

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 38/27



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99101785.4

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1173739C

[22] 申请日 1999.2.4 [21] 申请号 99101785.4

[30] 优先权

[32] 1998. 2. 4 [33] JP [31] 039609/1998

[71] 专利权人 日本化学研究株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 辰巳正史 井上桂 梶原淳一

审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书 1 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 含人生长激素的水性药物组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种含人生长激素的注射用水性药物组合物，其中所述人生长激素被溶于含有苯扎氯铵的极弱或较弱酸性缓冲溶液中，较好的缓冲溶液是马来酸盐缓冲液。该组合物是一种稳定性良好的液体制剂，而且注射时引起的疼痛感较弱。

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

1. 一种含人生长激素的注射用水性药物组合物，其中所述人生长激素被溶于含有 0.002-0.03mg/ml 苯扎氯铵的缓冲溶液中，其中溶液的 pH 值等于或大于 5，并小于 7，其中 2-20mM 马来酸盐用作溶液的缓冲剂，从而减轻组合物注射时引起的疼痛感。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，所述组合物中还含有 D-甘露糖醇和/或中性盐。

3. 如权利要求 2 所述的组合物，1ml 所述组合物中 D-甘露糖醇的含量为 30~100mg 。

4. 如权利要求 2 所述的组合物，其中所述的中性盐为氯化钠。

5. 如权利要求 4 所述的组合物，1ml 所述组合物中氯化钠的含量为 5-20mg 。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物，所述组合物中还包含防腐剂。

7. 如权利要求 6 所述的组合物，其中所述的防腐剂选自苯甲酸钠、苯甲酸和苯酚。

8. 如权利要求 7 所述的组合物，其中所述的防腐剂为苯甲酸钠。

9. 如权利要求 8 所述的组合物，1ml 所述组合物中苯甲酸钠的含量为 0.1~5mg。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物，所述组合物中还包含非离子型表面活性剂。

11. 如权利要求 10 所述的组合物，其中所述的非离子型表面活性剂选自由吐温 20 和吐温 80 组成的组。

12. 如权利要求 10 所述的组合物，1ml 所述组合物中非离子型表面活性剂的含量为 0.5~5mg。

含人生长激素的水性药物组合物

5 本发明涉及一种含人生长激素的可注射药物制剂，特别涉及一种溶液形式的含人生长激素的药物制剂。

人生长激素(略称为"hGH")是一种单链多肽激素，是包含 191 个氨基酸残基的天然存在型激素，hGH 通常以生物活性单体形式存在，但已知在热力或机械力作用下，如对药物制剂加以振荡，可凝集成二聚物，然后是多聚物，使其失去生物活性(Berker, G. W. 等, (1987) Biotechnol. Appl. Biochem., 9, p. 478)。

10 另一方面，众所周知，长时间保存的 hGH 水溶液会逐渐产生脱酰氨基产物，而较少形成 hGH 的聚合产物。这些脱酰氨基 hGH 的生物活性虽然没有什么改变(Becker, G. W.等(1998) Biotechnol. Appl. Biochem., 10, p. 326)，但由于它的存在被认为是质量的下降，所以不是一种理想的药物，其被允许的含量通常在说明书中加以规定。

另外，一般认为因凝聚而引起的 hGH 变性大多数是由于物理力的作用，而因脱酰氨基引起的变性主要是在化学力作用下产生的。

鉴于上述原因，至今还没有获得一种令人满意的 hGH 水性制剂，常用的是在注射前溶解的冻干制剂。

20 由于用 hGH 来缓解侏儒症需要很长一段时间，所以，允许患者自己进行注射，一般从治疗开始就可在家用药。使用 hGH 的冻干制剂时，先将制剂溶于适当的溶剂中，然后由患者自己(通常是孩子)或其家人进行皮下或肌肉注射。这样，溶解冻干制剂是由患者或其家人来做的。所以，需要医生正确指导患者如何进行溶解，以避免产生会减弱 hGH 生物活性的凝聚物。产品广告还包括使用须知和

25 hGH 应采用温和的圆周运动加以溶解的指导。

由于在形成冻干制剂时已注意到凝聚物的形成，所以，人们已经尝试用各种方法抑制凝聚物的形成，但是，仍迫压希望有一种更容易处理、更稳定的制剂来代替通常所用的需要在使用前溶解的制剂。最近，一种带有注射器的药盒型制剂已经投入使用，由于它具备较复杂的结构，所以溶解冻干 hGH 的操作可在注射器

30 中进行，这样就必须对患者或其家人进行仔细而详尽的使用说明，因此，不能够排除各种不可预见的错误操作出现的危险性。

由于患者或其家人一般是在家里注射 hGH，所以，供应一种省去溶解步骤

的水性 hGH 制剂将会更方便. 这种合适的水性制剂将会减少给患者及其家人带来的不便, 因为它不需要分为两个部分、并在使用前进行溶解这样复杂的结构, 例如, 有一种笔型产品, 它包括用隔膜隔开的冻干 hGH 和溶剂.

