



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101903014 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 200880121661. 2

A61K 9/50 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 21

A61K 38/27 (2006. 01)

(30) 优先权数据

07024906. 5 2007. 12. 21 EP

(56) 对比文件

US 5219572 A, 1993. 06. 15, 权利要求 1-23,
说明书第 3 栏第 32 行至第 7 栏第 25 行, 实施例 1.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 18

US 6544646 B2, 2003. 04. 08, 权利要求

1-15, 说明书第 [0041]-[0075] 段.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/EP2008/009849 2008. 11. 21

审查员 张溪

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02009/080164 EN 2009. 07. 02

(73) 专利权人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

(72) 发明人 J·理查德 H·G·巴尔达斯基

R·阿格斯蒂尼托 L·德安格里斯

F·德恰姆普斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 殷骏

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书21页 附图6页

(54) 发明名称

固体内核中包含生长激素的固体脂质微囊

(57) 摘要

本发明涉及具有持续释放特性的生长激素 (GH) 配制剂, 特别是人生长激素 (hGH) 和制备它们的方法。所述生长激素配制剂可以不经蛋白质变性而生产, 并且可以通过使用常规的注射器经具有小直径的针头方便地给药于需要该配制剂的人。

1. 微囊,其包含 (1) 至少一个含有生长激素、填充剂、表面活性剂的固体内核,其中所述生长激素是人生长激素或者其保留了人生长激素的生物活性的片段或盐,所述填充剂是糖醇、糖类和 / 或氨基糖,所述表面活性剂是聚山梨醇酯或聚氧乙烯 - 聚氧丙烯嵌段共聚物,以及 (2) 包含一种脂质的外壳,由此该微囊的重量平均直径为 100nm 至 500 μ m,其中所述内核通过利用喷雾干燥技术制备,而外壳通过利用基于加压流体工艺制备。

2. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述糖类是单糖、双糖或三糖。

3. 根据权利要求 2 的微囊,其中所述糖类是蔗糖、乳糖、麦芽糖或海藻糖。

4. 根据权利要求 3 的微囊,其中所述糖类是蔗糖。

5. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述氨基糖是葡萄糖胺、N- 甲基葡萄糖胺、半乳糖胺或神经氨酸。

6. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述糖醇是甘露醇、山梨醇、卫矛醇、木糖醇或核糖醇。

7. 根据权利要求 6 的微囊,其中所述糖醇是甘露醇。

8. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述表面活性剂是聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类。

9. 根据权利要求 8 的微囊,其中所述表面活性剂是聚氧乙烯 (20) 山梨醇酐单油酸酯或聚氧乙烯 (20) 山梨醇酐单月桂酸酯。

10. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述脂质具有至少 40 $^{\circ}$ C 的熔点。

11. 根据权利要求 10 的微囊,其中所述脂质具有在 48 $^{\circ}$ C 到 75 $^{\circ}$ C 范围内的熔点。

12. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述脂质是脂肪醇类、脂肪酸酯类或多元醇酯类。

13. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述脂质是至少一种脂肪酸与至少一种多元醇的酯类。

14. 根据权利要求 12 的微囊,其中所述脂质是聚乙二醇化的甘油酯和 / 或甘油和脂肪酸的酯。

15. 根据权利要求 14 的微囊,其中所述脂质是聚乙二醇化的甘油酯 **Gelucire[®]** 50/02、棕榈硬脂酸甘油酯或它们的共混物。

16. 根据权利要求 1 的微囊,其中构成外壳的相含有用于内核的分散剂。

17. 根据权利要求 16 的微囊,其中所述分散剂是磷脂。

18. 根据权利要求 17 的微囊,其中所述分散剂是大豆卵磷脂。

19. 根据权利要求 1 的微囊,其中所述外壳还含有增塑剂。

20. 根据权利要求 19 的微囊,其中所述增塑剂是泊洛沙姆的中链甘油三酯。

21. 药物配制剂,其包含根据权利要求 1 ~ 20 任一项的微囊,该微囊悬浮于分散介质中。

22. 试剂盒,其包含含有根据权利要求 1 ~ 20 任一项的微囊的容器,以及具有分散介质的容器。

23. 制备根据权利要求 1 ~ 20 任一项的微囊的方法,其包括如下步骤

(a) 制备至少包含生长激素、填充剂和表面活性剂的水溶液 / 分散体,所述填充剂是糖醇、糖类和 / 或氨基糖,所述表面活性剂是聚山梨醇酯或聚氧乙烯 - 聚氧丙烯嵌段共聚物;

(b) 喷雾干燥步骤 (a) 中制备的所述水溶液 / 分散体以生产包含蛋白质的微粒;

(c) 收集在步骤 (b) 中获得的微粒;

(d) 在 $0.4P_c$ 和 $3P_c$ 之间的压力和 30°C 至 70°C 范围内的温度下, 制备均匀分散体, 该分散体含有在步骤 (c) 中获得的微粒和在加压流体中的构成所述外壳的脂质相, 其中 P_c 是所述流体的临界压力;

(e) 通过喷嘴将在步骤 (d) 中制备的所述分散体降压, 并且收集在步骤 (e) 中获得的包裹蛋白质颗粒。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述压力在 $0.5P_c$ 和 $2P_c$ 之间, P_c 是所述流体的临界压力。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述压力在 $0.75P_c$ 和 $1.5P_c$ 之间, P_c 是流体的临界压力。

26. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述加压流体是二氧化碳。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述二氧化碳使所述脂质膨胀以在溶解和分散步骤 (d) 期间形成饱和熔融体。

28. 根据权利要求 23 ~ 27 任一项的方法, 其中步骤 (d) 中的所述温度在从 35°C 至 65°C 的范围内。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中所述温度为 60°C 。

30. 根据权利要求 23 ~ 27 任一项的方法, 其中步骤 (d) 期间的压力是在从 6.0MPa 到 11.0MPa 的范围内, 而膨胀后压力是在从 1.0MPa 到 5.5MPa 的范围内。

31. 根据权利要求 30 的方法, 其中所述膨胀后压力在从 1.5MPa 至 3.5MPa 的范围内。

32. 根据权利要求 30 的方法, 其中所述膨胀后压力在从 3.0MPa 至 5.0MPa 的范围内。

固体内核中包含生长激素的固体脂质微囊

[0001] 本发明涉及具有持续释放性能的生长激素 (GH) 配制剂,特别是人类生长激素 (hGH) 和制备它们的方法。所述生长激素配制剂可以不经过蛋白质变性而生产,并且可以通过常规的注射器或医疗或电子注射设备经具有小直径的针头方便地给药于需要该配制剂的人。

[0002] 目前对于人中hGH缺乏症的治疗方案是,例如,主要基于通过皮下注射的生长激素递送。hGH在调节细胞和器官生长以及在发育和老化的各个阶段的生理功能中起至关重要的作用。例如,hGH的过量产生导致儿童巨人症和成人肢端肥大症,而生产不足则导致儿童侏儒症[Mauras等人,J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 85(10), 3653-3660(2000); Frindik等人,Hormone Research, 51(1), 15-19(1999); Leger等人,J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 83(10), 3512-3516(1998)]、特纳综合征(仅为女性)[Bramswig, Endocrine, 15(1), 5-13(2001); Pasquino等人,Hormone Research, 46(6), 269-272(1996)]和慢性肾功能不全[Carroll等人,Trends in Endocrinology and Metabolism, 11(6), 231-238(2000); Ueland等人,J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 87(6), 2760-2763(2002); Simpson等人,Growth Hormone & IGF Research, 12, 1-33(2002)]。在成人中,hGH缺乏症会影响蛋白质、碳水化合物、脂类、矿物质和结缔组织的代谢过程并导致肌肉、骨骼或皮肤萎缩[Mehlsand Haas,Growth Hormone & IGF Research, Supplement B, S31-S37(2000); Fine等人,J. Pediatrics, 136(3), 376-382(2000); Motoyama等人,Clin. Exp. Nephrology, 2(2), 162-165(1998)]。其它hGH缺乏症-相关的紊乱表现为生长不足或包括AI DS消耗综合征[Hirschfeld,Hormone Research, 46, 215-221(1996); Tritos等人,Am. J. Medicine, 105(1), 44-57(1998); Mulligan等人,J. Parenteral and Enteral Nutrition, 23(6), S202-S209(1999); Torres and Cadman,BioDrugs, 14(2), 83-91(2000)]和Prader-Willi综合征[Ritzen,Hormone Research, 56(5-6), 208(2002); Eiholzer等人,Eur. J. Pediatrics, 157(5), 368-377(1998)]。

[0003] 许多产品已经被开发以试图满足稳定和长效并因此可以通过较低频率的注射时间表递送的hGH疗法的需要。

[0004] 为此,各种药物递送技术,如水凝胶[Katakam等人,J. Controlled Release, 49(1), 21-26(1997); Kim and Park,J. Controlled Release, 80(1-3), 69-77(2002)]、脂质体[Weiner等人,J. Pharm. Sci., 74(9), 922-925(1985)]、油乳剂[Yu等人,J. Pharm. Sci., 85(4), 396-401(1996); Zhao等人,J. Dairy Sci., 75(11), 3122-3130(1992)]和可生物降解的聚合物微球体[Jostel等人,Clin. Endocrinol. (Oxf), 62(5): 623-627(2005); Sun等人,J. Pharmacol. Exp. Ther., 289(3): 1523-1532(1999); Jones等人,Adv. Drug Deliv. Rev., 28(1): 1-84(1997); Johnson等人,Wat Med, 2(7): 795-799(1996)],已经被采用。然而,所产生的hGH配制剂往往显示不希望的药物突释(burst release)或者可能难以生产。

[0005] 例如,Nutropin Depot[®],是包含重组人生长激素(r-hGH)的乳酸羟基乙酸共聚物(PLG)微球体的可注射悬浮液(见<http://www.gene.com>)。相当高的生产成本导致了该产品从市场上撤出。此外,涉及Nutropin Depot[®]在儿科病人中施用的研究表明注射部

位副作用,引起结节、红斑、疼痛、瘀伤、瘙痒、脂肪萎缩和浮肿。

[0006] 目前由 LG 制药公司(韩国)开发的另一个产品,是含有 hGH、透明质酸、卵磷脂和甘油三酯的微粒混悬配制剂。该产品的缺点包括不宜的递送手段,特别是,递送流体必须借助 26 号针头注射 [Kim 等人, J. Controlled Release, 104 :323-335 (2005) ;U. S. 申请号 2005/0100605 ;EP 0918535B1]。

[0007] PCT 专利申请 WO 2004/060310 和 WO 2004/060920 涉及包括那些含有与聚电解质(即聚阳离子)络合的 hGH 晶体的 hGH 配制剂。这种 组合物是稳定的且能够持续释放 hGH 长达一周的时间段。虽然聚阳离子-络合的 hGH 晶体组分使这些组合物稳定且长效,但有可能在某些患者中,络合晶体表面的带电荷性质可能导致局部反应,其包括注射部位的轻微发红和肿胀。

