

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/00

A61K 9/16



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813796.2

[43] 公开日 2003 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 1446077A

[22] 申请日 2001.8.6 [21] 申请号 01813796.2

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 7 [33] US [31] 60/223,144

[32] 2000. 8. 29 [33] US [31] 60/228,634

[32] 2000.10.13 [33] US [31] 60/240,478

[86] 国际申请 PCT/US01/24632 2001.8.6

[87] 国际公布 WO02/11695 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.31

[71] 申请人 耐科塔医药公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 辛西娅·史蒂文森

杰恩·E·哈施泰特

S·鲁斯·莱尔曼 奇志·江

戴维·B·贝内特 戴维·莱西卡

杨 兵

江德强 柯尔斯藤·卡伯特

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 5 页 说明书 47 页

[54] 发明名称 具有最小聚集的可吸入喷雾干燥 4
- 螺旋束蛋白粉剂

[57] 摘要

本发明提供可高度分散的喷雾干燥粉末组合物，特别是成烟雾状输送到肺部的可吸入干粉制剂。本发明的粉剂在两个条件：(1)防止蛋白聚集和(2)提供适于吸入的微粒(也就是显示出优良的烟雾剂性能)下通过喷雾干燥 4 α -螺旋束蛋白而制备。

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

-
1. 喷雾干燥的可吸入 4- α -螺旋束蛋白粉剂，其具有优良的成烟雾性和蛋白质稳定性，其中包括 4- α 螺旋束蛋白，
- 5 其中所述粉剂无表面活性剂，其特征在于，(i)喷射剂量为至少大约 65%，和(ii)总蛋白聚集量少于 10%。
2. 权利要求 1 的粉剂，其中所述 4- α 螺旋束蛋白包括生长激素。
- 10 3. 权利要求 2 的粉剂，其中所述生长激素是人生长激素。
4. 权利要求 3 的粉剂，基本上由人生长激素和缓冲剂组成。
5. 权利要求 4 的粉剂，基本上由人生长激素和磷酸盐缓冲剂组
- 15 成。
6. 权利要求 4 的粉剂，其特征还在于，MMAD 小于大约 3.5 微米。
- 20 7. 权利要求 1 的粉剂，其中还包括起稳定作用的赋形剂，当喷雾干燥中将该赋形剂与所述 4- α 螺旋束蛋白联合使用时，与相应的纯制剂相比，其有效地维持或降低粉剂的聚集水平。
8. 权利要求 7 的粉剂，其中所述赋形剂选自糖、氨基酸和包括 2-5
- 25 个氨基酸的寡聚体。
9. 权利要求 7 的粉剂，其中所述粉剂是快速作用的。
10. 权利要求 7 的粉剂，该粉剂为水溶性的。
- 30

11. 权利要求 8 的粉剂，其中所述赋形剂是糖。
12. 权利要求 11 的粉剂，其中所述糖是蔗糖和棉子糖。
- 5 13. 权利要求 12 的粉剂，其中所述蛋白质是人生长激素。
14. 权利要求 8 的粉剂，其中所述赋形剂是氨基酸。
15. 权利要求 14 的粉剂，其中所述氨基酸选自天冬酰胺、异亮
10 氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、正亮氨酸和缬氨酸。
16. 权利要求 15 的粉剂，其中所述氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和正亮氨酸。
- 15 17. 权利要求 15 的粉剂，其中所述蛋白质是人生长激素。
18. 权利要求 8 的粉剂，其中所述赋形剂是包括 2-5 氨基酸的寡
聚体。
- 20 19. 权利要求 18 的粉剂，其中所述赋形剂是三亮氨酸。
20. 权利要求 19 的粉剂，其中所述蛋白质是人生长激素。
21. 权利要求 20 的粉剂，其特征在于，MMAD 小于 3.0 微米。
- 25 22. 权利要求 7 的粉剂，其中包括小于大约 30 重量%的所述起稳定作用的赋形剂。
23. 权利要求 7 的粉剂，其特征还在于，40℃贮藏 1 个月后总聚
30 集量少于大约 10%。

24. 权利要求 7 的粉剂，其中包括至少大约 50 重量%的 4- α 螺旋束蛋白。

5 25. 喷雾干燥制备可吸入 4- α 螺旋束蛋白粉剂的方法，所述粉剂具有优良的成烟雾性和蛋白质稳定性，所述方法包括：

 (a) 在无表面活性剂存在下将 4- α 螺旋束蛋白溶入含水溶剂形成溶液，和

 (b) 在能够制备具有(i)喷射剂量至少大约 65%和(ii)总蛋白聚集量少于 10%特征粉剂的前提下喷雾干燥所述溶液。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述 4- α 螺旋束蛋白包括生长激素。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述生长激素是人生长激素。

15

28. 权利要求 25 的方法，其中步骤 (a) 形成的溶液的固体含量范围为按重量计大约 0.02 到大约 20%。

29. 权利要求 28 的方法，其中步骤 (a) 形成的溶液的固体含量范围为按重量计大约 0.05 到大约 5%。

20

30. 权利要求 28 的方法，其中步骤 (a) 形成的溶液的固体含量范围为按重量计大约 0.05 到大约 2%。

31. 权利要求 25 的方法，其中步骤 (a) 形成的溶液基本上由 4- α 螺旋束蛋白和缓冲剂组成。

25

32. 权利要求 31 的方法，其中所述缓冲剂是磷酸盐。

33. 权利要求 31 的方法，其中所述蛋白质包括生长激素。

30

34. 权利要求 25 的方法，其中步骤 (b) 制备的粉剂具有小于大约 3.5 微米的 MMAD。

5 35. 权利要求 25 的方法，其中还包括向步骤 (a) 形成的蛋白质溶液添加与相应的纯制剂相比能有效地维持或降低粉剂聚集水平的起稳定作用的赋形剂。

10 36. 权利要求 35 的方法，其中起稳定作用的赋形剂选自糖、氨基酸和包括 2-5 个氨基酸的寡聚体。

37. 权利要求 36 的方法，其中起稳定作用的赋形剂是糖。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述糖是蔗糖和棉子糖。

15

39. 权利要求 38 的方法，其中所述蛋白质是人生长激素。

40 权利要求 36 的方法，其中所述赋形剂是氨基酸。

20

41. 权利要求 40 的方法，其中氨基酸选自天冬酰胺、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、正亮氨酸和缬氨酸。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸和正亮氨酸。

25

43. 权利要求 42 的方法，其中所述蛋白质是人生长激素。

44. 权利要求 36 的方法，其中所述赋形剂是包括 2-5 氨基酸的寡聚体。

30

45. 权利要求 44 的方法，其中所述赋形剂是三亮氨酸。

46. 权利要求 45 的方法，其中所述蛋白质是人生长激素。

5 47. 权利要求 46 的方法，其中步骤 (b) 制备的粉剂是以 MMAD 小于 3.0 微米为特征的。

48. 权利要求 45 的方法，其中步骤 (a) 还包括，将蛋白质溶液 pH 调整至小于大约 4。

10

49. 权利要求 25 的方法，其中溶解在所述含水溶剂中的 4- α 螺旋束蛋白包括在所述溶液中存在的总固体重量的至少大约 50%。

15 50. 权利要求 25 的方法，其中所述条件包括在大约 30-100psi 范围的雾化压力下喷雾干燥所述溶液。

51. 权利要求 50 的方法，其中所述条件包括在大约 30-80psi 范围的雾化压力下喷雾干燥所述溶液。

20 52. 喷雾干燥的可吸入人生长激素粉剂，其具有优良的成烟雾性和蛋白质稳定性，其中包括人生长激素，

其中所述粉剂无表面活性剂，并且其特征在于(i)喷射剂量至少大约 65%，和(ii)总蛋白聚集量少于 10%。

具有最小聚集的可吸入喷雾干燥 4-螺旋束蛋白粉剂

5 本申请要求对下列美国临时专利申请有优先权：专利申请序列号 60/223,144，2000 年 8 月 7 日提出申请；专利申请序列号 60/228,634，2000 年 8 月 29 日提出申请；和 2000 年 10 月 13 日提出申请的专利申请序列号 60/240,487，这些申请的全部内容作为参考而引入本文。

10 发明领域

 本发明涉及可高度分散的喷雾干燥粉末制剂，特别是成烟雾状输送到肺部的可吸入干粉制剂。本发明的粉末在两个条件：(i)防止蛋白聚集，和(ii)提供理想的适合吸入的微粒（也就是，显示优良的烟雾剂性能）下通过喷雾干燥 4 α -螺旋束蛋白制备。

15

发明背景

 传统上，吸入疗法与更传统的给药途径例如口服和静脉注射相比在生物治疗和常规药物给药中扮演相对次要角色。注射仍然是生物治疗（例如，肽、蛋白质和核酸）给药的常规途径，而由于与注射相关的许多缺点（例如，不方便、不舒服、病人对用针给药方法的讨厌），
20 需要可供选择的给药途径。

 肺部给药是一个比用针给药方法有几个优点的可供选择给药途径。这些优点包括病人自我给药方便、可能减少药物的副作用、吸入
25 给药容易、不用针等等。许多蛋白质、肽、DNA 和小分子吸入疗法的临床前和临床研究显示在肺部和全身都有疗效。然而，尽管有这样的效果，但是近几年来吸入疗法在卫生保健领域没有像预期那样得到发展，部分是由于可吸入药物制剂发展特有的一系列问题。特别是，肺部给药的干粉制剂，虽然与不方便的液体剂型和推进剂驱动制剂相比
30 有一些独特的优点，但是易于出现使干粉基吸入疗法效果显著减小的

聚集和低流动性现象。

5 最近几年来，部分地由于受干粉烟雾剂给药的优点和众所周知干粉制备技术（例如，冻干法、风干和共沉淀）的一些不足之处影响，
喷雾干燥已经作为制备微米尺寸肺部给药粉末的方法而采用（Platz, R.
等，国际专利公开号 WO 96/32149）。喷雾干燥采用热气流蒸发液体
给料雾化形成的微分散雾滴以形成干粉。虽然长期以来喷雾干燥在食
品和制药工业已经被用于制备干粉，但是由于担心某些蛋白质在喷雾
干燥过程中被热降解，其用于医疗蛋白受到相当程度的限制。然而，
10 目前越来越多的证据支持喷雾干燥大分子生物制剂以制备适合于吸入
疗法的生物活性粉末的一般用途（Foster, L. 国际专利公开号 WO
98/16205; Platz, R. 国际专利公开号 WO 97/41833; Eljamal, M. 国际专
利公开号 WO 96/32152; Eljamal, M. 国际专利公开号 96/32116; Eljamal,
M. 国际专利公开号 95/24183; Bennett, D. 国际专利公开号
15 01/00312），许多肽和蛋白质，当暴露于喷雾干燥的严厉条件下，易
于形成某种程度的聚集（伸展）。

某些蛋白质，特别是具有属于 4- α -螺旋束超家族（例如，hGH、
INF- γ 、INF- β 、GM-CSF、M-CST、IL-2、IL-4、IL-5）特征的蛋白
20 质非常容易变性、伸展、聚集和沉淀，并失去生物活性。这些蛋白质
在序列和结构（构象）上有很大的相似性，其特征是蛋白质中心部位
折叠成向上、向上、向下、向下、逆平行、左手手性的具有双反手环
拓扑结构的 α -螺旋束。于是，由于它们的不稳定性，喷雾干燥和将这
类蛋白质制备成吸入剂存在一系列独特的挑战。

25

对这类蛋白质的蛋白质伸展有影响的喷雾干燥过程中的几个方面，
例如剪切力、高温、雾滴中蛋白质暴露于液气界面（表面效应）、
液壁相互作用等等，能导致含不适合（或者至少非最佳）吸入尺寸范
围的聚集形式蛋白质程度高的干燥颗粒的产生。关于 4- α -螺旋束蛋白
30 加工处理过程中不稳定性有无数的实例。由于喷气雾化重组复合 α -干

扰素（rConIFN）变得不稳定，导致不溶性非共价聚集快速形成，雾化 25 分钟后只保留了大约 25%的初始单体蛋白（Ip, A. Y.等, *J. Pharm Sci.*, 84(10), 1995: 1210-1214）。在一项喷雾干燥蛋白如 hGH 的可行性考察中，发现 25%的蛋白质在加工处理中被降解，虽然添加 0.1%
5 （w/v）聚山梨醇酯 20 使喷雾干燥中不溶性和可溶性聚集的形成减少大约 70-85%（Mumenthaler, M.等, *Pharm. Research*, 11(1), 1994: 12）。在二价锌离子存在情况下，发现添加聚山梨醇酯 20 进一步抑制喷雾干燥中 hGH 降解（Maa, Y-F.等, *J. Pharm. Sci.*, 87(2), 1998: 152-159）。在一项连续注射白介素-2 的生物活性和物理稳定性研究中，IL-2 与导管的管形材料形成的暂时性表面结合被确定是造成观察到的大多数生物活性降低（降低~90%）的原因（Tzannis, S.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5460（1996））。

4- α -螺旋束蛋白中，生长激素特别不稳定，至今许多方法已经被
15 采用以获得稳定的药物治疗剂。生长激素的降解产物包括脱酰氨基或次硫酸盐产物和二聚体或聚合体形式。具体地，生长激素的占主导地位
的降解反应是(i)直接水解脱去酰氨基或通过环琥珀酰亚胺中间体以形成各种各样数量的 L-asp-hGH、L-iso-asp-hGH、D-asp-hGH 和 D-iso-asp-hGH, 和(ii)蛋氨酸残基位点 14 和 25 的氧化。人生长激素位点
20 14 和 25 也容易氧化。更重要地，人生长激素聚集的形成是不利的，因为其能够导致生物活性降低和免疫原性升高（Becker 等, *Biochem.*, 9:478-487(1987); Leppert, P., Moore, W. V., *J. Clin. Endocrinol.*, 51:691-697(1980)）。