以下是各种较好的关于 hGH 水性制剂的专利申请.

- 5 CABI 在待审专利公报 No.508156/1994(以下称为“CABI 公报”)中揭示了 hGH 的注射用组合物, 或 pH 为 5 ~ 7.5、含有 2 ~ 50mM 柠檬酸缓冲剂的活性类似物. 该公报还揭示了用柠檬酸盐能够获得比磷酸盐更好的稳定性, pH 值以约 6.0 ~ 7.0 为好.

10 上述 CABI 公报还揭示了该制剂能够至少稳定保存 12 个月. 该公报中的单体稳定性是指其含量不少于最初的 85 %, 考虑到一般认为单体含量应不少于 90 %, 所以, 上述 CABI 揭示的制剂几乎不具备充分的稳定性.

另外, 本发明者们独立于上述 CABI 揭示内容对质量和稳定性的改进进行研究后还发现, pH 值是制备溶液形式的 hGH 制剂的关键因素, 使用能够将 pH 值维持在 5 ~ 7 的范围内, 更理想地在 5.5 ~ 6.5pH 范围内的缓冲剂. 例如柠檬酸盐,
15 作为这样的缓冲剂是有效的(待审专利公报 No.92125/1996).

此外, Genentech Inc.在待审专利公报 No.509719/1995(以下称为“Genentech 公报”)中揭示了包含 hGH、甘露糖醇、缓冲液和非离子型表面活性剂的液体 hGH 制剂. 该公报揭示了较理想的柠檬酸盐缓冲液.

Novo Nordisk Pharma 在待审专利公报 No.507497/1993 中揭示了一种制剂,
20 它的制备过程如下: 首先, 在二价阳离子(如 Zn^{2+})存在下, 添加丙酮或乙醇使 hGH 结晶, 然后使结晶冷冻干燥, 再将经过干燥的结晶放置在 pH 为 6.1 ~ 6.2 的含有磷酸盐、乙酸锌、甘油和苄醇的混悬液中. 该公报还揭示, 在 22 ~ 24 的温度下, 对上述 hGH 结晶的混悬液进行为时 6 个月的稳定性测试, 分别用离子交换 HPLC 测定脱酰氨基反应和分解反应的情况, 用 GPC 测定二聚物和聚合物的含量. 其结果
25 是, 6 个月后, 该制剂中的脱酰氨基产物为 5.0%, 二次脱酰氨基产物为 1.8%, 二聚物为 1.2%, 聚合物为 0.3%, 都低于对一般的冻干制剂重新获得的溶液进行稳定性测试后获得的数据. 上述公报还揭示在结晶时要获得较大结晶的关键是 Zn^{2+} . 而且, 虽然在 hGH 的结晶过程中使用了可溶于水的溶剂, 如丙酮或乙醇, 但并没有提到混悬液中的 hGH 结晶的次级或更高级结构有进一步的变化, 这就留下了疑问.
30

丙酮和乙醇常用于纯化蛋白质, 以得到沉淀形式. 该方法是利用了蛋白质对有机溶剂的溶解度较低这一特性. 虽然上述公报中的有机溶剂浓度低于使蛋白质

沉淀的浓度，但将它们用于人服用的药物制剂却是不合适的。

鉴于上述情况，本发明者们进行了进一步研究以求获得更好的水性 hGH 制剂。在研究过程中，按照本发明者们的待审专利公报和 CABI 公报所述的方法，使用柠檬酸盐缓冲液制备了各种液状水性 hGH 制剂，并测定了它们在各时间段的
5 稳定性。结果发现，任何一种制剂都产生了肉眼可见的微粒，在聚集后尤为明显，用孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤可除去微粒，但在长期保存后或振荡产生的应力下仍会出现。由于这些微粒的形成会影响药物制剂的质量，所以，希望有一种能够抑制微粒产生的水性制剂。

另一方面，有报道认为，柠檬酸盐作为酸性极弱至较弱的缓冲液被广泛地用于注射用制剂，在用于 hGH 时，该制剂皮下或肌肉注射会引起疼痛感(待审专利公报 No.51003/94)。本发明者们自己也用按照上述 CABI 公报和上述本发明者们的待审专利公报中描述的方法制得的制剂作了试验，同样发现在注射这些含有柠檬酸盐的 hGH 注射剂时产生较强烈的疼痛感。
10

