0.1-1.0mA,能有效地导入 0.2-4  $\mu\text{g}$  的鲑鱼降钙素;当电流再增加时,反而使得药物的吸收下降,推测其原因为过大的电流引起皮肤结构的破坏所致。Thysman 等 [Sophie Thysman, Cecile Hanchard, Veronique Preat, Human calcitonin delivery in rats by Iontophoresis, Journal of Pharm. Pharmacol. 46(1994)725-730] 在研究鲑鱼降钙素溶液 (pH4, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 离子导入时,采用电流 0.33mA·cm<sup>-2</sup>、2.5kHz、占空比为 1:1,给药时间从 20min 延长到 1 小时,发现鲑鱼降钙素的导入流量并没有升高,认为这可能是鲑鱼降钙素在转运药物的皮肤毛孔处被阻塞或先在皮肤中积累,尔后不断地从中释放的原因。体内实验证明了该方法能引起大鼠的降血钙效应。渗透促进剂与离子导入合并应用可能产生协同作用,为极大地降低药物剂量和渗透促进剂用量提供可能。Tomohira 等 [Yuso Tomohira, Yoshiharu Machida, et al., Iontophoretic transdermal absorption of insulin and calcitonin in rats with newly-devised switching technique and addition of urea, International Journal of Pharmaceutics 155(1997) 231-239] 将尿素和离子导入法联合应用便取得了很好的效果,并降低了对皮肤的刺激性。此外,在制剂中加入酶抑制剂如抑肽酶 [Kazuhiro Morimoto, Yasushi Iwakura, et al., Effects of proteolytic enzyme inhibitors as absorption enhancers on the transdermal iontophoresis delivery of calcitonin in rats, Journal of Pharm. Pharmacol. 44(1992)216-218] 等降低被皮肤中存在的酶的降解,也有效地提高了鲑鱼降钙素的经皮转运效率。

现有技术表明,吸收促进剂和其它技术在增加粘膜和皮肤的通透性的同时,也引起对粘膜和皮肤的较大的刺激性,生物利用度还不能令人满意。

因此,仍需要研制出一种无刺激性和毒性、稳定性好、具有更高的生物利用度的经粘膜和皮肤给药,或延长药物注射的半衰期的降钙素组合物。

发明内容 一方面，本发明提供一种降钙素脂质体组合物。

另一方面，本发明提供降钙素脂质体组合物用于经粘膜和皮肤给药的用途，也可用于注射给药。

根据本发明的一个方面，其提供一种用于经粘膜和皮肤及注射给药的脂质体组合物，其包含降钙素及由磷脂、胆固醇、辅助剂及其它表面活性剂构成的脂质体。

本发明还涉及制备脂质体组合物的方法，该方法选自薄膜法、反相蒸发法、注入法、复乳法、熔融法、冷冻干燥法、离心法、钙融合法、硫酸铵梯度法、加压挤出法、前体脂质体法、气雾剂法和透析法。在各制备方法中，都先将降钙素溶解在水相中。

本发明组合物可根据任何常规方法配制成各种制剂，例如滴鼻剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、软膏剂、注射剂。

本发明组合物可用于制备治疗骨质疏松症、变形性骨炎、高血钙及高血钙危象、神经性营养不良、急性胰腺炎疾病、甲状旁腺机能亢进、骨骼愈合、骨痛和白内障及与血钙异常有关的疾病的药物。

本发明组合物用于制备治疗上述疾病的药物可通过以下途径给药：鼻粘膜、口腔粘膜、阴道粘膜、子宫粘膜、肺粘膜、肠粘膜、眼部和皮肤、注射。优选通过鼻粘膜和/或口腔粘膜给药。更优选通过鼻粘膜给药。

本发明的脂质体组合物为稳定的均匀分散的乳剂形式，并包括作为活性成分的降钙素，还包括由磷脂、胆固醇、辅助剂及其它表面活性剂构成的脂质体。本发明的组合物使降钙素经粘膜和皮肤给药的体内生物利用度大大提高。本发明组合物中的降钙素的代表性例子是鲑降钙素、人降钙素、鳗降钙素、鸡降钙素、猪降钙素、牛降钙素、羊降钙素、鼠降钙素和大马哈鱼降钙素。本发明组合物中的降钙素至少是其中的一种，组合物中降钙素的含量为 0.0001-1%，优选 0.0005-0.01%，更优选 0.0005-0.005%，以组合物的总重量计。

