[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 38/18
A61K 9/16 A61K 47/02

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96194611.3

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177612C

[22] 申请日 1996.6.3 [21] 申请号 96194611.3
[30] 优先权
[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/478,502
[86] 国际申请 PCT/US1996/008474 1996.6.3
[87] 国际公布 WO1996/040073 英 1996.12.19
[85] 进入国家阶段日期 1997.12.8
[71] 专利权人 阿尔克姆斯控制治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 史蒂芬·E·扎尔 保尔·A·伯克
霍华德·伯斯滕
阿夫拉姆·布瑞克勒
审查员 李 博

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图 4 页

[54] 发明名称 非凝集体促红细胞生成素的延续释放组合物

[57] 摘要

本发明涉及延续释放非凝集体促红细胞生成素的组合物以及所述组合物的制备方法。 本发明的延续释放组合物包括生物学相容的聚合物以及生物活性剂颗粒，非凝集体促红细胞生成素，其中，所述的颗粒被分散在所述的生物学相容的聚合物内。本发明的制备延续释放非凝集体促红细胞生成素的组合物的方法包括将生物学相容的聚合物溶于聚合物溶液中，得到聚合物溶液，将生物学活性剂、凝集稳定化的促红细胞生成素的颗粒分散于该聚合物溶液中，再将聚合物固化，形成含有分散的所述的促红细胞生成素颗粒的聚合物基质。 本发明组合物的使用方法是给对象提供治疗有效血液水平剂量的生物学活性非凝集体促红细胞生成素来实现一段时间的延续释放。 采用本方法，就可以给对象提供有效剂量的本发明的延续释放组合物。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种从聚合物基质中延续释放生物学活性非凝集的促红细胞生成素的组合物，包括:

(a) 生物学相容的聚合物；和

(b) 生物学活性凝集稳定的促红细胞生成素颗粒，其中所述的颗粒包括与盐析盐接触的促红细胞生成素，所述的盐析盐降低促红细胞生成素在水溶液中溶解度，并且，所述的促红细胞生成素颗粒被分散在该聚合物基质内。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的盐包括选自由 Mg^{2+}、Li^{+}、Na^{+}、K^{+}、NH_4^{+}和它们的组合组成的组的阳离子。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中所述的盐包括选自由 SO_4^{2-}、HPO_4^{2-}、乙酸根、柠檬酸根、酒石酸根、Cl^{-}、NO_3^{-}、ClO_3^{-}、I^{-}、ClO_4^{-}、SCN^{-}和它们的组合组成的组的阴离子。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的盐是硫酸铵。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的盐的含量为促红细胞生成素中总固体颗粒重量的 10%至 80%或至少为 40%。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的促红细胞生成素的凝集被保持在开始剂量的 5%以下。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的聚合物选自聚丙交酯，聚乙交酯，聚（丙交酯-共-乙交酯），聚乳酸，聚乙醇酸，聚己内酯，聚碳酸酯，聚酰胺酯，聚酐，聚氨基酸，聚原酸酯，聚缩醛，聚二噁烷，聚亚烷基烷基酯，聚氨基甲酸酯，以及它们的混合物和共聚物。

8. 根据权利要求 7 所述的放组合物，其中所述的聚合物选自聚丙交酯，聚乙交酯，聚（丙交酯-共-乙交酯）。

9. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的促红细胞生成素颗粒在所述聚合物中的重量含量为 0.1%至 30%。

10. 根据权利要求 9 所述的组合物，其中所述的促红细胞生成素颗粒在所述聚合物中的重量含量为 5%。

11. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的促红细胞生成素是在有缓冲液保持 pH 在 4.0 ~ 8.0 之间冷冻干燥的。

12. 根据权利要求 11 所述的组合物，其中所述的缓冲液选自磷酸盐和柠檬酸盐缓冲液。

13. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述的生物学相容的聚合物进一步包括多价金属阳离子组分，其中，该金属阳离子组分不被包含在所述的促红细胞生成素颗粒中，并且，其中，该金属阳离子组分被分散在该生物学相容的聚合物中，用来调节促红细胞生成素从该基质中的释放。

14. 根据权利要求 13 所述的组合物，其中所述的金属阳离子组分中的金属阳离子是选自由 Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}组成的组的多价离子。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物，其中所述的金属阳离子组分选自 $Mg(OH)_2$、$MgCO_3$、$ZnCO_3$、$CaCO_3$、$Zn_3(C_6H_5O_7)_2$、$Mg(OAc)_2$、$MgSO_4$、$Zn(OAc)_2$、$ZnSO_4$、$ZnCl_2$、$MgCl_2$ 和 $Mg_3(C_6H_5O_7)_2$。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的组合物，其中所述的金属阳离子组分与聚合物的重量比在 1:99 ~ 1:2 之间。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物，其中所述的金属阳离子组分是碳酸镁，占组合物总重量的约 10%。

18. 根据权利要求 1 所述的组合物在制备治疗贫血的药物中的应用。

19. 一种生物学活性凝集稳定的促红细胞生成素，包括经过冷冻干燥的含有促红细胞生成素、硫酸铵和缓冲液的溶液，其中所述的缓冲液的 pH 为 4 ~ 8。

20. 根据权利要求 19 所述的促红细胞生成素，其中所述的硫酸铵的重量含量为总固体颗粒重量的 10% ~ 80%，或至少为 40%。

21. 根据权利要求 20 所述的促红细胞生成素，其中所述的缓冲液是磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液。

22. 根据权利要求 19 所述的促红细胞生成素在制备治疗贫血的延续释放组合物中的应用。

23. 一种制备生物学活性凝集稳定促红细胞生成素颗粒的方法，该方法包括下述步骤:

(a) 将盐析盐、生物学活性促红细胞生成素和 pH 为 4～8 的缓冲液相混合，形成凝集稳定的混合物；以及

(b) 将所述的混合物冷冻干燥形成生物学活性凝集稳定的促红细胞生成素的颗粒。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的抗凝集剂是硫酸铵，并且硫酸铵的加入重量是总固体颗粒重量的 10%～80%，或至少为 40%。

25. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的缓冲液是磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液。

26. 根据权利要求 23 所述的方法，进一步包括如下步骤:

c) 将生物学活性、凝集稳定的促红细胞生成素颗粒分散在一种聚合物溶液中，该聚合物溶液含有一种生物学相容聚合物和一种用于该聚合物的溶剂；以及

d) 固化该聚合物以形成一种包含所述促红细胞生成素颗粒的分散体的聚合物基质。

说 明 书

非凝集体促红细胞生成素的延续释放组合物

与本发明相关的背景技术

促红细胞生成素（ EPO ）是一种糖蛋白，可以从尿液中制备，也可以利用重组遗传工程来制备，它用作提高患者血红细胞数目的补血药。

正常情况下，血红细胞的生产需要由肾来分泌促红细胞生成素。促红细胞生成素启动骨髓中受体干细胞的繁殖和分化，刺激在成熟的红细胞合成血红蛋白，加速血红细胞从骨髓到循环系统的释放，从而提高血红细胞的数量。

通常，促红细胞生成素用来治疗贫血病人，特别是肾功能有问题的贫血患者。现在，一般采用皮下或静脉内每周三次给以促红细胞生成素水液来保持适当的血清促红细胞生成素水平。

对于长期接受促红细胞生成素的患者来讲，经常性地注射促红细胞生成素水液会导致血清促红细胞生成素水平的显著变化，以及患者应变性的问题。

为了解决伴随着注射促红细胞生成素水液的问题，已经尝试过制备含有比注射液浓度更高剂量的可控释放装置，将促红细胞生成素包被在聚合物和/或蛋白质内，使促红细胞生成素可以在体内释放一周或更长。

然而，这些可控释放装置一般都表现出开始时的促红细胞生成素释放水平很高，随后的释放就减少了。进而，由于这些延续释放装置内含有高剂量的促红细胞生成素，所以，促红细胞生成素分子（单体）就会在几天后发生凝集的现象，形成凝集的促红细胞生成素，这种凝集的促红细胞生成素与促红细胞生成素单体不同，它们在体内是免疫原性质的。

因此，就存在着可以在体内延续释放生物学活性的促红细胞生成素但又不引起免疫系统在促红细胞生成素的释放期间内发生反应的制剂和装置。

本发明的概述

本发明涉及延续释放生物学活性的促红细胞生成素的组合物和所述组合物的制备方法以及使用方法。本发明的延续释放组合物包括生物学相容的聚合物以及生物学活性凝集稳定性的促红细胞生成素的颗粒，其中，所述的颗粒被分散在所述的生物学相容的聚合物内。

本发明的制备延续释放非凝集体促红细胞生成素的组合物的方法包括将生物学相容的聚合物溶于聚合物溶剂中，形成聚合物溶液，将凝集稳定化的促红细胞生成素颗粒分散于该聚合物溶液中，再将聚合物固化，形成含有分散的所述的促红细胞生成素颗粒的聚合物基质。