不象制剂的稳定性问题那样，注射时的疼痛感对于制剂的质量不是很重要的问题。但是，考虑到 hGH 制剂需要在很长一段时期内经常注射，而且患者通常为
15 孩子，所以，为了减轻患者的疼痛感，从而确保患者的配合，人们希望有一种本身不会引起疼痛感的注射液。目前，实际上还没有一种在注射时病人不会觉得疼的制剂被用于治疗，因此，对于上述 CABI 公报和 Genentech 公报(后者认为柠檬酸盐缓冲液是一种较理想的缓冲液)所描述的制剂，以及本发明者们的上述专利申请所述制剂来讲，还可以在减轻注射时的疼痛感这一方面作些改进，消除或减轻疼痛感将有益于患者。
20

本发明的第一个目的是解决注射用 hGH 水性制剂的稳定性问题，即提供一种脱酰氨基、聚合和聚集等现象实质上都被抑制、且不会产生上述微粒的稳定的 hGH 水性制剂。

25 本发明的另一目的是提供一种在皮下或肌肉注射时能够消除或减轻因其组分而引起疼痛感的 hGH 水性制剂。

本发明者们以冷冻干燥前不经意地保存过一段时间的各种 hGH 制剂进行试验，发现将 hGH 溶于马来酸盐缓冲液或琥珀酸盐缓冲液使 pH 值维持在 6 左右的水溶液而获得的制剂，其稳定性接近于用柠檬酸盐缓冲液将 pH 值维持在同样
30 水平的溶液(如待审专利公报 No.92125/1996 所述)，而且，它们不会产生二聚物或聚合物，也不会产生脱酰氨基产物。进行以下试验，能够发现人生长激素的质量发生了哪些重大变化，即用体积排除高效液相色谱法(SE-HPLC)测定单体含

量, 用反相高效液相色谱法测定脱酰氨基产物的含量, 观察一般外观, 测定 pH 值。在制备过程中对水性制剂进行进一步认真研究的结果是, 在热力作用下、并在凉爽的地方放置 6 个月后, 从丙酮酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液和马来酸盐缓冲液中选出的具备较好缓冲能力的缓冲液是马来酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液。

这样就能够再次确定, 通过使用上述缓冲液, 能够在极弱或较弱酸性的 pH 范围内获得 hGH 的稳定性。但是, 进一步观察后发现, 在极弱或较弱的酸性条件下完成制剂的制备后, 制剂中出现了极少量肉眼可见的微粒, 它们能散射光并区别于凝聚物, 所以, 本发明者为了寻求抑制微粒形成的方法而试验了很多化合物的作用, 结果发现低浓度的苯扎氯铵能够有效地抑制微粒的产生。在此基础上又进行进一步研究的结果是, 采用某些水性制剂配方, 按此配方将 hGH 溶于含有苯扎氯铵的极弱或较弱酸性溶液中能够形成稳定的 hGH 水性制剂, 该 hGH 水性制剂中的脱酰氨基反应、聚合反应和聚集现象、以及形成微粒现象都受到抑制, 从而完成了本发明。

同时, 对上述极弱或较弱酸性水性制剂进行深入研究时发现, 当选用柠檬酸盐作为缓冲液将 pH 值维持在一定范围内时, 在皮下或肌内注射时会产生较强烈的疼痛感, 而选用马来酸盐或琥珀酸盐这些类似的多元羧酸盐时, 却几乎不产生疼痛感。所以, 在上述研究的基础上, 成功制备了稳定性良好、注射时不会产生疼痛感的含有 hGH 的水性药物组合物。

本发明提供一种用于注射的含有人生长激素的水性药物组合物, 其中所述人生长激素被溶于含有苯扎氯铵的极弱或较弱酸性缓冲溶液中。

上述极弱或较弱酸性缓冲溶液的 pH 值以 5 ~ 7 为宜, 较好为 5.5 ~ 6.5, 更好的是 5.75 ~ 6.25, 特别好的是 6。

从稳定性的观点来看, 本发明组合物中所含的苯扎氯铵的量可确定在一个较宽的范围, 只要在制备过程中和长期保存过程中均可抑制微粒的产生。然而, 以 0.002 ~ 0.03mg/ml 的量为宜, 该量是皮下或肌内注射用药物制剂所允许的量, 更好的是 0.005 ~ 0.02mg/ml。

至于缓冲剂, 较合适的是将 pH 值调节在 7 以下, 较佳为不超过 6.5, 且具有将 pH 值保持在下限以上、不引起 hGH 沉淀的缓冲能力。具备将 pH 值维持在 5 ~ 7 的范围内, 更好是在 5.5 ~ 6.5 的范围内的缓冲液作用的缓冲剂将被优先选择, 具体例子包括马来酸盐、琥珀酸盐和柠檬酸盐。