25 因此，蛋白质变性、聚集形成及流动性和分散性差粉末的产生继续困扰制备用于吸入疗法的 4-螺旋束蛋白粉末的进展。而且，至今所采用的许多方法不合要求或不适合吸入疗法粉末制剂，如表面活性剂的使用，其被认为干扰肺部病理和上皮刺激剂，或预喷雾干燥溶液的蛋白质固体浓度增加，其能导致微粒太大以致不能有效地输送到肺部
30 深处。

因此，存在这样一个需要去改善 4-螺旋束蛋白肺部给药可吸入粉末烟雾剂，和具体地，需要烟雾剂特性极好和聚集减少的喷雾干燥粉末。

5

发明概述

本发明基于喷雾干燥 4 α -螺旋束蛋白独特喷雾条件的发现，以提供适于吸入的蛋白粉末制剂，特别是 4 α -螺旋束蛋白粉末制剂，该制剂是(i)在喷雾干燥和贮藏过程中抗蛋白质聚集、(ii)高度分散和(iii)在
10 适合吸入尺寸的范围。所采用起稳定作用的条件和赋形剂有效地为蛋白质掩蔽了喷雾干燥极恶劣条件，以致于这些否则会（也就是，没有这种起稳定作用的条件）造成蛋白质聚集程度很高的操作参数适合和通常最佳形成具有下述性能的微粒：(i)含有少于 10%总蛋白聚集、更优选少于 7%总聚集、甚至更优选少于 5%总聚集，和(ii)具有至少大约
15 65%喷射剂量、更优选至少大约 70%的喷射剂量。本发明喷雾干燥微粒被适当地控制大小以适合吸入疗法，也就是，具有小于 10 微米的 MMAD，优选小于 5 微米，更优选小于 3.5 微米，最优选小于 3 微米。

在本发明的一项优选的实施方式中，4 α -螺旋束蛋白包括人生长
20 激素。

本发明中喷雾干燥制剂，在某些特定实施方式中，与喷雾干燥纯制剂相比，包括有效地维持或降低粉末聚集水平（也就是，不溶性或可溶性聚集水平）的起稳定作用的赋形剂。具体地，起稳定作用的赋
25 形剂包括糖、氨基酸和包括 2 至 5 个氨基酸的寡聚体。

在一实施方式中，起稳定作用的赋形剂是蔗糖或棉子糖。

在另一实施方式中，起稳定作用的赋形剂是亮氨酸、异亮氨酸或
30 正亮氨酸。

然而在另一实施方式中，起稳定作用的赋形剂是三亮氨酸。

5 在本发明中一具体实施方式中，喷雾干燥微粒中稳定剂的量小于或等于大约重量的 30%。

然而在另一具体实施方式中，本发明的喷雾干燥粉末包括至少大约重量 50%的 4 α -螺旋束蛋白例如人生长激素。

10 本发明中喷雾干燥粉末在贮藏过程也是稳定的，这样以致在某些实施方式中，40 $^{\circ}$ C贮藏 1 个月后，保持小于大约 10%的总聚集量。

15 然而在本发明的另一实施方式中，在最佳喷雾干燥条件下喷雾干燥 4 α -螺旋束蛋白，以致于不需要添加稳定剂。使人吃惊地，纯喷雾干燥操作法可有效地产生含蛋白质聚集（可溶性和不溶性）量最少（也就是小于 10%）、良好分散性（大于 65%和优选 70%的喷射剂量）和小空气动力学微粒尺寸（MMAD 小于大约 4 微米）的喷雾干燥微粒。

20 在另一方面，本发明提供的制剂和喷雾干燥条件使诱导 4 α -螺旋束蛋白二级结构变化减到最少，也就是 α -螺旋很大程度上得到保持。特别地，本发明提供的喷雾干燥粉剂通过 FTIR 或圆二色光谱（CD）测量，相对于喷雾干燥前的天然结构， α -螺旋损失不超过大约 50%、优选不超过 40%、更优选不超过 30%和甚至更优选不超过 10-20%。本发明喷雾干燥制剂使用的特别优选的构象稳定剂和溶剂是能使蛋白质 α -螺旋和不受欢迎的 β -折叠保持稳定的那些试剂，包括醇类特别是乙醇。本发明在保持蛋白质 α -螺旋性这个方面的一个实施方式中，预喷雾干燥溶液的固体浓度小于 2mg/ml。

30 结合后附的实施例，根据下列详细描述本发明的这些和其他的目标和性质会变得更明显。

发明的详细描述

I. 定义

本文下列采用的术语有指定的含义。

5

正如本文所用，生长激素可能是来自任何来源如鸟、牛、马、人、绵羊和猪的生长激素，最优选人生长激素。对于蛋白质活性剂，例如，本文所描述的任何 4 α -螺旋束蛋白，就它们保持与标准长度肽/蛋白质相关的治疗活性的合理程度来说，本发明计划使用天然和合成或重组

10 衍生的蛋白质，以及它们的类似物。

10

正如本文所用，术语“类似物”指其中一个或多个氨基酸已经被取代、消除（也就是，片断）、添加（例如，N-或 C-末端延长的衍生物例如 Met-hGH）或另外对天然（野生型）人类序列进行修饰并且显示至少大约 10、20、30 或 40%、优选至少 50%、60%或 70%和更优选至少 80%、90%、95%、100%或超过 100%天然（非-合成）、内源性肽生物活性的蛋白质。

15

20

“氨基酸”指同时含有氨基和羧基的任何化合物。虽然氨基最通常出现在邻近羧基的位置，但是氨基可以位于分子内的任何位置。氨基酸也可以含有另外的官能团，例如，氨基、硫代、羧基、羧酰胺、咪唑等。氨基酸可以是合成的和自然存在的，也可以采用它的外消旋或旋光活性（D-或 L-）形式，包括各种比例的立体异构体形式使用。

25

“亮氨酸”指包括 D-亮氨酸、L-亮氨酸、外消旋亮氨酸和各种比例的这两个对映体。

30

依照本发明，“纯”制剂指含 4 α -螺旋蛋白和任选缓冲物（一般是干粉重量的 0-15%）的喷雾干燥粉末，实质上不含额外赋形剂，也就是额外赋形剂含量小于大约重量 1%。

“肽”是由每一个通过肽键相连少于大约 100 个氨基酸组成。肽可以是均-或杂-肽（也就是，由同一的或不同的如上面定义的氨基酸残基组成），并且其长度变化可以从 2 个氨基酸到大约 100 个氨基酸。

5

“二肽”，本文也指二聚体，指由 2 个通过肽键相连的氨基酸组成的肽。

“三肽”，本文也指三聚体，指由 3 个氨基酸组成的肽。

10

“蛋白质”是由 100 个或更多氨基酸组成的大分子。

“总蛋白聚集”指相对于 100%单体 4 α -螺旋蛋白，可溶性和不溶性蛋白聚集物的百分比，分别用尺寸排阻色谱法和紫外光谱法测定。

15

“聚集水平”指可溶性或不溶性聚集物，除非另有说明。

“表面活性”材料指有表面活性（测量，例如表面张力测量法）、和以具有能减少其所溶入液体的表面张力为特征的材料。与液体和另一相之间界面相关的表面张力是液体的特性，这是由于表层分子有向内的吸引力。

20

“快速作用”干粉指当吸入给药时粉末不具有控释或缓释特性。

25

正如本文所用，“含水溶剂”指水或包括水和一种或多种可与水混溶共溶剂的混合溶剂系统。

“干粉”指一般含有少于大约 10%水分、优选少于 7%水分、更优选含有少于大约 5-6%水分、甚至更优选含有少于大约 3%水分和最

30

优选含有少于 2%水分的粉末制剂，根据粉末制剂中活性剂类型来确定。

5 “适合肺部给药”的“可吸入”干粉指包括能够(i)容易分散于或通过吸入器容易分散，和(ii)受试者吸入后至少部分微粒到达肺部以允许其渗透至肺泡的固体（也就是非溶液）微粒的制剂。这种粉末被认为是“适于呼吸的”或“可吸入的”。

10 “成烟雾状散开的”微粒指当该微粒通过被动或自动吸入器分散入气流时能保持在气流中悬浮一段足够长的时间以使至少部分微粒被病人吸入，从而使吸入微粒的一部分可到达肺部的微粒。

15 “喷射剂量”或“ED”提供在起动或分散动作发生后来自合适吸入器的药物制剂的输送指标。更具体地，对于干粉制剂，ED 是从单位剂量包装和吸入器管口出来粉剂百分比的测量标准。ED 被定义为吸入器输送剂量与额定剂量（也就是，起动前置入适当吸入器的每单位剂量粉剂的质量）的比例。ED 是一个实验测定的参数，一般使用模拟病人给药的体外仪器测定。为了测定 ED 值，干粉额定剂量，一般以单位剂量形式，放入合适的、随后驱动和分散粉末的干粉吸入器（例如美国专利 No. 5,785,049 描述的那样，转让给吸入治疗系统公司）。所产生的烟雾云被仪器的真空吸入，在这里它被贴近仪器管口的配衡过滤器捕获。到达过滤器的粉末量组成喷射剂量。例如，对于放入吸入器的含 5mg 干粉剂型，如果粉末分散导致如上所描述的配衡过滤器回收 4mg 粉末，于是干粉制剂的喷射剂量是：4mg（释放剂量）
20 /5mg（额定剂量） $\times 100 = 80\%$ 。对于非-均质粉末，ED 值提供自起动后吸入器药物的输送指标而不是干粉的输送指标，是以药物的量而不是粉末总重量为基础。同样地对于 MDI 剂型，ED 相应于从剂量形式和吸入器管口喷射出药物的百分比。

30 本发明上下文中的“无表面活性剂”指包括少于大约重量 0.1%表

面活性剂的喷雾干燥粉末。

“细粒量”（ $FPD_{<3.3\mu m}$ ）提供了烟雾剂质量的测量标准，并定义为阶式碰撞法在 3.3 微米（ $FPD_{<3.3\mu m}$ ）测定的粉末量。当以 1cfm
5 （28.3L/min）流速操作时，这个参数与安德森撞击器 3 级时的总量相关，并提供体外估算输送给病人 3.3 微米以下的剂量。

“细粒百分率”（ $FPF_{<3.3\mu m}$ ）提供从单位剂量形式（例如，起泡
10 包装）至肺部深处的烟雾化粉末输送效率的测量标准，并且用以每分钟 28.3 升真空操作短排气道安德森阶式撞击取样器的实验方法来检测。FPF 用百分比表示，定义为相对于单位剂量形式中含有的粉末量(毫克)，小于 3.3 微米微粒尺寸的烟雾化粉末的总量(毫克)。

“可分散的”或“可成烟雾状散开的”粉末指 ED 值至少大约 30%、
15 更优选 40-50%、甚至更优选至少大约 50-60%或更大的粉末。具有优良成烟雾状散开性的粉末，其 ED 值至少大约 65%或更大。

“质量中位直径(mass median diameter)”或“MMD”是平均微粒
20 尺寸测量标准，因为本发明的粉剂一般是多分散的（也就是，由一定范围内尺寸的微粒组成）。本文报告的 MMD 值通过离心沉降法检测，虽然许多通常采用的技术（例如，电子显微镜、光散射、激光衍射）也能够用来测量平均微粒尺寸。

“质量中位空气动力学直径(mass median aerodynamic diameter)”
25 或“MMAD”是分散微粒的空气动力学粒径测量标准。根据其沉淀行为，空气动力学直径用于描述成烟雾状散开的粉末，而且是在空气中具有相同沉淀速度的单位密度微球的微粒的直径。空气动力学直径包括微粒形状、密度和微粒的实际尺寸。正如本文所用，MMAD 指用阶式碰撞法测定的成烟雾状散开粉末的空气动力学微粒尺寸分布范围的中点或中值，除非另有说明。
30

“可药用盐”包括，但不限制于，用无机酸制备的盐，例如氯化物、硫酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、溴化物和硝酸盐，或用有机酸制备的盐，例如苹果酸盐、马来酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙基琥珀酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、对甲苯磺酸盐、棕榈酸盐、水杨酸盐和硬脂酸盐，及依托酸盐（*estolate*）、葡庚糖酸盐和乳糖酸盐。同样地，含可药用阳离子包括，但是不限于，锂、钠、钾、钡、钙、铝和铵（包括烷基取代铵）。

10

“可药用赋形剂或载体”指可以任选地包含于本发明制剂中并且被吸入肺部后对受试者特别是对受试者的肺部没有显著的毒副作用的赋形剂。

15

“药理有效量”或“生理有效量”指如本文所描述的微粒状干燥粉末制剂含有的 4- α 螺旋束蛋白量是当这样的制剂被给予肺部时需要在受试者血流中能提供理想的蛋白质水平以产生预期生理应答。精确的剂量依赖许多因素，例如，4- α 螺旋束蛋白、制剂的活性、使用的特定吸入器、粉末的物理特性、拟定病人的使用量（也就是，每天给药量的剂量）、病人的顾虑等等，根据本文提供的信息，本领域技术人员能容易地确定。