[0008] 本发明的目的是提供持续释放的配制剂,其很大程度上避免了先有技术配制剂的缺点,如突释效应(burst effects),有限的缓释性能,而且不含有引起副反应的助剂如聚电解质。此外,这种持续释放的配制剂应该通过使用传统的注射器或者机械或电子的注射装置经 27 到 29 号(G)的针头容易地施用。

[0009] 令人惊讶的是,已经发现这种配制剂可以通过提供微囊获得,所述微囊包含至少一个固体内核,其含有生长激素、填充剂和表面活性剂,和包裹这种固体内核的含有至少一种脂质的外壳。因此,本发明涉及颗粒配制剂,其包含(1)至少一个固体内核,其包含至少生长激素、填充剂和表面活性剂和(2)含有至少一种脂质的外壳。所述固体内核是由至少一个含有生长激素的微粒构成的。固体多芯微囊,即包含多于一个被外壳包裹的生长激素微粒,也是发明的一部分。

[0010] 根据本发明可被配制的生长激素可以源于动物,如牛或猪生长激素。优选源于人类。本发明一个优选的实施方式涉及微囊,其中所述生长激素是人类生长激素(hGH)或者保留了人类生长激素生物活性的功能衍生物、片段、变体、类似物或其盐类。

[0011] 术语“人生长激素”或“hGH”,如本发明中所使用的,优选包含如附图 5 中描述的氨基酸序列。所述术语“人生长激素”或“hGH”如本文使用的也意指包括天然存在的和合成的衍生物,如上所述,包括但不限于,20kD 和 22kD 这两种人类生长激素、GH-V、GH 的亚砷化(sulfoxidized)和去酰胺基形式和生长激素基因位点的其它成员。

[0012] 20kD-hGH 已经被报道出现在垂体以及血流中(Lewis 等人, J. Biol. Chem. 253 : 2679 (1978) ;Lewis 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 92 :511 (1980)。该化合物,其缺乏从谷氨酸(Glu)-32 到谷氨酰胺(Gln)-46 的 15 个氨基酸残基,是由信使核糖核酸的选择性剪接产生的(DeNoto 等人, Nucleic Acids Res. 9 :3719 (1981))。20-K-hGH 是由垂体产生并分泌到血液中。它在成人中占大约 5% 的生长激素产量,在儿童占大约 20% 的生长激素产量。它具有与 22kD 生长激素相同的促生长活性,而且已经被报道,有等于或大于 22kD 形式的脂解活性值。它与 22kD 的生长激素有相同亲和力地结合生长激素受体,而且具有如 22kD 的生长激素十分之一的催乳(催乳素样)生物活性。与 22kD 不同,20-k-hGH 具有弱抗胰岛素活性。

[0013] GH-V 是发现于胎盘中的生长激素的变体。进一步已知的 GH 衍生物包括 hGH 的去酰胺基和亚砷化形式。

[0014] 蛋白质中的天冬酰胺和谷氨酰胺残基在适当的条件下可经去酰胺基化反应。垂

体 hGH 已经显示经历了这类反应,导致天冬酰胺 (Asn)-152 向天冬氨酸的转化,在较小程度上,谷氨酰胺-137 到谷氨酸的转化 (Lewis 等人, *Endocrinology* 104:1256 (1979))。去酰胺基的 hGH 已经显示具有对用枯草杆菌蛋白酶的蛋白质水解的改变敏感性,表明去酰胺化可能对 hGH 的直接蛋白质水解降解具有生理学重要性。生物合成的 hGH 已知在特定的贮藏条件下降解,导致在不同的谷氨酰胺 (谷氨酰胺 (Asn)-149) 中去酰胺化。这是主要的去酰胺化位置,但是在谷氨酰胺-152 的去酰胺化也被注意到 (Becker 等人, 1988)。垂体分泌的和生物合成的 hGH 都在甲硫氨酸 (Met)-14 和甲硫氨酸-125 发生亚砷化 (Becker 等人, 1988)。在垂体的而不在生物合成的 hGH 中也曾报导过甲硫氨酸-170 的氧化。

[0015] 去酰胺的 hGH 和甲硫氨酸-14 亚砷化 hGH 这两者都被发现显示完全的生物活性 (Becker 等人, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10:326 (1988))。

[0016] 根据本发明,所述 hGH 可以是天然存在的人生长激素,例如提纯自脑垂体或血液或血清,或者其可以是重组 hGH。重组 GH 可以在任何适合的宿主中表达,无论是原核或真核的宿主。例如大肠杆菌是对 hGH 表达特别适合的宿主。在大肠杆菌中表达的 hGH 就人类的序列而言包含额外的 N 末端甲硫氨酸,这种 hGH 称为 Met-GH。酵母、昆虫或哺乳动物细胞对于重组生长激素的表达更适合。所述 hGH 可以在人类或动物细胞中表达,例如在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中。优选地, hGH 可以在鼠类细胞系例如 C127 细胞系中表达。

[0017] 术语“生长激素”,如本文所使用的,还包括功能衍生物、片段、变体或具有如附图 5 中所描述的氨基酸序列的 hGH 类似物,倘若所述功能衍生物、片段、变体或类似物保留生长激素的生物活性,也就是说,起生长激素受体的激动剂的作用。换句话说,它们有能力结合生长激素受体,从而启动所述受体的信号传导活性。

[0018] 术语“功能衍生物”或“化学衍生物”,如本文所使用的,涵盖了那些由作为侧链出现于 N 或 C 末端基团残基上的官能团制备的衍生物,通过本领域中已知方法,只要它们保持药学可接受性,而且如本文所述的不显著降低 hGH 的生物活性,即,结合 hGH 受体和启动受体信号传导的能力;而且不赋予包含它的组合物以毒性,就都包含于本发明。衍生物可含有化学组成部分 (moieties),诸如碳水化合物或磷酸酯残基,条件是此种衍生物实质上保持了 hGH 的生物活性和保持了药学可接受性。

[0019] 例如,衍生物可以包括羧基脂族酯,经与氨或者和伯胺或仲胺反应的羧基的酰氨,与酰基组成部分 (例如烷酰基或碳环芳酰基团) 形成的氨基酸残基上的游离氨基的 N-酰基衍生物或者与酰基组成部分形成的游离羟基 (例如丝氨酸或苏氨酸残基的那些) 的 O-酰基衍生物。这样的衍生物也可以包括,例如,聚乙二醇侧链,其可以掩蔽抗原位点并且延长分子在体液的滞留。

[0020] 被衍化或是与络合剂相结合的生长激素可以长久稳定。因此,本发明的实施方式之一涉及人生长激素的聚乙二醇形式。这种人生长激素的聚乙二醇形式在例如 W02005/074546 中描述过。遗传工程的生长激素在体内显示长期持续的活性,也是本发明范围内 hGH 衍生物的实例。

[0021] 在 N 末端乙酰化的 hGH 已经被分离和鉴定 (Lewis 等人, 1979)。尚不明确是否酰基化作用起调节作用或仅仅是提纯作用的人工制品。但是,预期该分子以与其它 hGH 衍生物相似的方式显示 GH 活性。因此,在实施方式中,本发明涉及在 N 末端酰基化的人生长激素衍生物。根据本发明所述配制剂的一个实施方式包含人生长激素二聚体,其选自含有由

通过链内二硫键链接的二硫化物二聚体、共价不可逆非二硫化物二聚体、非共价二聚体和它们的混合物的组。

[0022] 如本文所使用的术语“突变型蛋白”涉及 GH 的类似物,其中天然生长激素的一个或多个氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代,或被删除,或者一个或多个氨基酸残基被加入到 GH 的天然序列,而其相较野生型生长激素不相当大地降低所得产品的活性。这些突变型蛋白可以由已知的合成法和 / 或由定点突变技术,或者其它已知适合的相关技术制备。

[0023] 根据本发明突变型蛋白包括由核酸,诸如 DNA 或 RNA 编码的蛋白质,其与在严格条件下编码 GH 的 DNA 或 RNA 杂交。编码 hGH 的多核苷酸是编码具有如附图 5 所述的氨基酸序列的蛋白质的多核苷酸。

[0024] 术语“严格条件”涉及杂交和之后的清洗条件,本领域中技术人员按照惯例称之为“严格的”。参见 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N. Y., § § 6.3 和 6.4 (1987, 1992)。非局限性地,严格条件的实例包括清洗条件,低于所研究的杂交计算出的 T_m 12–20°C,在例如, 2x SSC 和 0.5% SDS 5 分钟, 2x SSC 和 0.1% SDS 15 分钟; 0.1x SSC 和 0.5% SDS 在 37°C 下 30–60 分钟,然后 0.1x SSC 和 0.5% SDS 在 68°C 下 30–60 分钟。本领域技术人员熟知,严格条件也取决于 DNA 序列、寡核苷酸探针(如 10 到 40 个碱基)或混合寡核苷酸探针的长度。如果使用混合探针,优选使用四甲基氯化铵 (TMAC) 替代 SSC。参见 Ausubel, supra。

[0025] 由序列比较确定的一致性反映了两个或更多个多肽序列或者两个或更多个多核苷酸序列之间的关系。一般来说,一致性是指两个多核苷酸或两个多肽序列上相应确切核苷酸与核苷酸或是氨基酸与氨基酸,分别地关于序列长度的比较。

[0026] 对于没有确切对应的序列,“%一致性”可以被确定。一般来说,将待比较的两个序列对准以获得一个序列间最大的关联性。这可以包括在一个或这两个序列中插入“空隙”,以提高对准的程度。%一致性可以所比较的每个序列的全长来确定(即所谓的总体对准),这特别适合于相同或非常相似长度的序列,或者遍及较短的、定义的长度(即所谓区域对准),这更适合于不等长度的序列。

[0027] 用于比较两个或更多个序列一致性和同源性的方法在本领域中众所周知。因此,例如在 Wisconsin Sequence Analysis Package(序列分析包), 9.1 版 (Devereux J 等人, *Nucleic Acids Res.*, 12, 387–395, 1984) 中可获得的程序,例如 BESTFIT 和 GAP 程序,可以用来确定两个多核苷酸之间的 %一致性和两个多肽序列之间的 %一致性和 %同源性。BESTFIT 应用 Smith 和 Waterman 的“区域同源性”算法 (Smith and Waterman *J Mol Biol*, 147, 195–197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482–489, 1981) 并且找到两个序列之间相似性的最佳单一区域。其它用于确定两个序列间一致性和 / 或相似性的程序也是本领域中已知的,例如 BLAST 程序家族 (Altschul S F 等人, *J Mol Biol*, 215, 403–410, 1990, Altschul S F 等人, *Nucleic Acids Res.*, 25 :389–3402, 19) 和 FASTA (Pearson W R and Lipman D J, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444–2448, 1988)。