这种促红细胞生成素的延续释放制剂的优点是提供在体内的更长时间、更为一致的血液水平的促红细胞生成素，降低开始时候的促红细胞生成素的冲击水平，并通过消除血清促红细胞生成素水平的波动来提高治疗效果。优点还包括通过减少注射次数而使患者的接受和相容性得到提高。这些优点还包括可以使用比注射更少量的

促红细胞生成素，因为血清促红细胞生成素的水平被维持在靠近治疗阈限值附近。

附图的简要说明

图 1 中的 a)是单体促红细胞生成素释放的累积图， b) 是促红细胞生成素（单体加凝集的促红细胞生成素）释放的累积图， c) 是在 28 天的期间内，从含有 10%（ w/w ） $MgCO_3$ 和 5%（ w/w ）的实施例 1 的 Am1 制剂的未封闭的聚（丙交酯-共-乙交酯）聚合物（ PLGA ）（分子量 10000 道尔顿）的微球中，从开始时刻到各个记时点之间在体内 HEPES 缓冲液中释放的单体促红细胞生成素的百分数对时间的作图。

图 2 中的 a) 是单体促红细胞生成素释放的累积图， b) 是促红细胞生成素（单体或凝集的促红细胞生成素）释放的累积图， c) 是在 28 天的期间内，从含有 10%（ w/w ） $MgCO_3$ 和 5%（ w/w ）的实施例 1 的 Am7 制剂的未封闭的聚（丙交酯-共-乙交酯）聚合物（ PLGA ）（分子量 10000 道尔顿）的微球中，从开始时刻到各个记时点之间在体内 HEPES 缓冲液中释放的单体促红细胞生成素的百分数对时间的作图。

图 3 中的 a) 是单体促红细胞生成素释放的累积图， b) 是促红细胞生成素（单体或凝集的促红细胞生成素）释放的累积图， c) 是在 28 天的期间内，从含有 10%（ w/w ） $ZnCO_3$ 和 10%（ w/w ）的实施例 1 的 Zn1 制剂的未封闭的聚（丙交酯-共-乙交酯）聚合物（ PLGA ）（分子量 10000 道尔顿）的微球中，从开始时刻到各个记时点之间在体内 HEPES 缓冲液中释放的单体促红细胞生成素的百分数对时间的作图。

图4是CS/HC处理和未处理的大鼠的血液中网状细胞的百分数对36天时间的作图，大鼠在第0天被皮下注射了实施例5的10000单位的促红细胞生成素延续释放微球RMAm7，在第28天又被注射了2000单位促红细胞生成素水液。

图5是被皮下注射了实施例3的各种促红细胞生成素延续释放微球的大鼠血清促红细胞生成素浓度（IU/ml）对22天时间的作图。

图6是被皮下注射了实施例3的10000单位促红细胞生成素延续释放微球的大鼠血液网状细胞百分数对28天时间的作图。

图7是被皮下注射了10000单位实施例2的延续释放微球的大鼠血清促红细胞生成素浓度（IU/ml）对28天时间的作图，其中的微球含有实施例1的AM7制剂并包被在未封闭的PLGA聚合物中，该聚合物的分子量是a) 10000道尔顿， b) 31000道尔顿，或c) 48000道尔顿。

本发明的技术方案

本文中所述的促红细胞生成素（EPO），包括各种形式的EPO，例如， EPO-α和EPO-β。 EPO可为动物来源的，也可以是重组的，如美国专利第4,703,008号所述。

本发明中使用的EPO是分子形式（单体或非凝集体）生物学活性的EPO。单体EPO一般都不是免疫原性的。

凝集的EPO分子对于刺激血红细胞生产不是生物学活性的。另外，凝集的EPO可以引起免疫反应，引起抗EPO的抗体的产生。这就会削弱长期EPO治疗的效果。再者，凝集的EPO可以刺激自体免疫系统对外源性EPO的反应。

生物学活性的非凝集体的促红细胞生成素的延续释放，是在比直接注射 EPO 水液获得的释放期更长的期间内，释放可以测量到的血清水平的生物学活性单体性 EPO。优选的延续释放期将可以在约一周或更长，更为优选的是两周或更长。

从聚合物基质内延续释放生物学活性的非凝集体 EPO，可以是连续的或不连续的，其释放量可以是相对恒定的，也可以是变化的。EPO 释放的连续性和释放的水平可以根据多种因素，例如，使用一种或多种聚合物组合物， EPO 的加载量，和/或赋形剂的选择等来达到理想效果。

本文中，凝集稳定的促红细胞生成素包括生物学活性的、并被至少一种抗凝集剂稳定过的单体 EPO。在一个实施方案中，适合于作为抗凝集剂的一类物质或一些物质的组合物包括，能够降低 EPO 在水性液体中的溶解性的物质，例如，降低在 PBS， HEPES 或体液（例如，淋巴液）中的溶解性并维持局部的 EPO 的浓度低于 EPO 分子发生明显凝集的浓度的物质。本文中所述的局部 EPO 浓度指的是在延续释放微球或装置的周围、之间或之内的溶化的 EPO 浓度。

在另一个实施例中，适宜的抗凝集剂包括可以防止明显的 EPO 单体凝集的碳水化合物，虽然其工作原理尚不清楚。

显著的凝集指的是开始包被的 EPO 单体的数量中有约 10%或更多发生凝集。一般优选将凝集保持在开始 EPO 单体剂量的约 5%以下。更为优选的是将凝集保持在开始 EPO 单体剂量的约 2%以下。在实施例 3 和 4 中，进一步讨论了本发明延续释放组合物的凝集水平。

在一个实施例中，一种抗凝集剂通过将 EPO 从水性溶液中沉淀出来降低了 EPO 的溶解性，保持了适宜的较低的局部 EPO 浓度。

可以沉淀蛋白质但又不使蛋白质变性的物质包括盐，例如由 Thomas E. Creighton 在《蛋白质：结构和分子原理》（Proteins: Structures and Molecular Principles, p149-150; published by W.H. Freeman and Company, New York）中所描述的属于 Hofmeister 系列的沉淀血清球蛋白的那些盐（或称作为“盐析”盐）。本发明中可以使用的盐析盐包括，含有一种或一种以上的 Mg^{2+}、Li^{+}、Na^{+}、K^{+}、和 NH_4^{+} 的金属阳离子，并含有一种或一种以上的 SO_4^{2-}、HPO_4^{2-}、乙酸根、柠檬酸根、酒石酸根、Cl^{-}、NO_3^{-}、ClO_3^{-}、I^{-}、ClO_4^{-}和 SCN^{-}阴离子的盐。

在另一个实施例中，抗凝集剂包括碳水化合物，例如甘露醇。

在众多的抗凝集剂中选择适合稳定 EPO 的抗凝集剂时，本领域的技术人员可以通过稳定性测试方法来进行确定，例如，可以使用的方法有 SEC、聚酰胺凝胶电泳（PAGE），也可以采用确定蛋白质活力的方法来确定延续释放组合物中释放出来的含有凝集剂的 EPO 颗粒的蛋白质活性，例如实施例 3 中所述。

适宜的生物学活性凝集稳定的促红细胞生成素的颗粒是固体颗粒，包括冷冻干燥的颗粒、冻干颗粒、压片，以及用其它已知的从两种成分（例如，EPO 和抗凝集剂）且其中一种是温度敏感成分的混合物中制备固体颗粒的方法而制备的颗粒。

当生物学活性凝集稳定的 EPO 被冷冻干燥时，优选 EPO 含有缓冲液使其pH值处于的范围可以防止在冷冻干燥时发生 pH 变化而使生物学活性受到明显损失。适宜的 pH 值的范围一般为约 4.0-8.0。优选的 pH 值的范围是约 5.0-7.0。一般使用液体缓冲液例如碳酸氢钠来达到适宜的 pH 范围。适宜的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、以及它们的结合。

EPO 颗粒中还可以含有其它的赋形剂，例如稳定剂和填充剂。加入稳定剂的目的是保证 EPO 在整个释放期间的活力。适宜的稳定剂包括，例如，碳水化合物、氨基酸、脂肪酸、和表面活性剂，以及其它的本领域所熟知的。稳定剂的使用数量依照对 EPO 的重量比来确定。对于氨基酸、脂肪酸、碳水化合物例如蔗糖、麦芽糖、菊粉、葡聚糖和肝素来讲，则碳水化合物对 EPO 的重量比一般为约 1:1 至约 20:1 。对于表面活性剂来讲，例如 TWEEN™ 和 PLURONIC™ 来讲，表面活性剂对 EPO 的比例为约 0.01:1 至约 1:1 。