20

II. 制剂组分

本发明部分地基于申请者发现喷雾干燥分子特别是蛋白质如 4- α 螺旋束蛋白以制备稳定的、非聚集的适于呼吸应用的干粉的最佳条件。发明者面临的挑战是使影响蛋白质聚集、脱酰胺（降解）和变性的各种因素与那些影响空气动力学微粒尺寸和微粒分散性及贮藏稳定性的因素保持平衡。这些因素经常在相反的方向起作用，以致使蛋白质聚集最小化的条件经常导致微粒具有不适合吸入疗法的特性（例如，大的微粒尺寸、低分散性）。

30

下面描述的是优选的起稳定作用的赋形剂和制剂组分，当结合下面更详细描述的特殊喷雾干燥操作参数使用时，其有效地为蛋白质掩蔽/防护喷雾干燥的苛刻条件，以致这些本来导致蛋白质很大程度上聚集的条件适合，并且通常是形成适于呼吸微粒的最佳条件。不受任何特殊理论的束缚，稳定剂可以通过多种途径起作用，例如，通过降低表面张力、增加扩散、与防止伸展起稳定作用的蛋白质憎水/离子联合、缓冲等。因而，采用这些稳定剂不但使蛋白质聚集最小化，而且提高所得喷雾干燥制剂的烟雾剂性能，并且在一些情况下，在先前不知道的或做不到的可成气雾剂，特别是可成烟雾状散开的 4- α 螺旋束蛋白制剂的情况下提供可成烟雾状散开的制剂。

现在描述本发明中喷雾干燥组合物的组分。

15 A. 4- α 螺旋束蛋白

本发明涉及但不限于蛋白质药用剂，特别是 4 α -螺旋束蛋白。属于这个结构家族的蛋白质包括 G-CSF、生长激素，IFN- γ 、IFN- β 、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5 和 M-CSF。虽然在序列水平上，具有限制性同源，这些生长因子和细胞因子共享 4 个以反手连接环的螺旋拓扑结构（A-D）。更具体地，这些蛋白质在构象结构上共享共同的折叠，以具有上-上-下-下、反向平行、左手手性、带双反手环拓扑结构的 4- α 螺旋束为特征。一个说明性的 4 α -螺旋蛋白，IL-2，在其天然结构中，具有大约 42-63%的 α 螺旋，带有很少或无 β -折叠（Tzannis, S.等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 5460（1996））。本发明的目标之一就是为在喷雾干燥过程中保持蛋白质 α -螺旋二级结构，同时抑制 β -折叠构造，以制备适于呼吸的蛋白质粉末。

本文所描述的方法和制剂特别适合用于生长因子如生长激素，特别是人生长激素。人生长激素（hGH）是由垂体前叶腺以脉冲方式分泌的蛋白质，其对生长的调节来说必不可少。hGH 是由 191 个氨基酸

组成的，分子量大约 22 kDa 以及 pI 接近 5.3 的单链多肽。在整个生命过程中 hGH 刺激骨骼生长，并且对体内营养物、碳水化合物、蛋白质和脂类的正常代谢来说必不可少。其在蛋白质的代谢中扮演重要角色，因为其通过使用脂肪作为更有效的能源而趋向于增加蛋白质合成（合成代谢）和减少蛋白质破坏（分解代谢）。在儿童时期天然 hGH 分泌量很高，在青少年时期达到最高水平，然后在成年期降低到其最低水平。本发明制剂中使用的人生长激素一般通过重组制备（例如，通过大肠杆菌）或来自垂体。

制剂中 4 α -螺旋蛋白的量将是为获得理想结果每单位剂量输送治疗有效量蛋白质的必须量。实际上，根据特殊的药剂、其活性、被治疗疾病的严重程度、病人的种群、剂量要求和期待的治疗效果，这将会有很大的变化。无论何处，制剂一般含有从大约重量的 1%至大约重量 99%的活性蛋白质，典型的是从大约重量的 2%至大约重量 95%的活性蛋白质，更典型的是从大约重量 5%至 85%的 4 α -螺旋束蛋白，并且也取决于制剂中含有的赋形剂/添加剂的相对量。更具体地，喷雾干燥制剂通常含有至少大约为下述百分数的下列活性物质之一：10%、20%、30%、40%、50%或更高重量比的 4 α -螺旋束蛋白。优选地，喷雾干燥粉末含有至少大约 50%，例如大约重量 50-100%的 4 α -螺旋束蛋白如人生长激素。在本发明的具体实施方式中，喷雾干燥粉末包括至少大约重量 60%的 4 α -螺旋束蛋白，甚至更优选至少大约重量 70%的 4 α -螺旋束蛋白（例如，大约 70%-100%活性蛋白），更优选至少大约重量 80%或更多的 4 α -螺旋束蛋白（重量 80-100%的活性蛋白），或者大约重量 90-100%的 4 α -螺旋束蛋白。一般而言，期望微粒有高蛋白质含量。本发明的喷雾干燥制剂对输送剂量从 0.001mg/天至 100mg/天、优选剂量从 0.01mg/天至 75mg/天、更优选剂量从 0.10mg/天至 50mg/天的蛋白质例如 4 α -螺旋束蛋白特别有用。

B. 增强稳定性的赋形剂

在一些实例中，本发明的制剂包括一种或多种起保护作用或稳定

作用的赋形剂。正如上面所讨论的，本发明的一个方面是基于申请人发现，当结合最佳喷雾干燥条件使用时，某些赋形剂或添加剂（例如，氨基酸如亮氨酸，寡聚体如三亮氨酸，糖如蔗糖、甘露醇和棉子糖，和盐类如氯化钠、氯化钾等等）不但在使蛋白质聚集最小化方面，而且
5 而且在减小所得粉末制剂空气动力学尺寸和增加所得粉末制剂分散性方面是优异的，正如使用示范蛋白质、人生长激素（hGH）的实施例所显示的那样。而且，本发明示范制剂中的几个在延长的储藏中是稳定的，也就是，聚集水平在贮藏时不会有大地增加。

10 稳定剂的实例包括氨基酸，肽，特别是包括 2-9 个氨基酸的寡聚体、更优选 2-5 聚体和多肽，所有这些可以是同种或杂种。作为 4 α -螺旋束蛋白稳定剂使用的氨基酸包括甘氨酸（gly）、丙氨酸（ala）、缬氨酸（val）、正缬氨酸（2-氨基戊酸）、2-氨基庚酸、亮氨酸（leu）、
15 异亮氨酸（ile）、蛋氨酸（met）、脯氨酸（pro）、苯丙氨酸（phe）、色氨酸（trp）、丝氨酸（ser）、苏氨酸（thr）、半胱氨酸（cys）、酪氨酸（tyr）、天冬酰胺（asp）、谷氨酸（glu）、赖氨酸（lys）、精氨酸（arg）、组氨酸（his）、正亮氨酸（nor）及其修饰的形式。优选的氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、2-氨基庚酸、苯丙氨酸和色氨酸。特别优选起稳定作用的氨基酸/赋形剂是亮氨酸、异亮氨酸和正亮氨酸。
20

在考虑到优选氨基酸稳定剂的特征，优选那些水中溶解性相对低氨基酸，例如，从大约 10mg/ml 至 75mg/ml。不受任何理论的束缚，降低的水溶性导致减少所得喷雾干燥粉末的水分吸附和延迟析晶，对于本发明中适合呼吸的粉末而言，这两个都是理想的特征（例如，在这点上，亮氨酸比组氨酸优选，组氨酸比丙氨酸优选，丙氨酸比甘氨酸优选）。也优选具有稍大范德瓦尔斯体积例如大于大约 100 \AA^3 的氨基酸，例如，异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸和苯丙氨酸。增大范德瓦尔斯体积往往是与所得喷雾干燥药粉 Tg 提高相关，因而预示
25 更大贮藏稳定性。同样优先疏水性氨基酸，如亮氨酸（leu）、缬氨酸
30

(val)、异亮氨酸 (isoleu)、色氨酸 (try)、丙氨酸 (ala)、蛋氨酸 (met)、苯丙氨酸 (phe)、酪氨酸 (tyr)、组氨酸 (his) 和脯氨酸 (pro)。优选氨基酸稳定剂的另一个因素是降低水表面张力的能力，其与所得喷雾干燥微粒的更低 MMD 和减少的蛋白质聚集相关；有效降低水表面张力的表面活性氨基酸包括天冬酰胺、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、亮氨酸和缬氨酸。同时优选玻璃态转变温度大于 40°C、更优选大于 50°C、甚至更优选大于 60°C、最优选 70°C 或更高的氨基酸。喷雾干燥粉末中包含这些氨基酸通常可以改善烟雾剂性能，特别是 MMAD 和 ED，大约为 10-25%。一种特别优选的氨基酸是亮氨酸，由于其表面活性，其往往富集在喷雾干燥微粒的表面，也就是，亮氨酸在喷雾干燥蛋白微粒表面的浓度通常比其在粉末本体的浓度要高。其他能够在喷雾干燥蛋白微粒表面富集的表面活性氨基酸包括天冬酰胺、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、正亮氨酸和缬氨酸。这代表本发明中稳定剂的另一个优选性质-在喷雾干燥过程中保护或遮掩药剂例如 4 α -螺旋蛋白的倾向。在这个特定的实施方案中，药剂被稳定剂分子在雾滴表面屏蔽以防御喷雾干燥的恶劣条件。在这种情况下，稳定剂不是封装剂，也不形成离散的涂层，而只是简单地以较大浓度形式积聚在喷雾干燥过程雾滴的表面，产生具有稳定剂浓度提高表面的微粒。

20

同样，优选作为稳定剂使用的是含有 2 个和多个亮氨酰残基的二肽和三肽，如吸入治疗系统公司的国际专利公布 WO 01/32144 所描述，其全文作为参考而引入本文。这类稳定剂的代表是二亮氨酸和三亮氨酸。含二-亮氨酰的三聚体含有 2 个相邻的亮氨酰残基(在位点 1 和 2)，或者他们能够形成三聚体的末端(占据位点 1 和 3)。三聚体含有的其余氨基酸可以是上面章节 I 所定义的任何氨基酸。合适的氨基酸例如甘氨酸 (gly)、丙氨酸 (ala)、缬氨酸 (val)、亮氨酸 (leu)、异亮氨酸 (ile)、蛋氨酸 (met)、脯氨酸 (pro)、苯丙氨酸 (phe)、色氨酸 (trp)、丝氨酸 (ser)、苏氨酸 (thr)、半胱氨酸 (cys)、酪氨酸 (tyr)、天冬酰胺 (asp)、谷氨酸 (glu)、赖氨酸 (lys)、

30

精氨酸 (arg)、组氨酸 (his)、正亮氨酸 (nor) 及其修饰的形式。
优选地, 对于含有二-亮氨酰的三聚体, 三聚体的第三个氨基酸成分是
下列之一: 亮氨酸 (leu)、缬氨酸 (val)、异亮氨酸 (isoleu)、色
氨酸 (try)、丙氨酸 (ala)、蛋氨酸 (met)、苯丙氨酸 (phe)、酪
氨酸 (tyr)、组氨酸 (his) 和脯氨酸 (pro)。本发明采用的三聚体的
实例包括但是不限于下列: leu-leu-gly, leu-leu-ala, leu-leu-val, leu-
leu-leu, leu-leu-ile, leu-leu-met, leu-leu-pro, leu-leu-phe, leu-leu-trp, leu-
leu-ser, leu-leu-thr, leu-leu-cys, leu-leu-tyr, leu-leu-asp, leu-leu-glu, leu-
leu-lys, leu-leu-arg, leu-leu-his, leu-leu-nor, leu-gly-leu, leu-ala-leu, leu-
val-leu, leu-ile-leu, leu-met-leu, leu-pro-leu, leu-phe-leu, leu-trp-leu, leu-
ser-leu, leu-thr-leu, leu-cys-leu, leu-try-leu, leu-asp-leu, leu-glu-leu, leu-
lys-leu, leu-arg-leu, leu-his-leu, 和 leu-nor-leu。

由以上描述氨基酸任何组合组成的二聚体和三聚体也适合在本发
明使用。最优选含有至少下列氨基酸中的两个的二聚体和三聚体: 亮
氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。

虽然由于它们在水中有限的溶解性而成为非优选, 本发明另外采
用的稳定性和成烟雾状散开性能增强肽是含有如上所述氨基酸的任何
组合的 4-聚体和 5-聚体。更优选地, 4-聚体或 5-聚体将包括 2 个或多
个亮氨酸残基。这些亮氨酸残基可以出现在肽内的任何位点, 而其余
(也就是非-亮氨酰) 氨基酸的位点被如上所述任何氨基酸占据, 条件
是所得 4-聚体或 5-聚体在水中溶解度至少大约是 1mg/ml。优选地, 4-
聚体或 5-聚体中非-亮氨酰氨基酸是亲水性氨基酸例如赖氨酸, 因此增
加了肽在水中的溶解度。

也优选其玻璃态转变温度大于 40°C、更优选大于 50°C、甚至更
优选大于 60°C、最优选 70°C 的二肽和三肽。

聚氨基酸, 特别是包括本文所述任何氨基酸的那些, 也适合作为

稳定剂使用。优选聚氨基酸如聚-赖氨酸、聚-谷氨酸和聚（lys、ala）。

5 在喷雾干燥中为保护蛋白质方面同样适合使用的是糖类赋形剂，糖类（例如，糖、衍生糖例如糖醇、醛糖酸、酯化糖和糖多聚体），特别是蔗糖。适合本发明使用的糖类赋形剂，例如，单糖如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等；二糖如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等；多糖如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等等；和糖醇如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇（葡糖醇）、吡喃糖基山梨糖醇、肌醇等等。优选非还原糖、在喷雾干燥固体中能与蛋白质一起形成无定形或玻璃相的糖，和具有相对高 Tg 的糖（例如，Tg 大于 40°C，优选大于 50°C，更优选大于 60°C，甚至更优选大于 70°C，最优选大于 80°C 和更高）。特别优选的起稳定作用的赋形剂是蔗糖、甘露糖和海藻糖，从实施例也能看出。