[0028] 1. 任何这种突变型蛋白优选具有充分复制 GH 的氨基酸序列(例如,在附图 5 中描述的氨基酸序列),诸如具有与 GH 实质上相似的活性。GH 的一种活性是其结合 GH 受体的能力。只要所述突变型蛋白具有与 GH 受体 (GHR) 实质的结合活性,它就可以被视为具有与 GH 实质上相似的活性。因此,通过此种突变型蛋白的常规试验方法,可以确定任何所提

到的突变型蛋白是否实质上具有与 GH 相同的活性,所述常规试验方法包括例如,将此种突变型蛋白进行简单的夹心竞争分析 (sandwich competition assay) 以确定其是否与适当标记的 GHR 或细胞表达的 GHR 结合,诸如放射性免疫分析法或酶联免疫分析法。

[0029] 2. 在优选的实施方式中,任何这种突变型蛋白具有至少 60% 或 70% 或 80% 或 90% 或 95% 或 98% 或 99% 的 GH 氨基酸或 DNA 序列的一致性或者同源性。hGH 的氨基酸序列示于附图 5 中。编码 GH 的 DNA 序列在本领域中已知,例如,从 DeNoto 等人,1981 或 Martial 等人,1979。

[0030] 3. 根据本发明突变型蛋白的优选变化是那些已知的“保守性”替换。GH 多肽的保守性氨基酸替换可以包括,具有足够相似的物理化学性质的一族中的同义氨基酸,所述族成员之间的替换将保持分子的生物功能 (Grantham, 1974)。显然,在上述定义的序列内也可以进行氨基酸的插入和删除而不改变它们的功能,特别是如果插入或者删除仅仅涉及少数氨基酸,例如,30 以下,20 以下和优选 10 以下,而且不移动或置换那些对功能结构至关重要的氨基酸,例如,半胱氨酸残基。通过这样的删除和 / 或插入产生的蛋白质和突变型蛋白属于本发明范围。

[0031] 4. 术语“融合蛋白”是指包含 GH 的多肽,或者突变型蛋白或其片段与其他蛋白质融合,例如,与那些具有在体液中延长的停留时间的其它蛋白质。所述融合可以是直接的或通过连接物的,例如 5 到 10 个氨基酸的肽连接物。GH 可以因此被融合于其它蛋白质、多肽等,例如免疫球蛋白或其片段。IgGs 的 Fc 部分,如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 适合于免疫球蛋白-融合蛋白的制备。Ig 融合蛋白描述于例如 EP 314317A1 (Genentech) 或 EP 0 325 224A2 (Zymogenetics Inc.)。

[0032] 5. 作为 GH 或突变型蛋白和融合蛋白的“活性片段”,本发明涵盖单独的蛋白质分子或与结合于其上的相关分子或残基一起的任何片段或前体,例如,糖或磷酸酯残基,或者蛋白质分子或糖残基本身的聚集体,条件是所述片段具有实质上相似的 GH 活性。

[0033] 6. 根据本发明配制的 GH 可以用于治疗和 / 或预防许多疾病或紊乱,单用或者与其它活性成分组合。这些疾病或紊乱优选涉及内源性 GH 生产不足。经纯化的 GH 可以用于例如治疗和 / 或预防 GH 缺乏, AIDS 消耗, 脂质营养不良 (也称为 HARS-HIV- 相关畸形 / 代谢障碍综合征), 或者短肠综合症, 特别是儿科的。给予生长激素可以对症的疾病可以包括肝硬化、成人生长不足、动脉粥样硬化、克罗恩病和溃疡性结肠炎、关节炎、心脏恶病质、充血性心力衰竭、慢性肾功能不全、血细胞重建或动员、男性不育症、造血干细胞动员、多发性硬化、中风、多系统萎缩或癌症。

[0034] 本文使用的术语“微囊”是微米和亚微米级颗粒,其具有包含至少一个固体内核和一个外壳的结构,而且或多或少呈球形。被称为纳米胶囊的颗粒,其是具有如所定义的相同结构的在亚微米级范围的颗粒,显然也包含在本文使用的“微囊”内。

[0035] 典型地,本发明的微囊的重量平均直径在大约 100nm 到大约 500 μm 之间。更优选地,所述平均颗粒直径在大约 1 μm 和大约 100 μm 之间。在其它实施方式中,微球的平均直径在大约 10 μm 到大约 80 μm 之间,这是一个非常适于通过装配有具有小直径的针头的注射器施用的尺寸范围。本发明的所述微囊非常实用地在肌内或皮下注射后实现局部组织保留,因此可以建立贮库,以提供所述引入颗粒中的生长激素的持续释放。

[0036] 根据本发明用于颗粒中的填充剂优选是糖醇、糖、糖醇和 / 或氨基糖。

[0037] 如果填充剂是糖,优选单糖、双糖或三糖。可以提到的单糖的实例是葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖和山梨糖;可以提到的双糖的实例是蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖;可以提到的三糖的实例是棉子糖。优选的是蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖,特别优选蔗糖。

[0038] 糖醇表示反应性的羰基基团被还原为醇基团的单糖,例如己糖醇和戊糖醇。可以用作填充剂的糖醇优选包括己糖醇,例如,甘露醇、山梨醇、卫矛醇、木糖醇或核糖醇。特别优选的是甘露醇和/或山梨醇,特别优选甘露醇。

[0039] 可以用作填充剂的氨基糖是单糖,其含有伯、仲或叔氨基基团或酰化的氨基基团($-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}$)代替羟基。对于本发明的目的,这里特别优选的是葡萄糖胺、N-甲基葡萄糖胺、半乳糖胺和神经氨酸。

[0040] 构成微囊核芯的微粒可以包含一种填充剂或不同填充剂的混合物。如果用混合物,这样的混合物可以包含来自同一族的填充剂,例如,来自糖、糖醇或氨基糖或者它可以包含来自不同族的填充剂,例如糖和糖醇一起。

[0041] 根据本发明所述填充剂存在于构成微囊核芯的微粒中,其比例为占总重量的 20 ~ 99%,优选占总重量的 30 ~ 90%,特别优选占总重量的 35 ~ 75%。

[0042] 可用于表面活性剂的是所有经常用于药制剂的表面活性剂。优选表面活性剂是非离子型表面活性剂,特别优选聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类(聚山梨醇酯)和聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。所述构成微囊核芯的微粒可以包含一种或多种表面活性剂。所述表面活性剂或表面活性剂的混合物以占总重量的 0.01 ~ 2%,优选占总重量的 0.05 ~ 0.5%,更优选的是占总重量的大约 0.1% 的比例存在于微粒中。

[0043] 聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类也被称为聚山梨醇酯和商品名 **Tween[®]**。适合的聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯类,特别是,聚氧乙烯(20)山梨醇酐单月桂酸酯、聚氧乙烯(20)山梨醇酐单棕榈酸酯和聚氧乙烯(20)山梨醇酐单硬脂酸酯。优选聚氧乙烯(20)山梨醇酐单月桂酸酯和聚氧乙烯(20)山梨醇酐单油酸酯,特别优选聚氧乙烯(20)山梨醇酐单油酸酯。

[0044] 聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物也被称为泊洛沙姆。特别优选的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物是泊洛沙姆 188,以商品名 **Lutrol[®]** F68 商购可得。

[0045] 用于制备壳的脂质根据本发明可以是纯的脂肪醇类、脂肪酸酯类和/或多元醇酯类或它们的共混物,其中多元醇可以是甘油或聚乙二醇。在本发明的具体实施方式中,脂类选自磷脂、 C_8-C_{22} 脂肪酸的单-、二-和三-甘油酯、脂肪酸酯、脂肪醇、糖甘油脂(glycoglycerolipids)(这种化合物含有一个或两个以糖苷键连接于甘油或二酰基甘油的糖)、蔗糖酯及它们的共混物。采用的脂类优选具有高于待施用的人体或动物体温度的熔点,以避免由于脂类熔融引起的蛋白质的快速递送。采用的脂类优选具有至少大约 40°C 的熔点,优选在 45°C 至 80°C 的范围内,且更优选在 48°C 至 75°C 的范围内。

[0046] 在本发明的优选方式中,用于形成壳的磷脂选自包含卵磷脂、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油、二棕榈酰基卵磷脂、二油酰磷脂酰乙醇胺、二油酰基卵磷脂、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油和它们的共混物的组之中。

[0047] 甘油和脂肪酸的酯类可以是甘油的单酯、二酯和/或三酯,和中和/或长链(C_8 至 C_{22})的脂肪酸和/或其混合物。在本发明的优选方式中,单-、二-、三-甘油酯选自 C_8-C_{22} 脂肪酸的单-、二-、三-甘油酯,特别是选自包含癸酸、辛酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬

脂酸的单-、二-、三-甘油酯及其混合物的组。纯的甘油三酯,如以商标名 **Dynasan**[®]商购可得的,诸如 **Dynasan**[®] 114(三肉豆蔻酸甘油酯)、**Dynasan**[®] 118(三硬脂酸甘油酯)也可以用于形成微囊的壳。氢化植物油也可以特别适合的是脂质壳的构成部分,优选长链的氢化植物油类型 I,例如,棕榈油、大豆油或棉子油。特别优选的氢化植物油是氢化棕榈油,例如以 **Dynasan**[®] P 60 为商标商购可得的。

[0048] 所述脂肪酸酯类是脂肪酸与一元或二元醇的单酯。可以用于本发明的脂肪酸酯优选选自 C_{12} - C_{22} 酸与 C_1 - C_{10} 的直链或分支的脂肪族醇的酯类和它们的混合物,如棕榈酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、硬脂酸乙酯、硬脂酸辛酯及其混合物。

[0049] 可以用于本发明的脂肪醇类是长链 (C_{12} - C_{22}) 醇和它们的混合物,诸如十六醇、肉豆蔻醇、鲸蜡硬脂基醇 (cetearyl alcohol)、硬脂醇、二十二烷醇和它们的混合物。

[0050] 可以用于本发明的糖甘油脂的实例是单半乳糖甘油二酯 (MGDG) 和双半乳糖甘油二酯 (DGDG),它们的混合物和它们酰化和磺化的衍生物。

[0051] 可用于本发明的实例是甘油与二十二酸 (C_{22}) 的酯 (INCI: 山嵛酸甘油酯,美国药典: 甘油二十二烷酸酯),其也以商标 **Compritol**[®] 888 销售。它由以下组成: 单-(12-18%),二-(52%)和三-甘油酯(28-32%)以及除二十二酸(>85%)以外,还包含 C_{16} - C_{20} 脂肪酸。甘油二十二烷酸酯的熔点在 69 到 74°C 之间。

[0052] 可用于本发明的甘油和脂肪酸酯的另一个实例是以商标 **Precirol**[®] ATO 5(Precirol)销售的脂类,它是甘油与棕榈酸和硬脂酸的酯(硬脂酸棕榈酸甘油酯)的混合物,且由与棕榈酸和硬脂酸的单-(8-17%),二-(54%)和三-甘油酯(29-38%)组成。

