

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610147971.4

[51] Int. Cl.

A61K 9/12 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 2 日

[11] 公开号 CN 101209242A

[22] 申请日 2006.12.26

[21] 申请号 200610147971.4

[71] 申请人 信谊药厂

地址 201206 上海市新金桥路 905 号

[72] 发明人 潘邻霖 陈彬华 高原 夏凌云
周明慧

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陈哲锋

权利要求书 1 页 说明书 24 页

[54] 发明名称

一种重组人表皮生长因子喷雾剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种重组人表皮生长因子喷雾剂，它包括重组人表皮生长因子、表面活性剂、保护剂以及药学上可接受的载体，其中所述喷雾剂包含传递体，且至少 80% 的传递体的粒径是均一的。本发明还提供了制造上述喷雾剂的方法。

1. 一种重组人表皮生长因子喷雾剂, 它包括重组人表皮生长因子、表面活性剂、保护剂以及药学上可接受的载体, 其中所述喷雾剂包含传递体, 且至少 80% 的传递体的粒径是均一的。

2. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于至少 85%、较好至少 90%、更好至少 95%、最好至少 99% 的所述传递体的粒径是均一的。

3. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于所述重组人表皮生长因子的用量是 0.5-20 μ g/ml, 较好为 1-15 μ g/ml, 更好为 2-10 μ g/ml。

4. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于所述表面活性剂包括磷脂类(例如卵磷脂等)、聚氧乙烯氧丙烯共聚物类(例如 Pluronic F-68 等)、吐温-80、司盘-85、油酸、胆酸盐中的一种或多种。

5. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于所述表面活性剂的用量为 0.05-0.5g/ml, 较好为 0.1-0.4g/ml, 更好为 0.15-0.25g/ml。

6. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于所述保护剂包括聚乙二醇类(例如 PEG400 等)、白蛋白、 β -环糊精及其衍生物, 聚维酮, 玻璃酸钠, 羟丙基甲基纤维素中的一种或多种。

7. 如权利要求 1 所述的喷雾剂, 其特征在于所述保护剂的用量为 0.01-0.5g/ml, 较好为 0.02-0.3g/ml, 更好为 0.05-0.15g/ml。

8. 一种制备所述重组人表皮生长因子喷雾剂的方法, 所述方法包括:

(a) 用水溶解重组人表皮生长因子, 并分散在保护剂中, 得到溶液 A;

(b) 用溶剂溶解表面活性剂, 得到溶液 B;

(c) 将溶液 A 加入到溶液 B 中, 搅拌混匀得到溶液 C;

(d) 将溶液 C 经超声雾化器在 1.0-2.5MHz 频率下于 10-60°C 超声雾化后, 通入正在搅拌的缓冲液中, 或者, 将溶液 C 加入缓冲液后再搅拌, 得到的所述喷雾剂。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述超声雾化的频率为 1.5-1.7MHz; 和/或, 超声雾化的温度为 15-50°C, 更好为 20-40°C。

10. 一种由权利要求 8 所述方法制备的重组人表皮生长因子喷雾剂。

一种重组人表皮生长因子喷雾剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种生物制剂及其制备方法，具体涉及一种重组人表皮生长因子喷雾剂及其制备方法。

背景技术

人表皮生长因子（hEGF）是人体重要的多肽，它具有多种生物学功能，例如可与表皮细胞上特异的受体结合，将信息传递入细胞，改变细胞内的酸碱度和游离钙度，从而促进糖酵解和蛋白质合成以及增加某些专一性基因转录，促进 DNA 复制和细胞分裂。因此，hEGF 可促进表皮细胞、神经细胞和器官组织上皮细胞生长；可促进新生胎儿齿、骨与各器官的生长；可促进肝细胞再生；可促进胃肠道黏膜细胞生长和保护胃肠道黏膜受损。

重组人表皮生长因子（rhEGF）是通过基因工程技术将大肠杆菌或酵母分泌表达而来的，其制品纯度可达 98%。重组人表皮生长因子属于分子量超过 500 道的大分子多肽类药物。因该类药物分子量大，亲水性强且带电荷，所以将其透皮给药吸收存在难点。目前，市售的深圳市华生原基因工程发展有限公司生产的“金因肽”喷雾剂所用原料是重组人表皮生长因子的衍生物，为增加稳定性而对 rhEGF 蛋白做了一定的修饰。但是经过修饰的 rhEGF 比原构型的 rhEGF 效价低，而且没有从根本上解决 rhEGF 在室温贮存的稳定性问题。市售的 rhEGF 喷雾剂只能于 2~8℃ 低温条件保存，不宜于随身携带，使用不方便。