只要能够保证缓冲能力, 对缓冲剂的浓度就没有特别的限定, 其浓度一般为

1 ~ 100mM, 较好为 1 ~ 50mM, 更好为 2 ~ 20mM。本说明书中, 术语“浓度”在指缓冲剂时, 是指包括构成缓冲液的游离有机酸及其一级解离或进一步解离形成的所有共轭碱在内的化学物的总浓度。

上述缓冲剂中, 较好的是马来酸盐和琥珀酸盐缓冲剂, 因为在皮下或肌肉内注射本发明组合物时不会因组分的缘故引起疼痛感。尤其好的是马来酸盐, 作为皮下或肌肉注射剂的缓冲剂已有丰富经验。

本发明进一步提供一种注射用含人生长激素的水性药物组合物, 其中所述的人生长激素被溶解于含苯扎氯铵的极弱或较弱酸性缓冲溶液中, 所用的缓冲剂为马来酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂, 特别好的是马来酸盐缓冲剂, 这样在注射时, 上述组合物就不会引起疼痛感。这种组合物不仅能保持较高的 hGH 稳定性, 而且, 大大减轻了患者在每次注射时的疼痛感, 因而有更多益处。

本发明中, 术语“人生长激素”或其简称“hGH”包括 191 个氨基酸组成的天然 hGH。对其起源没有特别限定, 可以通过任何途径获得, 如利用遗传重组技术或从垂体提取。此外, 该术语还包括利用遗传重组技术获得的具有 N-末端甲硫氨酸、由 192 个氨基酸组成的生理活性 hGH, 以及部分氨基酸缺失、被取代或被插入, 但与天然人生长激素的活性接近的其他变异物。

对包含在本发明组合物中的人生长激素的量没有特别的限定, 其上限为能溶于所用缓冲液的最大量, 下限为在一般制剂中的含量, 人生长激素的含量较好为 $\leq 10\text{mg/ml}$ 左右, 该量被这些制剂经常采用。

制备本发明的组合物时, 所用的苯扎氯铵可以是液体也可以是固体, 只要它是作为药品的添加剂所允许的级别即可。

注射剂的渗透压对皮下或肌肉注射尤为重要, 必须引起重视。注射剂低渗或高渗都会在注射时引发疼痛感。一般推荐注射溶液与生理盐水的相对克分子渗透压为 0.9 ~ 1.6, 较好为 1.0 ~ 1.4。

一般通过单独或混合添加 D-甘露糖醇和中性盐将本发明组合物的相对克分子渗透压浓度调整到上述范围内。D-甘露糖醇可将相对克分子渗透压浓度调整到 0.9 ~ 1.6, 较好为 1.0 ~ 1.4, 其量是每 1ml 本发明组合物中含 30 ~ 100mg。中性盐如氯化钠等, 也可将渗透压调整到 0.9 ~ 1.6, 较好为 1.0 ~ 1.4, 其量是每 1ml 本发明组合物中含 5 ~ 20mg。

目前, 作为药品使用的 hGH 剂量被控制在每周每公斤体重 0.5[IU], 因此其冻干制剂往往要分数次注射, 所以, 需要在保存期间常添加防腐剂以防止细菌等的感染。

添加到本发明组合物中的防腐剂的量以不影响 hGH 的质量，并能够发挥其防腐作用为佳。一般来说，最适合本发明组合物的防腐剂首推苯甲酸钠，另外也可使用苯甲酸、苯酚等。一般被应用于需在使用前溶解的冷冻 hGH 制剂中的苄醇、间甲酚和对羟基苯甲酸甲酯不被推荐用于本发明组合物，因为它们与苯甲酸钠、苯甲酸或苯酚相比，对脱酰氨基产物的形成会起促进作用。上述防腐剂的用量可参考通常用于注射剂的防腐剂用量方便地进行调整，例如，苯甲酸钠的用量一般是每 1ml 本发明组合物 0.1 ~ 5mg，较好为 0.5 ~ 3mg。

本发明组合物中还可包含非离子型表面活性剂，例如吐温 20 或吐温 80，当每 1ml 本发明组合物中的添加量为 0.5 ~ 5mg 时，更好为 1 ~ 2mg 时，虽然作用不是很大，但能够进一步提高稳定性。