Precirol[®] ATO 5 具有在 50 到 60°C 之间的熔点,且约为 2 的 HLB 值。

[0053] 聚乙二醇与脂肪酸的酯亦称为聚乙二醇化的甘油酯,而且可以通过天然的油与聚乙二醇 (PEG) 的醇解反应制备。它们是长链 (C_{12} 至 C_{18}) 脂肪酸的甘油单酯、二酯和/或三酯,以及长链 (C_{12} 至 C_{18}) 脂肪酸的 PEG(单-和/或二-)酯的混合物,且可以包含游离的 PEG。聚乙二醇化的甘油酯,例如,以 **Gelucire**[®] 为商标可从 Gattefosse 商购可得。通常以 **Gelucire**[®] 为商标销售的脂类进一步用说明其熔点和 HLB 值两个两位数标示。熔点用摄氏度表示而 HLB(亲水-亲脂平衡)的数值范围是从 0 到大约 20。低 HLB 值表示更亲脂的并疏水的物质,而更高的值表示更亲水的且疏脂的物质。所述化合物对水或对油性物质的亲和力经实验确定,而其 HLB 值是经实验赋值的。存在于微囊壳中的聚乙二醇化的甘油酯的实例,是 **Gelucire**[®] 50/13、**Gelucire**[®] 53/10 并优选 **Gelucire**[®] 50/02。

[0054] 所述颗粒配制剂的壳可以包含一种脂质或不同脂类的混合物。如果使用混合物,这种混合物可以包含来自同一族的脂类,例如,来自甘油与脂肪酸的酯或聚乙二醇化的甘油酯,或者它可以包含不同族的脂质,例如,甘油与脂肪酸的酯和聚乙二醇化的甘油酯一起。

[0055] 根据本发明的优选的实施方式存在于微囊壳中的脂质是聚乙二醇化的甘油酯和/或甘油与脂肪酸的酯。

[0056] 除了脂质以外,所述壳可以含有添加剂如增塑剂,其可以改善脂质的成膜能力。增塑剂是溶解于脂质并因此增加脂质可塑性和流动性并且室温下通常为液态的物质。增塑剂

的添加限制了在包衣中形成结晶微区并降低所述（脂质）包衣材料的多孔性。因此，本发明的一个优选实施方式涉及微囊，其中外壳还包含增塑剂。

[0057] 可存在于微囊外壳中的脂质或脂类混合物与添加剂如增塑剂和分散剂一起，在本申请中称为“脂质相”。

[0058] 可以存在于脂质相的增塑剂是，例如，与用作包衣材料的脂质相比，具有明显较低熔点的脂类，例如中链的甘油三酯（MCT）或两亲嵌段聚氧乙烯 - 聚丙二醇共聚物（泊洛沙姆），如 **Lutrol**[®] F127。其关于脂质相的总重量的浓度是在 0 ~ 10% 的范围内，优选在 1 ~ 6% 的范围内。

[0059] 所述壳也可以包含一种或多种促进核芯 hGH 微粒在熔融的脂质中分散的分散剂。因此，进一步优选的实施方式涉及微囊，其中构成外壳的脂质相含有用于内核的分散剂。根据特别优选的实施方式，所述分散剂是磷脂或其衍生物，例如大豆卵磷脂，优选大豆卵磷脂。其关于全部形成壳的脂质相的总重量的浓度在 0 ~ 2% 范围内，优选在 0.1 ~ 1% 范围内。

[0060] 本发明的微囊可以通过两步过程制备。第一步提供构成微囊内核的微粒，其在第二步中被提供以外壳。

[0061] 优选地，在微囊制备中的第一步通过利用喷雾干燥技术完成实施，而第二步通过使用利用接近其临界压力 (P_c) 的压力下加压的流体的过程实施。表达“在接近其临界压力 P_c 的压力下加压的流体”是指在包含 $0.4P_c$ 和 $3P_c$ 之间的压力下加压的流体。因此本发明的另一个主题涉及制备本发明的微囊的方法，其中所述内核通过利用喷雾干燥技术制备，而所述外壳通过利用以加压流体为基础的过程制备。根据优选的实施方式，所述过程在超临界 (SC) 压力下操作。表达“在 SC 压力下的流体”是指在超过其临界压力 (P_c) 下加压的流体，无论其温度。这意味着，所述温度可以选择为低于或高于临界温度 (T_c)。在本发明的优选方式中，使用微囊化工艺，其利用超临界流体 (SCF)，这意味着流体的压力和温度两者都将分别高于 P_c 和 T_c ，至少在所述工艺的一部分如此。

[0062] 正如已经提到的，第一步骤，即制备构成内核的颗粒可以通过利用喷雾干燥技术实施。喷雾干燥在原理上是溶剂萃取过程。要获得的产品的成分是溶解 / 分散于液体中的，然后，例如通过采用蠕动泵，进料到喷雾干燥器的雾化器。可以用于液体雾化的合适的雾化器，包括 转盘的情况下，雾化发生归因于盘的高速旋转。在这两种情况下，雾化导致液体分裂成小滴进入干燥室，在其中，溶剂被从气溶胶滴中萃取并排出，例如通过排出管到溶剂收集器。

[0063] 可以用于颗粒制备的合适喷雾干燥技术，是众所周知并被描述的，例如，K. Masters 的“*Spray-drying handbook*”，John Wiley & Sons, New York, 1984。在优选的实施方式中，液体的雾化通过使用喷嘴进行。合适的喷雾干燥器的实例包括 Buchi 的实验室规模喷雾干燥器，如小型喷雾干燥机 290，或 MOBILE MINOR[™]，或 Niro 的制药喷雾干燥机 **PharmaSD**[®]。

[0064] 喷雾干燥条件对产品性能、水分、粒径、形态以及蛋白质聚集和降解程度有重大影响。温度是最重要的工艺参数，因为蛋白质暴露于高温可导致降解。对于喷雾干燥器，两个温度必须予以控制：入口温度和出口温度。前者是独立的工艺参数，而且它可以由操作者设置，后者取决于液体进料速度、雾化空气体积流量、干燥体积流量和显然，所选择的入口温

度。

[0065] 根据本发明适当的实施方式,所述入口温度在 90℃ 到 150℃ 的范围内,优选从 95℃ 至 130℃,更优选从 100℃ 至 120℃。

[0066] 根据本发明,所述用于制备颗粒配制剂制剂的核的含有蛋白质、填充剂和表面活性剂的溶液,含有 0.001 ~ 2 重量%的表面活性剂,优选 0.05 ~ 1 重量%,并尤其优选 0.1% ~ 0.2 重量%。用于喷雾干燥的溶液 / 分散体包含存在于微囊内核的所有成分,即生长激素、填充剂和表面活性剂。所述溶液 / 分散体可以进一步含有助剂,例如用于改善生长激素在这种溶液 / 分散体中的稳定性或用于改善其加工性能。例如所述溶液 / 分散体可以包含缓冲液,例如,磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、醋酸缓冲液和 / 或琥珀酸缓冲液。所述缓冲液可以 1mM 到 100mM 的浓度,优选从 5mM 到 50mM,更优选从 10mM 到 20mM 的浓度存在。

[0067] 所述溶液 / 分散体优选具有从 pH 5.0 到 pH 8.5 范围的 pH 值,优选从 pH 5.5 到 pH 7.5,更优选从 pH 5.85 到 pH 7.4。具体而言优选 pH 值是 pH 5.85 到 pH 7.4。

[0068] 根据适合的实施方式,生长激素以大约 1mg/ml 到大约 10mg/ml 的浓度存在。

[0069] 根据另一个实施方式,用于喷雾干燥的溶液 / 分散体含有填充剂,其浓度从 1mg/ml 到 20mg/ml,优选从 2mg/ml 到 10mg/ml,更优选 5mg/ml。

[0070] 含有至少一种脂质的壳可以通过使用以下过程施加于加载蛋白质的核芯,在该过程中将核芯微粒与在临近 P_c 的压力 P 、临近 T_c 的温度下加压的流体接触,以便能够使壳材料膨胀。所述表达“临近 T_c 的温度”是指流体在以开尔文 (K) 计包括由 $0.8T_c$ (以 K 计) 到 $1.5T_c$ (以 K 计) 的温度 T 下。例如,这可以是包囊过程,如在 US 5,057,342 (H. F. Bok 等人, 1989), US 5,066,522 (T. A. Cole 等人, 1989) 中,以及更近期地在 US 2003/0157183A1 中描述的。这种工艺在于加压流体溶解于含有经分散的核芯微粒的熔融脂类中,导致所谓的气饱和悬浮液,其通过喷嘴进一步膨胀形成包含加载蛋白质核芯的固体脂质微囊。所述加压流体优选选自包含氧化亚氮、丙烷、乙烷和二氧化碳 (CO_2) 的组,单独使用或在共溶剂存在时使用。 CO_2 是优选的用于本发明的加压流体。共溶剂可以用来促成加压流体在脂质相中的溶解,并且降低分散体的粘度。用于本发明的共溶剂可以是酮、醇、酯和含有 3 到 8 个碳原子的轻烃,并优选丙酮、乙醇、正丙醇、异丙醇或乙酸乙酯。它们以低浓度使用,低于 10%,并优选接近于大约 1%。将所述共溶剂在所述过程的最后的降压 / 膨胀阶段期间从最终的微囊中除去。与在 EP 0784 506B 中描述的过程相反,用于本发明的所述脂质相不需要在超临界的流体中溶解以实施该过程。与 EP 0784 506B 相比,这是本发明的关键优点,其相当大地拓宽了可用于形成壳的固体脂类的范围,导致高得多的产品产量,并确保与引入配制剂中的原料相同组成的明确定义的固体脂质壳。在本发明优选的实施方式中,在 hGH 核芯微粒在脂质熔融体中的分散阶段期间,流体压力 P 的值是从大约 $0.75P_c$ 到大约 $1.5P_c$ 的范围内。因此,本发明的一个优选的目的是制备微囊的方法,其中通过喷雾干燥技术制备所述内核和通过使用在包含 囊的方法,其中通过喷雾干燥技术制备所述内核和通过使用在包含 $0.5P_c$ 到 $2P_c$ 之间,优选在从大约 $0.75P_c$ 到大约 $1.5P_c$ 范围内的压力下加压的流体制备所述外壳, P_c 是流体的临界压力。

[0071] 在本发明的包囊过程中,加载生长激素的核芯微粒和脂质试剂与加压流体接触,如二氧化碳 (CO_2),导致蛋白质颗粒在熔融的、气体饱和的脂质试剂中的混悬体。如果使用 CO_2 作为加压流体,在该阶段使用的压力优选选自从 5MPa 到 15MPa 的范围,优选从 5.8MPa

到 11.0MPa 的范围。所述加压流体在赋形剂中溶出通常导致赋形剂在远低于其熔融 / 玻璃化转变温度 (~ 10 至 50℃) 下膨胀 / 熔融,产生具有降低的粘度的饱和熔融体。饱和熔融体的温度优选在从 30℃ 至 70℃ 的范围内,更优选从 35℃ 至 65℃。