填充剂一般包括惰性物质。适宜的填充剂都是本领域所熟知的。

在本发明延续释放组合物中用作基质的适宜的聚合物有生物学相容的聚合物，包括生物降解和非生物降解的聚合物，以及这些聚合物的混合物和共聚物。

本文中所述的生物降解指的是在体内会分解或缺蚀从而生成较小化学物质的组合物。降解可以由例如酶学，化学或物理学过程来完成。适宜的生物学相容、生物降解的聚合物包括，例如，聚（丙交酯），聚（乙交酯），聚（丙交酯-共-乙交酯），聚（乳酸），聚（乙醇酸），聚（乳酸-共-乙酯酸），聚己内酯，聚碳酸酯，聚酰胺酯，聚酐，聚（氨基酸），聚原酸酯，聚缩醛，聚（二噁烷），聚（亚烷基烷基酯），生物降解的聚氨基甲酸酯，以及它们的混合物和共聚物。适用于本发明调控释放组合物的生物学相容、非生物降解的聚合物包括选自下组的非生物降解的聚合物，聚丙烯酸酯，亚乙基-乙烯基乙酸酯的聚合物和其它酰基取代的纤维素乙酸酯，非生物降解的聚氨基甲酸酯，聚苯乙烯，聚氟乙烯，聚氟乙烯，聚（乙烯咪挫），氯磺化聚烯烃，聚环氧乙烷，以及它们的混合物和共聚物。

如果聚合物和其降解后的产物对接受者不具有毒性，也不产生明显的有害作用及副作用，例如不在注射位置产生免疫反应，则该聚合物或其聚合物基质就是生物学相容的。

另外，聚合物的终端基团可以被修饰。例如，聚合物可以被封闭，未被封闭，或者是被封闭物与未被封闭物的混合物。被封闭的聚合物指的是本领域内传统定义的被封闭物，特别是羧基终端被封闭。通常，封闭基团从聚合反应的起始物衍生而来，并且通常是酰基基团。未被封闭的聚合物如本领域内通常所定义，特别是具有自由羧基终端基团。

本发明中可用的聚合物的分子量，可以由本领域的技术人员根据所需的聚合物降解速率，物理性质如机械强度，聚合物在溶液中的溶解速率等因素来确定。通常，可接受的分子量的范围在约 2,000 道尔顿至约 2,000,000 道尔顿。在优选方案中，聚合物是生物降解的聚合物或共聚物。在更优选的方案中，聚合物是聚（丙交酯-共-乙交酯）（此后缩略为“PLGA”），且丙交酯与乙交酯的比率为约 1:1，分子量大约为 5,000 道尔顿至约 70,000 道尔顿。在更为优选的方案中，本发明中所用的 PLGA 的分子量为约 10,000 道尔顿。

延续释放组合物微球内所含有的 EPO 数量，或者是在另外类型延续释放装置用含有的凝集稳定的 EPO 颗粒的数量是预防性或治疗性有效量，可以由本领域的技术人员根据体重，病状，使用的聚合物的种类，从聚合物中释放出来的量等因素来决定。

在一个实施方案中，EPO 延续释放组合物含有约 0.01% (w/w) 至约 50% (w/w) 生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒。EPO 颗粒的使用量将根据需要 EPO 达到的效果，计划的释放水平，释放 EPO 的时间，EPO 的释放期等而变化。优选的 EPO 颗粒装载量的范围在约 0.1% (w/w)至约 30% (w/w) EPO 颗粒。更优选的 EPO 颗粒装载量

的范围在约 0.1% (w/w)至约 10% (w/w) EPO 之间。最优选的生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒的装载量为约 5% (w/w)。

在另一个优选方案中， EPO 延续释放组合物还含有金属阳离子组分，但是，它并不含在生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒之内，而是分散在聚合物之中。

本文中所述的金属阳离子组分是含有至少一种处于非游离状态、或处于游离状态、或这两种状态结合的多价金属阳离子（二价或更高价）成分。适宜的金属阳离子成分包括，例如，金属盐、金属氢氧化物、含有金属阳离子的强碱（ pH 为约 7 ，或更高）弱酸盐。优选的金属阳离子为二价的金属阳离子。

如果金属阳离子成分对接受者不具有毒性，也不产生明显的有害作用及副作用，例如不在注射位置产生免疫反应，则该金属阳离子就是生物学相容的。

金属阳离子成分可以含有另外的阳离子和/或含在 EPO 颗粒的抗凝集剂中的阴离子。金属阳离子成分起着调节从延续释放组合物的聚合物基质中释放 EPO 的作用，还可以提高 EPO 在组合物中的稳定性。在调控的 EPO 释放中，至少有一种 EPO 释放的特征，例如， EPO 的起始释放水平、其后的释放水平、释放的期间和/或释放量中的一个特征，与不含金属阳离子成分的聚合物基质释放 EPO 的特征不同。

用于调控释放的金属阳离子成分包括至少一种多价金属阳离子。适宜的调控释放 EPO 的金属阳离子组分的实例包括或含有 $Mg(OH)_2$、 $MgCO_3$ (例如， $4MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$)、 $ZnCO_3$ (例如， $3Zn(OH)_2 \cdot 2ZnCO_3$)、 $CaCO_3$、 $Zn_3(C_6H_5O_7)_2$、 $Mg(OAc)_2$、 $MgSO_4$、 $Zn(OAc)_2$、 $ZnSO_4$、 $ZnCl_2$、 $MgCl_2$ 和 $Mg_3(C_6H_5O_7)_2$。

优选的金属阳离子组分与聚合物的重量比例为约 1 ： 99 至约 1 ： 2 。最佳的比例取决于所使用的聚合物和金属阳离子组分。在本申请的共悬未决美国专利申请 08/237,057 和共悬未决的 PCT 申请 PCT/US 95/05511 号中，有对于用含有分散的金属阳离子组分的聚合物基质调控从聚合物基质中释放生物活性剂的进一步描述，这两篇文献的教导都通过在此引述而合并于本文。

在另一个方案中，微颗粒中含有至少一种成孔剂，例如，水溶性盐，糖或氨基酸，对微颗粒的微结构进行修饰。加入到聚合物溶液中的成孔剂的份额为约 1% (w/w)至约 30% (w/w)。优选的是在本发明的非生物降解聚合物基质中加入至少一种成孔剂。

在本发明中的 EPO 延续释放组合物可以为膜状、片状、筒形、盘状和微颗粒状。在本文中所说的微颗粒包括直径小于约 1 毫米的聚合物颗粒，并有生物学活性凝集稳定的 EPO 分散于其中。微颗粒可以是球形的、非球形的、或非规则状的。优选微颗粒是微球形的。一般，微颗粒的尺寸应该适宜于注射。微颗粒的优选直径尺寸范围是约 1 至 180 微米，可以通过 23 号针头注射。

在本发明的制备 EPO 延续释放组合物的方法中，适宜量的生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒被分散在聚合物溶液中。分散的方法包括搅拌，搅动，超声或其它熟知的混合方法。含有分散的生物学活性凝集稳定的 EPO 的聚合物溶液再经过适宜方法的固化，形成本发明的 EPO 延续释放组合物。

另外，生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒和聚合物混合到聚合物溶液中时，可以依次加入，颠倒加入，间隔加入，分开加入或同时加入，从而形成 EPO 颗粒在聚合物溶液中的分散液。

适宜的聚合物溶液含有大约 1% (w/w)至约 30% (w/w)的适宜的生物学相容的聚合物，其中，生物学相容的聚合物通常溶于适宜的聚合物溶液中。优选的是，聚合物溶液中含有约 2% (w/v)至约 20% (w/v)聚合物。最优选的聚合物溶液中含有约 5%至约 10% (w/w)聚合物。

适宜的聚合物溶剂指的是，聚合物在其中溶解，但是，生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒在其中基本不溶解并且不反应。适宜的聚合物溶剂的例子有，极性有机液体，例如，二氯甲烷，氯仿，乙酸乙酯和丙酮。

本发明的 EPO 延续释放微颗粒的制备在实施例 2 中有进一步的描述。

制备生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒时， EPO 与至少一种 EPO 抗凝集剂混合到适宜的溶剂中，形成稳定化的混合物，其中，每一种组分都可以是悬浮或溶解状态的，或者是悬浮与溶解共存。

在形成稳定化的混合物时，抗凝集剂的含量一般为 EPO 颗粒的总固体的约 10%（ w/w ）至约 80%（ w/w ），并且优选为 40%（ w/w ）。

应该理解的是， EPO 在与抗凝集剂组分接触之前，可以是固态或溶解状态的。还应该理解的是，抗凝集剂在与 EPO 接触之前，可以是固态或溶解状态的。在优选的技术方案中，是将 EPO 水溶液与抗凝集剂组分的水溶液相混合来形成稳定的混合物。

然后，该稳定化的混合物被形成生物学活性凝集稳定的促红细胞生成素颗粒。任何本领域中已知的从两种成分且其中一种为温度敏感成分的混合物中制备固体颗粒的方法都可以被采用。例如，溶