另外，市售的 rhEGF 系普通的溶液制剂，透皮吸收率低。例如在深 II 度烧伤创面愈合早期，创面出现水肿，表面存在坏死组织，从而使局部应用的 rhEGF 无法穿透该层组织作用到皮肤的上皮细胞，造成治疗起效慢，伤口愈合时间长。

而且，市售 rhEGF 喷雾剂是以 10% 的甘油和 1.0% 甘露醇为保护剂，因此对甘油、甘露醇有过敏史者不宜使用，且使用时会出现红疹等过敏反应。

因此，目前急需一种新的 rhEGF 喷雾剂，它并没有上述缺陷。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种重组人表皮生长因子（rhEGF）喷雾剂，所述 rhEGF 保持了蛋白的原有构型，且效价高，可常温贮存，便于使用。所述喷雾剂透皮吸收率高，起效快，伤口愈合时间短。

本发明的另一个目的是提供上述重组人表皮生长因子喷雾剂的制备方法。

本发明一方面提供了一种重组人表皮生长因子喷雾剂，它包括重组人表皮生长因子、表面活性剂、保护剂以及药学上可接受的载体，其中所述喷雾剂包含传递体，且至少 80% 的传递体的粒径是均一的。

在本发明的一个优选实例中，至少 85%、较好至少 90%、更好至少 95%、最少至少 99% 的所述传递体的粒径是均一的。

在本发明的一个优选实例中，所述重组人表皮生长因子的用量是 0.5-20 μ g/ml，较好为 1-15 μ g/ml，更好为 2-10 μ g/ml。

在本发明的一个优选实例中，表面活性剂包括磷脂类、聚氧乙烯氧丙烯共聚物类、吐温-80、司盘-85、油酸、胆酸盐中的一种或多种。

在本发明的一个优选实例中，所述表面活性剂的用量为 0.05-0.5g/ml，较好为 0.1-0.4g/ml，更好为 0.15-0.25g/ml。

在本发明的一个优选实例中，所述保护剂包括聚乙二醇类、白蛋白、 β -环糊精及其衍生物，聚维酮，玻璃酸钠，羟丙基甲基纤维素中的一种或多种。

在本发明的一个优选实例中，所述保护剂的用量为 0.01-0.5g/ml，较好为 0.02-0.3g/ml，更好为 0.05-0.15g/ml。

本发明另一方面提供了一种制备所述重组人表皮生长因子喷雾剂的方法，所述方法包括：

- (a) 用水溶解重组人表皮生长因子，并分散在保护剂中，得到溶液 A；
- (b) 用溶剂溶解表面活性剂，得到溶液 B；
- (c) 将溶液 A 加入到溶液 B 中，搅拌混匀得到溶液 C；
- (d) 将溶液 C 经超声雾化器在 1.0-2.5MHz 频率下于 10-60℃ 超声雾化后，通入正在搅拌的缓冲液中，或者，将溶液 C 加入缓冲液后再搅拌，得到的所述喷雾

剂。

在本发明的一个优选实例中，所述超声雾化的频率为 1.5-1.7MHz；和/或，超声雾化的温度为 15-50℃，更好为 20-40℃。

本发明还提供了一种由本发明所述方法制备的重组人表皮生长因子喷雾剂。

本发明的重组人表皮生长因子喷雾剂比普通的水溶性制剂具有许多优点：

(1) 本发明重组人表皮生长因子喷雾剂的物理、化学稳定性以及生物学稳定性更好。

(2) 本发明重组人表皮生长因子喷雾剂使大分子多肽类药物能很容易透过皮肤屏障，进入皮肤深层甚至进入体循环而发挥作用，有利于治疗深层皮肤损伤。

具体实施方式

在本发明中，所用术语“传递体”指一种自聚集泡囊，其主要成分为磷脂和表面活性剂，所述传递体的粒径多在 10-100 纳米之间，外观为胶体溶液。所述传递体通过自身膜的高度变形性，以渗透压差为驱动力，能穿透比它本身小数倍孔道的类脂聚集体。例如，将所述传递体非封闭地涂抹于皮肤上，可透过直径约为 0.4 纳米的皮肤角质层孔道。