15

在喷雾干燥中有利的 4 α -螺旋蛋白是电解液，优选强电解液。在申请者进行的初步研究中，发现向含 4 α -螺旋蛋白液体制剂掺入调节溶液离子强度的电解液（例如，许多可药用无机盐中任何一种，例如氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾等等），也有效地“屏蔽”喷雾干燥中的蛋白质。不受任何理论的束缚，假定由于溶液中电解质浓度的增加，在喷雾干燥过程，离子趋向于在雾滴表面富集，因此，在喷雾干燥过程，可以保护或屏蔽雾滴中心的活性蛋白质。

20

本制剂和方法中有用的另外赋形剂和添加剂在吸入治疗系统公司的国际专利公布 No. WO 96/32096 和《药用赋形剂手册》（“Handbook of Pharmaceutical Excipients”）第三版，Kibbe, A. H. 主编（2000）中提供。优选玻璃态转变温度（Tg）高于大约 35°C、优选高于大约 40°C、更优选高于 45°C 和最优选高于大约 55°C 的赋形剂。

25

30 蛋白质赋形剂的实例包括白蛋白如人血清白蛋白（HSA）、重组

人类白蛋白（rHA）、凝胶、酪蛋白、血红蛋白等等。本发明的制剂也包括缓冲剂或 pH 调节剂，通常但不是必需为用有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的有机酸盐。其他合适的缓冲剂包括三羟甲基氨基甲烷（Tris）、氨基丁三醇盐酸化物、硼酸盐、磷酸甘油和磷酸盐。氨基酸如甘氨酸也是合适的。

本发明的喷雾干燥制剂通常被认为是快速作用，也就是当吸入给药时，它们不显示控释或缓释特征。一般而言，本发明的制剂是非微球和非脂质体，并且其微粒趋向于非中空。而且，本发明的喷雾干燥的人生长激素微粒不含表面活性剂，在模型蛋白，乳酸脱氢酶中表面活性剂对喷雾干燥产品的贮藏稳定性产生不利影响（Adler, M.; Lee, G., J. Pharm Sci: Feb 88(2): 199-208(1999)）。令人惊讶地，申请人已经在没有表面活性剂存在情况下制备出人生长激素非聚集喷雾干燥粉剂，而以往的研究显示表面活性剂对于防止喷雾中蛋白质的聚集是必不可少的（Maa, Y-F.等，J. Pharm Sci., 87(2): 152-159(1998)）。

本发明的制剂可以还包括矫臭剂、气味掩饰剂、无机盐（例如氯化钠）、抗菌剂（氯化苯甲烃铵）、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（例如聚山梨醇酯如“吐温 20”和“吐温 80”和普流罗尼（pluronic）如 F68 和 F88，购自 BASF，虽然其浓度低于大约重量的 0.1%）、山梨聚糖酯、脂质体（例如，磷脂如卵磷脂和其他卵磷脂、磷脂酰乙醇胺，虽然不优选脂质形式）、脂肪酸和脂肪酯、类固醇（例如胆固醇）和螯合剂（例如 EDTA、锌和其他这类合适的阳离子）。当使用 4 α -螺旋蛋白粉时，普流罗尼通常的百分率低于大约重量的 1%，更优选百分率低于大约重量的 0.1%。本发明优选的赋形剂组合包括 pluronic 如 F68 和三亮氨酸。本发明的制剂和方法所采用优选的阳离子包括铝、锰、锌和镁。当存在时，这些阳离子通常以从大约 50:1 阳离子（mol）/蛋白质（mol）至大约 1:1、更优选在大约 20:1 和 2:1 之间变化的相对摩尔量存在。特别优选含有阳离子与蛋白质的摩尔比

为大约 2:1、7:1、10:1、15:1、和 20:1 的制剂。这些比率中特别优选的是阳离子、锌，虽然在即使与缺乏锌或其他二价阳离子条件下也可获得无显著水平可溶性聚集物的喷雾干燥制剂。优选地，该制剂缺乏渗透增强剂，或如果有，这些增强剂通常以小剂量形式出现，例如，
5 少于大约干燥固体重量的 10%左右，更优选少于大约 5%。其他适合本发明制剂使用的药用赋形剂和/或添加剂列于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”，第 19 版，Williams & Williams, (1995)，和“Physician’s Desk Reference”，第 52 版，Medical Economics, Montvale, NJ(1998)。

10

通常，本发明药剂含有大约重量的 1%至大约 99%稳定剂，优选大约重量 5%-98%稳定剂，更优选大约重量的 15-95%稳定剂。甚至更优选的，喷雾干燥制剂含有大约重量的 0-40%稳定剂，更优选大约重量的 0-30%稳定剂，例如，优选的制剂将含有下列的任何量：1、2、3、
15 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 重量%稳定剂。通常，期望喷雾干燥微粒中蛋白质浓度高，特别是喷雾干燥人生长激素。因此，本发明的稳定剂在喷雾干燥过程中通常非常有效地保护蛋白质，因为它们以少于大约重量（固体）30%的理想浓度存在。通常，稳定剂最佳量通过实验来确定，也就是通过制备含有不同剂量稳定剂（从低到高变化）的制剂，检测所得将喷雾干燥制剂的蛋白质聚集、MMADs 和分散性，然后进一步研究获得最佳烟雾剂性能而对蛋白质聚集和贮藏稳定性无显著副作用的范围。

20

25 III. 制备干粉

本发明干粉制剂通过在使蛋白质聚集度最小化的条件下通过喷雾干燥制备。例如，制剂的喷雾干燥通常按照“Spray Dry Handbook”，第 5 版，K. Masters, John WileySons, Inc., NY, NY(1991)和 Platz, R., 等，国际专利公开号 WO 97/41833(1997) 和 WO 96/32149(1996)的描述进行，这些内容作为参考而引入本文。
30

药剂，优选 4 α -螺旋蛋白如生长激素，通常由水溶液和悬浮液喷雾干燥，根据活性蛋白在所用 pH 范围的溶解性。采用这种方法，4 α -螺旋蛋白首先在水里溶解或悬浮，任选地含有生理可接受的缓冲剂。

5 在一优选的实施方案中，蛋白质（例如，hGH）溶解在水溶液中。含活性剂溶液的 pH 范围通常在大约 3 至 11 之间，更通常在大约 3.5-9，在一些实例中，优选接近中性 pH（5.5-7.8），因为此 pH 有助于粉末在肺部分散后保持生理相容性。因此在蛋白质的 pI、其上或下的 pH 配制溶液。也就是说，液体制剂在大约 3-4、4-5、5-6、6-7、7-8 或 8-9 范围的 pH 被喷雾干燥。正如本文实施例显示，令人惊讶地在低 pH 条件下，也就是，在低于大约 4（3.5-4）pH 条件下，喷雾干燥 hGH 粉末获得了优良烟雾剂性能。然而，当在接近中性 pH（7-8）条件下喷雾干燥时，也获得合适的粉末。在本发明的一项实施方式中，4- α -螺旋蛋白如 hGH 的悬浮液在大约等于其 pI（等电点）的 pH 条件下被

10 喷雾干燥，在 hGH 的情况下，其等电点是 5.3。在本发明一个特别优选的实施方式中，在 pH5.3 时包括三亮氨酸溶液和悬浮的 4 α -螺旋蛋白，hGH 的悬浮液被喷雾干燥。

水性制剂可任选地含有另外可与水混溶的溶剂，如丙酮、醇类等等。代表性的醇类是低级醇，例如甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇等等。这些混合溶剂系统通常含有大约 0-80%与水易混溶的溶剂，更优选大约 20-40%，最优选大约 10-30%与水易混溶的溶剂。喷雾干燥溶液一般含有 0.01%（重量/体积）至大约 20%（重量/体积），通常 0.05%至 10%（重量/体积，例如，mg/ml），优选大约 0.1 至 2%（重量/体积，

25 也就是说，1-20mg/ml）浓度的溶解固体。具体地，喷雾干燥前制剂通常具有下列固体浓度之一：0.1 mg/ml 或更大，0.5mg/ml 或更大，1mg/ml 或更大，1.5mg/ml 或更大，2mg/ml 或更大，3mg/ml 或更大，4mg/ml 或更大，或 5mg/ml 或更大。优选固体浓度为大约 10-15mg/ml。在本发明的一项实施方式中，蛋白质在固体浓度为 0.1 mg/ml 时被喷雾干燥，其有效地提供蛋白质天然构象得到保持的喷雾干燥固体。因

30

此本发明优选的实施方式是在喷雾干燥过程采用最佳固体浓度，任选地使用 1 个或多个稳定剂，以提供具有最小蛋白质聚集和优良烟雾剂特性的适于呼吸的粉末。

5 同样，当在维持蛋白质 α 螺旋性（如上所述）的固体浓度操作时，优选在优选蛋白质浓度范围的高端（也就是，较高的固体含量）喷雾干燥，因为更高的蛋白质浓度相当于雾滴中蛋白质含量高，其将减少雾滴表面上由于与气-水界面接触而变性的蛋白质相对百分率。因此，如果假设只有一部分蛋白质分子位于雾滴表面，并且只有这些分子易于（或至少最易于）变性，于是其余处于非表面的蛋白质分子代表“受保护的

10 的有效载荷”。

 然后，在常规的喷雾干燥器，例如购自供应商如 Niro A/S（Denmark）、Buchi（Switzerland）等等的那些，将溶液喷雾干燥获得分散的干粉。喷雾干燥溶液的最佳条件根据制剂组分变化，并且通常由实验来确定。用于喷雾干燥物质的气体通常是空气，虽然惰性气体例如氮或氩也是合适的。而且，用于干燥喷雾物质气体的入口和出口温度是不会引起喷雾物质中活性剂分解的温度。这个温度通常通过实验来确定，虽然通常入口温度从约 50°C 变化至约 200°C，而出口温度从约 30°C 变化至约 150°C。优选参数包括在大约 20-150 psi 范围的雾化压力，优选大约 30-40 至 100psi。通常采用的雾化压力为下列之一（psi）：20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 或更高。喷雾干燥粉末在物理性质上与其他蒸发干燥方法制备的粉末截然不同，通常显示在与通过其他干燥方法如冻干法制备的粉末不同的形态和热史（包括玻璃态转变温度、玻璃态转变宽度和焓弛豫曲线）。

15

20

25

 一旦被制备，在制备、加工和贮藏过程中 4 α -螺旋蛋白干粉制剂优选在干燥（也就是说相对低的湿度）条件下进行。不考虑采用的特定的干燥参数，喷雾干燥操作优选获得可吸入的、非-蛋白质聚集的、包括活性 4 α -螺旋束蛋白，优选人生长激素的高度分散微粒。

30

V. 干粉制剂特征

本发明的粉剂还具有几个性质的特征，最值得注意的是：(i)即使在贮藏阶段也能保持始终如一的高度分散性，(ii)小空气动力学微粒尺寸 (MMADs)，(iii)改善的细粒剂量值，也就是，有尺寸小于 3.3 微米 MMAD 微粒更高百分率的粉剂，所有这些有助于改善蛋白质如 hGH 进行全身治疗时粉末渗透入下呼吸道（也就是肺泡）组织的能力。本发明喷雾干燥粉剂的这些物理性质，下面将更充分地描述，将这些粉末喷雾输送至肺部深处的效率最大化是重要的。

10

本发明的干粉剂由能有效渗透入肺部的可雾化微粒组成。本发明微粒的质量中位直径小于大约 20 μm ，优选小于大约 10 μm ，更优选小于 7.5 μm ，最优选小于大约 4 μm ，甚至更优选小于大约 3.5 μm ，通常在 0.1 μm 至 5 μm 直径范围。优选由大约 0.2 至 4.0 μm MMD 微粒组成的粉剂。在某种条件下，粉剂也包括非适于呼吸的载体微粒如乳糖，这里非适于呼吸的微粒尺寸通常大于 40 微米。

15

本发明粉剂还具有烟雾剂微粒尺寸分布小于大约 10 μm 质量中位空气动力学直径 (MMAD) 的特征，优选 MMAD 小于大约 5 μm ，更优选小于大约 4.0 μm ，甚至更优选小于大约 3.5 μm ，最优选小于大约 3 μm 。粉剂的特征在于质量中位空气动力学直径范围是大约 0.1-10 μm ，优选大约 0.2-5.0 μm MMAD，更优选大约 1.0-4.0 μm MMAD，甚至更优选大约 1.5 至 3.0 μm 。示范性喷雾干燥 hGH 粉末的例证性 MMAD 值在实施例中提供。这些实施例中有几个证明了通过最佳喷雾干燥条件和选择及稳定剂浓度联合使用而获得烟雾剂微粒尺寸分布的改善。

20

25

本发明粉剂还具有它们的密度特征。该粉剂一般具有大约 0.1 至 10 g/立方厘米的堆集密度，优选大约 0.1-2 g/立方厘米，更优选大约 0.15-1.5 g/立方厘米。