解的稳定化混合物可以经过蒸发、冷冻干燥、冻干。固体的稳定化混合物可以被压成片状。

在本发明的一个实施方案中，溶解的稳定化混合物是在缓冲液中被缓冲，该缓冲液保持 pH 值为使生物学活性不会由于颗粒成型的过程（例如，在冷冻干燥）中的 pH 改变造成明显损失的 pH 值。一般，在稳定化混合物中缓冲液对 EPO 的比例为总固体的约 5%（w/w）至约 20%（w/w）。适宜的溶剂是，EPO 和抗凝集剂在其中都至少微溶，如同在碳酸氢钠缓冲液或磷酸盐缓冲液中一样。对于水性溶剂，优选使用的是水，去离子水和注射用水都可以。

稳定化混合物一般被缓冲到 pH 为约 4.0 至 8.0 之间。优选的 pH 值范围是约 5.0 至 7.0 之间。优选的 pH 值范围一般通过使用水性缓冲液，例如磷酸盐缓冲液来实现。更优选的缓冲液包括磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、以及它们的结合。

适宜的 pH 值范围可以通过缓冲液透析来实现，即利用缓冲液作为对 EPO 和/或抗凝集剂的溶剂，在加入抗凝集剂之前、之中、和/或之后将大量的缓冲液加入到 EPO 溶液中。

然后，对溶解的稳定的混合物进行干燥，例如冷冻干燥，形成生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒。稳定化的混合物可以成批量的干燥，也可分成小部分后干燥。

在优选的技术方案中，稳定化的混合物被微颗粒化，例如，使用超声喷嘴，冷冻，然后冷冻干燥，形成生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒。

在另一个优选实施例中，稳定化混合物是一种缓冲溶液，含有 EPO、硫酸铵（约每克 EPO 为约 6 克至 8 克硫酸铵）、和缓冲液

（约每克 EPO 为约 5 克至 30 克缓冲液），pH 为约 5 至 7 。更优选的是缓冲溶液为 5 mM 柠檬酸盐/5 mM 磷酸盐缓冲液，或 5 mM 磷酸盐缓冲液（ pH 7 ）。

在优选的技术方案中，凝集稳定的EPO的直径为约1至6微米。EPO 颗粒可以破碎分开，如在共悬未决的 1993 年 1 月 21 日提交的美国专利申请 08/006,682 所描述的生产生物学活性制剂小颗粒的方法，该篇文献通过在此引述而全部合并于本文。另外， EPO 颗粒可以在加入到聚合物溶液之后再破碎，例如，使用超声破碎、或超声喷嘴。

对于生物学活性凝集稳定的EPO颗粒的合成在实施例1中有进一步的描述。在实施例 2-5 中，还给出了含有生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒的微球的描述和其释放药理动力学和药效学的描述。

在本发明方法的一个技术方案中，聚合物溶液中还有不含在 EPO 颗粒内的金属阳离子组分，该金属阳离子组分被分散在聚合物溶液中，调控 EPO 的释放。

应该理解的是，金属阳离子组分和凝集稳定的 EPO 颗粒可以依次，颠倒，间隔，分别和同时加入到聚合物溶液中。

另外，聚合物，金属阳离子组分和凝集稳定的 EPO 可以依次，颠倒，间隔，分别和同时加入到聚合物溶剂中。

调控释放生物活性剂的组合物的形成方法在共悬未决的美国专利 08/237,057 和共悬未决的 PCT 申请 PCT/US95/05511 中有进一步的描述。

含有凝集稳定的 EPO 颗粒和金属阳离子组分的微球，在实施例 2 中有进一步的描述。

一种适宜的以聚合物溶液固化形成含有凝集稳定的 EPO 的聚合物基质的方法是溶剂蒸发法，见于授予 Schnoring 等的美国专利 3,737,337，授予 Vranchen 等的美国专利 3,523,906，授予 Kitajima 等的美国专利 3,691,090，以及授予 Tice 等的美国专利 4,389,330，这些文献都通过在此引述而全文合并于本文。溶剂蒸发法通常都用作形成 EPO 延续释放微颗粒或其它的形状的 EPO 延续释放装置的方法。

在溶剂蒸发方法中，含有凝集稳定的 EPO 颗粒悬浮液的聚合物溶液混合到或搅拌到使聚合物溶剂部分混溶的连续相中，形成乳化液。该连续相一般都是水性溶剂。通常，乳化剂都包括在连续相中以稳定乳化液。然后，对聚合物溶剂进行数小时或更长的蒸发，使得聚合物固化，得到分散有凝集稳定的 EPO 颗粒的聚合物基质。在该方法中，必须小心的是，不要对聚合物溶液加热过高使 EPO 在 EPO 颗粒中变性。实施例 2 中进一步讨论了高水平生物学活性，即高于 98%的生物学活性仍然被保持的本发明的微颗粒。

另一种适宜的以聚合物溶液固化形成含有凝集稳定的 EPO 的聚合物基质的方法是相分离法，见于美国专利 4,675,800，该篇文献通过在此引述而全文合并于本文。在该方法中，含有凝集稳定的 EPO 颗粒的聚合物溶液中的聚合物被用加入该聚合物的非溶剂沉淀在 EPO 颗粒周围，形成乳化液，其中的聚合物非溶剂与聚合物溶剂相混溶。

优选的从聚合物溶液中制备凝集稳定的 EPO 微颗粒的方法采用了快速冷冻和溶剂萃取的方法，可见于授予 Gombotz 等的美国专利 5,019,400 和在 1995 年 5 月 18 日申请的共悬未决美国专利申请

08/433,726 ，这两篇文献中的教导都通过在此引述而合并于本文。与其它方法相比，例如，与分相法相比，这种形成微球的方法可以进一步地减少制备对某种 EPO 的延续释放组合物的方法中的 EPO 的用量。这种微颗粒的形成方法的进一步描述还可见于实施例 2 。

在这种方法中，含有 EPO 颗粒分散液的聚合物溶液被处理以生成液滴，而且这些液滴中的大部分都含有聚合物溶液和生物学活性凝集稳定的 EPO 颗粒。这些液滴再经过适宜的方法冷冻，形成微颗粒。对聚合物溶液分散液进行处理来生成液滴的方法的示例包括将分散液直接通过超声喷嘴，压力喷嘴，瑞利喷射（ Rayleigh jet ），或者其它的已知的制造溶液液滴的方法。

适宜的将液滴冷冻来形成微颗粒的方法包括将液滴放置于或使其接近于液态气体，例如，液态氩，液态氮，形成冷冻的微液滴，然后再与液态气体分离。随后，再将微液滴与非溶剂液体接触，例如，乙醇，或者是乙醇与己烷或戊烷的混合物。冷冻的微液滴中的溶剂就被以固体和/或液体的形式萃取到非溶剂中，形成含有生物学活性凝集稳定的 EPO 微颗粒。加入乙烷与其它的非溶剂液体，例如己烷或戊烷，可以提高从聚合物中萃取溶剂的萃取率，例如，从聚（丙交酯-共-乙交酯）聚合物中萃取溶剂的比率。

通过改变液滴的大小，可以制备很宽尺寸范围的 EPO 延续释放微颗粒，例如，可以通过改变超声喷嘴的口径来改变液滴的大小。如果需要尺寸比较大的微颗粒，可以用注射机直接将微颗粒挤压到冷液体中来制备。增大聚合物溶液的粘度也可以增大微颗粒的尺寸。由这种方法生产的微颗粒大小可在很宽的范围内变化，例如，可在直径为 1000 微米至 1 微米的范围内变化，或者更小。

从聚合物溶液中制备 EPO 延续释放组合物的另一种方法包括挤压成膜，例如，使用模具制备薄膜或其它形状。例如，当把含有

凝集稳定的 EPO 颗粒分散液的聚合物溶液放入模具后，聚合物溶剂就可以通过已知的方法去除，或者通过降低聚合物溶液的温度，直到形成具有均匀干重薄膜或其它固定形态为止。在共悬未决的美国专利申请 08/237,057 中，对用聚合物溶液制备含有生物活性物质的成膜方法有进一步的描述。

本发明的制备生物学活性 EPO 延续释放组合物的方法也可以用于制备其它生物学活性制剂的延续释放组合物，只要这种生物学活性制剂可以溶解于水溶液中并有足够高的溶液浓度，具有凝集形成生物学非活性聚合物的倾向就可以。

据信， EPO 的释放有两种机制。 EPO 可以通过聚合物基质中的充满液体的通道渗透释放，例如，通过溶解 EPO 或者通过在合成延续释放组合物的过程中去除聚合物溶剂形成的空腔来完成。聚合物的水解速率可以通过非自然的 pH 值来提高。因此，酸性或碱性的赋形剂可以被加入到聚合物溶液中，用来形成微颗粒，改变聚合物侵蚀速率。