在本发明中，所述术语“均一”表示用激光散射粒度分布测定仪测定粒径时为一个峰。

本发明提供了一种重组人表皮生长因子喷雾剂，它包括重组人表皮生长因子、表面活性剂、保护剂以及药学上可接受的载体，其中所述喷雾剂包含传递体，且至少 80% 的传递体的粒径是均一的。

在本发明的喷雾剂中，所述重组人表皮生长因子在本领域中是常规的。它可从商业市场上购得。在本发明的一个实例中，所述重组人表皮生长因子购自中科院上海生物化学研究所。

在本发明的喷雾剂中，所述重组人表皮生长因子的用量在本领域中是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述结合常识可以直接推导出其具体的用量。在本发明的一个优选实例中，所述重组人表皮生长因子的用量是 0.5-20 $\mu\text{g/ml}$ ，较好为 1-15 $\mu\text{g/ml}$ ，更好为 2-10 $\mu\text{g/ml}$ 。

通常，以所述喷雾剂的总重量计，所述重组人表皮生长因子在喷雾剂中的百分含量为 0.000005-0.0002 重量%，较好为 0.00001-0.00015 重量%，更好为 0.00002-0.0001 重量%。

在本发明的喷雾剂中，所述表面活性剂是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述，可以直接推导出哪些表面活性剂可用于本发明中。在本发明的一个优选实例中，所述表面活性剂包括磷脂类（例如卵磷脂等）、聚氧乙烯氧丙烯共聚物类（例如 Pluronic F-68 等）中的一种或多种。在本发明的另一个优选实例中，所述表面活性剂选自吐温-80、司盘-85、油酸、胆酸盐中的一种或多种。

在本发明的喷雾剂中，所述表面活性剂的用量是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接推导出其具体用量。在本发明的一个优选实例中，所述表面活性剂的用量为 0.05-0.5g/ml，较好为 0.1-0.4g/ml 重量份，更好为 0.15-0.25g/ml。

通常，以所述喷雾剂的总重量计，所述表面活性剂的百分含量为 5-20 重量%，较好为 7.5-15 重量%，更好为 10-12 重量%。

在本发明的喷雾剂中，所述保护剂是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接推导出哪些保护剂可用于本发明中。在本发明的一个优选实例中，所述保护剂包括聚乙二醇类（例如 PEG400 等）和白蛋白中的一种或多种。在本发明的另一个优选实例中，所述保护剂选自 β -环糊精及其衍生物、聚维酮、玻璃酸钠、羟丙基甲基纤维素中的一种或多种。

在本发明的喷雾剂中，所述保护剂的用量是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接推导出其具体用量。在本发明的一个优选实例中，所述保护剂的用量为 0.01-0.5g/ml，较好为 0.02-0.3g/ml，更好为 0.05-0.15g/ml。

通常，以所述喷雾剂的总重量计，所述表面活性剂的百分含量为 1-5 重量%，较好为 1.5-4 重量%，更好为 2-3 重量%。其中，如果存在白蛋白的话，所述白蛋白的重量百分含量通常为 0.001-0.05 重量%，较好为 0.005-0.03 重量%，更好为 0.008-0.02 重量%，最好为 0.01 重量%。

在本发明的喷雾剂中，所述药学上可接受的载体是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接推导出哪些药学上可接受的载体可用于本发明中。在本发明的一个优选实例中，所述药学上可接受的载体包括溶剂和缓冲液等。

在本发明的喷雾剂中，所述溶剂是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接得到哪些溶剂可用于本发明中。在本发明的一个优选实例中，所述溶剂包括短链醇（例如 C1-C6 醇，如乙醇、丙二醇等）。

在本发明的喷雾剂中，所述缓冲液是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接得到哪些缓冲液可用于本发明中。在本发明的一个优选实例中，所述缓冲液包括 10mmol 的磷酸盐缓冲液（pH6.2）。

在本发明的喷雾剂中，所述溶剂的用量是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接得到其具体用量。通常，所述溶剂的用量只要能溶解上述重组人表皮生长因子、表面活性剂和保护剂即可。在本发明的一个优选实例中，所述溶剂的用量为 0.001-1g/ml，较好为 0.005-0.5g/ml，更好为 0.01-0.2g/ml，最好为 0.03-0.05g/ml。