30

该粉剂一般含水量低于大约重量的 20%，通常低于大约重量的 10%，优选低于大约重量 6%。更优选地，喷雾干燥粉末通常残余含水量低于大约 3%，更优选低于大约 2%，最优选在大约重量的 0.5 和 2% 之间。如此低含水量的固体倾向于更大的封装和贮藏稳定性。通常，
5 本发明的粉末是吸湿的，也就是，如果不贮藏在密封容器如起泡包装，它们具有从空气吸收水分的趋势。

本发明制剂的最显著特征之一是它们的高度分散性，如 ED 值所显示。本文描述的喷雾干燥方法和稳定剂有效地提供比它们的非最佳相似物有更显著改善分散性的制剂。通常，这些粉剂的喷射剂量 (ED)
10 大于 30%，一般大于 40%，更优选地，本发明粉剂的 ED 大于 50%，经常大于 55%。实际上，看看实施例，本发明的喷雾干燥粉末通常具有超过 65%的最佳 ED 值，通常在大约 70-90%或更大的范围。

另外用于描述干粉总烟雾剂性能特征的测量标准是描述空气动力学直径小于 3.3 微米粉末百分率的细粒百分率 (FPF)。本发明粉剂特别
15 适合肺部给药，其 FPF 值在大约 30%-64%或更多的范围。优选含有至少大约 30%、微粒尺寸低于 3.3 μm 至大约 0.5 μm 烟雾微粒的粉剂，并且当以烟雾剂形式给药时，其非常有效地到达肺部的各部分，包括
20 肺泡。

关于化学稳定性和物理稳定性，本文描述的制剂都具有良好的稳定性，也就是，随着时间的过去烟雾剂性能不变。通常，关于化学稳定性，制剂中含有的 4 α -螺旋束蛋白在喷雾干燥中降解不会多于大约
25 10%。这就是说，粉剂具有至少大约 90%完好的活性蛋白质，优选至少大约 95%完好的活性蛋白质，甚至更优选含有至少大约 97%或更多完好的活性蛋白质。优选地，喷雾干燥操作产生具有少于大约 10%的总蛋白聚集、优选少于大约 7%总聚集、最优选少于 5-6%总聚集的粉剂。更具体地，喷雾干燥粉末通常有少于大约 10%不溶性聚集物，
30 优选少于大约 7%不溶性聚集物，更优选含有少于大约 5%不溶性聚集物。

关于可溶性聚集物，喷雾干燥粉末通常含有少于 7%可溶性聚集物，优选少于 6%可溶性聚集物，更优选少于 5%可溶性聚集物，最优选少于 4%、3%、2%或 1%可溶性聚集物。喷雾干燥微粒中单体总含量通常大于 90%，更优选大于下列之一：91%、92%、93%、94%或 95%。

5 而且，本发明制剂进一步显示良好贮藏稳定性，其特征是在 40℃和环境相对湿度条件下贮藏 1 个月后总蛋白聚集量少于大约 10%。换句话说，许多本发明示范生长激素制剂的总聚集含量在 40℃贮藏 1 个月实质上保持不变，因而说明本发明获得了可吸入生长激素制剂在喷雾干燥和贮藏中的化学和物理稳定性的最佳平衡。

10

关于烟雾剂性能，本发明制剂的特征在于在环境条件下贮藏 3 个月时喷射剂量减少不超过大约 20%、优选不超过大约 15%、更优选不超过 10%。

15

本发明制剂对烟雾剂性能的改善和最小蛋白聚集能够产生几个相关优势，例如：(i)减少贵重药物在吸入器中的损失，因为更多的粉末被雾化，所以使用者能够吸入更多；(ii)减少每单位剂量所需干粉的量，因为粉末雾化的高效率，(iii)减少每天吸入的次数，通过增加到达使用者肺部雾化药量。

20

VI. 制剂给药

本文描述的制剂可以通过任何合适的干粉吸入器 (DPI) 给药，也就是，利用病人的吸入呼吸作为传输手段将药物干粉输送至肺部的吸入器装置。优选如 Patton, J.S.等, 美国专利 No. 5,458,135(1995), Smith, A.E., 等, 美国专利 No. 5,740,794(1998); 和 Smith, A.E.等, 美国专利 No. 5,785,049(1998), Schuler, C.等, 国际专利公开号 WO 01/00263 所描述的吸入治疗系统干粉吸入装置，作为参考而引入本文。

25

30

当使用这种类型装置给药时，粉末装在一个带有可穿孔盖和其他入口表面的容器，优选起泡包装或药筒，其中容器可容纳单次剂量单

位或多次剂量单位。用可计量的干粉药物剂量填充于大量空腔（也就是，单位剂量包装）的合适方法被描述，例如，在 Parks, D. J.等，WO 97/41031(1997)，作为参考而引入本文。

5 本文描述的同样适合输送粉剂的是在例如 Coccozza, S.等美国专利 No. 3,906,950(1974) 和 Coccozza, S.等美国专利 No. 4,031,075(1997)所描述类型的干粉吸入器，作为参考而引入本文，其中给予使用者的干粉剂量按预定计量包含在硬胶囊。

10 其他肺部干粉给药的干粉分散装置包括下述文献所述：例如 Newll, R.E.等，欧洲专利 No. EP 129985(1988); Hodson, P.D.等，欧洲专利 No. EP 472598(1996); Coccozza, S.等，欧洲专利 No. EP467172(1994)，和 Lloyd, L.J. 等，美国专利 No.5,522,385(1996)，以上作为参考而引入本文。同样适合本发明干粉给药的是例如 Astra-Draco “TURBUHALER”
15 的吸入器。这种类型的装置在 Virtanen, R., U.S. P4,668,281(1987); Wetterlin, K., 等，U.S. P4,667,668(1987); 和 Wetterlin, K., 等，U.S. P4,805,811(1989)有详细的描述，所有这些作为参考而引入本文。其他合适的装置包括例如 Rotahaler® (Glaxo), Discus® (Glaxo), Spiros™ 吸入器(Dura Pharmaceuticals),和 Spinhaler® (Fisons) 的干粉吸入器。同
20 样合适的装置是采用使用活塞提供空气以夹带粉末药物，由穿过筛子的经过空气将药物从推进器筛子喷出，或者在能随后通过装置管口将粉末给予病人的混合室里混合空气和粉末药物，这些如 Mulhauser, P. 等，U.S. P5,388,572(1997)所描述，作为参考而引入本文。

25 干粉也可以使用在药用惰性液体推进物例如含氯氟烃或氟烃中含有药物的溶液或悬浮液的，加压、计量剂量吸入器(MDI)例如 Ventolin® 计量剂量吸入器来输送，如 Laube 等，U.S.P5,320,094(1994)和 Rubsamen, R.M.等，U.S.P5,672,581(1994)所描述，都是作为参考而引入本文。另外，本文描述的粉剂可以溶解或悬浮在例如水、乙醇或盐水等溶剂中，
30 并且通过喷雾给药。用于输送雾化溶液的喷雾器包括 AERx™

(Aradigm), Ultravent®(Mallinkrodt), 和 Acorn II ®(Marquest Medical Products)。

5 使用前, 干粉一般在环境条件下贮藏, 优选在 25°C 或低于 25°C 的温度下贮藏, 并且相对湿度 (RH) 范围在大约 30 至 60%。更优选的相对湿度条件, 例如低于大约 30%, 可以通过将干燥剂放入剂型的二次包装来完成。

VII. 应用

10 本发明的制剂是有用的, 当哺乳动物受试者肺部给予治疗有效量, 以治疗或预防对如上面章节 II.A 所描述的与 4 α -螺旋束蛋白给药相关的任何疾病。

15 具体地, 示范性 4 α -螺旋束蛋白、hGH, 当给予治疗有效量, 对于治疗诸如儿童生长激素缺乏、成人生长激素缺乏、慢性肾功能不全和性功能延迟发育综合症疾病是有用的。

20 本发明下列实施例是说明性的, 并且不能被解释为限制本发明的范围。对于本领域技术人员而言, 根据本文现有的公开、附图和权利要求书, 这些实例的变化和相等物是显而易见的。

本文参考的所有文章、书籍、专利和其他出版物的全文作为参考特此引入。

25 实施例

材料和方法

A. 材料.

Des-phe 人生长激素 (Des-phe hGH), BresaGen Limited, Adelaide, South Australia

30 天然人生长激素, BresaGen Limited, Adelaide, South Australia

甲硫氨酰-人生长激素 (met hGH), BresaGen Limited, Adelaide,
South Australia

L-亮氨酸 (Aldrich, St. Louis, MO)

乙醇, 2000 标准强度 (USP/NF, Spectrum Chemical Mfg. Corp.,
5 New Brunswick, N.J.)

甲醇 (HPLC 级, EM Industries, Gibbstown, N.J)

三亮氨酸 (Bachem California Inc, USA. Torrance, CA)

磷酸钠, 二元, 7-水合结晶: J.T. Baker, 批号: M30150

磷酸钠, 一元, 单水合结晶: J.T. Baker, 批号: M50156

10 蔗糖: J.T. Baker, 批号: N21593

棉子糖, 五水化物: Pfanstiehl, 批号: 25320A

海藻糖, 二水化物: Spectrum, 批号: OF0359

Ile: Sigma, 98%, 批号: 28H00462

Val: Aldrich, 99%, 批号: 08311AU

15 Phe: Aldrich, 99%, 批号: 13022TS

Trp: Aldrich, 99%, 批号: 12729HS

B. 方法.

微粒尺寸测量 (Horiba)

20 粉剂的质量中位直径 (MMD) 用 Horiba CAPA-700 微粒尺寸分析仪 (Horiba Instruments inc., Irvine, CA) 测定。测量是基于悬浮介质中分散微粒的离心沉降。基于微粒 Stokes' 直径的质量中位直径通过微粒密度及悬浮介质密度和粘度来计算。

25 对于所有粉末, 粉末密度设为 1.5g/cm^3 。(这个标称值被用于所有被分析粉末并且在通常喷雾干燥粉末范围内)。微粒尺寸测量通过将大约 5-10mg 粉末悬浮于 5ml Sedisperse A-11 (Micromeritics, Norcross, GA) 并且用超声波分散 10 分钟的方法操作。微粒尺寸数据被收集的范围被设为 0.4 至 $10.0\mu\text{m}$ 。

30

微粒尺寸(VMD):微粒尺寸分布用2bar剪切力操作的 SYMPATEC HELOS 微粒尺寸测定器来测量。与 R2 相对应的焦点距离结合 1DR 型检测器使用。体积平均直径 (VMD) 可从分布获得。

5 化学稳定性: 通过反相 HPLC (RP-HPLC) 测定蛋白质纯度/蛋白质降解程度。

10 含水量: 粉末残存含水量通过使用 Mitsubishi 湿度测量计 model # CA-06 的 Karl Fischer 滴定分析技术测定。含水量也可以通过热重量分析 (TGA) 测定。

15 可溶性聚集物测定: 可溶性聚集物通过使用装有溶剂输送系统、光电二极管阵列检测器、温度控制的自动进样器和数据管理系统的 Waters HPLC 系统的尺寸排阻高压液相色谱法或 SEC 来测定。

20 不溶性聚集物测定: 不溶性聚集物通过使用 Shimadzu UV-2101 PC 双波长分光光度计的紫外光谱 (UV) 来测定。样品被扫描波长范围是 360 至 240nm。通过测定溶液浊度对不溶性聚集物定量(Eckhardt, B.M. 等, Pharm Res., 8(11), 1360-1364(1991))。

20

空气动力学微粒尺寸测定

25 Andersen 阶式撞击取样器 Andersen 阶式撞击取样器 (带有根据微粒尺寸大小通过惯性撞击法捕获板上微粒的一系列平台的类似筛网的装置) 用于测定空气中雾化粉末制剂的 MMAD 和微粒尺寸分布。在测试前和测试后称量该板, 测定每阶的板上沉积的粉末质量。除非另作说明, 使用传统的有 8 阶 (从顶部到底部为 0 至 7 阶) 的 Andersen 阶式撞击取样器进行研究, 当以 28.3L/min 流速操作时, 其具有 9.0 至 0.4 μ m 范围的截留尺寸和捕获 <0.4 μ m 微粒的最终过滤平台。该装置测试的设置与 ED 测试的结构相似, 除了阶式撞击取样器
30 和美国药典 (USP) 入口 (USP 23, 章节 <601>) 接在管口而不是滤

器上。多分散通常对每一阶式撞击行为进行处理以获得重量上精确的数据。

5 Andersen 短排气道 (SS) 方法 在 SS 方法中, 平台放置的顺序跟上面所描述传统 Andersen 阶式撞击取样器的结构相比有所改变。从顶部, 平台 0 用于将入口锥体接在入口。紧接着在平台 0 的下面安置平台 3, 接下去是滤器平台 (平台 F)。含有粉末的气流只穿过平台 0 和 3; 空气 (而不是粉末) 流过其他放在平台 F 下适当位置以收集总体的剩余。预称量的滤器放置在平台 F 上面并且捕获 $<3.3\mu\text{m}$ 微粒。
10 第二个滤器放置在平台 3 下面的反向板层上面并且捕获 $>3.3\mu\text{m}$ 微粒。对于本文所描述的研究, 一个含有 2mg 粉末制剂的 BP (起泡包装) 分散于烟雾剂给药装置, 按照 USP 方法以 28.3L/ml 速率推进形成真空。每次 6mg 目标质量, 重复此操作 2 次。然后, 滤器被移开并称重以测定沉积粉末的量。