[0072] 在通过加压流体使加载蛋白质的核芯微粒在膨胀的熔融脂质中均匀分散后,通过喷嘴使饱和悬浮液的降压,导致溶解于滴的流体大体积膨胀,由于与流体膨胀有关的强降温,使它们散开成迅速固化的小滴 (即所谓的焦耳 - 汤姆逊效应)。调整流体在脂质中的溶解、分散和降压条件以便形成具有类似球形形态、导致低突释效应的低孔隙度和高内聚力的微囊。在均匀分散体降压的压力优选在从环境压力到 5.5MPa 的范围内,更优选从 1.5MPa 到 3.5MPa,而最优选在大约 3MPa。

[0073] 根据优选实施方式,本发明的微囊通过包含以下步骤的方法制备:

[0074] (a) 制备包含至少生长激素、填充剂和表面活性剂的水溶液 / 分散体;

[0075] (b) 喷雾干燥步骤 (a) 中制备的水溶液 / 分散体以生产包含蛋白质的微粒;

[0076] (c) 收集在步骤 (b) 中获得的微粒;

[0077] (d) 在加压流体溶解于脂质相的压力和温度条件下,制备包含在步骤 (c) 中获得的微粒和在加压流体中的脂质的均匀分散体;

[0078] (e) 通过喷嘴使在步骤 (d) 中制备的分散体降压并且收集在步骤 (e) 中获得的微囊。

[0079] 在本发明最优选的实施方式中,用于实施所述方法的加压流体是 CO₂;用于流体溶解和 hGH 微粒分散的压力是大约 6. MPa 或 100MPa,温度是在从大约 60℃ 至大约 70℃ 范围内,而膨胀后压力 (这是在减压容器的压力) 是从大约 3.0MPa 到 5.0MPa 的范围内。

[0080] 本发明的微囊可以在悬浮于适宜的药学可接受、可注射的介质中之后给于有需要的人,例如经由具有小直径的针头和使用常规的注射器 (25-30 号 (Gauge))。优选悬浮介质是含水介质,其可以进一步含有适宜的表面活性剂和 / 或填充剂。术语“含水的”如本文使用的可以被理解是水或者水与其它溶剂,特别是与有机溶剂的混合物。如果一种或多种组分溶解或悬浮于水或者水与其它溶剂的混合物中则提供水溶液 / 悬浮液。如果所述水溶液 / 悬浮液含有一种或多种药学活性成分,且这种溶液 / 悬浮液是适合人或动物的治疗或预防性治疗的,那么这种溶液 / 悬浮液是药物制剂。如果在水溶液 / 悬浮液或药物制剂中存在有机溶剂,那么优选存在这种有机溶剂,其是适合于肠胃外给药的,诸如二甲亚砜 (DMSO),但是优选醇类例如乙醇、1,2- 丙二醇、甘油、聚乙二醇和四乙二醇醚 (glycofurol)。

[0081] 为了增加肠胃外给药的耐受性,悬浮液的渗透压优选在等渗的范围,即在从大约 250 到 350mOsmol/kg 的渗透压。然后将制剂直接基本上无痛苦地直接静脉内、动脉内以及皮下施用。

[0082] 为了实现渗透压,所述含水介质可以含有等渗的改性剂,优选生理耐受性的盐,例如氯化钠或氯化钾,或者生理耐受性的多元醇,例如葡萄糖或甘油,在对于等渗改性所必需的浓度下。在本发明优选的实施方式中,用于微囊的含水分散介质是生理盐水。

[0083] 所述分散介质可以进一步含有助剂诸如适宜的表面活性剂 (泊洛沙姆 188 和 407、**Solutol**[®] HS 15, **Tween**[®] 20) 和 / 或适宜的糖醇,例如甘露醇和 / 或山梨醇。

[0084] 可选地,用于所述微囊的给药的悬浮介质可以是不含水的可注射的低粘度液体,诸如中链甘油三酯 (甘油的脂肪酸酯) 的混合物。优选的中链甘油三酯是 **Mygliol**[®]

812(来自 Dynamit Nobel 公司), **Labrafac**[®] WL1349(辛酸甘油三酯来自 Gattefoss é 公司,法国),或 Lipoid MCT(来自 Lipoid 公司,德国)。

[0085] 为了使微囊适合于肠胃外给药以供施用,它们有利地以使用前在无菌条件下密封于适于贮藏的容器中的形式。因此本发明的有利目的是微囊使用前在无菌条件下密封于适于贮藏的容器中的提供形式。

[0086] 用于提供适合于肠胃外给药的微囊悬浮液的要素可有利地一起放在试剂盒中。因此,本发明另一个主题是包含含有微囊的容器和具有分散介质的容器的试剂盒,其中所述微囊包含 (1) 包含生长激素、填充剂、表面活性剂的内核和 (2) 包含至少一种脂质的外壳。

[0087] 现在已经充分描述了本发明,本领域的技术人员将认识到,在不违背本发明的精神和范围并不需繁杂的实验的情况下,同样可以在广泛范围的等同参数、浓度和条件内实施。

[0088] 本发明已经结合其具体实施方式进行了描述,它将被理解为,通常根据本发明的原则,它能够进一步改进。本申请意图覆盖本发明的任何变化方案、用途或适应性修改,并包括这些由本发明所隶属的本领域的公知常识所带来的偏差,并可以施加于如下列举在附属的权利要求范围内的前文的必要技术特征。

[0089] 此处引用的所有参考文献,包括杂志或摘要,已发表或未发表的美国或外国的专利申请,美国或外国授权的专利或任何其它参考文献,通过参考以整体并入本文,包括在所引用的文献中的所有数据、表格、附图和文字。此外,在本文中所引用的参考文献中所引用参考文献的全部内容也通过参考以整体并入。

[0090] 关于已知方法步骤、常规的方法步骤、已知方法或常规方法的引用无论如何不是承认本发明的任何方面、描述或实施方式是被在相关技术中揭示、教导或建议的。

[0091] 前述特定实施方式将完全显示本发明的通常性质,其他人可以通过应用本领域的常识(包括本文所引用的参考文献的内容),不经繁杂的实验,易于改进和/或适应于这样的具体实施方式的不同的应用,而不背离本发明的总体思想。因此,这样的适应性修改和改进意欲在所公开的实施方式的等价物的含义范围之内,基于本文中提供的教导和指教。理解为,本文的措辞或术语是用于描述而非限制的目的,从而本领域的技术人员根据本文提供的教导和指教,本申请措辞或术语被本领域技术人员与本领域的技术人员的常识相结合地理解。

[0092] 除非明确说明,否则在该专利申请中公开的所有百分比(%)数据意图表示重量百分比(% (w/w))。

[0093] 实施例解释本发明,但不限于此。

[0094] 喷雾干燥

[0095] 使用来自 Büchi 的微型喷雾干燥机。热气是除湿的空气或氮气。气体的温度在从大约 80℃至大约 150℃的范围。

[0096] 粒径分布分析

[0097] 利用所述喷雾干燥方法制备的粉末的粒径分布是通过激光衍射系统(Mastersizer 2000, Malvern Instruments)和颗粒图像分析仪(Morphologi G2, Malvern Instruments)表征的。Mastersizer 2000 用于测量在使用异丙醇作为溶剂的液体悬浮液中喷雾干燥粉末的粒径分布。在加入到样品池中之前,每种悬浮液经超声处理 2 分钟。

[0098] 不同于该一般步骤,将批次参考号 DM5、GP5b、D5 和 DM10 的粒径,在重悬于含有 Tween 20 的水溶液后进行测量,其中将各悬浮液在涡流混合器(10s)中搅拌并超声处理大约 5 分钟。

[0099] 可选地,将粉末通过光学显微镜利用 Morphologi G2(Malvern)检查以利用等圆直径(circular equivalent diameter)确定颗粒的形态和粒径分布。粒径结果以微米计表示为数均分布和参数($D(n,0.9)$), $D(n,0.5)$ 和 $D(n,0.1)$,其表示颗粒样品数目的 90、50 和 10% 在相应的 D 值以下)和表示为体积分布和参数($D(v,0.9)$), $D(v,0.5)$ 和 $D(v,0.1)$),其表示颗粒样品体积的 90、50 和 10% 在相应的 D 值以下)。

[0100] 蛋白质物理化学特性——排阻和逆相色谱法

[0101] 通过喷雾干燥获得的 GH 核芯微粒的样品通过尺寸排除色谱法 (SEC) (用于蛋白质含量和聚集百分比的测定)和逆相高效液相色谱法 (RP-HPLC) (用于氧化和去酰胺化形式的百分比的测定)进行分析。对于 RP-HPLC,主要的 GH 化学降解产物(氧化和去酰胺化形式)利用 C4 柱保持在 45°C 从原形式分离。蛋白质峰在 220nm 被监测到。蛋白质通过等度洗脱用由 71% 50mM Tris 缓冲液和 29% 异丙醇组成的溶剂从柱洗脱。SEC 用 TSK 凝胶 G2000SWXL 柱保持在室温下进行。蛋白质峰在 214nm 被监测到。将蛋白质通过等度洗脱用由 97% v/v 63mM 盐酸盐缓冲液和 3% v/v 异丙醇组成的溶剂从柱洗脱。

[0102] 实施例 1:筛选和选择适合于雾化的操作条件

[0103] 入口温度(°C)

[0104] 众所周知,在喷雾干燥期间蛋白质所暴露的热应力和机械应力引起蛋白质降解。使在喷雾干燥期间施用的操作条件最优化以保持在喷雾干燥过程期间蛋白质的稳定性。入口温度和进料物质中蛋白质的浓度是变化的以评价在所生产的微粒中 GH 的回收效果和降解产物的水平。由两种浓度(20mg/mL 和 10mg/mL)开始和设置不同的入口温度(80°C、90°C、120°C 和 150°C)获得数种粉末。对于分析,将粉末溶解于磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH 7.4(至理论浓度 1mg/mL)中并用 SE-HPLC 分析,以测定粉末中 hGH 的量和高分子量物质(HMWS)的存在。

[0105] 在表 1 中总结了由 SEC-HPLC 的 hGH 回收和完整性(integrity)结果。

[0106] 表 1:由喷雾干燥粉末中获得的 SEC-HPLC 结果

[0107]

hGH 量	入口温度 (设置)	出口温度℃ (测量)	hGH 回收率%， 经 SE-HPLC	HMWS%， 经 SE-HPLC	%湿度
20mg/mL	80℃	35℃	nt	nt	Nt
20mg/mL	90℃	45℃	32	0.68	2.2
20mg/mL	120℃	65℃	36	0.59	1.5
20mg/mL	150℃	100℃	30	1.14	0.5
10mg/mL	90℃	45℃	29	0.80	2.2
10mg/mL	120℃	65℃	36	0.80	1.1
10mg/mL	150℃	100℃	27	1.50	0.6

[0108] 根据表 1 中所示的结果,如果不使用保护剂,纯蛋白质的喷雾干燥会对蛋白质稳

定性有深远的影响。在喷雾干燥后少于 40% 的 hGH 被回收, 无论进料中的 hGH 浓度和所使用的入口温度。该低回收率与形成大量不溶的聚集体有关, 其在重构后可见残余白色颗粒。