第二种机制是通过聚合物的降解来释放 EPO 。降解的速率可以通过改变聚合物水合速率的聚合物性质来控制。这些性质包括，例如，聚合物中不同单体的比例，例如，丙交酯与乙交酯的比例；使用 L-旋异构体来替代外消旋混合物；聚合物的终端基团和分子量等。这些性质影响亲水性和结晶性，从而控制聚合物的水合速率。亲水性赋形剂，例如，盐、碳水化合物、表面活性剂也可以被加入来提高水合性，从而改变聚合物的侵蚀速率。

通过改变聚合物的性质，可以控制渗透和/或聚合物降解对 EPO 释放的作用。例如，降低聚合物的分子量、使用未封闭的聚合物来替代封闭的聚合物、提高聚（丙交酯-共-乙交酯）聚合物中乙交酯成分的含量都可以提高聚合物的水解，从而使聚合物腐蚀造成的

EPO 释放得到提高。在实施例 5 中，对不同分子量的未封闭的 PLGA 聚合物的效果有进一步的描述。

本发明的组合物可使用于人和动物，可以通过注射，埋植（例如，皮下，肌肉，腹膜内，颅内，阴道内和皮内）使用，也可以施用于粘膜（例如，鼻腔内或以栓剂的方式施用），或就地施用（例如，灌肠或喷雾剂），从而根据已知的病理条件对各种需要 EPO 治疗的病状提供理想的 EPO 剂量。

本发明将由以下的实施例进一步详细描述。

本发明的最佳实施例

实施例 1

生物学活性凝集稳定的 EPO 的制备

促红细胞生成素是按照美国专利第 4,703,008 号所述得到的。EPO 溶于去离子水中，形成浓度为约 1 mg/ml 的水溶液。不同的 EPO 样品溶液对三种不同配方的缓冲液［5 mM磷酸盐缓冲液（pH 7）、5 mM 柠檬酸盐、5 mM 磷酸盐缓冲液（pH 7）、10 mM 碳酸氢盐缓冲液（pH 7）］进行透析。

透析后，在透析的溶液中的 EPO 浓度经过确定为约 1 mg/ml，确定方法为在 280 nm (ϵ = 1.345 L $gm^{-1}cm^{-1}$)测量。

经过透析的 EPO 溶液与候选的抗凝集剂（例如，硫酸铵、乙酸锌、甘露糖/蔗糖、甘露糖/麦芽糖）的浓缩溶液混合，形成如下表 1 所示的 EPO 制剂。这些候选的抗凝集剂的溶液还可以含有另外的赋形剂（例如，菊粉、甘油、TWEEN 20™ 表面活性剂）。

抗凝集剂的溶液是单独制备的，使用的缓冲液与对 EPO 进行透析的缓冲液相同，然后，将抗凝集剂的溶液加入到透析的 EPO 溶液中。

适当体积的抗凝集剂溶液分别加入到各个 50 ml 的聚丙烯试管中，得到各种制剂所需要的浓度（见表 I）。然后，将每种透析过的 EPO 溶液加到适宜的抗凝集剂溶液中，轻缓颠倒来混合这些溶液。

表 I

配方（wt%）	Am1	Am4	Am7	Ma1	Ma3	Ma4	Zn1	Zn6
EPO	10.0	10.1	9.9	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
硫酸铵	66.8	64.7	79.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
乙酸锌	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	76.9	76.9
甘露醇	0.0	0.0	0.0	62.5	62.5	72.5	0.0	0.0
蔗糖	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	0.0
麦芽糖	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0
5 mM 柠檬酸盐缓冲液（pH 7）	0.0	15.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 mM 磷酸盐缓冲液（pH 7）	0.0	0.0	10.0	7.5	7.5	7.5	0.0	0.0
5 mM 柠檬酸盐/5 mM 磷酸盐缓冲液（pH 7）	22.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10 mM 碳酸氢盐缓冲液（pH 7）	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.1	12.1
菊粉	1.1	10.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
甘油	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0
TWEEN 20™ 表面活性剂	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0

每种制备的EPO溶液被移取60 ml到带有Teflon管子的塑料注射器内，然后通过超声喷嘴（ V1A型； Sonics and Materials, Inc., Danbury, CT ）雾化到含有液氮的聚丙烯容器内，保证所有被雾化的物质始终被浸没，形成冷冻颗粒。该容器始终保持在-80 ℃，直到液氮全部挥发。然后，将含有生物学活性凝集稳定的EPO的冷冻颗粒转移到玻璃烧杯中，冷冻干燥得到生物学活性凝集稳定的EPO颗粒。在干燥氮气条件下将EPO颗粒从冷冻干燥器内移出，在低湿度的条件下操作，保存在干燥的-80 ℃条件下。

实施例 2

含有生物学活性凝集稳定促红细胞生成素的PLGA微球的制备

含有实施例 1 的配方的凝集稳定 EPO 的微球是从未封闭的（ 50:50;分子量10000道尔顿）PLGA（购买自Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc., Montvale, NJ ），或从封闭的（ 50:50；分子量 10000 道尔顿） PLGA （购买自 Birmingham Polymers, Inc., Birmingham AL ）制备的。

此外，含有 Am7 制剂的凝集稳定 EPO 颗粒的微球是从未封闭（ 50:50)的分子量为约31000道尔顿或45000道尔顿的PLGA（购买自 Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc., Montvale, NJ ）制备的。

使用了 Gombotz 等人（美国专利第 5,019,400 号）所述的方法把实施例 1 的凝集稳定的EPO颗粒装入胶囊。在每种情况下，聚合物溶解在 5.1ml 的二氯甲烷中形成聚合物溶液。将碳酸镁或碳酸锌过 38 微米的筛子，然后加入到聚合物溶液中使最终浓度为 10% w/v 。然后。将聚合物/盐悬浮液与30 mg凝集稳定EPO颗粒合并。

含有悬浮盐和EPO颗粒的聚合物溶液放置在冰水浴上，用超声器进行超声处理（ Virtis Co., Gardiner, NY ），使蛋白质颗粒的直径

被减小到大约 2-3 微米，形成 EPO 颗粒悬浮于聚合物溶液中的悬浮液体。

乙醇冷冻床在聚丙烯管子内准备，外部围绕以液氮，然后用另外的液氮覆盖冷冻的乙醇。然后将 EPO/聚合物悬浮液用注射泵（ Orion Resarch Inc., Boston, MA ）以 1-2 ml/min 的速率从注射器内泵入置于含有冷冻的乙醇的容器的上方的超声喷嘴中。该喷嘴将 EPO/聚合物悬浮液雾化成小液滴，与液氮接触使这些小液滴形成微球并沉到冷冻的乙醇的表面。

将该容器放入-80 ℃的冰箱内，使液氮蒸发，乙醇融化。当乙醇融化时，微球就沉入乙醇中，二氯甲烷从微球中萃取出来。 24 小时之后，再向该容器加入预冷到-80 ℃的另外的乙醇。制成微球二天后，使用预冷的过滤器以 0.65 微米的 Durapore™ 膜（ Millipore, Bedford, MA ）过滤乙醇/微球混合浆液。过滤在预先用氮气吹扫过的手套箱中进行。将过滤后的微球被冷冻干燥（在预冷到-40 ℃的架子上）至干。

然后，对这些延续释放微球中 EPO 的免疫活性通过提取蛋白和放射性免疫检测（ RIA ）（ Incstar： Stillwater， MN ）进行了确定。为了将 EPO 从微球中提取出来，将大约 10 mg 的微球放到含有 250 μl 的二氯甲烷的试管中。将该样品涡旋 10 到 20 秒钟，放置在室温下 5 分钟使聚合物溶解。加入丙酮（ 750 μl ），再次涡旋 10 秒钟，在 4 ℃以 14000 转/分离心 30 秒钟，得到沉淀的 EPO 。移去上清液，重复上面的二氯甲烷和丙酮步骤两次。将样品用冷冻干燥器干燥或放入真空干燥箱中于室温下干燥 14-18 小时。将该 EPO 沉淀重新放入 1 ml 的 HEPES 缓冲液中并涡旋约 10 秒钟，然后在室温下放置约 1 小时直至完全溶解。被提取的 EPO 用缓冲液（ 8.1 mM

Na_2HPO_4， 1.5 mM KH_2PO_4， 400 mM NaCl， pH 7.5 ）稀释到浓度为大约 25 μg/ml 来进行分析。

测定的 EPO 的免疫活性为 121,000 ± 5000 单位/每毫克 EPO 。这个特异活性的结果与大批量 EPO 的活性结果类似（ 130,000-140,000 单位/每毫克 EPO ），这就说明在用本发明的方法形成的延续释放组合物的过程中， EPO 活性的损失不明显。在全部的微球中的单体含量被确定都高于 98%。