15

实施例 1

肺部给药的纯 hGH 制剂

天然全长 hGH (n-Hgh, BresaGen 天然全长, 目录号 hST-3, 批号 H057) 在不加其他物质情况下 (也就是, 没有赋形剂/稳定剂) 被
20 喷雾干燥。所得粉末的物理和化学稳定性及烟雾剂性能在喷雾干燥后和在 3 种不同温度贮藏 1 个月后立即进行评价。

溶液制备 喷雾干燥之前, 用带 YM-10 膜的 Amicon (微孔) 超滤池将蛋白质透析过滤以除去工业制剂中含有的甘露醇和甘氨酸。含
25 hGH (725mg) 和 5mM 硫酸钠的 pH7.8 溶液被制备。该液体制剂每毫升含有 10mg 固体 (也就是说, 1%总固体含量)。总固体的 6.9%是缓冲物, 总固体的 93.1%是[hGH], 或是 9.31mg/ml。

喷雾干燥 用带有改进型旋风器 (Platz, R. 等, 吸入治疗系统公司, 国际专利公开号 WO 97/41833, 1997 年 11 月 13 日)、雾化喷嘴
30

和粉末收集器的 Buchi 190 小型喷雾干燥器 (Buchi Labortechnik AG, Meierseggstrasse, Switzerland) 将纯制剂喷雾干燥。收集率大于 70%；通常收集率在大约 75-95% 范围。

- 5 粉末包装和特征描述 在相对湿度低于 5% 的手套式操作箱里将所得粉末手工填入 5mg 单位剂量包装 (起泡包装, BP)。把 BP 装入有干燥剂的袋中, 并且在 3 个不同温度, 4°C、25°C、40°C 下贮藏 1 个月。然后用上面通常描述的方法评价粉末的物理 (烟雾剂性能) 和化学特性。

10

表 1. 喷雾干燥的纯 hGH 的特征描述

	t=0	t=1 个月, 4°C	t=1 个月, 25°C	t=1 个月, 40°C
ED, %	72	76	74	73
MMAD, μ	3.5	3.8	3.4	3.6
FPF	45%	40%	47%	41%
含水量	1.9%	2.0%	2.0%	2.2%
不溶性聚集物 (UV)	1.4%	1.8%	2.0%	1.8%
可溶性聚集物 (SEC)	5%	2%	4%	6%
蛋白质纯度	97.0%	96.8%	96.0%	94.7%

- 15 以上数据表明, 某些喷雾干燥条件 (固体浓度、雾化压力、pH 等等) 能够用于制备具有高度分散性 (Ed 大于 70%)、良好空气动力学尺寸范围 (MMAD 平均为大约 3.5 微米)、蛋白质降解低 (少于大约 5%) 和 40°C 贮藏时可溶性和不溶性总聚集物少于 8%、在环境条件下贮藏少于大约 6%、低温贮藏时少于大约 4% 的 hGH 干粉。

实施例 2

20 不同操作条件下喷雾干燥纯 hGH

制备不含另外赋形剂/稳定剂的人生长激素水溶液, 并用上面所描述方法在不同操作条件下喷雾干燥以检验对所得粉末特性的影响。

相关操作参数和所得干粉特性的总结在下表 2 提供。IA = 不溶性

聚集物；SA=可溶性聚集物。

表 2 喷雾干燥的纯 hGH

实验号	固体 (%)	雾化压力 (psi)	MMAD (微米)	ED (%)	IA (%)	SA (%)	hGH (类型)
S3-01	1	40	3.5	72	0.7	5.1	天然
S4-03	1	80	3.3	76	0.5	2.5	Met
S5-04	1.1	60	3.8	76	1.1	2.6	Met
S6-01	0.5	60	3.4	83	0.3	5.3	D-Phe
S6-02	1	60	3.8	77	0.1	3.9	D-Phe
S6-03	1	40	4.1	72	0.5	4.1	D-Phe
S6-04	2	40	4.3	72	0.6	3.1	D-Phe
S7-07	1	80	3.3	79	0.1	3.3	Met

- 5 以上数据进一步支持采用本文所描述优选用于制备喷雾干燥中蛋白质聚集最少并且有优良烟雾剂特性（ED 大于 70%，MMAD 平均为大约 3 微米）4 α -螺旋束蛋白粉末的操作参数。

实施例 3

10 含三亮氨酸的适于呼吸的喷雾干燥 hGH 制剂

本研究的目的是确定三亮氨酸对烟雾剂特性和喷雾干燥 Met-hGH 一个月稳定性的影响。

A. 配方

- 15 如下配制五种不同配方的溶液。浓度为 7 mg/ml (70%w/w) 甲硫氨酰-人生长激素分别与浓度为 1.5 和 3 mg/ml 三亮氨酸 (L3) 混合以制备分别含重量 15%和 30%三亮氨酸的粉末。调整这些溶液至 pH3.6 或 7.8。类似地，制备含甲硫氨酰-人生长激素 (10 mg/ml) 和硫酸钠 (5mM) 的 pH7.8 水溶液。所有制剂在总固体含量为 1%情况下被制
- 20 备。

B. 喷雾干燥

上面所描述 hGH 溶液用如上面实施例 1 和 2 所描述的 Buchi 190 实验室规模喷雾干燥器喷雾干燥；采用的雾化压力是 80psi。

5 C. 特征描述

喷雾干燥 Met-hGH 粉末的烟雾剂特性和化学稳定性在下面提供：

表 3. 喷雾干燥的 hGH-三亮氨酸 (L3) 粉末

	15% L3	30% L3	0% L3	15% L3	30% L3
	PH 3.6	PH 3.6	PH 7.8	PH 7.8	PH 7.8
ED	92%	88%	76%	75%	73%
MMAD	2.6	3.1	3.3	3.3	3.1
VMOD	2.3	2.5	1.9	1.7	2.0
FPF	64%	54%	49%	51%	55%
含水量	0.9%	0.9%	1.0%	1.3%	1.3%
不溶性聚集物					
可溶性聚集物	1.0%	1.8%	2.5%	0.4%	0.5%
蛋白质纯度	95.3%	95.8%	95.2%	95.9%	95.7%

10 以上数据显示，当在喷雾干燥代表性的 4 α -螺旋束蛋白如 hGH 时，三亮氨酸是一种有效的稳定剂。而且，喷雾干燥采用的低 pH 条件似乎增强了分散性，特别是与三亮氨酸联合使用时，产生了生长激素分子的协同稳定作用以制备具有最低程度蛋白质降解、优良 ED（平均为大约 90%）和小空气动力学直径（从大约 2.6-3.1 微米）的粉末。

15

实施例 4

含糖适于呼吸的喷雾干燥 hGH 制剂

20 本研究的目的是研究糖作为稳定剂连同 hGH 喷雾干燥制剂的最佳操作参数一起，以获得令人满意烟雾剂特性和良好 hGH 稳定曲线粉末的采用。

在众多的糖中，优选非还原糖、当与干燥固体中蛋白质结合时能够形成非晶相的糖、具有高 T_g 的糖（例如，具有玻璃转化态温度大

于 30℃，优选大于 40℃，更优选大于 50℃，甚至更优选大于 60℃，最优选大于 70℃）。与这些优先选择相一致，本研究采用蔗糖（ $T_g=74^\circ\text{C}$ ）、棉子糖（ $T_g=102^\circ\text{C}$ ）和海藻糖（ $T_g=115^\circ\text{C}$ ）（ T_g 数据源于 A. Saleki-Gerdt, Zograf, G., Pharm Res., 11(8), 1166-1172(1994)）。

5

A. 制剂制备 制备 pH7.8 的 5mM 磷酸钠缓冲溶液。每个 met-hGH 冻干小瓶用 5ml HPLC 水使其成原状。总共使用 18 小瓶。在再制剂之前 hGH 溶液被透析过滤以除去赋形剂。用带 YM-10,000 过滤器的 Amicon（微孔）超过滤池进行透析过滤。采用 pH7.8 的 5mM 磷酸钠缓冲溶液和 4-5℃和气压 37psig 的条件透析过滤蛋白质溶液 11 小时。在透析过滤步骤后，用 UV 光谱在 277 nm 下检测蛋白质浓度，并且用 pH7.8 的 5mM 磷酸钠缓冲溶液将其浓度调整为 12.1 mg/ml。

制备浓度分别为 22.8、22.7 和 22.7mg/ml 的蔗糖、棉子糖和海藻糖储备液。这些储备液用 pH7.8 的 5mM 磷酸钠溶液制备。4 个配方在分别贴有 S5-01（蔗糖）、S5-02（海藻糖）、S5-03（棉子糖）和 S5-04（只有缓冲液）标签的离心管里制备。S5-01：在瓶子放入 40 ml 1.21 mg/ml hGH，再加入 10 ml 蔗糖储备液，pH 调至 7.8。S5-02：在瓶子放入 40 ml 1.21 mg/ml hGH，再加入 10ml 棉子糖储备液。pH 调至 7.8。S5-03：在瓶子放入 34 ml 1.21 mg/ml hGH，向其中加入 8.5ml 海藻糖储备液。pH 调至 7.8。S5-04：在瓶子放入 40 ml 1.21 mg/ml hGH，向其中加入 10ml pH 7.8 的 5mM 磷酸钠缓冲溶液。pH 调至 7.8。制剂总结在下表 4 提供。

25

表 4. 制剂总结

制剂	pH	hGH (mg/ml)	糖		缓冲液 (mM)	总固体%			总固体 (%)
				(mg/ml)		hGH	糖	缓冲液	
S5-01	7.8	9.7	蔗糖	4.55	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S5-02	7.8	9.7	棉子糖	4.55	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S5-03	7.8	9.7	海藻糖	4.55	5	64.9	30.4	4.6	1.5
S5-04	7.8	9.7	纯	0	5	93.4	0.0	6.6	1.0

B. 喷雾干燥：上面所描述的制剂溶液用如上面实施例所描述的 Buchi 190 小型喷雾干燥器喷雾干燥。喷雾干燥在 60psi 雾化压力和 60 °C 出口温度条件下进行。收集粉末，其收率在大约 60-85% 范围变动。

5 C. 稳定性：在相对湿度小于 5% 条件下将粉末转移到手套式操作箱，并且转移到用封口材料（lidstock）加热密封的单位剂量包装（每个起泡包装装入 5.0mg）。每个制剂的起泡包装被置于 40°C 温度的仓库。起泡包装和干燥剂一起密封在铝袋中。在一个月的时间点将样品从 40°C 温度的仓库取出。

10

烟雾剂性能、蛋白质聚集物、蛋白质纯度和残余水分分析结果以列表形式出现在下面。

表 5. 初始和 1 个月时间点的喷射剂量

制剂	种类	pH	初始时间点			1 个月时间点		
			ED%	SD	RSD%	ED%	SD	RSD%
S5-01	30%蔗糖	7.8	75.0	±2.8	3.7	75.9	±3.8	5.1
S5-02	30%棉子糖	7.8	77.4	±3.0	3.8	76.5	±3.1	4.0
S5-03	30%海藻糖	7.8	80.1	±2.2	2.7	76.8	±2.4	3.1
S5-04	纯	7.8	82.9	±3.0	3.6	78.5	±4.3	5.4

15

数据显示所有被测试制剂的 ED 大于 75%。当与纯制剂相比时，用 3 种糖（30%）制备的 hGH 粉末不能提供更高的 ED。关于已装袋粉末 40°C 下 1 个月的贮藏，ED 没有显著改变，虽然观察到海藻糖和纯制剂 ED 有稍微减少。

20

表 6. 初始和 1 个月时间点的 MMAD、FPF

制剂	种类	pH	初始时间点			1 个月时间点		
			MMAD (µm)	FPF (%)	VMD (µm)	MMAD (µm)	FPF (%)	VMD (µm)
S5-01	30%蔗糖	7.8	3.9	36	2.4	3.4	48	2.2
S5-02	30%棉子糖	7.8	3.9	37	2.5	3.9	37	2.3
S5-03	30%海藻糖	7.8	3.8	38	2.5	4.0	35	2.3
S5-04	纯	7.8	3.8	39	2.3	3.9	37	2.2

- 4 个制剂所得粉末有相似 MMAD (3.8-3.9 μm) 值。除蔗糖制剂 (3.4 μm) 外, 观察到其他制剂 MMAD 值 40 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏一个月后保持在相同范围。蔗糖制剂 MMAD 值减少可能由意外的实验误差所造成的, 因为测量的 CIE 值为 115% (超过 100%)。其他制剂的微粒尺寸分布在初始时间点和 1 个月时间点之间非常一致。

表 7. 含水量

制剂	种类	pH	初始时间点	1 个月时间点
			(%)	(%)
S5-01	30%蔗糖	7.8	1.1	1.0
S5-02	30%棉子糖	7.8	1.6	1.4
S5-03	30%海藻糖	7.8	1.4	1.3
S5-04	纯	7.8	1.2	1.4