在本发明的喷雾剂中，所述缓冲液的用量是常规的，本领域的普通技术人员根据本发明的描述可以直接得到其具体用量。通常，所述缓冲液用于将所述重组人表皮生长因子的含量调节到所需的水平，例如 0.5-20 μ g/ml。

在本发明中，所述喷雾剂包含传递体，且至少 80% 的所述传递体的粒径是均一的，较好至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 的所述传递体的粒径是均一的。

本发明还提供了一种制备所述重组人表皮生长因子喷雾剂的方法，所述方法包括：

- (a) 用水溶解重组人表皮生长因子，并分散在保护剂中，得到溶液 A；
- (b) 用溶剂溶解表面活性剂，得到溶液 B；
- (c) 将溶液 A 加入到溶液 B 中，搅拌混匀得到溶液 C；

(d) 将溶液 C 经超声雾化器在 1.0-2.5MHz 频率下于 10-60℃ 超声雾化后，通入正在搅拌的缓冲液中，或者，将溶液 C 加入缓冲液后再搅拌，得到的所述喷雾剂。

在上述方法中，得到所述溶液 A 的步骤是常规的。在本发明的一个优选实例中，首先用去离子水溶解重组人表皮生长因子，并搅拌约 4 小时，得到溶液；然后将所得溶液分散于保护剂中，于 40-50℃ 搅拌 4-8 小时，得到所述溶液 A。在本发明的另一个优选实例中，首先用去离子水溶解重组人表皮生长因子和一部分保护剂

(例如白蛋白等),同时搅拌约4小时,得到溶液;将所得溶液分散在剩余保护剂(例如PEG400等)中,于40-50℃搅拌4-8小时,得到所述溶液A。

在所述步骤(d)中,所述超声雾化器的频率通常为1.0-2.5MHz,较好为1.5-1.7MHz。另外,超声雾化的温度通常为10-60℃,较好为15-50℃,更好为20-40℃。

在所述步骤(d)中,搅拌所述缓冲液的搅拌器转速并没有具体限定,只要能将所述溶液C充分分散于缓冲液中即可。通常,所述转速为10-100rpm,较好为20-80rpm,更好为50-75rpm。

在上述方法中,所得喷雾剂的pH为5.0-7.0。在本发明的一个优选实例中,所述pH为6.0-6.8,较好为6.2。

下面结合实施例细说明本发明,这些实施例只是用于举例说明的目的,并没有限制本发明的范围。

实施例

测试方法:

使用HORIBA公司的LA-950型号激光散射粒度分布测定仪测定传递体的粒径及粒径分布。

使用1%磷钼酸负染色制备样品,通过透射电镜观测传递体的形态。

rhEGF含量测定

使用放射免疫分析药盒(购自北京华清生化技术研究所),利用均相竞争抑制原理,即抗hEGF抗体与¹²⁵I-hEGF和EGF标准(或待测样品)于4℃孵育24小时后,加入分离剂,离心弃上清液,用放射免疫γ计数器(购自上海核福光电仪器有限公司,SN-682型)测定放射性计数,根据logitB/B0-log标准曲线,计算样品中hEGF浓度。

包封率的测定

包封率测定通过葡聚糖凝胶柱色谱法测定,柱层析条件为Sephadex G-50

(17cm×3cm)；洗脱液为 10mmol 磷酸盐缓冲液 (pH6.2)，流速 1 毫升/分钟，温度为室温 (25℃)。每 3 毫升收集一次层析液，测定 rhEGF 的含量，分别得经柱分离出的载体包裹含药量和总药量，根据下列公式计算包封率。

$$\text{包封率}\% = \text{经柱分离的载体包裹含药量} / \text{总药量} \times 100\%$$

体外透皮率的测定

离体鼠皮的制备

取体重为 150-170g 的 SD 大鼠，用 8% 的硫化钠溶液背部脱毛，然后用生理盐水洗净皮肤，自然饲养 24 小时。次日实验前处死，立即剥离腹部皮肤，接着分离皮下脂肪和组织。选用无破损的皮肤浸泡于生理盐水中，置于冰箱内冷藏 (0—4℃) 12 小时后备用。