磷脂是构成本发明组合物中的脂质体的主要成分。可在本发明中使用磷脂是天然和/或合成的磷脂，其代表性例子包括大豆磷脂、卵磷脂、聚乙二醇一二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、磷脂酰乙醇胺、脑磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、鞘髓磷脂、二肉豆蔻酰卵磷脂或它们的衍生物或它们的混合物。本发明组合

物中含磷脂 2-10%，优选 2-6%，更优选 3-5%，以组合物的总重量计。优选在本发明中使用的磷脂是天然大豆磷脂和卵磷脂。

胆固醇也是常用的构成脂质体的成分，它的加入能调节脂质双层的流动性。本发明组合物含胆固醇 0-5%，优选 0-3%，更优选 0.5-2%，以组合物的总重量计。

辅助剂使脂质体带正电荷，以增加本发明组合物的粘膜或皮肤粘附性能，并在贮存时有利于脂质体的稳定。可在本发明中使用的辅助剂是荷正电的胆固醇衍生物、十八胺、二甲基溴铵、壳聚糖、阿拉伯胶，以及它们的混合物。本发明组合物中含辅助剂 0-5%，优选 0-2%，更优选 0-1%，以组合物的总重量计。优选在本发明中使用的辅助剂是胆固醇衍生物。

其它表面活性剂有助于增强脂质体的变形性和透过粘膜和皮肤的能力，提高药物透过粘膜和皮肤的透过率和透过速度。本发明组合物中含其它表面活性剂 0-6%，优选 0-4%，更优选 0-2%，以组合物的总重量计。可在本发明中使用的代表性的其它表面活性剂包括：

- (1) 胆盐和去氧胆盐，如胆酸钠、甘氨酸胆酸钠；
- (2) 聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯(Tween)，如 Tween-80；
- (3) 失水山梨醇脂肪酸酯(Span)，如 Span80；
- (4) 聚氧乙烯脂肪酸酯(Myrij)，如 Myrij59；
- (5) 聚氧乙烯脂肪醇醚(Brij)，如 Brij35；
- (6) 聚氧乙烯甘醇酸化的天然或者氢化植物油(Cremophor)，如 Cremophor EL；
- (7) 氧化乙烯-氧化丙烯共聚物(Pluronic)，如 Pluronic F68；
- (8) 带一个含碳原子数为 10-20 的直链烷基的季铵盐，以及它们的混合物。

在上述表面活性剂中，优选用于本发明的是去氧胆酸钠和胆酸钠。

另外，本发明的组合物还包括药学上可接受的抗氧化剂和/或防腐剂。

本发明脂质体组合物可通过常规方法制备，这些方法选自薄膜法、反相蒸发法、注入法、复乳法、熔融法、冷冻干燥法、离心法、钙融合法、硫酸铵梯度法、加压挤出法、前体脂质体法、气雾剂法和透析法。具体操作参见“药物新剂型与新技术”，115-120 页（人民卫生出版社），在此引入作为参考。在各制备方法中，都先将降钙素溶解在水相中。其中脂质体的有效粒径在 200nm 以下。

本发明组合物可根据任何常规方法，用可药用的添加剂和辅料配制成各种制剂，例如滴鼻剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、软膏剂和注射剂。

本发明组合物可用于制备治疗骨质疏松症、变形性关节炎、高血钙及高血钙危象、神经性营养不良、急性胰腺炎疾病、甲状旁腺机能亢进、骨骼愈合、骨痛和白内障及与血钙异常有关的疾病的药物。因此，可根据给药途径的不同，选择加入其它的辅料和添加剂。

本发明组合物用于制备治疗上述疾病的药物可通过以下途径给药：鼻粘膜、口腔粘膜、阴道粘膜、子宫粘膜、肺粘膜、肠粘膜、眼部和皮肤及注射。优选通过鼻粘膜和/或口腔粘膜给药。

为了达到本发明的目的，本发明进行了局部刺激性试验、降血钙效应评价和经大鼠鼻腔施用本发明组合物的药物动力学试验。

**附图说明** 参考附图 1 和 2，通过本发明的以下描述，本发明的上述及其它目的和特征将是显而易见的。附图 1 显示了降钙素水溶液皮下注射和鼻粘膜给药及本发明的降钙素脂质体组合物经鼻粘膜给药的降血钙效应。附图 2 显示了本发明的降钙素脂质体组合物经鼻粘膜给药及降钙素水溶液静脉注射给药的生物利用度。