含有 Am1 和 Am7 的 EPO 颗粒的微球也进行了 EPO 二聚体的分析，使用的是尺寸排除色谱（ Size Exclusion Chromatography ），对大分子量的 EOP 凝集体用 SDS-PAGE/Wstern blot 进行分析。没有检测到 EPO 二聚体或大分子量的凝集体。

实施例 3

凝集稳定的 PLGA 微球在体外的 EPO 释放

对凝集稳定的PLGA微球在体外的EPO释放的动力学进行了分析，使用了 HEPES 缓冲液（ 75 mM HEPES， 115 mM NaCl， 0.1%（体积） TWEEN 20™， 0.1%（重量）叠氮化钠用 NaOH 滴定到 pH 7.4 ），或使用含有 2%或 20%的羊血清的 HEPES 缓冲液。含有血清的缓冲液是 20%羊血清和 80%体积上述缓冲液。进行实验时，将 8-10 mg 的微球在 37 ℃悬浮于 1-5 ml 的缓冲液中。在特定的时间，将缓冲液全部更换为新的缓冲液。

HEPES 缓冲液中的样品在一定时间内对 EPO 单体（生物学活性 EPO ）和 EOP 凝集体（非生物学活性 EPO ）的释放，用大小排除色谱（ SEC ）确定。各种微球在 HEPES 缓冲液中于体外释放的动力学的 SEC 分析结果分别在图 1 、 2 和 3 中给出，其中微球是 a) 未封闭的 PLGA （分子量 10000 道尔顿）的并含有 Am1 或 Am7 的

微球； b) 封闭的 PLGA （分子量 10000 道尔顿）并含有 Zn1 的微球。图 1 和 2 中显示了含有硫酸铵作为抗凝集剂的微球在整个释放期间释放的几乎都是单体 EPO 。

图 3 显示含有乙酸锌作为抗凝集剂的微球释放的 EPO 有明显的凝集体，并且随释放期间而增加。

表 II 给出了用 SEC 和 RIA 分析对含有实施例 1 的各种 EPO 配方的微球（都在 10000 道尔顿的 PLGA 中）体外释放动力学的测定，使用的缓冲液为 HEPES 或 HEPES/血清。开始释放量和释放率在 HEPES/血清中用 RIA 测定。释放的 EPO 的整体性用 SEC 在 HEPES 缓冲液中进行。

表 II

配方	EPO 含量（%）	聚合物/盐	释放的凝集体（%开始量）	开始释放量（%）	平均释放（%/天）	释放期（天）
Zn1	10	封闭的/10% $MgCO_3$	12	66	1.2	14
Zn1	10	封闭的/10% $ZnCO_3$	22	46	1.7	28
Zn6	10	封闭的/10% $ZnCO_3$	37	32	1.6	28
Am1	5	未封闭的/10% $MgCO_3$	1	39	1.4	21
Am1	10	封闭的/10% $MgCO_3$	2	71	0.3	3
Am4	5	未封闭的/10% $MgCO_3$	1	29	1.1	21
Am4	5	未封闭的/无	1	35	0.9	28
Ma1	5	未封闭的/10% $MgCO_3$	1	44	1.8	24

表II（续表）

配方	EPO含量（%）	聚合物/盐	释放的凝集体（%开始量）	开始释放量（%）	平均释放（%/天）	释放期（天）
Ma3	10	未封闭的/10% $MgCO_3$	1	71	1.3	21
Ma4	10	封闭的/10% $ZnCO_3$	1	77	0.6	3

这些分析表明，添加适宜的抗凝集剂可以明显地减低释放期内的EPO凝集。这些分析还表明加入金属阳离子组分（例如，盐）到聚合物中，以及对聚合物进行选择（例如，封闭的和未封闭的），都可以明显地影响开始释放量的水平和释放期。

实施例4

在PLGA微球中用硫酸铵作为抗凝集剂稳定的EPO颗粒所释放的EPO的整体性

本实验的目的是确定从含有不同浓度的硫酸铵的微球中释放出来的EPO的整体性。

根据实施例1制备了类似AM7的凝集稳定的EPO制剂，不同之处是硫酸铵的浓度分别为10%、20%、或40%。被减去的硫酸铵部分用氯化钠或蔗糖替代，使硫酸铵和氯化钠或蔗糖的总重量为79%。

对单体和凝集的EPO的百分数在体外于第35天和42天进行确定。含有40%硫酸铵/氯化钠的AM7制剂在这两个时间点产生的凝集EPO都是3-4%，而10%和20%硫酸铵/氯化钠的AM7制剂产生5-6%的凝集EPO。甘露醇制剂产生的结果类似含有10%和20%硫酸铵的制剂。

当硫酸铵被蔗糖替代时，含有 40%硫酸铵的制剂没有释放出可被检测到数量的 EPO 。而用蔗糖替代氯化钠的 10%或 20%硫酸铵的制剂释放的凝集的 EPO 水平（ 6-9%）高于 AM7 制剂。

实施例 5

同期使用环孢菌素和氢化可的松对促红细胞生成素体内药物动力学的影响

实验动物是体重为 400 ± 50 g （ S.D.）的雄性 Sprague-Dawley 大鼠。实验开始前，没有给这些大鼠断食，实验开始后，喂以常规饮食，添加铁补充剂，自由饮水。每周腹膜内注射含铁葡聚糖（ Sigma Co., St. Louis, MO ） 5 mg/kg 。

这个实验使用如同在 1995 年 6 月 7 日提交的共悬未决的美国专利申请 08/480,813 所描述的方法，抑制受试动物中对释放的 EPO（或注射的 EPO ）的抗体产生，从而获得更为准确的血清 EPO 水平的情况。其中，对抗体产生的抑制是用给受试动物环孢菌素 A 和氢化可的松来实现的。

第一个实验的目的是比较从延续释放微球中释放 EPO 和皮下注射 EPO 的体内 EPO 药物动力学，特别是血清中网状细胞的情况。两组受试动物，每组三只，在第 0 天于肩胛间皮下注射 10000 单位 RMAm7 EPO 微球（含有 10% $MgCO_3$ 和 5% Am7 的分子量为 10000 道尔顿的未封闭 PLGA ），随后，在第 28 天，以 2000 单位剂量的水液 EPO 进行同样注射。对照组没有给以环孢菌素 A/氢化可的松，而受试组则接受了这些药物。

注射后，在第 1 、 3 、 4 、 8 、 10 、 14 、 16 、 20 、 24 、 28 、 30 、或 31 、 32 和 36 小时从尾静脉采血样。在以后的 4-5 天内，每天采一次血样。

对每个血样的网状细胞水平进行计数。结果见于图 4 。图 4 的结果显示，接受了免疫抑制的大鼠对 EPO 微球和 EPO 注射都产生了较高的网状细胞计数。而未进行免疫抑制的大鼠（对照组）的网状细胞水平低，原因是有免疫系统对 EPO 产生了抗体。在第 28 天给予了 EPO 注射之后，网状细胞水平没有明显升高特别说明了这一点。

图 4 还显示注射延续释放的微球比注射 EPO 水剂获得的增高血清网状细胞水平的期间更长。

第二个实验的目的是比较从不同的延续释放微球中释放 EPO 的体内药物动力学和药效学。

四组受试动物，每组三只，在肩胛间皮下注射下述四种微球制剂中的一种：

RAMm1	未封闭的 10K PLGA/10% $MgCO_3$/5% Am1
RMMa1	未封闭的 10K PLGA/10% $MgCO_3$/5% Ma1
PZZn1	封闭的 10K PLGA/10% $ZnCO_3$/5% Zn1
RMAm7	未封闭的 10K PLGA/10% $MgCO_3$/5% Am7

每只大鼠接受的剂量为 10000 — 12000 单位之间。在第 0 天到第 14 天，每只大鼠每天腹膜内注射溶于 0.5 ml 中的 10 mg 环孢菌素 A （ Sandimmune® Injection, Sandoz, East Hanover, NJ ）和 5 mg 氢化可的松（ Spectrum Co., Gardena, CA ），从第 15 天到第 28 天，每周注射两次。这些注射都是为了抑制大鼠免疫系统对 EPO 的反应。

在注射后的第 1 、 2 、 4 、 8 、 10（可选或不选）、 24 、 36 和 48 小时从尾静脉采取血样。在此后的 4-5 天，每天采取一次血样。用 ELISA 确定大鼠血清样品中的 EPO 浓度。此外，对血液中网状细胞水平计数。

图 5 和图 6 给出了这些制剂的血清 EPO 和血液网状细胞的情况。在这些动物中，大约 14 天的 EPO 水平保持在基线以上，表明对生物学活性 EPO 的延续释放。观察到 17 天的增高的网状细胞水平。此外，在 EPO 处理之后，每种制剂的总的网状细胞水平和未成熟的反应之间没有明显的不同。