制备本发明组合物的方法可参考常用的制备水性注射剂的方法。本发明组合物最好保存在凉爽的地方，温度最好为 2 ~ 8℃。

由于本发明组合物为水溶液，所以能够以比以往使用前需要溶解的制剂更为方便的形式供患者使用。采用传统的制备单一溶液型注射剂的方法将组合物装入容器时，较好的是在装瓶后排除气泡，以减少保存时振荡的影响，从而更加确保稳定性。

(稳定性试验)

hGH 中常会形成二聚物、聚合物和脱酰氨基产物，前两者可以用体积排除的 HPLC(SE-HPLC)测定，后者可以通过反相 HPLC(RP-HPLC)测定。另外，以已知生物活性为参照标准，用物理化学方法测定 hGH 已被接受为 hGH 生物检定的合适的测定方法，因为观察到 hGH 体积排除 HPLC 测定检出的单体峰面积与其生物活性有相关性(Yuki 等, Iyakuin Kenkyu, 25: 383 (1994))。因此，用这两种 HPLC 对 hGH 进行评估不仅能够测定单体和脱酰氨基产物，还能够测定 hGH 的生物活性。

本发明者们用上述测试方法对本发明的 hGH 水性制剂的稳定性进行测定的结果是，在 30℃ 和 40℃ 的温度下保存后检出了脱酰氨基产物的逐渐生成，由测定结果计算出的值表明，在温度为 4℃、pH 值为 5.5 ~ 6.5 的条件下，脱酰氨基产物的量被控制在 12% 以下。而且，在 4℃ 的温度下保存 1 年后，单体含量维持在 98% 左右，甚至更多。这些结果说明本发明的 hGH 水性药物组合物可以作为一种产品被保存在凉爽的地方，而不用象以往产品那样进行冷冻干燥。以下，将对稳定性研究的具体情况进行说明。

(测定方法)

按照 Yuki 等的方法(Iyakuhin Kenkyu, 25: 383 (1994)), 进行体积排除 HPLC 和反相 HPLC 测试.

1. 体积排除 HPLC(SE-HPLC)采用的柱子、洗脱液和流速等情况如下所示.

5 (1)柱子: TSK 凝胶 G3000SW_{XL}(7.8mm × 30cm)

(2)洗脱液: 0.2M 磷酸钠缓冲液(pH6.5), 0.2M 氯化钠

(3)流速: 0.6ml/min, 柱温: 室温, 测试时的波长: 280nm .

2. 反相 HPLC(RP-HPLC)采用的柱子、洗脱液和流速等情况如下所示.

(1)柱子: Vydac 214TP54 (4.6mm × 25cm)

10 (2)洗脱液: 50mM Tris-盐酸缓冲液(pH7.5): 正丙醇 = 71 : 29

(3)流速: 0.5ml/min, 柱温: 45 °C, 测试时的波长: 280nm .

(试验例 1)

[缓冲溶液 1]

15 每 1ml 20mM 柠檬酸盐缓冲溶液包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).

[缓冲溶液 2]

每 1ml 20mM 柠檬酸盐缓冲溶液包含 100mg D-甘露糖醇(pH6.0).

[缓冲溶液 3]

20 每 1ml 20mM 马来酸盐缓冲溶液包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).

[缓冲溶液 4]

每 1ml 20mM 马来酸盐缓冲溶液包含 100mg D-甘露糖醇(pH6.0).

[缓冲溶液 5]

25 每 1ml 20mM 琥珀酸盐缓冲溶液包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).

[缓冲溶液 6]

每 1ml 20mM 琥珀酸盐缓冲溶液包含 100mg D-甘露糖醇(pH6.0).

在上述 6 种缓冲溶液中分别加入等体积的 6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液, 轻轻混合后, 分别获得水性组合物 1 ~ 6(最终 pH 为 6). 然后, 用孔径为 0.22μm 的滤膜过滤每种溶液, 再吸入注射针筒中, 各为 1ml, 排出气泡后密封, 获得试样.

最后, 使上述每种水性制剂的一部分在 2 ~ 8 °C 温度下水平振荡(振幅为 20mm, 每分钟来回振荡 220 次)24 小时. 其结果如表 1 所示.