如上所述，本发明的组合物使降钙素经粘膜和皮肤给药的生物利用度显著提高。

以下实施例用于进一步详细说明本发明，但绝对不是对本发明范围的限制。

#### 具体实施方式

##### 实施例 1：滴鼻剂的制备

将天然大豆磷脂 525.0mg、胆固醇 175.0mg、十八胺 27.0mg、Brij35 166.0mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中，加入 200ml 氯仿-甲醇（1:1v/v）混合溶剂使其溶解，旋转蒸发去除有机溶剂，在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 10ml 30  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液（pH7.0）水化旋转洗膜，再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着，在所得组合物中加入苯扎氯铵，混合均匀，再将降钙素脂质体组合物分装在滴瓶中。

### 实施例 2：滴鼻剂的制备

将天然大豆磷脂 90.0mg、十八胺 10.8mg、Cremophor EL 4.8mg 及适量的维生素 E 共溶于 20ml 乙醚中,将此乙醚溶液匀速缓慢地滴入 2ml 含有 700  $\mu$ g/ml 降钙素的磷酸盐缓冲溶液 (pH7.0) 中(30°C-35°C),边滴加边搅拌,加完后继续搅拌 2 小时,再涡旋振荡得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着,在所得组合物中加入苯扎氯铵,混合均匀,再将降钙素脂质体组合物分装在滴瓶中。

### 实施例 3：滴鼻剂的制备

将天然大豆磷脂 37.5mg、胆固醇 17.7mg、聚乙二醇一二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 0.38mg、十八胺 2.7mg、Tween-80 8.3mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中,加入 20ml 氯仿使其溶解,再加入含 25  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲溶液(pH7.0),旋涡震荡,25°C 浴式超声成乳,室温减压旋转蒸发去除有机溶剂,成胶态后再减压蒸发得均匀混悬液,经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着,在所得组合物中加入苯扎氯铵,混合均匀,再将降钙素脂质体组合物分装在滴瓶中。

### 实施例 4：喷雾剂的制备

将天然卵磷脂 525.0mg、胆固醇 77.0mg、3 $\beta$ -[N-(N',N'-二甲氨基乙基)羧基]胆固醇 54.0mg、胆酸钠 64.0mg 分散在等渗的磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中,间歇超声 5min,加适量的甘露醇混匀,以 7°C /min 的冻干速率快速冷冻至-30°C。冻干后将其分散在含适量维生素 C 的 10 ml 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液 (pH7.0) 中,涡旋振荡得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着,在所得组合物中加入苯扎氯铵,混合均匀,在将降钙素脂质体组合物分装在喷雾剂喷瓶中。

### 实施例 5：气雾剂的制备

将天然大豆磷脂 105.0mg、胆固醇 30.8mg、3 $\beta$ -[N-(N',N'-二甲氨基乙基)羧基]胆固醇 1.3mg、Myrj59 40.0mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中,加入 15ml 氯

仿一甲醇 (1:1v/v) 混合溶剂使其溶解, 于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂, 在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 2 ml 30  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液 (pH7.0) 水化旋转洗膜, 再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着, 将所得降钙素脂质体组合物分装在气雾剂耐压容器中, 加上阀门, 紧密封闭后, 向容器中灌入抛射剂 (F<sub>1211</sub>) 即得。

#### 实施例 6: 凝胶剂的制备

将天然卵磷脂 450.0mg、胆固醇 154.0mg、二甲基溴铵 27.0mg、Brij35 57.0mg 置茄形瓶中, 加入 200ml 氯仿一甲醇 (1:1v/v) 混合溶剂使其溶解, 于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂, 在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入含适量维生素 C 的 10ml 的 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液 (pH7.0) 水化旋转洗膜, 再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着, 在所得组合物中加入适量的苯扎氯铵和等渗剂, 混合均匀, 再将降钙素脂质体组合物分散在羟丙基甲基纤维素凝胶基质中, 然后分装在滴瓶中。

#### 实施例 7: 凝胶剂的制备

将 1g 山梨醇置茄形瓶中, 将天然大豆磷脂 1050mg、胆固醇 154mg、聚乙二醇一二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 10mg、去氧胆酸钠 30mg 及适量的维生素 E 共溶于 200ml 氯仿一甲醇 (1:1v/v) 混合溶剂中, 将类脂质溶液分次加到茄形瓶中, 于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂, 将制得品置 4°C 真空干燥器中干燥 24 小时, 取出, 过 40 目筛, 即得空白脂质体。然后加入 20 ml 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液 (pH7.0), 涡旋振荡使之分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后, 将其分散在壳聚糖的水溶液中即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着, 在所得组合物中加入适量的苯扎氯铵, 混合均匀, 再将所得的降钙素脂质体组合物分散在卡伯姆和甘油基质中即得凝胶剂。