- 10 含水量在 1 至 6% 范围变动。如预料的那样, 含水量水平在 40 $^{\circ}\text{C}$, 干燥剂存在下贮藏一个月后没有增加。

表 8. RP-HPLC 分析化学降解的特征

时间点 (月)	制剂	种类	3 次进样平均值					
			hGH	SD	%RSD	EE	SD	%RSD
0	H051RP	开始, met-hGH	94.50	± 0.34	0.36	5.49	± 0.34	6.10
0	透析过滤后	制剂前	94.62	± 0.32	0.34	5.38	± 0.32	5.96
0	S5-01	30%蔗糖	94.29	± 0.44	0.47	5.71	± 0.44	7.74
0	S5-02	30%棉子糖	94.50	± 0.20	0.21	5.50	± 0.20	3.58
0	S5-03	30%海藻糖	94.41	± 0.67	0.71	5.59	± 0.67	12.05
0	S5-04	纯	94.31	± 0.40	0.43	5.69	± 0.40	7.06
1	H051RP	新鲜重建	96.07	± 0.21	0.22	3.93	± 0.21	5.29
1	S5-01	30%蔗糖	95.17	± 0.35	0.37	4.83	± 0.35	7.25
1	S5-02	30%棉子糖	94.30	± 0.36	0.38	5.70	± 0.36	6.32
1	S5-03	30%海藻糖	94.87	± 0.26	0.27	5.13	± 0.26	5.07
1	S5-04	纯	94.15	± 0.41	0.44	5.85	± 0.41	7.06

- 15 数据显示, 40 $^{\circ}\text{C}$ 一个月贮藏后所有被测试制剂的 hGH 和早期洗脱峰 (EE) 的百分率保持在相似水平。RP-HPLC 分析观察到所有制

剂之间 hGH 和 EE 量无显著差异。

表 9. SE-HPLC 分析可溶性聚集物 (SA) 的特征

时间点 (月)	制剂	种类	3 次进样平均值					
			hGH	SD	%RSD	EE	SD	%RSD
0	H051RP	开始, met-hGH	99.69	±0.01	0.01	0.31	±0.01	3.69
0	透析过滤后	制剂前	99.67	±0.05	0.05	0.33	±0.05	14.18
0	S5-01	30%蔗糖	98.04	±0.27	0.27	1.96	±0.27	13.70
0	S5-02	30%棉子糖	97.74	±0.18	0.18	2.26	±0.18	7.78
0	S5-03	30%海藻糖	97.66	±0.10	0.10	2.34	±0.10	4.08
0	S5-04	纯	97.47	±0.07	0.07	2.53	±0.07	2.59
1	H051RP	新鲜重组	99.91	±0.02	0.02	0.09	±0.02	16.37
1	S5-01	30%蔗糖	97.39	±0.17	0.17	2.61	±0.17	6.37
1	S5-02	30%棉子糖	96.65	±0.03	0.03	3.35	±0.03	0.96
1	S5-03	30%海藻糖	96.78	±0.04	0.05	3.22	±0.04	1.35
1	S5-04	纯	95.32	±0.06	0.07	4.68	±0.06	1.37

- 5 所有制剂喷雾干燥后其可溶性聚集物 (SA) 都稍微增加 (至大约 2%)。40℃, 干燥剂存在下贮藏一个月后, 可溶性聚集物均稍微增加。纯制剂的可溶性聚集物增加至 4.7%。这也许表明, 类似这些的糖具有抗聚集以稳定 hGH 蛋白的作用。在三个含糖制剂中, 蔗糖制剂显示在初始和 1 个月时间点其可溶性聚集物百分率值最低。

10

表 10. UV 光谱分析不溶性聚集物的特征

时间点 (月)	制剂	种类	3 次进样平均值		
			hGH	SD	%RSD
0	H051RP	开始, met-hGH	1.9		
0	透析过滤后	制剂前	0.2		
0	S5-01	30%蔗糖	0.0		
0	S5-02	30%棉子糖	2.9		
0	S5-03	30%海藻糖	1.6		
0	S5-04	纯	2.0		
1	S5-01	30%蔗糖	1.7	0.2	13.8
1	S5-02	30%棉子糖	1.9	0.1	3.7
1	S5-03	30%海藻糖	2.4	0.5	21.5
1	S5-04	纯	1.3	0.2	11.9

所有被测试制剂不溶性聚集物低于 3%。40℃ 一个月贮藏后观察到不溶性聚集没有增加。表 9 报告的一个月时间点 SD 和 %RSD 是从同一样品三重扫描中获得的。它反映同一样品 UV 测量的变异，而不是样品与样品间的差异。

5

同样，根据 B. M. Eckhardt, J. Q. Oeswin, 和 T. A. Bewley, *Pharm. Res.*, 8(11):1360-1364 (1991) 的描述计算总单体 (TM) 百分率。

表 11. 总单体百分率计算

时间点 (月)	制剂	种类	%		
			IA	SA	TM
0	H051RP	开始, met-hGH	1.9	0.31	97.5
0	透析过滤后	制剂前	0.2	0.33	99.6
0	S5-01	30%蔗糖	0.0	1.96	99.7
0	S5-02	30%棉子糖	4.6	2.26	93.2
0	S5-03	30%海藻糖	1.6	2.34	96.1
0	S5-04	纯	2.0	2.53	95.5
1	S5-01	30%蔗糖	1.7	2.61	95.7
1	S5-02	30%棉子糖	1.9	3.35	94.8
1	S5-03	30%海藻糖	2.4	3.22	94.5
1	S5-04	纯	1.3	4.68	94.1

10

与纯制剂相比，本研究评价的糖没有显示烟雾剂性能 (ED 和 MMAD) 的提高。然而，似乎含糖制剂提供更好的稳定性曲线，例如，当 hGH 用糖制剂时，可溶性聚集水平低于纯制剂；而且，蔗糖制剂提供最低量可溶性聚集物。

15

实施例 5

喷雾干燥参数优化

本研究的目的是将 4 α -螺旋束蛋白粉末的 MMAD 进一步减小至小于 3 微米而不牺牲分散性或增加蛋白质降解。虽然采用了 des-Phe hGH，在天然全长 hGH 粉末特性方面认为不出现显著性差异。

20

已经指出 (Mumenthaler, M.等, Pharm Res., 11:12-20(1994)和 Maa, Y-F 等, J Pharm Sci, 87:152-159(1998)), 喷雾干燥中 hGH 聚集是不可避免的, 并且大多数聚集出现在雾化阶段。申请人已经在 40psi 雾化压力下将纯天然 hGH 喷雾干燥成干粉 (实施例 1)。这批粉末的 MMAD 是 3.5 微米 (VMOD=2.7 微米), 大于 3 微米。本研究目的是确定能进一步将空气动力学微粒尺寸减少至小于 3 微米而不牺牲蛋白质聚集的低程度的最佳操作参数。

获得减小的 MMAD 的一个途径是减小被雾化干燥的初始微粒尺寸, 该尺寸受雾化压力增大和喷雾干燥溶液固体浓度减小的影响。两个参数的调整被研究。

实验设计

雾化压力 (40-60 psi) 和固体浓度 (0.5-2.0% w/v) 作为设计参数被采用。

1%固体 (S6-02) 时, 雾化器压力增加至 60 psi, 其目的是制备更小微粒。固体浓度被减小 (S6-03) 至 0.5%固体, 目的是减小微粒尺寸。然而, 应该注意到, 在为了制备更小微粒尺寸而采用的条件 (更低固体浓度和增加的雾化压力) 下, hGH 聚集水平的增加以前已经被观察到。换句话说, 增加 hGH 浓度也许很可能产生更低的聚集。因此, 决定将固体浓度增加至 2%w/v。实验 S6-04 的目的是, 采用 40psi 雾化压力将聚集保持在其最低水平。设计矩阵在下面提供。开始 hGH 材料高度不纯, 正如能够从表 13 的蛋白质纯度值看出。

25

表 12. 实验设计

实验 (编号)	固体浓度 (%w/w)	雾化压力 (psig)	注释 (微粒尺寸/聚集)
S6-01	0.5	60	最小的微粒 最大的聚集
S6-02	1.0	60	较小的微粒 较大的聚集
S6-03	1.0	40	以前使用的
S6-04	2.0	40	最大的微粒 最小的聚集

按照上面实施例所描述的方法进行溶液制备和喷雾干燥。所得喷雾干燥粉末的特征描述以列表形式在下面提供。

5

表 13. 喷雾干燥固体的特征

%固体浓度、雾化压力	0.5%, 60psi	1.0%, 60psi	1.0%, 40psi	2.0%, 40psi
ED	83%	77%	72%	72%
MMAD	3.4	3.8	4.1	4.3
FPF	48%	39%	33%	29%
VMOD	2.0	2.2	2.5	3.0
残余含水量	1.3%	1.5%	0.9%	1.3%
IA(UV)	0.3%	0.1%	0.5%	0.6%
SA(SEC)	5.4%	4.0%	4.1%	3.1%
蛋白质纯度	64.2%	63.8%	63.8%	64.2%

实施例 6

氨基酸稳定剂的使用

10 喷雾干燥过程中，氨基酸作为 4 α -螺旋束蛋白的潜在稳定剂被研究。根据数据的汇编，申请人已经发现关于含氨基酸粉末制剂的某些趋势并进行观察。通常，观察到，降低的溶解性跟降低的水分吸附和延迟的析晶相关 (Leu>His>Ala>Gly)；增大的范德瓦尔斯体积跟增大的 Tg 相关 (Leu>His>Ala>Gly)；增大的表面富集因素跟增大的疏水性相关；减少的表面张力跟减小的 MMD 和聚集相关。

15

基于这些信息，某些氨基酸（Leu, Ile, Val, nLeu, Phe, 和 Trp）作为 4 α -螺旋束蛋白的潜在喷雾干燥稳定剂被研究。在 hGH-氨基酸制剂中，氨基酸百分率保持在总固体量 30%以下。认为氨基酸的低百分率可能延迟/阻止析晶。

5

含水氨基酸-人生长激素制剂按照上面的描述被制备。制剂总结在下表 14 提供。

表 14. hGH-氨基酸制剂的组成

制剂	pH	hGH (mg/ml)	氨基酸		缓冲液 (mM)	总固体%			总固体 (%)
			名称	(mg/ml)		hGH	氨基酸	缓冲液	
S7-01	7.8	9.8	Leu	4.60	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S7-02	7.8	9.8	Ile	4.59	5	65.0	30.5	4.6	1.5
S7-03	7.8	9.8	Val	4.59	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S7-04	7.8	9.8	nLeu	4.59	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S7-05	7.8	9.8	Phe	4.60	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S7-06	7.8	9.8	Trp	4.59	5	64.9	30.5	4.6	1.5
S7-07	7.8	9.8	纯	0	5	93.4	0	6.6	1.0

10

按照上面实施例详细描述的方法用 80 psi 雾化压力制备这些制剂；粉末回收率在 55 至 66%范围。

粉末特征描述结果以列表形式在下面提供。

15

表 15. 喷射剂量

制剂	种类	pH	10 次样品平均值		
			ED%	SD	%RSD
S7-01	30%Leu	7.8	73.9	±5.6	7.6
S7-02	30%Ile	7.8	76.3	±3.5	4.6
S7-03	30%Val	7.8	74.5	±3.8	5.2
S7-04	30%nLeu	7.8	76.7	±2.2	2.9
S7-05	30%Phe	7.8	73.5	±2.6	3.6
S7-06	30%Trp	7.8	73.7	±4.6	6.2
S7-07	纯	7.8	78.5	±2.5	3.2

所有被测试制剂的 Ed 在 75.3%至 78.5%范围内。

表 16. MMAD、FPT、CIE 和 VMD 结果

制剂	种类	pH	MMAD (μm)	FPF (%)	VMD (μm)
S7-01	30%Leu	7.8	3.0	56	2.0
S7-02	30%Ile	7.8	3.1	54	2.0
S7-03	30%Val	7.8	3.4	49	2.1
S7-04	30%nLeu	7.8	3.1	56	2.0
S7-05	30%Phe	7.8	3.2	53	2.0
S7-06	30%Trp	7.8	3.6	43	2.2
S7-07	纯	7.8	3.3	49	1.9

5 制剂粉末显示 MMAD 值为 3.0-3.6 微米。含 Trp 和 Val 制剂具有更大的分别为 3.6 和 3.4 微米的 MMAD 值。含 Leu、Ile 和 nLeu 制剂的 MMAD 没有显著差异。纯制剂的 MMAD 是 3.3 微米，其比先前实施例中纯制剂的 MMAD 数据小得多。可能造成这种差异的一个因素是更高的雾化压力（80psi），因为 80psi 的雾化压力比 60psi 的雾化

10 压力更能促成小微粒尺寸的形成。制剂的 VDM 趋势与 MMAD 数据趋势相一致。制剂微粒尺寸分布是相似的。似乎 Leu、Ile 和 nLeu 作为喷雾干燥稳定剂具有稍微更好的特性，它们有助于小空气动力学尺寸和高 FPF 微粒的形成。

15 所有粉末残余含水量在 0.8%至 1.5%范围。

表 17. RP-HPLC 分析化学降解的特征

制剂	种类	pH	3 次进样平均值(%)					
			hGH	SD	%RSD	EE	SD	%RSD
H051RP	新鲜重建		95.7	0.4	0.4	4.3	0.4	9.1
H051RP	起动材料		95.5	0.5	0.5	4.5	0.5	10.7
H051RP	透析过滤后	7.8	95.5	0.4	0.4	4.5	0.4	8.7
S7-01	30%Leu	7.8	95.7	0.2	0.2	4.3	0.2	4.1
S7-02	30%Ile	7.8	95.5	0.1	0.1	4.5	0.1	1.6
S7-03	30%Val	7.8	95.4	0.1	0.1	4.6	0.1	2.2
S7-04	30%nLeu	7.8	95.5	0.1	0.1	4.5	0.1	2.1
S7-05	30%Phe	7.8	95.7	0.1	0.1	4.3	0.1	1.4
S7-06	30%Trp	7.8	95.7	0.4	0.4	4.4	0.4	8.6
S7-07	纯	7.8	95.3	0.2	0.2	4.7	0.2	3.2