上述水性制剂中，制剂 2、4、6 都不含苯扎氯铵，当它们被分到注射器中并密封时，注意到痕量微粒的形成，微粒量随着振荡而增加。与此相反，水性制剂 1、3 和 5 都含有苯扎氯铵，在被分到注射器中并密封时，没有发现形成了微粒，而且，即使剧烈振荡，也不会形成微粒。至于由 SE-HPLC 测得的单体含量或由 RP-HPLC 测得的脱酰氨基产物量，则在振荡前和振荡后没有明显差别，而且添加了苯扎氯铵也不引起任何差异。上述结果暗示在包含 hGH 的水性制剂中，苯扎氯铵是一种能够有效抑制微粒形成的稳定剂。

表 1 稳定性和缓冲溶液中苯扎氯铵的存在之间的关系

水性 制剂	在分装和密封过程中			振荡 24 小时后		
	单体含量 (%)	脱酰氨基 产物的量	一般 外观	单体含量 (%)	脱酰氨基产 物的量(%)	一般 外观
1	99.1	2.9	无色,清澈, 无微粒产生	99.1	3.0	无色,清澈, 无微粒产生
2	99.2	2.9	无色,清澈, 产生微粒很少	99.2	3.1	无色,清澈, 微粒增加
3	99.2	2.8	无色,清澈, 无微粒产生	99.2	2.9	无色,清澈, 无微粒产生
4	99.2	2.8	无色,清澈, 产生微粒很少	99.2	2.9	无色,清澈, 微粒增加
5	99.1	2.5	无色,清澈, 无微粒产生	99.1	2.7	无色,清澈, 无微粒产生
6	99.2	2.4	无色,清澈, 产生微粒很少	99.1	2.6	无色,清澈, 微粒增加

10

(试验例 2)

在每 1ml 含 0.002 ~ 0.1mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇的 20mM 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)和马来酸盐缓冲液(pH6.0)中分别加入等体积的 6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液，轻轻混合(最终 pH 为 6)。然后，用孔径为 0.22μm 的滤膜过滤每种溶液，再吸入注射针筒中，各 1ml，排出气泡后密封。以它们的一般外观为基础进行评估，测定能有效抑制微粒形成的苯扎氯铵量。结果如表 2 所示。当每 ml 制剂中的苯扎氯铵含量达到 0.002 ~ 0.3mg 时，就能够观察到抑制效果。

15

表 2 苯扎氯铵浓度和抑制微粒产生效果的关系

苯扎氯铵 的浓度(mg/ml)	柠檬酸盐缓冲液	马来酸盐缓冲液
	一般外观	一般外观
0.05	略显混浊	无色, 清澈, 无微粒产生
0.03	无色, 清澈, 无微粒产生	无色, 清澈, 无微粒产生
0.02	无色, 清澈, 无微粒产生	无色, 清澈, 无微粒产生
0.01	无色, 清澈, 无微粒产生	无色, 清澈, 无微粒产生
0.005	无色, 清澈, 无微粒产生	无色, 清澈, 无微粒产生
0.002	无色, 清澈, 无微粒产生	无色, 清澈, 无微粒产生
0.001	无色, 清澈, 有微粒产生	无色, 清澈, 有微粒产生
0	无色, 清澈, 有微粒产生	无色, 清澈, 有微粒产生

(试验例 3)

分别将试验例 1 的水性制剂 1、3 和 5 放置在 40℃ 和 50℃ 恒温箱中, 时间为 0、3、7、10、14 和 21 天, 然后启封, 用 RP-HPLC 和 SE-HPLC 进行分析。其结果如表 3 所示。RP-HPLC 分析的结果与稳定性评估方程式相符合, 这就表明虽然会出现脱酰氨基产物的逐渐形成, 但当规定脱酰氨基产物上限为 12% 时, 这些制剂至少可以稳定保存 1 年。另一方面, 从 SE-HPLC 的分析结果可看出, 即使在 2 ~ 8℃ 的温度下保存 1 年, 单体含量也可维持在 98% 左右, 或者超过 98%。比较保存期间各时间点所取试样, 从这些 HPLC 测定所得结果, 未见各缓冲液之间的差异。

表 3 在 40 ℃ 和 50 ℃ 的温度下放置后的水性制剂 1、3 和 5 的稳定性

水性 制剂	在 40 ℃ 的温度下放置							
	单体含量(%) (SE-HPLC)				脱酰氨基产物的量(%) (RP-HPLC)			
	最初	7 天	14 天	21 天	最初	7 天	14 天	21 天
1	99.1	99.1	99.1	99.0	2.9	13.4	22.7	28.9
3	99.2	99.3	99.2	99.0	2.8	13.5	22.6	28.9
5	99.1	99.0	98.8	98.8	2.5	13.3	23.0	28.7
水性 制剂	在 50 ℃ 的温度下放置							
	单体含量(%) (SE-HPLC)				脱酰氨基产物的量(%) (RP-HPLC)			
	最初	7 天	14 天	21 天	最初	7 天	14 天	21 天
1	99.1	98.8	98.5	98.3	2.9	29.7	36.3	38.9
3	99.2	99.0	98.9	98.6	2.8	29.9	36.5	39.1
5	99.1	98.8	98.3	97.5	2.5	30.0	36.5	39.0