实施例 6

聚合物分子量对大鼠中 EPO 释放的影响

按照实施例 4 所述，对三组大鼠（每组 3 只）进行注射，注射的是实施例 2 的微球，含有 Am7 EPO 颗粒，处于不同分子量的 PLGA 聚合物（ 10000 道尔顿、 31000 道尔顿或 45000 道尔顿）中。对每一只大鼠的剂量为约 10000 单位。

本实验的目的是确定聚合物分子量对延续释放 EPO 的水平和释放期的影响。

注射后，在第 3 、 7 、 10 、 14 、 17 、 21 、 24 、和 28 天对每一只大鼠从尾静脉采取血样。用 ELISA 对大鼠血清样品中的 EPO 浓度进行确定。结果见于图 7 。图 7 表明，对于含有 2% $MgCO_3$ 的未封闭的 PLGA ，分子量的明显降低导致 EPO 释放率的升高和释放期的缩短。

97.12.08

等同物

本领域的技术人员都将或能够在采用常规实验的条件下认识和确定本发明的具体技术方案的等同物。这些等同物都是本发明的权利要求书所要求保护的。

说 明 书 附 图

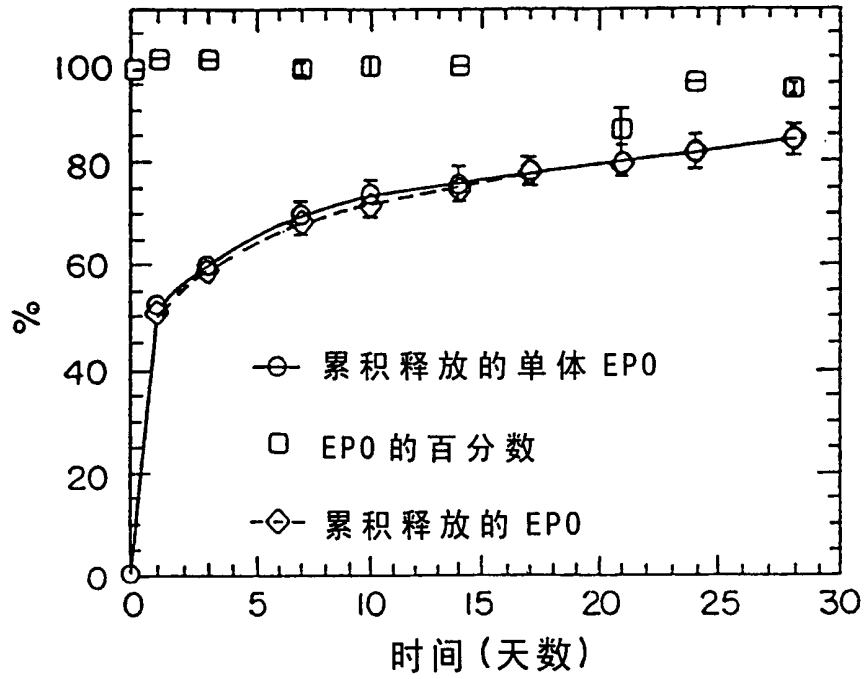

100
80
60
40
20
0
%
累积释放的单体 EPO
EPO 的百分数
累积释放的 EPO
0
5
10
15
20
25
30
时间（天数）

图 1

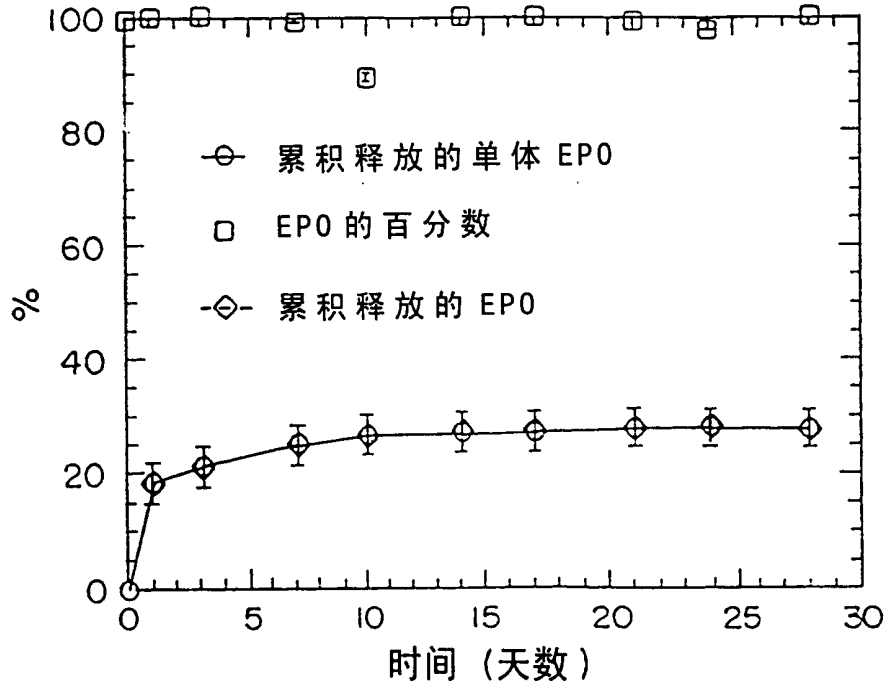

100
80