5 数据显示，所有被研究制剂的 hGH 和早期洗脱峰（EE）的百分率保持在相似水平。从 RP-HPLC 分析观察到制剂之间 hGH 和 EE 的百分率无显著差异。与非喷雾干燥溶液相比，似乎所有制剂中任何一种的早期洗脱峰没有增加。

表 18. SE-HPLC 分析可溶性聚集物（SA）的比较

制剂	种类	pH	3 次进样平均值(%)							
			第一次制备				第二次制备			
			hGH	SD	SA	SD	hGH	SD	SA	SD
H051RP	新鲜重建		99.9	0.03	0.1	0.03				
H051RP	起动材料		99.7	0.03	0.3	0.03				
H051RP	透析过滤后	7.8	99.7	0.03	0.3	0.03				
S7-01	30%Leu	7.8	93.9	0.16	6.1	0.16	96.3	0.15	3.8	0.15
S7-02	30%Ile	7.8	94.7	0.15	5.3	0.15	96.7	0.20	3.3	0.20
S7-03	30%Val	7.8	95.0	0.06	5.0	0.06	97.5	0.24	2.5	0.24
S7-04	30%nLeu	7.8	96.6	0.06	3.4	0.06	99.2	0.06	0.8	0.06
S7-05	30%Phe	7.8	96.7	0.09	3.3	0.09	98.6	0.09	1.4	0.09
S7-06	30%Trp	7.8	96.6	0.06	3.4	0.06	99.2	0.06	0.8	0.06
S7-07	纯	7.8	96.7	0.09	3.3	0.09	98.6	0.09	1.4	0.09

表 19. SE-HPLC 分析可溶性聚集物 (SA) 的特征

制剂	种类	pH	3 次进样平均值(%)					
			hGH	SD	%RSD	SA	SD	%RSD
S7-01	30%Leu	7.8	96.3	0.2	0.2	3.8	0.2	4.1
S7-02	30%Ile	7.8	96.7	0.2	0.2	3.3	0.2	6.1
S7-03	30%Val	7.8	97.5	0.2	0.3	2.5	0.2	9.7
S7-04	30%nLeu	7.8	99.2	0.1	0.1	0.8	0.1	7.6
S7-05	30%Phe	7.8	98.6	0.1	0.1	1.4	0.1	6.1
S7-06	30%Trp	7.8	99.2	0.1	0.1	0.8	0.1	7.6
S7-07	纯	7.8	98.6	0.1	0.1	1.4	0.1	6.1

似乎，含 Leu、Ile 和 Val 制剂有更高的可溶性聚集物，而其他制剂具有相似的可溶性聚集物水平 (~1%)。

5

表 20. UV 光谱分析不溶性聚集物的特征

制剂	种类	pH	3 次进样平均值(%)		
			IA	SD	%RSD
H051RP	起动材料		1.2	0.2	13.8
H051RP	透析过滤后	7.8	1.6	0.2	14.7
S7-01	30%Leu	7.8	1.1	0.0	4.1
S7-02	30%Ile	7.8	0.9	0.1	14.0
S7-03	30%Val	7.8	1.5	0.2	12.2
S7-04	30%nLeu	7.8	1.2	0.5	37.6
S7-05	30%Phe	7.8	0.8	0.1	11.6
S7-06	30%Trp	7.8	1.5	0.3	22.7
S7-07	纯	7.8	0.3	0.1	42.0

所有被测试制剂的不溶性聚集物在 0.3 至 1.5% 范围。观察到喷雾干燥后 IA 没有增加。所有制剂具有相似的 IA 水平。表 11 报告的 SD 和 %RSD 是从相同样品的三重扫描中获得的。

10

表 21. 总单体百分数计算

制剂	种类	pH	(%)		
			IA	SA	TM
S7-01	30%Leu	7.8	1.1	3.8	95.2
S7-02	30%Ile	7.8	0.9	3.3	95.8
S7-03	30%Val	7.8	1.5	2.5	96.1
S7-04	30%nLeu	7.8	1.2	0.8	98.0
S7-05	30%Phe	7.8	0.8	1.4	97.8
S7-06	30%Trp	7.8	1.5	0.8	97.7
S7-07	纯	7.8	0.3	1.4	98.3

总的来说，所有制剂的 ED 大于 73%，并且 MMAD 在大约 3.0 至 3.6 μ m 范围。含 Val 和 Trp 制剂的粉末具有相对较大的 MMAD(3.4 和 3.6 μ m)，而从化学稳定性观点来看，各含 30%水平 Leu 和 Ile 制剂的 hGH 与含其他氨基酸制剂相比有稍微更高的可溶性聚集物。

实施例 7.

喷雾干燥 hGH 制剂

按照上面通常所描述的方法制备和喷雾干燥 des-phe hGH 的 4 种制剂：1 个纯 hGH 制剂，1 个 Zn²⁺/Tween20/ hGH 制剂，和 2 个含锌量不同的制剂：Zn²⁺:hGH (7:1 和 20:1)。通过添加 5mM 磷酸钠缓冲液调整蛋白质浓度。批量在 500mg 至 550mg 范围，而粉末产率在 80% 至 100%范围。制剂相关数据的总结在下表提供。

表 22. hGH 制剂组成

实验号	[hGH], mg/ml	Tween 20, %	Zn: hGH 摩尔比	pH
1276-52	9.7	0	0	7.7
1276-53	9.5	0.05	2:1	7.5
1276-54	8.6	0	20:1	5.4
1381-72	9.7	0	0	7.7
1381-86	9.3	0	7:1	7.7

喷雾干燥粉末的物理和化学稳定性及烟雾剂性能被测定并且总结

如下。

表 23. 喷雾干燥 hGH 粉末的特征

实验号	时间点	含水量, %wt	MMAD, μm	ED, %	不溶性聚集 物, %	可溶性聚集 物, %
1276-52	初始时间	2.6	4.5	65		
1276-53	初始时间	2.5	3.9	49	1.3	5.5
1276-54	初始时间	2.1	3.5	75	2.6	4.4
1381-72	初始时间	2.9	3.6	73	1.2	4.2
1381-72	3 周, 25°C/60 RH-包装的 起泡包装	2.0	3.5	70	1.1	6.7
1381-72	3 周, 25°C/75 RH-包装的 起泡包装	1.9	3.4	69	1.3	8.2
1381-86	初始时间	2.4	3.2	69		

- 5 在环境条件和加速环境条件下 1 个月贮藏后，纯制剂粉末的喷射剂量和 MMAD 分别保持在 70%和 3.5 μm 近似不变，显示纯制剂的坚固性。

实施例 8.

10 hGH 雾化研究

- 15 进行下面的研究是为了确定当与一定量起稳定作用赋形剂联合使用时配方和/或操作参数例如喷雾干燥代表性 4- α 螺旋蛋白，hGH 的最佳雾化压力的影响。雾化研究在如先前所描述的 Buchi 190 里进行，雾化溶液收集在 Erlemeyer 瓶中。除非另有说明，所有实验在相同浓度在 5 mM 磷酸缓冲液中的 10mg/ml met-rHGH 和 80psi 雾化条件下进行。所研究的赋形剂/溶剂是如下表 24 所示剂量的 α 磷酸甘油酯、亮氨酸、乙醇、三亮氨酸、三苯丙氨酸、F-68、rHA、锌、镁、钙和羟乙基淀粉。所有雾化前和雾化后样品用 pH、UV 和 SE-HPLC 分析。样品的等分也被离心并用 UV 分析。测量所有雾化前样品的表面张力。

表 24. 制剂成分

赋形剂	赋形剂量	hGH 量	5mM 磷酸盐缓冲液
10%Agphos	6mg	2.158ml	3.842ml
30% Agphos	18 mg	2.158 ml	3.842 ml
30%Leu	18 mg	2.158 ml	3.842 ml
5%乙醇	300 μ l	2.158 ml	3.542 ml
30%乙醇	1.8ml	2.158 ml	2.042 ml
5%三亮氨酸	2.93 mg	2.158 ml	3.842 ml
30%三亮氨酸	17.91 mg	2.158 ml	3.842 ml
30%Phe-3	18.03 mg	1.813 ml	4.187 ml
70%Phe-3	42.14 mg	1.813 ml	4.187 ml
0.01% F-68	6 μ l	1.813 ml	4.181 ml
0.1% F-68	60 μ l	1.813 ml	4.127 ml
5%rHA	0.012ml	1.813 ml	4.175 ml
50%rHA	0.120ml	1.813 ml	4.067 ml
Zn2:1	17 μ l	2.406 ml	3.577 ml
Zn7:1	58 μ l	2.406 ml	3.536 ml
Zn20:1	166 μ l	2.406 ml	3.428 ml
Mg20:1	190 μ l	2.406 ml	3.404 ml
Ca20:1	223 μ l	2.406 ml	3.371 ml
20%HES	11.97mg	2.406 ml	3.594 ml
50%HES	30.1 mg	2.406 ml	3.594 ml

	SE-HPLC					UV		PH
	%单体		平均值	wrt pre	%不溶性聚集体 (未离心)	%不溶性聚集体 (离心)		
40psi	95.59	95.44	95.52	96.05	4.0	1.9	7.4	
60 psi	94.88	94.87	94.88	95.40	4.1	1.8	7.2	
80 psi	94.8	94.8	94.80	95.33	3.3	2.1	7.3	
前 10/3.6(6.8)	86.69	89.22	87.96		2.1	6.3	6.8	
后	85.37	85.33	85.35	98.48	7.2	1.5	6.84	
前 10/7.5	75.17	75.96	75.57		3.2	1.5	7.46	
后	67.86	67.49	67.68	90.28	3.5	3.2	7.46	
前 2/7.5	83.06	81.76	82.41		3.5	0.1	7.48	
后	61.45	61.61	61.53	73.98	4.1	4.2	7.41	
前 10/3.6	86.81				0.7	0.9	3.52	
后	82.52			95.06	1.3	1.2	3.51	
前 10% agphos	84.98				1.1	5.5	7.27	
后	75.55			88.90	3.9	7.8	7.18	
前 30% agphos	84.02				3.0	6.0	7.37	
后	76.13			90.61	6.0	7.8	7.25	

前 30% leu	85.36					1.9	4.8	7.3
后	75.17				88.06	4.6	3.2	7.16
前 5% etoh	85.41					1.2	1.9	7.44
后	76.77				89.88	2.7	4.3	7.29
前 30% etoh	79.46					9.9	1.2	6.97
后	78.84				99.22	12.8	0.7	6.8
前 5% leu-3	85.82					2.5	2.1	7.31
后	77.19				89.94	2.4	8.2	7.19
前 30% leu-3	86.02					2.8	4.2	7.15
后	82.1				95.44	5.6	2.2	7.04
前 30% Ile-3	99.36					1.5%	0.5%	7.44
后	98.6				99.24	0.9%	0.4%	7.37
前 70% Ile-3	99.34					0.4%	0.3%	7.64
后	98.89				99.55	0.6%	0.6%	7.6
前 30% Phe-3	99.16					2.2%	0.9%	9.17
后	98.12				98.95	1.7%	0.4%	8.82
前 70% Phe-3	97.74					3.1%	1.1%	10.64
后	97.68				99.94	2.8%	1.2%	10.49
前 0.01%F-68	99.32					0.2%	0.6%	7.2
后	93.06				93.70	6.3%	4.3%	7.08
前 0.1%F-68	99.27					-0.5%	0.6%	7.39
后	97.37				98.09	4.4%	3.2%	7.04
前 5% rHA	92.87					-0.6%	1.6%	7.4
后	85.73				92.31	0.8%	0.8%	7.11
前 50% rHA	66.24					0.2%	1.4%	7.28
后	61.88				93.42	7.4%	3.0%	7.04
前 Zn 2:1	97.53					7.1%	4.7%	3.04
后	95.59				98.01	23.7%	0.3%	3.05
前 Zn 7:1	97.83					16.4%	0.8%	3.43
后	96.51				98.65	52.4%	1.0%	3.44
前 Zn 20:1	99.04					49.7%	5.4%	3.31
后	93.09				93.99	57.8%	2.6%	3.2
前 Mg 20:1	97.77					9.7%	1.4%	3.39
后	95.59				97.77	26.5%	0.7%	3.43
前 Ca 20:1	97.79					8.6%	0.2%	3.16
后	96.08				98.25	37.2%	1.0%	3.21
前 20% HES	98.07					3.9%	0.7%	7.21
后	95.03				96.90	4.1%	1.6%	7.16
前 50% HES	98.2					3.1%	1.3%	7.28
后	93.64				95.36	4.2%	3.0%	7.28

观察上表结果，将喷雾干燥后的值与喷雾干燥前的值比较，当 agphos 以更高浓度出现时，agphos 制剂显示聚集稍微减少；含亮氨酸制剂没有这种现象，但是总的结果良好。含乙醇制剂显示聚集减少，
5 特别是在更高浓度时候，虽然有沉淀从溶液析出，尤其是在更高浓度时。三亮氨酸制剂显示在更高浓度时聚集减少，而 Phe-3 制剂在低浓度和高浓度聚集没有变化-二者结果都很好。含 F-68 制剂显示在更高浓度聚集减少，而对于含锌制剂，锌 7:1 制剂表现最好（对于所有含锌制剂，都有沉淀从溶液析出，最坏的是 20:1）。含阳离子制剂，镁
10 和钙也表现良好，但是同样地出现沉淀形成。（注意：ppt 级时溶液析出的问题）。含 HES 制剂显示在更高 HES 浓度聚集稍微增加。