- (试验例 4)
- [缓冲溶液 7]
- 5 每 1ml 20mM 柠檬酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).
- [缓冲溶液 8]
- 每 1ml 20mM 马来酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).
- 10 [缓冲溶液 9]
- 每 1ml 20mM 琥珀酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇 (pH6.0).
- 在上述三种缓冲溶液中各加入等体积的 6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液，轻轻混合，分别获得水性制剂 7 ~ 9(最终 pH 为 6)。然后，用孔径为 0.22μm 的滤膜过滤
- 15 每种溶液，再吸入注射针筒中，各 1ml，排出气泡后密封，获得试样。然后将每种水溶液放置在 2 ~ 8 ℃ 的温度下，时间为 6 个月，分别在保存 0、1、3、6 个月后测定试样中单体含量、脱酰氨基产物量和一般外观的变化，结果如表 4 所示。在这些制剂中均未观察到微粒的形成。

表 4 水性制剂 7 ~ 9 在 2 ~ 8 ℃ 的温度下保存 6 个月的结果

水性 制剂	单体含量(%) (SE-HPLC)				脱酰氨基产物的量(%) (RP-HPLC)			
	最初	1 个月	3 个月	6 个月	最初	1 个月	3 个月	6 个月
7	99.0	99.0	99.0	99.1	2.4	2.4	3.7	4.2
8	99.2	99.3	99.1	99.0	2.3	2.3	3.6	4.0
9	99.1	99.0	98.9	98.9	2.4	2.5	3.7	4.3

(试验例 5)注射时的疼痛试验

为了测试组合物引起的皮下注射的疼痛感，分别在柠檬酸盐、马来酸盐或琥珀酸盐缓冲液(最初 pH6.0)中添加适量的 D-甘露糖醇制得注射用制剂，它们与生理盐水的克分子渗透压浓度比为 1.1。由于测试的目的是检测上述各缓冲液所造成的疼痛感，所以其中没有添加 hGH。充分解释了测试目的后，进行测试，即给十个健康男性志愿者注射以下三种制剂，测定疼痛程度。这三种制剂的测试采用的是盲法。疼痛程度用以下四种方式表示：(++)表示很疼，(+)表示较疼，(±)表示有点疼，(-)表示不疼。

- 配方 1： 10mM 柠檬酸盐缓冲液 + D-甘露糖醇(pH6.0)
- 配方 2： 10mM 马来酸盐缓冲液 + D-甘露糖醇(pH6.0)
- 配方 3： 10mM 琥珀酸盐缓冲液 + D-甘露糖醇(pH6.0)

表 5

注射时的疼痛感和缓冲液

的关系(每组十个试样)

配方	(++)	(+)	(±)	(-)
配方 1	10	0	0	0
配方 2	0	0	0	10
配方 3	0	0	1	9

测试结果如表 5 所示。表中的数据表示给出相应判断的受试者的人数。全部十名受试者都认为注射了以柠檬酸盐为基础组分制得的制剂后“很疼”，而注射了以马来酸盐为基础组分制得的制剂后“不疼”。另外，九名受试者认为注射了以琥珀酸盐为基础组分制得的制剂后“不疼”，仅有一名受试者认为“有点疼”。上述结果表明注射了以马来酸盐或琥珀酸盐为基础组分制得的制剂后，没有疼痛

感，或只有一点点疼，与此相反，注射了以柠檬酸盐为基础组分制得的制剂后会引起很强的疼痛感。

(试验例 6)

[缓冲溶液 10]

5 每 1ml 20mM 柠檬酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵、 50mg D-甘露糖醇、 5mg 氯化钠和 2mg 苯甲酸钠(pH6.0).

[缓冲溶液 11]

 每 1ml 20mM 马来酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵、 50mg D-甘露糖醇、 5mg 氯化钠和 2mg 苯甲酸钠(pH6.0).

10 [缓冲溶液 12]

 每 1ml 20mM 琥珀酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵、 50mg D-甘露糖醇、 5mg 氯化钠和 2mg 苯甲酸钠(pH6.0).

 在上述三种缓冲溶液中加入等体积的 6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液，轻轻混合，分别获得水性制剂 10 ~ 12(最终 pH 为 6). 然后，用孔径为 0.22μm 的滤膜过滤每

15 种溶液，再吸入注射针筒中，各 1ml，排出气泡后密封，获得试样。然后将每种水溶液放置在 40 ℃ 和 50 ℃ 的温度下， 21 天后打开，用 RP-HPLC 和 SE-HPLC 进行分析，其结果如表 6 所示.