#### 实施例 8: 霜剂的制备

将天然大豆磷脂 750mg、胆固醇 350mg、十八胺 54mg、甘氨酸钠 130mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中, 加入 400ml 氯仿一甲醇 (1:1v/v) 混合溶剂使其

溶解，于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂，在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 20ml 20  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液（pH7.0）水化旋转洗膜，再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着，将液体石蜡、硬脂酸、十八醇、凡士林加热熔融，在搅拌下缓缓加入三乙醇胺、尼泊金乙酯和十二烷基硫酸钠及本发明组合物，搅拌至冷凝即得。

#### 实施例 9：软膏剂的制备

将天然大豆磷脂 190mg、胆固醇 38mg、十八胺 14mg、Pluronic F68 60mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中，加入 200ml 氯仿-甲醇（1:1v/v）混合溶剂使其溶解，于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂，在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 5ml 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液（pH7.0）水化旋转洗膜，再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

接着，将本发明组合物加苯扎氯铵和羊毛脂研匀，再加入已熔融的凡士林，使之混匀即得软膏剂。

#### 实施例 10：注射剂的制备

将天然大豆磷脂 260mg、胆固醇 77mg、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 3.4mg 及适量的维生素 E 置茄形瓶中，加入 150ml 氯仿-甲醇（1:1v/v）混合溶剂使其溶解，于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂，在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 5ml 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液（pH7.0）水化旋转洗膜，再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。经 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

向所得组合物中加入适量的抑菌剂苯甲醇水溶液，混合均匀，过滤，灌封，辐射灭菌即得。

#### 实施例 11：冻干粉针的制备

将天然大豆磷脂 260mg、胆固醇 77mg、Tween-80 2mg 置茄形瓶中，加入 15ml 氯仿-甲醇（1:1v/v）混合溶剂使其溶解，于 35°C 恒温水浴中旋转蒸发去除有机溶剂，在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后加入 5ml 50  $\mu$ g/ml 的降钙素的磷酸盐缓冲水溶液（pH7.0）水化旋转洗膜，再涡旋振荡使膜分散得脂质体混

悬液。经 0.2  $\mu$  m 微孔滤膜过滤即得均匀分散的降钙素脂质体组合物。

在所得的脂质体组合物中加入适量的甘露醇，混合均匀，冻干，密封，辐射灭菌即得。

### 试验例 1：鼻纤毛毒性试验

采用在体蟾蜍上腭模型法。具体操作如下：将蟾蜍仰卧固定，使口腔张开并固定，于上腭粘膜处滴加受试药液 0.5ml，使完全浸没上腭，接触 30min 后用生理盐水洗净受试药液，用手术剪分离上腭粘膜，取约 3 mm×3 mm 大小，立即用生理盐水洗净血块及杂物，粘膜面向上平铺于载玻片上，于粘膜表面滴加生理盐水，盖上盖玻片，于 40×10 倍的光学显微镜下观察粘膜纤毛的运动情况，随后将载玻片搁置于加有少量蒸馏水饱和的层析缸中，密闭，环境温度为 20~25℃。此后每隔一定时间取出标本，置显微镜下观察，如纤毛继续运动则放回层析缸中，直至纤毛运动停止。记录从给药后至纤毛运动停止所持续的时间。另取蟾蜍如上操作，滴加生理盐水 0.5ml 作为对照。以给药组的纤毛持续运动时间( $t_i$ )除以生理盐水对照组的纤毛持续运动时间( $t_0$ )，得到纤毛持续运动时间的相对百分率，即

$$P = t_i/t_0 \times 100\%$$

百分率越高，表示受试药液对纤毛运动的影响越小，即对纤毛毒性越小。

表 1 表面活性剂溶液和实施例 1-4 脂质体的混悬液的纤毛毒性 ( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

<i>Drugs</i>	<i>T</i>	<i>P (%)</i>
生理盐水	734±99	100.0
0.25% Cremophor EL	521±43	70.9
0.86% 胆酸钠溶液	440±50	59.9
1.0% Brij35 溶液	204±59	27.8
1.0% Tween80 溶液	541±112	73.7
实施例 1	709±50	96.6
实施例 2	706±94	96.2
实施例 3	719±79	98.0
实施例 4	723±88	98.6