60
40
20
0
%
累积释放的单体 EPO
EPO 的百分数
累积释放的 EPO
0
5
10
15
20
25
30
时间（天数）

图 2

97.12.08

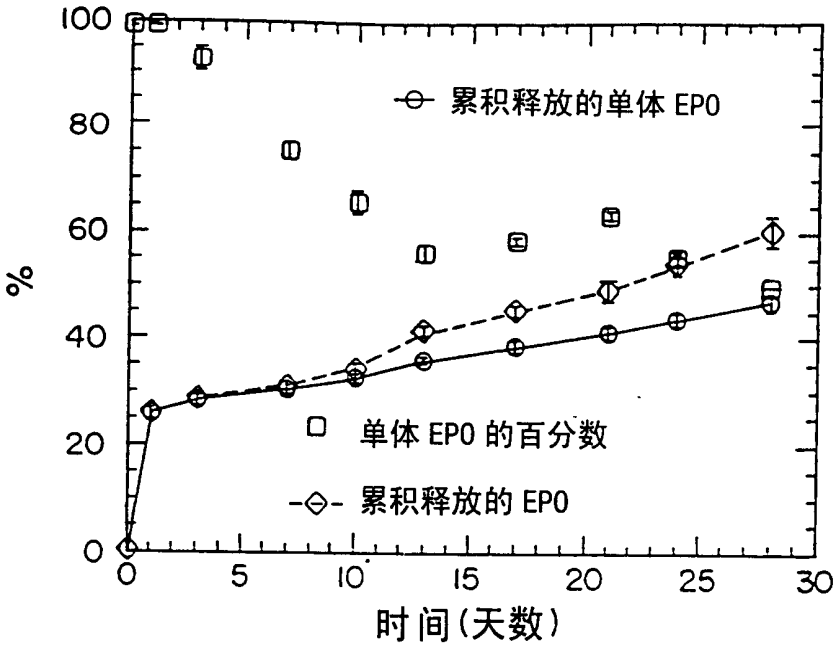


图 3

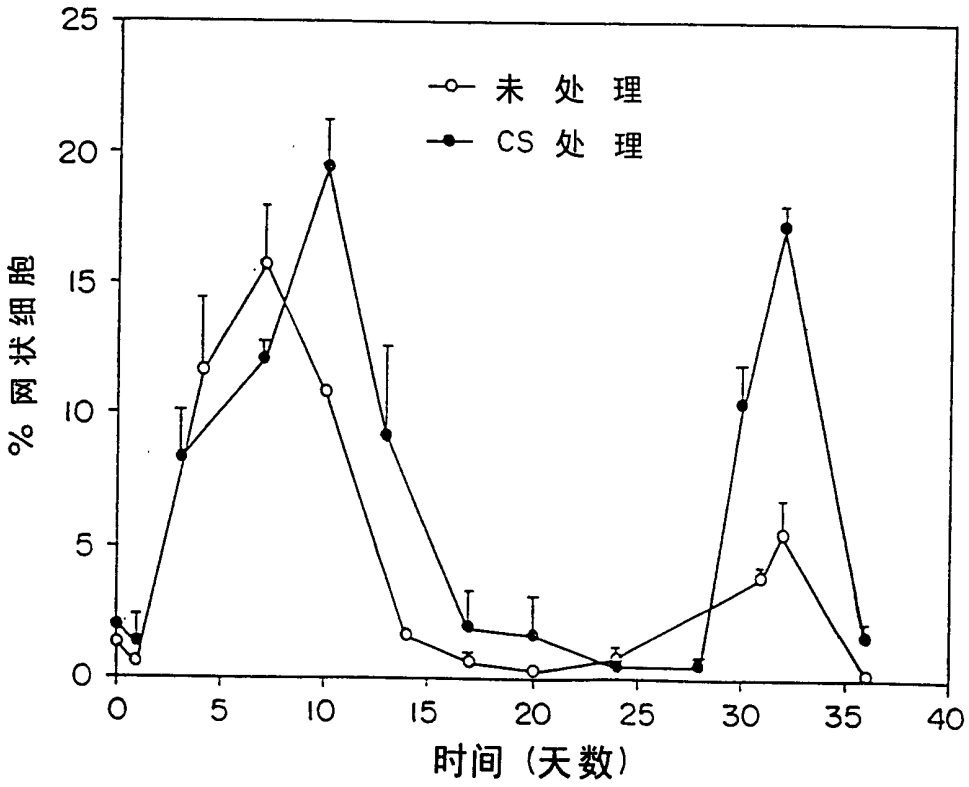


图 4

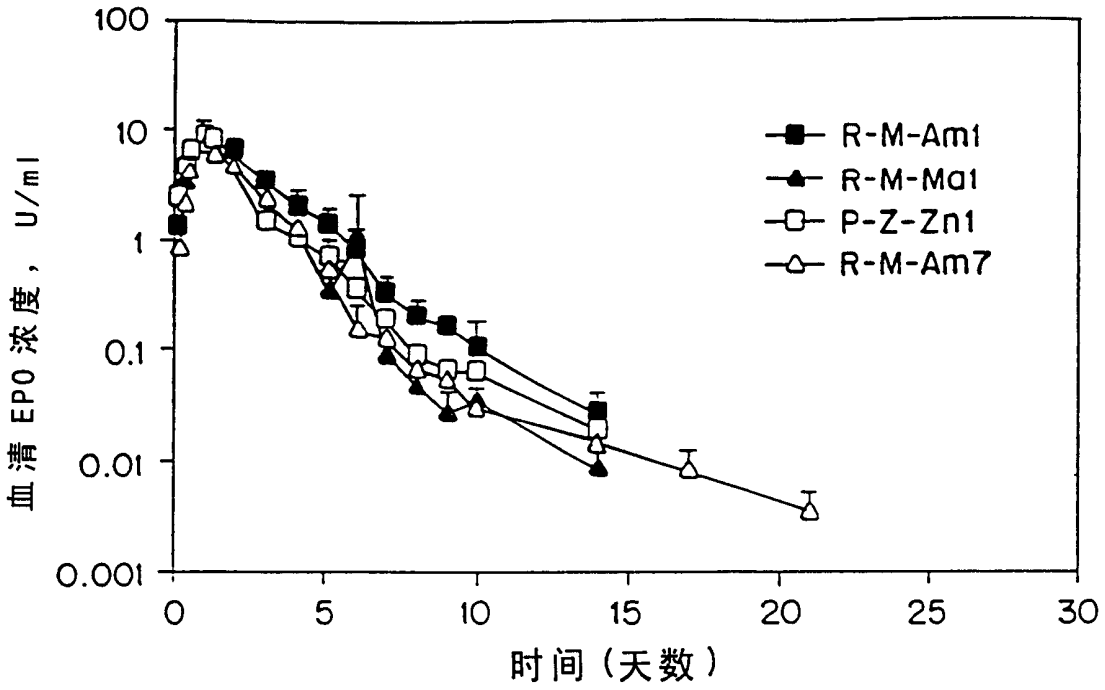

100
10
1
0.1
0.01
0.001
血清 EPO 浓度，U/ml
0
5
10
15
20
25
30
时间（天数）
R-M-Am1
R-M-Ma1
P-Z-Zn1
R-M-Am7

图 5

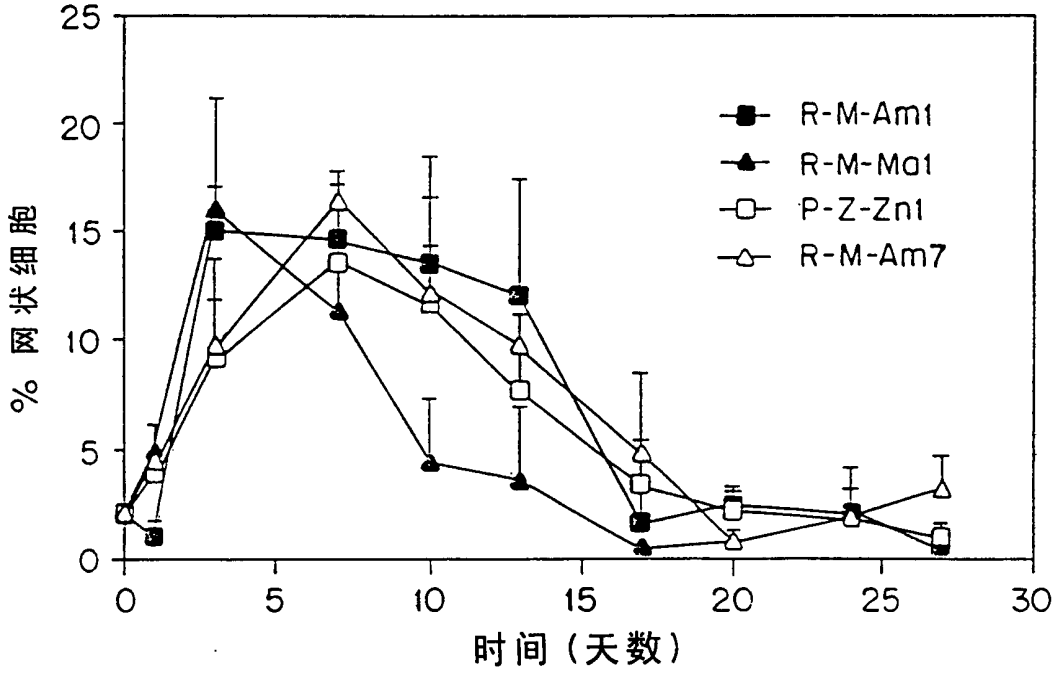

25
20
15
10
5
0
% 网状细胞
0
5
10
15
20
25
30
时间（天数）
R-M-Am1
R-M-Ma1
P-Z-Zn1
R-M-Am7

图 6

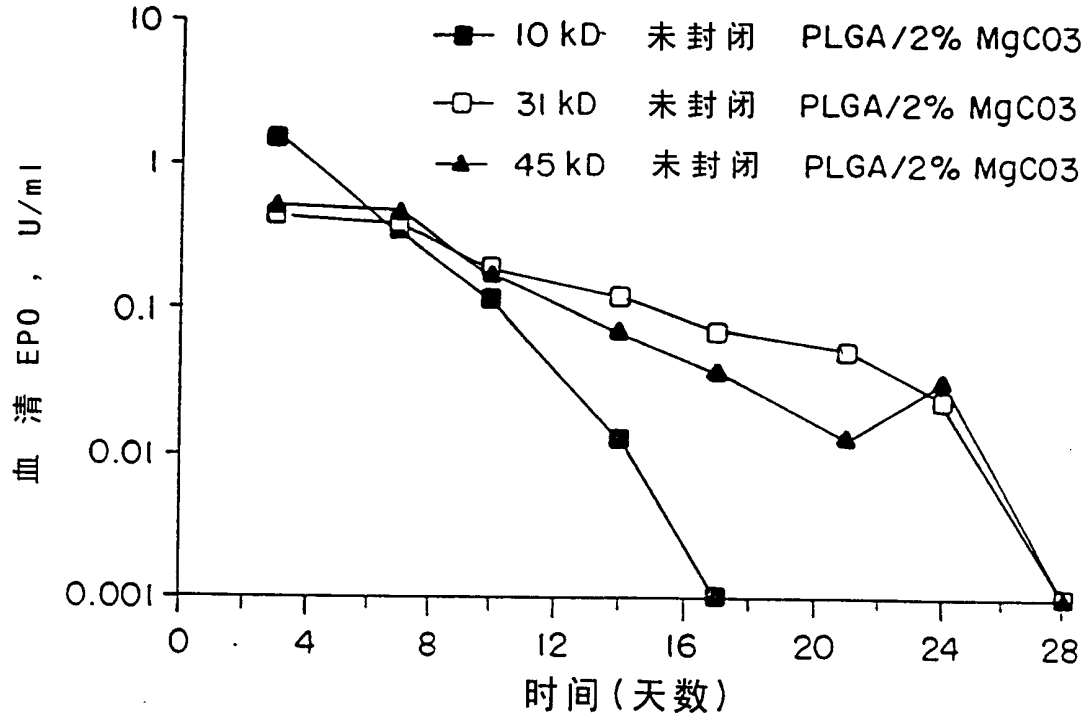

10 kD 未封闭 PLGA/2% MgCO3
31 kD 未封闭 PLGA/2% MgCO3
45 kD 未封闭 PLGA/2% MgCO3
血清 EPO，U/ml
10
1
0.1
0.01
0.001
0
4
8
12
16
20
24
28
时间（天数）

图 7