表 6 水性制剂 10 ~ 12 的分析结果

水性 制剂	单体含量(%) (SE-HPLC)				脱酰氨基产物量(%) (RP-HPLC)			
	40 ℃		50 ℃		40 ℃		50 ℃	
	最初	21 天后	最初	21 天后	最初	21 天后	最初	21 天后
10	99.2	99.1	99.2	98.5	2.3	28.0	2.3	38.1
11	99.4	99.2	99.4	98.5	2.3	27.9	2.3	37.9
12	99.2	98.9	99.2	98.0	2.4	28.0	2.4	38.3

20

 在 40 ℃ 和 50 ℃ 的温度下保存 21 天后，任何一种水性制剂中的单体含量都没有什么变化，而脱酰氨基产物的形成在上述试验例 3 所述预期的长期稳定性限度内，即足以预期 1 年的稳定性。

25

(试验例 7)

[缓冲溶液 13]

每 1ml 20mM 马来酸盐缓冲液中包含 0.02mg 苯扎氯铵和 100mg D-甘露糖醇钠(pH6.0).

5 在上述缓冲溶液 13 中加入等体积的 20.4mg/ml 天然 hGH 水溶液, 轻轻混合, 获得水性制剂 13(最终 pH 为 6). 然后, 用孔径为 0.22μm 的滤膜过滤该溶液, 再吸入注射针筒中, 各 1ml , 排出气泡后密封, 获得试样. 然后将该水性制剂 13 保温于 40 ℃ 和 50 ℃ 的温度下, 21 天后打开, 用 RP-HPLC 和 SE-HPLC 进行分析, 其结果如表 7 所示.

10

表 7 水性制剂 13 的分析结果

水性 制剂	单体含量(%) (SE-HPLC)				脱酰氨基产物量(%) (RP-HPLC)			
	40 ℃		50 ℃		40 ℃		50 ℃	
	最初	21 天后	最初	21 天后	最初	21 天后	最初	21 天后
13	99.2	98.8	99.2	97.1	2.2	28.5	2.2	39.6

在 40 ℃ 和 50 ℃ 放置 21 天后, 该水性制剂的单体含量没有什么变化, 而脱酰氨基产物的形成在上述试验例 1 所述预期的长期稳定性限度内, 即足以预期 1

15 年的稳定性.

以下, 参照实施例对本发明进行更为详细的说明, 但应当注意, 本发明并不仅限于这些实施例, 可以增加或减少以下实施例中所述每种组分的量或浓度, 也可用其他组分代替一种或多种实施例中的组分, 或者添加其他组分.

(实施例 1)

20 按照如下配方将各组分进行混合, 制得缓冲溶液, 然后添加以下所述 hGH 溶液, 再通过过滤灭菌, 获得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
D-甘露糖醇	100mg
20mM 柠檬酸盐缓冲液	适量
总量	1ml (pH6.0)

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

(实施例 2)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

5

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
D-甘露糖醇	100mg
20mM 马来酸盐缓冲液	适量
总量	1ml (pH6.0)

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

10

(实施例 3)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
D-甘露糖醇	100mg
20mM 琥珀酸盐缓冲液	适量
总量	1ml (pH6.0)

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

15

(实施例 4)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
D-甘露糖醇	50mg
氯化钠	5mg
苯甲酸钠	2mg
20mM 柠檬酸盐缓冲液	适量
总量	1ml (pH6.0)

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

(实施例 5)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

5

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
------	--------

D-甘露糖醇	50mg
--------	------

氯化钠	5mg
-----	-----

苯甲酸钠	2mg
------	-----

20mM 马来酸盐缓冲液	适量
--------------	----

总量	1ml (pH6.0)
----	-------------

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

(实施例 6)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

10

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.02mg
------	--------

D-甘露糖醇	50mg
--------	------

氯化钠	5mg
-----	-----

苯甲酸钠	2mg
------	-----

20mM 琥珀酸盐缓冲液	适量
--------------	----

总量	1ml (pH6.0)
----	-------------

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

(实施例 7)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

15

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.002mg
------	---------

D-甘露糖醇	100mg
--------	-------

20mM 马来酸盐缓冲液	适量
--------------	----

总量	1ml (pH6.0)
----	-------------

[hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml

(实施例 8)

与实施例 1 同样操作, 按照如下配方制得注射用制剂(最终 pH 为 6.0).

[缓冲溶液]

苯扎氯铵	0.01mg
------	--------

D-甘露糖醇	100mg
--------	-------

20mM 马来酸盐缓冲液	适量
--------------	----

总量	1ml (pH6.0)
----	-------------

5 [hGH 溶液]

6.8mg/ml 天然 hGH 水溶液 . . . 1ml