离体透皮试验

将大鼠皮肤自然固定在改良的 Franz 扩散池上 (扩散面积 $S=2.5\text{cm}^2$)，使皮肤表面面向给药室，皮肤里层与接受液 (即生理盐水，接受池容积 10ml) 刚好接触。将所述样品均匀喷在鼠皮表面。将扩散池置于恒温磁力搅拌器内，使温度控制在 $37\pm1^\circ\text{C}$ ，转速为 $30\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。搅拌 12h 后取接收液 10ml。

将所取得接收液用 $0.45\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤，进行 rhEGF 的含量测定，计算透皮量。

$$\text{透皮吸收率}\% = \text{透皮量} / \text{给药量} \times 100\%。$$

实施例 1

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	乙醇	0.3kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	人血白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
(pH6.2) 加至		

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，并采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器于 40℃ 搅拌 5 小时，得到溶液 A。

将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司药用注射级）和上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用乙醇（购自上海振兴化工一厂药用级）溶解，得溶液 B。

将溶液 A 加入溶液 B 中，经 78HW-1 型磁力恒温搅拌器于室温搅拌 1 小时，采用 NS1001L 型高压均质机高压均质后，得到溶液 C。

将溶液 C 经 MDSIN 大雾量型超声波雾化器（型号 M230852，雾化频率：1.5-1.7MHz，雾化温度：40℃）超声雾化后，通入正在搅拌（H 型电动搅拌机，上海瑞柯坤泰贸易有限公司）的磷酸盐缓冲液中，待溶液 C 完全加入后再搅拌 1 小时。

取样测 pH 值（PHS-3C 型 pH 计），将 pH 值控制在 5.0-7.0 范围内。

药液经囊式过滤器粗滤后，经 0.20μm 微孔滤膜（购自 PALL 公司的无菌过滤膜）除菌，每瓶灌装 10±1ml。

实施例 2

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 50℃下搅拌 6 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司药用注射级）和上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 3

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	1kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 45℃搅拌 8 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）和 P 上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 4

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	2kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 47℃ 搅拌 4 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 5

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	2kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀区会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 44℃ 搅拌 7 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）和 P 上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 6

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	1.5kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的 rhEGF（购自中科院上海生物化学研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）和 P 上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 7

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（2000IU/ml）

活性成分	rhEGF	20mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
溶剂	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 47℃搅拌 4 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）和 P 上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 8

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（10000IU/ml）

活性成分	rhEGF	100mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	丙二醇	0.5kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	白蛋白	1g
溶剂	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	（pH6.2）加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后将该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器在 47℃搅拌 4 小时，得到溶液 A。

再将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司，药用注射级）和 P 上述重量的 Pluronic F-68（购自 BASF 公司）用上述重量的丙二醇（购自上海浦顺进出口有限公司，药用级）溶解，得溶液 B。

其余步骤同实施例 1。

实施例 1—8 所得喷雾剂中传递体的粒径分布数据见表 1:

处方	表 1			
	数均粒径 (nm)		粒径分布 (%)	
	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2
实施例 1	79.2	--	100.0	--
实施例 2	73.4	--	100.0	--
实施例 3	81.6	--	100.0	--
实施例 4	78.7	--	100.0	--
实施例 5	80.5	--	100.0	--
实施例 6	77.9	--	100.0	--
实施例 7	79.1	--	100.0	--
实施例 8	83.3	--	100.0	--

实施例 9

重组人表皮生长因子喷雾剂（每 1000 瓶）（5000IU/ml）

活性成分	rhEGF	50mg
表面活性剂	卵磷脂	1kg
表面活性剂	Pluronic F-68	0.5kg
溶剂	乙醇	0.3kg
保护剂	PEG-400	0.5kg
保护剂	人血白蛋白	1g
缓冲液	10mmol 磷酸盐缓冲液	10L
	(pH6.2) 加至	

用水 50ml 溶解上述重量的重组人表皮生长因子（购自中科院上海生物化学研究所）和上述重量的人血白蛋白（购自上海生物制品研究所）得到溶液，将所得溶液搅拌 4 小时。然后该溶液分散于上述重量的 PEG400（购自北京市海淀会友化工，药用级）中，并采用 78HW-1 型磁力恒温搅拌器于 40℃ 搅拌 5 小时，得到溶液 A。