[0109] 对于在更高的入口温度生产的粉末测得更高百分比的 hGH HMWS, 证实由蛋白质暴露于高温引起的热降解风险。更高入口温度的使用也可能促成低水分含量的微粒的产生 (表 1)。可是, 对这些在低入口温度下核芯微粒获得的含水量直至 7-10% 是可接受的, 并与蛋白质的良好稳定性一致。

[0110] 实施例 2: 对填充剂和表面活性剂作用的研究

[0111] 为了研究赋形剂在喷雾干燥期间防止 hGH 降解的能力, 对于喷雾干燥制备了包含糖类 (10mg/mL 甘露醇、海藻糖、蔗糖)、添加或不添加表面活性剂 (0.1% 泊洛沙姆 188 和聚山梨醇酯 20) 的几种溶液。hGH 的浓度设置在 2mg/mL。溶液通过将所述表面活性剂和填充剂溶解于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲剂然后在温和混合下添加 hGH 本体 (bulk) 而制成。所述溶液在 120°C 的入口温度、538L/h 空气流速、5mL/min 溶液流速和 38m³/h 抽吸出器速度下雾化。分析粉末样品的 hGH 回收率 和纯度 (通过 SE-HPLC) 并就粒径分布 (通过 Mastersizer 2000) 进行表征。还与未喷雾干燥的参考 hGH 物料相比, 就氧化和去酰胺化形式的增加 % (通过 RP-HPLC) 而言, 分析了包含表面活性剂的配制剂。

[0112] 用于喷雾干燥的组合物和获得的配制剂的分析数据 (回收率和 % HMWS (通过 SE-HPLC)) 总结于表 2。对于分析而言, 将粉末溶解于 PBS pH 7.4 (至理论浓度 1mg/mL) 且通过 SE-HPLC 对 hGH 回收率和完整性进行分析。

[0113] 表 2: 通过喷雾干燥获得的 hGH 微粒的物理化学特征, 作为填充剂 (碳水化合物) 浓度以及表面活性剂的种类和浓度的函数

[0114]

填充剂	填充剂 浓度 (mg/mL)	聚山梨醇 20 (w/w %)	泊洛沙姆 188 (w/w %)	蛋白质回收%	HMWS%	氧化和去酰胺化的形式的增加, 通过 RP-HPLC (%) *
海藻糖	2	-	0.1	97	2.7	2
海藻糖	5	-	-	47	0.80	
海藻糖	10	-	-	43	1.26	
海藻糖	10	0.1	-	97	4.7	0
海藻糖	10	-	0.1	97	3	0
海藻糖	20	-	-	43	0.36	-
蔗糖	2	0.1	-	97	3.3	0
蔗糖	2	-	0.1	98.3	1.7	0
蔗糖	10	-	-	20	0.03	
蔗糖	10	0.1	-	90	10.7	0
蔗糖	10	-	0.1	98	2.8	0
甘露醇	10	0.1	-	94	9	3.22
甘露醇	10	-	0.1	97	5.8	
甘露醇	10	-	-	44	0.64	0

[0115] 当 hGH 仅与碳水化合物配制时, 测量到低回收率 (从 20% 到 44%), 不论所述碳水化合物的浓度。这可能与形成大的不溶聚集体有关, 其在重构后可见白色颗粒, 而当使用表面活性剂时不出现。以 0.1 重量 % 添加聚山梨醇 20 或泊洛沙姆 188 显著改善回收率, 推测是通过限制蛋白质的界面暴露, 无论表面活性剂的类型, 并使得粉末在分析前完全溶解。

[0116] 还通过 RP-HPLC 就 % 氧化的和去酰胺化的形式而言分析与碳水化合物和表面活性剂一起配制的 hGH。将粉末溶于 PBS pH 7.4 以获得 2mg/mL 的理论浓度。平行测定未喷雾干燥的 hGH 本体, 作为参考。

[0117] 获得的结果展示在表 2 中, 说明与参考的非喷雾干燥的本体相比, 对于经雾化的样品, hGH 氧化的和去酰胺化的形式的百分比没有增加。

[0118] 实施例 3: 粒径分布

[0119] 在表 2 中所描述的粉末的粒径展示在表 4 中：直径表达为体积分布和数值分布这二者。

[0120] 当表达为数值分布时，经喷雾干燥的颗粒的平均直径小于 $5\mu\text{m}$ ，表明经雾化的粉末具有优良的质构。体积分布展示了较大的平均直径，表明大聚集体以非常低的比例存在。

[0121] 表 4：含有 hGH 的喷雾干燥粉末的粒径分布

[0122]

配制剂	数值分布			体积分布		
	D	D	D	D	D	D
	(0.1)	(0.5)	(0.9)	(0.1)	(0.5)	(0.9)
	μm	μm	μm	μm	μm	μm
hGH 2 mg/mL+蔗糖 10 mg/mL+ 聚山梨醇 20 0.1 %	1.09	1.74	3.46	6.01	28.24	66.69
hGH 2 mg/mL+蔗糖 10 mg/mL+泊 洛沙姆 188 0.1 %	0.54	0.86	3.86	3.69	8.18	8.56

[0123]

hGH 2 mg/mL+海藻糖 10 mg/mL+ 聚山梨醇 20 0.1 %	1.54	2.37	4.08	2.95	6.55	49.95
hGH 2 mg/mL+海藻糖 10 mg/mL+ 泊洛沙姆 188 0.1 %	0.54	0.78	4.00	9.10	49.22	160.74
hGH 2mg/mL+甘露醇 10 mg/mL+ 聚山梨醇 20 0.1 %	0.76	1.21	2.90	1.63	5.32	12.01
hGH 2mg/mL+甘露醇 10 mg/mL+ 泊洛沙姆 188 0.1 %	0.61	0.88	1.74	1.65	6.70	15.62

[0124] 利用加压流体工艺进行微粒包衣

[0125] 使用如附图 1 中示意性描述的 SCF 设备。在所有试验中，采用以下步骤：

[0126] - 将颗粒 / 包衣剂 (2) 混合物置于混合槽 (1) 并与加压 CO_2 接触，其由 CO_2 罐 (4) 泵在混合条件下送十分钟。

[0127] - 然后将混合物用搅拌器 (3) 搅拌一小时。在这一步，在配置有反压调节器 (8) 的收集容器 (7) 中设置粉化条件。

[0128] - 一小时以后，停止搅拌并通过开启阀门启动经由喷嘴 (6) 的粉化。

[0129] - 在粉化末期，将收集容器 (7) 缓慢降压；收集并筛分样品 ($500\mu\text{m}$)。

[0130] 通过使用该基于加压流体的包裹工艺制备具有在脂质微囊中 5% w/w 微粒有效载荷的加载 hGH 脂质微粒的八种配制剂，并进行分析表征 (hGH 物理化学特征，体外 hGH 释放曲线)。此外，还制备了 10 重量%有效载荷配制剂用于初级加工和分析评价。工艺参数和配制剂数据总结于表 5 中。

[0131] 以 5 重量%有效载荷生产的样品就粒径分布、外观 (aspect) 和产率而论是可接受的。此外,具有 10 重量%有效载荷的初级配制剂显示生产具有如此高的有效载荷的颗粒 (其对于达到目标剂量可能是必需的),看来是可行的。

[0132] 表 5 :载有 hGH 的脂质微囊 ;工艺操作参数和配制剂组成 (10 巴 = 1.0MPa)

[0133]

批次参考	有效载荷	包衣剂	添加剂	膨胀前的温度 / 压力	膨胀后的压力
1P5	5%	Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂	60 巴 /60℃	30 巴
2P5	5%	Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂	60 巴 /60°	30 巴
3P5	5%	Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂 5% MCT (Miglyol)	60 巴 /60℃	30 巴
4P5	5%	Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂 2.5% Lutrol F127	60 巴 /60℃	30 巴
5P5	5%	Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂 2.5% Lutrol F127	60 巴 /60℃	30 巴
1G5	5%	Gelucire 50/02	0.5%大豆卵磷脂	100 巴 /60℃	50 巴
2G5	5%	Gelucire 50/02	0.5%大豆卵磷脂	100 巴 /60℃	30 巴
3G5	5%	Gelucire 50/02	0.5%大豆卵磷脂	100 巴 /60℃	30 巴
1GP5	5%	50% Gelucire 50/02 50% Precirol AT0 5	0.5%大豆卵磷脂	100 巴 /60℃	50 巴
1G10	10%	Gelucire 50/02	0.5%大豆卵磷脂	100 巴 /60℃	50 巴
DM5	5%	Dynasan P60F	5% MCT 0.5%大豆卵磷脂	110 巴 /70℃	30 巴
GP5b	5%	Gelucire 50/02/ Precirol Ato 5 50/50	0.5%大豆卵磷脂	70 巴 /60℃	30 巴
D5	5%	Dynasan P60F	0.5%大豆卵磷脂	110 巴 /70℃	30 巴
DM10	10%	Dynasan P60F	5% MCT 0.5%大豆卵磷脂	110 巴 /70℃	30 巴

[0134] - 分析结果总结于表 6 中。利用该工艺生产的加载 hGH 的脂质微囊显示非常高的蛋白质回收率 (> 98%) 并且几乎没有由工艺引起的蛋白质降解,因为相关蛋白质降解产物的增加 (通过 RP-HPLC) 保持在低于 6%。

[0135] 表 6 :载有 hGH 的脂质微囊 ;分析数据

[0136]

组合物	理论 hGH 比例 w/w(%)	SEC HPLC			RP HPLC* 有 关的蛋白质	湿度比例 (%)
		总 hGH 比例 w/w(%)	纯度 w/w(%)	HMWS w/w(%)		
hGH 微粒 [*]	38	37.5	99.48	0.52	6.3	7-10
hGH 微粒 ^{**}	38	32.34	99.44	0.56	6.5	n. d.
hGH 微粒 ^{***}	38	35.21	99.44	0.56	6.66	7.42
1P5	1.75	1.55	99.05	0.95	8.04	0.78
2P5	1.7	1.59	98.89	1.11	8.76	0.79
3P5	1.75	1.22	98.52	1.48	10.69	1.0
4P5	1.75	1.5	99.05	0.95	10.70	1.14
5P5	1.75	1.48	99.15	0.85	11.3	0.97
1G5	1.88	1.63	99.17	0.83	7.35	1.0
2G5	1.75	1.52	98.45	1.55	7.00	0.7
3G5	1.7	1.79	98.83	1.17	8.25	0.93
1GP5	1.7	1.72	99.04	0.96	8.12	0.62
1G10	3.4	3.26	99.35	0.65	7.43	1.3
DM5	1.7	1.40	99.52	0.48	5.89	1.19
GP5 b	1.7	1.54	99.14	0.86	8.30	1.37
D5	1.7	1.46	99.56	0.54	6.93	1.18
DM10	3.4	2.85	99.14	0.86	5.69	0.6

[0137] * 参考批次 1G5, 1GP5, 1G10。

[0138] ** 参考批次 1P5, 2P5, 3P5, 4P5。

[0139] *** 参考批次 2G5, 3G5, 5P5。

[0140] 表 7: 载有 hGH 的微囊的产率和粒径分布

[0141]

组合物	PSD (μm)			产率 (%)
	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)	
1P5	7.6	38.4	100.0	78
2P5	3.9	34.4	86.8	79
3P5	6.8	39.6	111.1	81
4P5	3.1	19.8	71.6	76
5P5	6.6	31.9	98.7	75
1G5	3.0	77.3	242.0	69
2G5	2.9	31.9	101.8	79
3G5	2.5	14.1	117.4	81
1GP5	2.8	27.8	161.6	82
1G10	1.	4.5	14.6	63
DM5	6.3	62.2	157.8	N. A.
GP5 b	3.6	34.7	100.1	N. A.
D5	5.0	49.7	129.7	N. A.
DM10	5.6	65.7	184.9	N. A.