各表面活性剂溶液和实施例 1 的组合物蟾蜍上腭给药 30min 后纤毛持续摆

动时间见表 1。

采用在体蟾蜍上腭模型法评价不同表面活性剂和脂质体组合物对鼻粘膜纤毛运动的影响。结果表明脂质体对纤毛运动均无明显影响；不同表面活性剂对纤毛运动有一定的影响，因此脂质体显著降低了表面活性剂对鼻粘膜纤毛的毒性。

### 试验例 2：降血钙效应试验

取体重 250g-300g 的雄性 SD 大鼠，随机 3 分组，每组 5 只。实验前 24hr 禁食，可自由饮水。鲑鱼降钙素的给药剂量为  $5.0 \mu\text{g/kg}$ ，给药途径：①皮下注射 给药方法：大鼠背部皮下注射；②鼻腔给药方法：大鼠仰卧，鼻孔朝上，以滴鼻方式给药。给药前先从大鼠尾部取血作为空白对照，从给药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 小时定时从大鼠尾部取血约 0.5ml，6000rpm 离心 10min，取上清采用 OCPC 比色法测定血清钙离子浓度。测得结果见表 1 和图 1。

表 2 鼻腔给药或皮下注射给药后不同时间点的降血钙百分率 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

时间 (小时)	降钙素水溶液 (鼻腔给药)	实施例 1 (鼻腔给药)	降钙素水溶液 (皮下注射)
0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
0.5	100.2±3.2	93.7±2.4	89.3±2.7
1.0	96.5±2.3	81.6±3.9	80.7±3.8
1.5	93.8±4.2	77.1±3.5	79.1±3.5
2.0	95.1±3.8	72.5±3.0	73.9±2.4
3.0	96.2±2.1	67.2±7.9	70.1±4.5
4.0	98.7±2.1	72.5±7.7	66.0±5.5
5.0	96.3±3.6	74.3±8.7	61.0±6.2
6.0	95.8±4.6	80.9±9.9	58.8±5.7
8.0	99.5±5.4	84.6±6.8	58.7±7.7

表 2 和图 1 的结果表明，降钙素水溶液经鼻粘膜给药仅轻微降低了血清钙离子水平，与降钙素水溶液的皮下注射相比，其药理学的绝对生物利用度为 13.6%。而实施例 1 的组合物经鼻粘膜给药，则显著地降低了血清中钙离子水平，在给药后的前 3 个小时内基本与降钙素水溶液的皮下注射相当，与降钙素水溶液的皮下注射相比，其药理学的绝对生物利用度为 69.4%，是降钙素水溶液的鼻粘膜给药的

5.1 倍，显示了本发明组合物的优越性。

### 试验例 3：药物动力学试验

为考察包含在本发明组合物中的鲑鱼降钙素经鼻粘膜给药的生物利用度，如下对实施例 1 中的本发明制剂经鼻粘膜给药、鲑鱼降钙素水溶液剂经静脉注射，分别进行药物动力学研究，比较鲑鱼降钙素在体内的吸收。用异硫氰基荧光素(FITC) 对鲑鱼降钙素进行标记，用荧光光度方法分析降钙素的含量。

取体重 250g-300g 的雄性 SD 大鼠，随机分 3 组，每组 5 只。试验前 24 小时禁食，可自由饮水。称重后按  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  的 FITC-降钙素给药量给药，给药途径：①静脉注射给药方法：大鼠股静脉注射；②鼻腔给药方法：大鼠仰卧，鼻孔朝上，以滴鼻方式给予实施例 1 中的本发明制剂。给药前先从大鼠尾部取血作为空白对照，从给药后 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 小时定时从大鼠尾部取血约 0.6ml，并分离血清。