将上述重量的卵磷脂（购自上海太伟药业有限公司药用注射级）和上述重量

的 Pluronic F-68 (购自 BASF 公司) 用乙醇 (购自上海振兴化工一厂药用级) 溶解, 得溶液 B。

将溶液 A 加入溶液 B 中, 经 78HW-1 型磁力恒温搅拌器于室温搅拌 1 小时, 采用 NS1001L 型高压均质机高压均质后, 得到溶液 C。

将溶液 C 经 MDSIN 大雾量型超声波雾化器 (型号 M230852, 雾化频率: 1.5-1.7MHz, 雾化温度: 40℃) 超声雾化后完全加入磷酸盐缓冲液中, 然后再搅拌 (H 型电动搅拌机, 上海瑞柯坤泰贸易有限公司) 1 小时。

取样测 pH 值 (PHS-3C 型 pH 计), 将 pH 值控制在 5.0~7.0 范围内。

药液经囊式过滤器粗滤后, 经 0.20μm 微孔滤膜 (购自 PALL 公司的无菌过滤膜) 除菌, 每瓶灌装 10±1ml。

实施例 10

制备工艺的确定

如实施例 1 所示配方和方法制备重组人表皮生长因子喷雾剂, 不同的是如下表 2 所示改变制备工艺。

表 2						
工艺方法		数均粒径		粒径分布		电镜观测形态
		(nm)		(%)		
		Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	
传统技术	将溶液 C 直接加入搅拌的缓冲液中	101.3	361.5	24.3	75.7	粒径大小不均
						一，多室和单室传递体共存
实施例 9	将溶液 C 超声雾化加入缓冲液，然后再搅拌	86.4	241.8	90.1	9.9	粒径大小均一，
						有少量大粒径多室传递体共存
实施例 1	将溶液 C 超声雾化加入搅拌中的缓冲液里	79.2	--	100.0	--	粒径大小均一，
						几乎为小粒径单室传递体

由以上数据可见, 实施例 1 和实施例 9 的制备工艺较传统技术取得的效果好,

而实施例 1 中的制备工艺较实施例 9 中的制备工艺更好,制备的传递体粒径更均一。

实施例 11

超声雾化参数的确定

如实施例 1 所示配方和方法制备重组人表皮生长因子喷雾剂,不同的是如下表 3 和 4 所示改变制备工艺。

表 3

超声雾化强度	包封率 (%)	数均粒径 (nm)		粒径分布 (%)	
		Peak1	Peak2	Peak1	Peak2
0.8~1.0 MHz	54.33	93.5	--	100.0	--
1.5~1.7 MHz	57.62	81.1	--	100.0	--
2.5~2.7 MHz	40.31	60.2	--	100.0	--

表 4

超声雾化温度	包封率 (%)	数均粒径 (nm)		粒径分布 (%)	
		Peak1	Peak2	Peak1	Peak2
20℃	55.71	79.15	--	100.0	--
40℃	56.83	80.33	--	100.0	--
60℃	25.68	76.12	--	100.0	--

由上表 3 可知,当采用超声雾化法时,超声强度不宜过大,当强度超过 2.5MHz 时,所制备的传递体被部分破坏,包封率有所下降。另外,超声强度不宜过小,当强度小于 1.0MHz 时,传递体不能充分分散于缓冲液中,其粒径有所增加。

由上表 4 可知,当采用超声雾化法时,超声雾化温度不宜过高,当温度超过 60℃时,传递体的包封率明显下降。

实施例 12

表面活性剂的筛选

如实施例 1 所示配方和方法制备重组人表皮生长因子喷雾剂，不同的是使用如下表 5 所示的表面活性剂。

表 5

表明活性剂种类	用量 (wt%)	包封率 (%)	透皮吸收率 (%)
磷脂	15%	12.53	3.63
磷脂:胆酸钠	10%:5%	46.74	20.35
磷脂:Pluronic F-68	10%:5%	55.97	53.71
磷脂:吐温 80	10%:5%	21.33	17.84
磷脂:司盘 80	10%:5%	13.61	5.47
磷脂:油酸钠	10%:5%	17.15	8.64
磷脂:聚氧乙烯蓖麻油	10%:5%	25.72	13.69
磷脂:十二烷基硫酸钠	10%:5%	9.11	7.86