[0142] 此外,这些配制剂在体外的释放特征也是量化的。在附图 2a 和 2b 中提供了基于 **Gelucire**[®] 的配制剂的结果,在附图 3 中提供了基于 **Precirol**[®] 的配制剂的结果,和在附图 4 中提供了基于 **Precirol**[®]/**Gelucire**[®] 的配制剂的结果。对于基于 **Precirol**[®]/**Gelucire**[®] 的其它配制剂以及基于 **Dynasan**[®] 的配制剂的结果在附图 6 中提供。

[0143] 基于 **Gelucire**[®] 的配制剂展示低的体外突释(大约 20-30%)和持续释放的曲线。两个不同批次的 **Gelucire**[®] 50/02 配制剂(1G5 和 3G5) 的体外释放曲线是相似的,并且使得可以结论为所述过程是可高度重复的。低突释也被发现于以有效载荷 10 重量% 的生产的 hGH 微粒所述配制剂。

[0144] 值得注意的是,对于同样的 hGH 负载(5%),体外突释在所述基于 **Dynasan**[®] 的配制剂中进一步降低,且如此低的突释与改善的持续释放曲线相结合。

[0145] 对于同样的 hGH 负载(5%),基于 **Precirol**[®] 的配制剂显示较高的突释,但随后较慢的释放速率。两个不同批次的 **Precirol**[®] 配制剂(1P5 和 5P5) 的体外释放曲线使得可能结论为所述过程是稳定的。

[0146] 进一步证明,自喷雾干燥微粒化的 hGH 颗粒开始,可以利用加压流体工艺生产显示低体外突释和体外持续释放曲线的加载 hGH 的可注射的固体脂质微囊。已显示,这些配制剂可以没有任何 hGH 变性地被生产(低水平 HMWS 和相关蛋白质降解产物增加)。

[0147] 进行一项研究以评价加载 hGH 的可注射的脂质微囊的贮藏稳定性,其在氮气下于 2-8℃和 25℃填充于 3mL 的玻璃小瓶。所述样品通过 SEC 分析用以测定蛋白质含量和蛋白质的聚集水平,并进行 RP-HPLC 分析用以测定所述氧化和去酰胺化的形式。对于分析,使用二氯甲烷从脂质微粒中萃取 hGH。溶剂使微粒中的脂质溶解并使蛋白质沉淀。将蛋白质沉淀用溶剂洗涤、干燥,然后在 HPLC 分析之前用水相重构。色谱分析如上所述地进行。将样品通过库伦测定法分析含水量。在起初、2 周、1 个月和 2 个月时提取和分析样品。表 8 和 9 中的结果显示通过所述工艺获得的脂质微粒中的 hGH 在 2-8℃和 25℃至少 2 个月之内是稳定的。

[0148] 那些本领域的技术人员利用不多于常规试验就将认识到或者能够确定,本文还明确描述了许多本发明具体实施方式的等价物。这些等价物有意包含在以下权利要求的范围之内。

[0149] 表 8 :在 2-8℃下 hGH 脂质微囊的稳定性

[0150]

样品	理论 hGH 含量 w/w(%)	SE-HPLC			RP-HPLC	含水量 (%)
		总 hGH 含量 w/w(%)	纯度 w/w(%)	HMWS w/w(%)	相关蛋白 质	
时间 0						
3G5	1.7	1.5	99.1	0.9	10.15	1.3
2P5	1.7	1.6	98.9	1.1	8.5	1.0
1GP5	1.7	1.7	99.1	0.9	9.5	0.8
1G10	3.4	3.2	99.0	1.0	8.0	1.1
2 周 2-8℃						
3G5	1.7	1.4	98.9	1.1	11.6	1.0
2P5	1.7	1.5	98.6	1.4	9.5	1.3
1GP5	1.7	1.6	98.8	1.3	9.5	1.2
1G10	3.4	3.1	98.8	1.2	8.0	2.8
1 个月 2-8℃						
3G5	1.7	1.5	99.0	1.0	9.9	0.8
2P5	1.7	1.8	98.8	1.2	9.2	1.0
1GP5	1.7	1.7	99.0	1.0	9.7	0.9
1G10	3.4	3.2	99.0	1.0	7.7	1.2
2 个月 2-8℃						
3G5	1.7	1.6	99.0	1.0	9.5	0.8
2P5	1.7	1.8	98.8	1.2	9.0	0.9
1GP5	1.7	1.8	98.9	1.1	9.0	0.9
1G10	3.4	3.3	98.9	1.1	7.4	1.9

[0151] 表 9 :在 25℃下 hGH 脂质微囊的稳定性

[0152]

样品	理论 hGH 含量 w/w(%)	SE-HPLC			RP-HPLC	含水量 (%)
		总 hGH 含量 w/w(%)	纯度 w/w(%)	HMWS w/w(%)	相关蛋白 质	
时间 零						
3G5	1.7	1.4	99.0	1.0	nt	1.3
2P5	1.7	1.8	98.8	1.2	9.8	0.9
1GP5	1.7	1.6	98.9	1.1	10.7	0.8
1G10	3.4	3.2	99.0	1.0	7.7	1.1
2 周 25℃						
3G5	1.7	1.4	98.9	1.1	11.7	1.1
2P5	1.7	1.6	98.6	1.4	8.8	1.5
1GP5	1.7	1.5	98.8	1.2	11.0	1.2
1G10	3.4	3.2	98.8	1.3	9.2	1.8
1 个月 25℃						
3G5	1.7	1.5	98.9	1.2	12.3	0.9
2P5	1.7	1.5	98.9	1.1	10.1	1.0
1GP5	1.7	1.7	98.5	1.5	10.5	0.9
1G10	3.4	3.3	98.8	1.2	8.7	1.3
2 个月 25℃						
3G5	1.7	1.5	98.8	1.2	12.7	0.7
2P5	1.7	1.8	98.5	1.5	10.7	0.9
1GP5	1.7	1.7	98.7	1.3	12.2	1.0
1G10	3.4	3.4	98.7	1.3	9.3	1.3

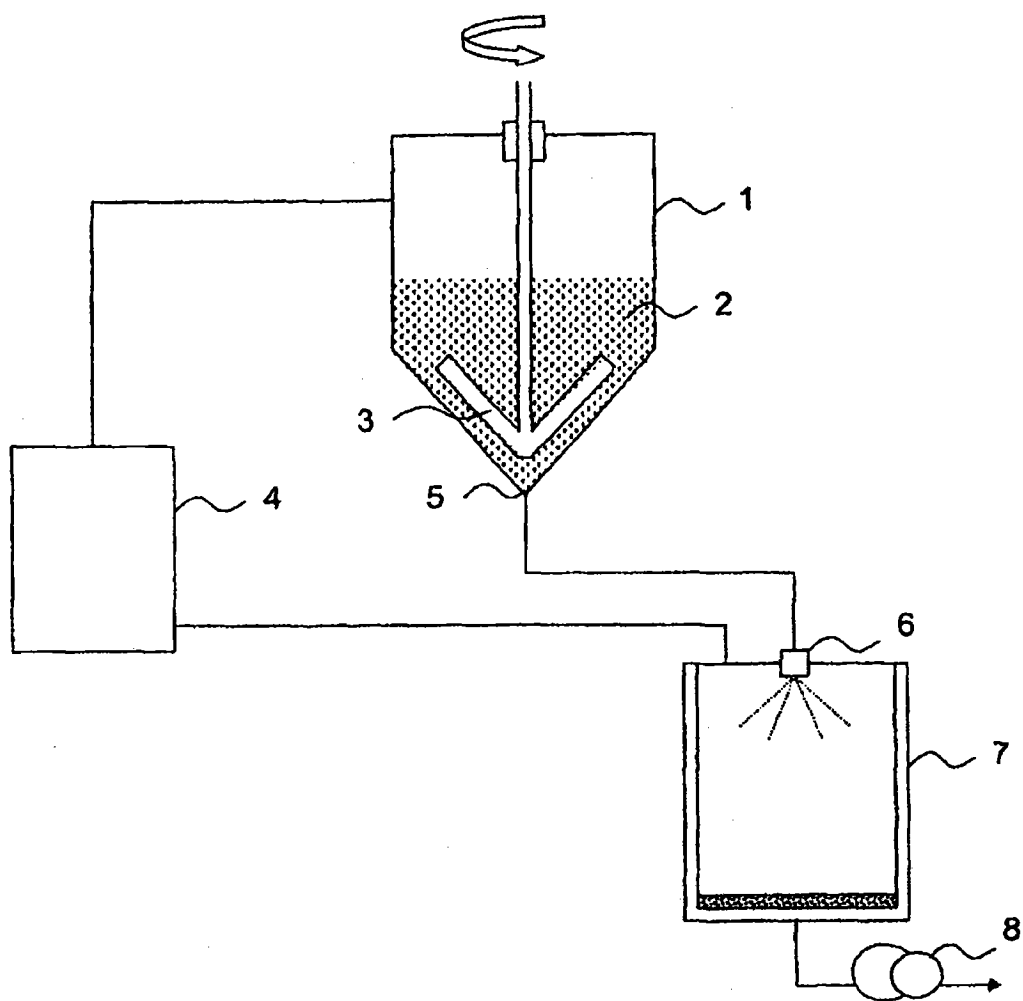
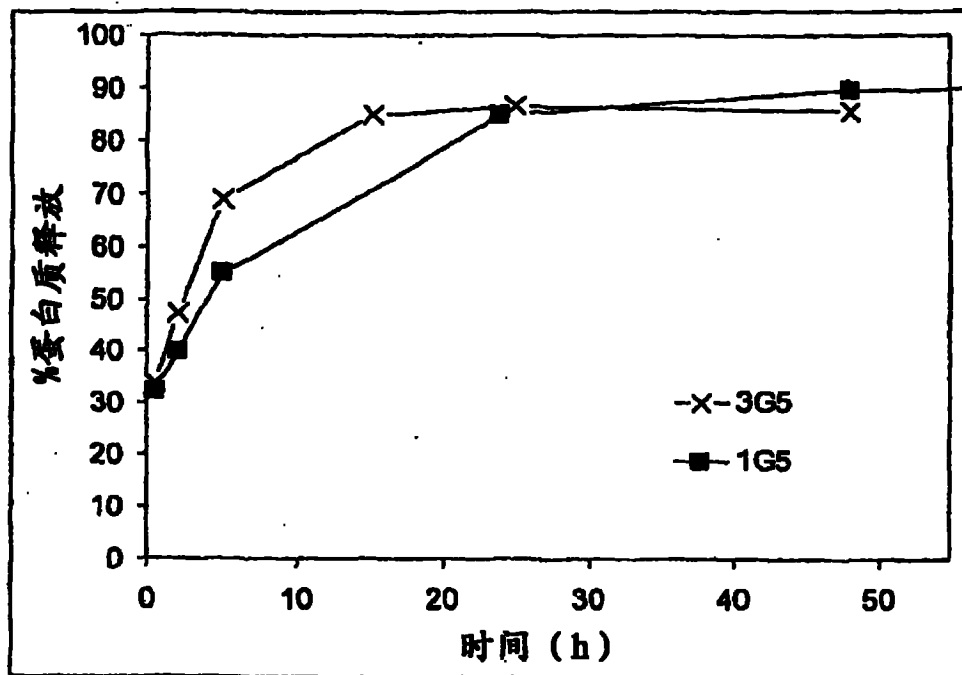
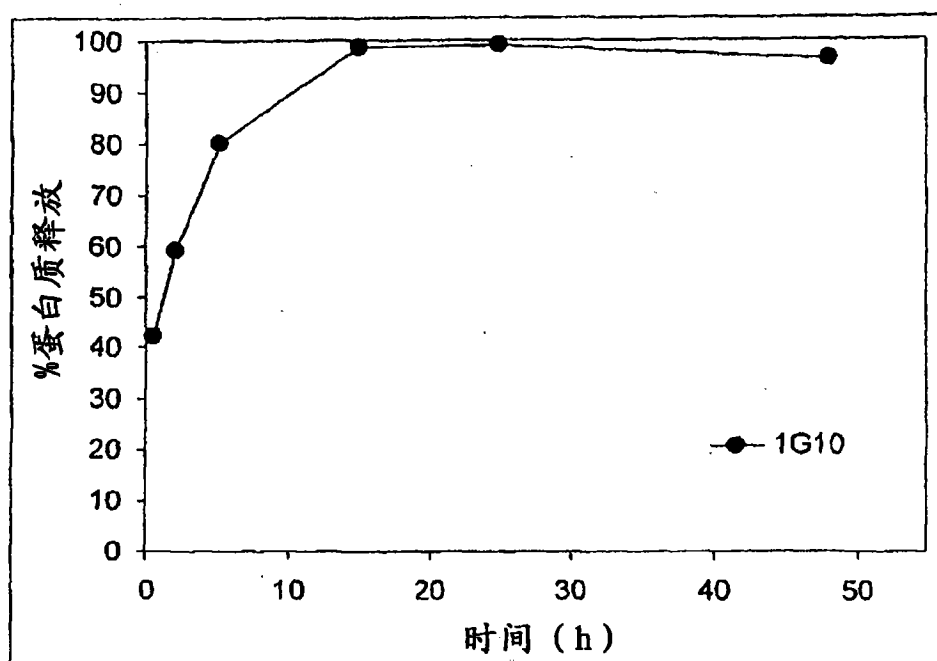