各取血清 150 $\mu\text{l}$ ，加入 pH7.0 磷酸盐缓冲液 2.5ml 混合均匀后，进行荧光光度分析。测得结果如表 2 和图 2。

表 3 降钙素水溶液静脉注射和实施例 1 的鼻腔给药的血药浓度值

时间(小时)	降钙素水溶液 静脉注射 C(ng/ml)	实施例 1 鼻腔给药 C(ng/ml)
0	172.651 $\pm$ 33.248	4.561 $\pm$ 0.000
0.25	93.661 $\pm$ 10.410	7.493 $\pm$ 1.472
0.5	73.300 $\pm$ 10.372	9.749 $\pm$ 0.915
1	63.956 $\pm$ 6.237	12.863 $\pm$ 1.618
1.5	61.102 $\pm$ 6.855	14.260 $\pm$ 1.082
2	63.214 $\pm$ 5.089	16.960 $\pm$ 3.071
3	57.219 $\pm$ 12.827	12.885 $\pm$ 1.445
4	47.329 $\pm$ 5.860	11.478 $\pm$ 1.998
6	37.791 $\pm$ 6.293	10.408 $\pm$ 1.636
8	32.133 $\pm$ 7.134	8.976 $\pm$ 1.466

表 3 和图 2 的结果表明，与降钙素水溶液的静脉注射相比，本发明的实施例 1 经鼻粘膜给药，其绝对生物利用度是 28.4%，显然比国外的市售品高出近 10 倍。

虽然已利用上述具体的实施方案对本发明进行了描述，但应认识到，本领域的技术人员还可进行各种的改进和改变，而且它们也应如权利要求书限定的本发明的范围之内。

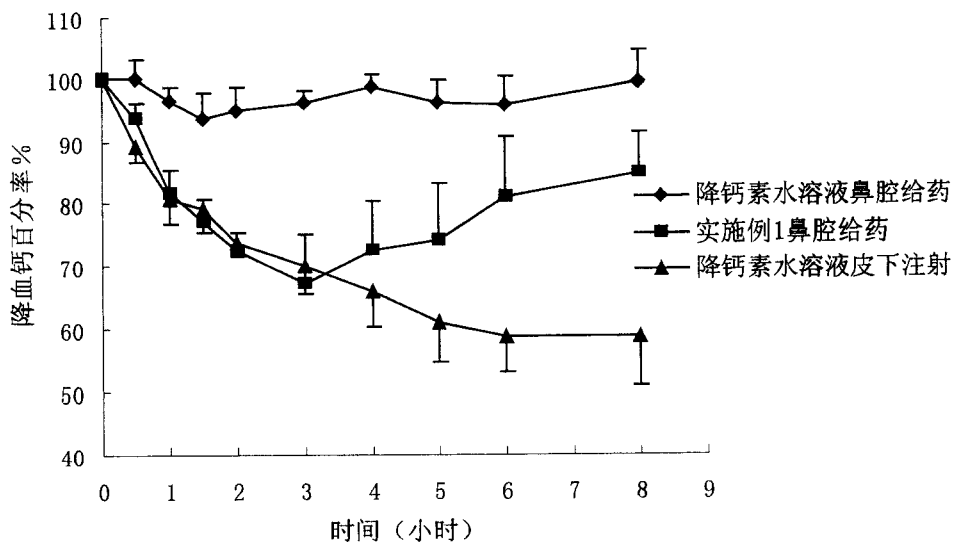


图1. 降血钙百分率与时间的关系曲线

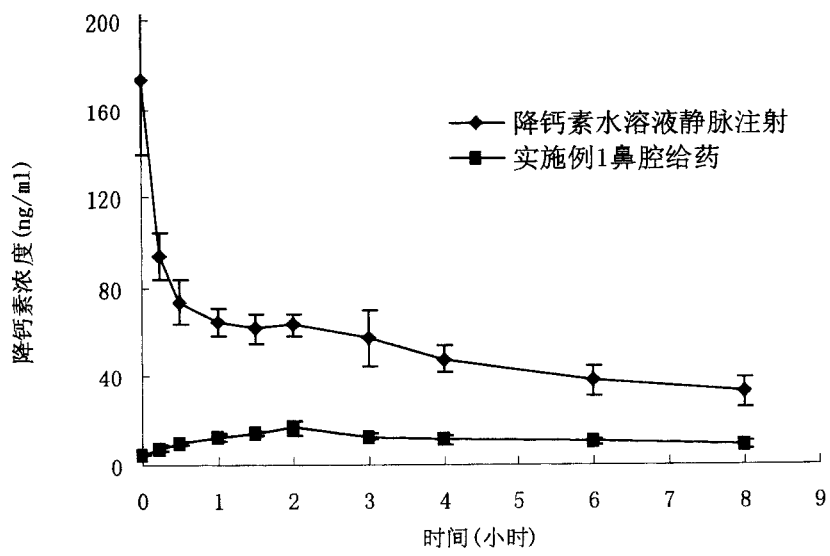


图2 药-时曲线