如实施例 1 所示配方和方法制备重组人表皮生长因子喷雾剂，不同的是使用如下表 6 所示的表面活性剂及其用量。

表 6

表面活性剂种类	用量 (wt%)	包封率 (%)	透皮吸收率 (%)
磷脂:Pluronic F-68	10%:5%	55.97	53.71
磷脂:Pluronic F-68	10%:10%	58.63	54.33
磷脂:Pluronic F-68	5%:10%	25.38	39.52

由上表可知，单独使用磷脂作为表面活性剂，则透皮吸收率低；当使用混合表面活性剂时，包封率和透皮吸收率最佳。

另外，通过比较不同比例的混合表面活性剂（磷脂:Pluronic F-68）制得的喷雾剂的包封率和透皮吸收率，发现磷脂:Pluronic F-68 之比优选大于 2:1。

实施例 13

如实施例 1 所示配方和方法制备重组人表皮生长因子喷雾剂，不同的是使用如下表 7 所示的保护剂。

表 7

保护剂种类	不使用保护剂	PEG-400	人血白蛋白	PEG-400+人血白蛋白
零天包封率（%）	41.62	55.84	43.11	56.72
保存时间	活性测定（IU/瓶）			
0 天	5.05×10 ⁴	4.91×10 ⁴	5.16×10 ⁴	5.07×10 ⁴
40℃ 1 个月	3.43×10 ⁴	4.26×10 ⁴	4.08×10 ⁴	5.01×10 ⁴

由上表可知，PEG400 和人血白蛋白对 rhEGF 都有保护作用。在高温（例如 40℃）条件下，能使 rhEGF 免受失活。而且，联合使用 PEG400 和人血白蛋白的作用更佳。

因此，加入保护剂（例如 PEG400 和人血白蛋白）后，可使重组人表皮生长因子喷雾剂的贮存稳定性提高，从而克服了现有制剂需低温贮存的缺陷。

实施例 14

稳定性实验

rhEGF 喷雾剂经稳定性考验后的活性测定

考验时间	实施例 7	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	9 月	12 月	18 月
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	25℃	2.01	2.11	1.94	1.99	2.05	1.97	2.09	1.92
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	40℃	2.01	1.94	2.05	2.14	2.08	--	--	--
考验时间	实施例 1	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	9 月	12 月	18 月
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	25℃	5.15	4.97	4.65	4.72	4.76	5.16	4.75	4.83
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	40℃	5.15	4.67	4.88	4.87	4.95	--	--	--
考验时间	实施例 8	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	9 月	12 月	18 月
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	25℃	10.13	9.87	10.09	9.91	10.03	9.95	10.17	9.93
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	40℃	10.13	10.08	9.94	10.11	9.84	--	--	--
考验时间	金因肽*	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	9 月	12 月	18 月
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	25℃	2.11	1.92	2.05	1.96	1.65	1.32	1.04	0.75
活性测定 ($\times 10^3$ IU/ml)	40℃	2.11	1.73	1.64	1.21	0.94	--	--	--

*：深圳市华生元基因工程发展有限公司生产的 rhEGF 喷雾剂，其效价约为 2000IU/ml

金因肽喷雾剂规格为 2000IU/ml，25℃时不到 9 个月效价下降了 500IU/ml，40℃时不到 3 个月效价下降了 500IU/ml。

实施例 7 喷雾剂规格为 2000IU/ml，在 25℃和 40℃下保存，效价几乎没有下

降，效价范围在 5000±500IU/ml 内。

实施例 1 和实施例 8 喷雾剂规格分别为 5000IU/ml 和 10000IU/ml，在 25℃和 40℃下保存后，效价几乎没有下降，效价变化范围在±500IU/ml 内。

由以上结果可以看出，本发明的 rhEGF 喷雾剂在 25℃保存 18 个月，和在 40℃下保存 6 个月，各项指标与 0 月比较无显著差异，从而表明本发明的 rhEGF 喷雾剂在 25℃温度可以稳定保存至少 18 个月，在 40℃温度可以稳定保存至少 6 个月。而金因肽贮存条件为 2-8℃，在 25℃和 40℃下贮存时，效价明显下降。