图 1



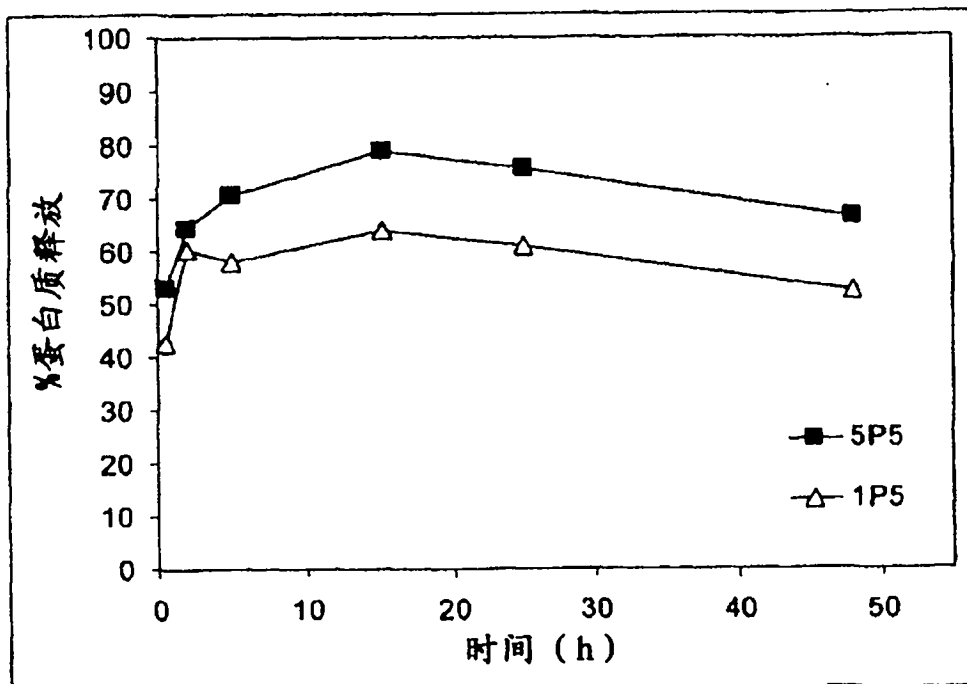
含5% hGH核心微粒的2 Gelucire®-基微囊配制剂 (1G5, 3G5) 的体外释放曲线。 %蛋白质释放是基于实验测定的微囊hGH负载计算的。

图 2a



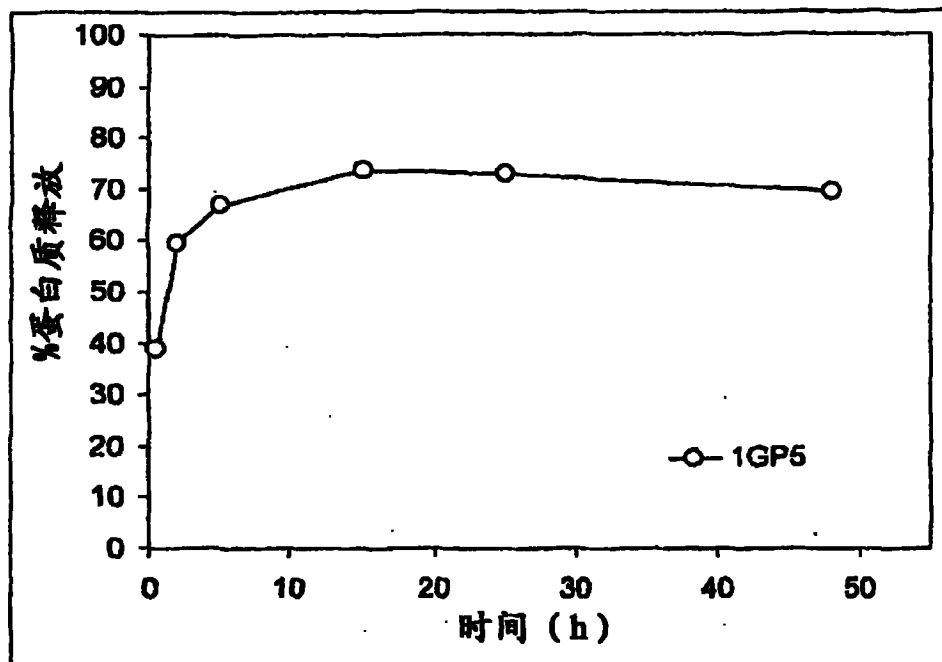
具有10% hGH微粒有效负载的Gelucire®-基微囊配制剂的体外释放曲线。该释放曲线是鉴于实验测定的hGH负载计算的。

图 2b



2 Precirol®-基微囊配制剂 (1P5, 5P5) 的体外释放曲线。 %蛋白质释放是基于实验测定的微粒的hGH负载计算的。

图 3



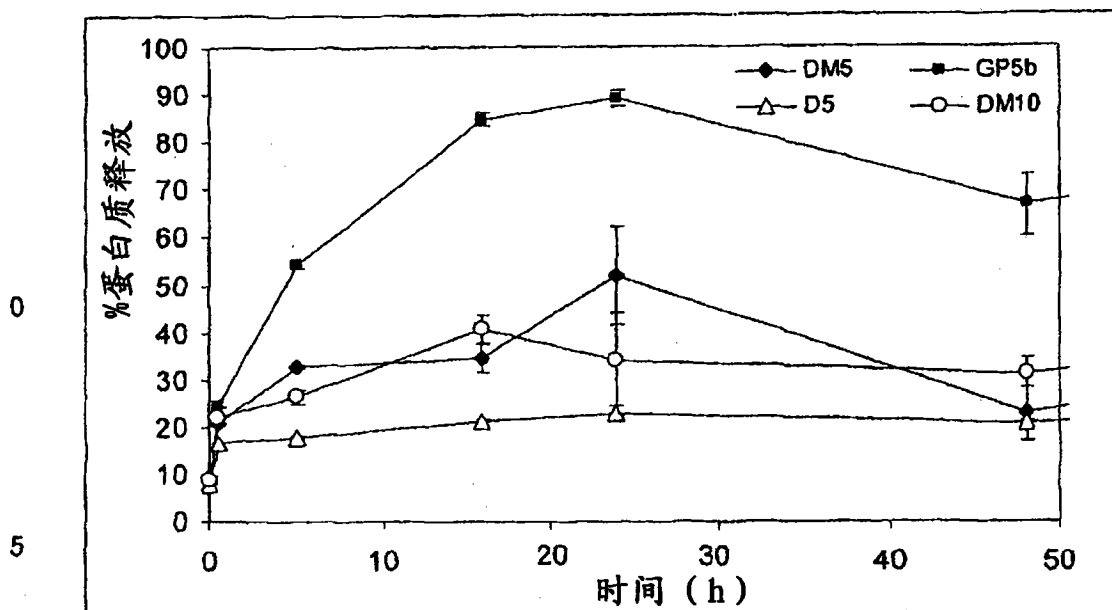
一种Precirol®/Gelucire®-基配制剂 (1GP5) 的体外释放曲线。%蛋白质释放是基于实验测定的微粒的hGH负载计算的。

图 4

FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSES IPT
 60
 PSNREETQQK SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVMGASDSNV YDLLKOLEEG
 120
 IQTLMGRLED GSPRTGQIEK QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV
 180
 QCRSVEGSCG F

人生长激素的氨基酸序列

图 5



微囊配制剂的体外释放曲线 (DM5, GP5b, D5, DM10)。
%蛋白质释放是基于实验测定的微粒的hGH负载计算的。

图 6