因此，与市售产品相比，本产品在常温下贮存稳定，方便贮存使用。

实施例 15：治疗烧伤的效果

1. 试验对象

使用健康成年 SD 大鼠，体重 200～260g，雌雄各半。

2. 动物模型及实验分组

使用 5 只大鼠为正常对照组。另取 136 只大鼠于实验前 1 天进行背部脱毛，实验当天用 25g/L 戊巴比妥钠溶液麻醉（35mg/kg），并用 80℃热水浸烫 15 秒，每组大鼠背部脊柱两侧对称部位各制作 2 个直径约为 2cm 的圆形深 II 度烫伤创面，其中左侧为 L 区，右侧为 R 区，通过病理切片进行证实为（以下称烧伤）。烧伤后立即向腹腔内注射乳酸钠林格液 5ml。大鼠烧伤后分笼饲养，自由进食饮水。按创面处理方法的不同将大鼠随机分为 4 组。

不同创面处理方法分组

分组	试验区	代码	处理方法	大鼠数量 (只)
			给药均为 600IU 或等量盐水	
A 组	对照区	AL	无菌等渗盐水	34
	给药区	AR	实施例 1 所得喷雾剂	
B 组	对照给药区	BL	金因肽	34
	给药区	BR	实施例 1 所得喷雾剂	
C 组	及时给药区	CL	创面伤后立即用金因肽用药	34
	延迟给药区	CR	创面伤后第 5 天用金因肽用药	
D 组	及时给药区	DL	创面伤后立即用实施例所得喷雾剂用药	34
	延迟给药区	DR	创面伤后第 5 天用实施例所得喷雾剂用药	

各组创面清创后，除敷料上使用的药物不同外其余处理相同，均在无菌操作下进行，每天换药 1 次直至创面愈合。

3. 标本采集

在伤后第 7、10、14 天，分别取创面组织标本，每组每个时相点各 8 只大鼠。创面标本存放于-80℃冰箱待用。

4. 检测指标

创面愈合时间和创面愈合率：（1）每组 10 只大鼠，每天观察创面愈合情况，以完全上皮覆盖作为创面愈合时间的依据。（2）每组于伤后第 7、10、14 天采用透明胶片描记加称重法测定局部创面面积，按下列公式计算：创面愈合率 = $\left[\left(\text{原始创面面积} - \text{未愈合创面面积} \right) / \text{原始创面面积} \right] \times 100\%$ 。

5. 结果

5.1. 创面愈合率统计结果

伤后不同时间各组大鼠创面愈合率的比较（%， $\bar{X} \pm s$ ）

试验组	鼠数 (只)	伤后时间 (天)		
		7	10	14
A 组				
AL	8	26.2±3.1	39.1±4.2	58.2±2.7
AR	8	43.4±2.5 Δ	61.7±4.7 Δ	81.5±5.6 Δ
B 组				
BL	8	33.8±2.6	43.5±4.3	69.1±5.5
BR	8	44.2±2.9 Δ	63.8±3.6 Δ	84.9±7.1 Δ
C 组				
CL	8	33.1±3.4	43.2±4.4	67.7±4.5
CR	8	32.7±3.1	42.4±4.8	68.5±5.2
D 组				
DL	8	43.7±3.1	62.4±3.9	83.2±4.9
DR	8	36.2±3.4 Δ	51.6±2.8 Δ	72.6±5.3 Δ

注：与自身对照创面比较， $\Delta 0.05 \geq P > 0.01$

分析 A 组和 B 组数据，发现 rhEGF 喷雾剂用药组创面与对照创面相比，各时相点创面愈合面积百分比明显增加，统计学有显著差异。而且本发明的 rhEGF 喷雾剂比市售产品各时相点创面愈合面积百分比明显增加，统计学有显著差异。

分析 C 组和 D 组数据，发现烧伤后立即或伤后第 5 天开始使用 rhEGF，市售产品中两者在促进创面愈合的作用上无明显区别，而本发明的 rhEGF 喷雾剂烧伤后立即用药比伤后第 5 天开始用药有显著差别。

5.2. 不良反应观察

本试验过程中，观察到的不良反应情况如下表。

试验组	咳嗽	昏厥	皮疹	
			L 侧	R 侧
A 组	0	0	0	0
B 组	1	0	1	0
C 组	2	1	3	2
D 组	0	0	0	0

与市售产品相比，本发明 rhEGF 喷雾剂的皮肤渗透力强，在深 II 度烧伤创面愈合早期也能起到快速促进皮肤愈合的作用，利于缩短创面愈合的时间。

另外，与市售产品相比，本发明 rhEGF 喷雾剂的不良反应较少。