



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 37/36

// (A61K 37/36,
31:74, 31:23)

[11] CN 86 1 05483 A

[43] 公开日 1987年1月28日

[21] 申请号 86 1 05483

[22] 申请日 86.7.30

[30] 优先权

[32] 85.7.30 [33] 美国 [31] 760,630

[71] 申请人 国际矿物和化学公司

地址 美国印第安纳州特雷霍特南第三街
1401号邮箱207号

[72] 发明人 亚历山大·布卢姆

卡利戴库里奇·N·西瓦拉马克里么南
拉维·维斯·瓦纳塞

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 王 巍

[54] 发明名称 促生长激素的稳定化方法

[57] 摘要

本发明提供了保持给动物服用的促生长激素流动性的方法和保持它的生物活性的方法。此外,本发明还公开了能促进生长的新配方,该配方能使促生长激素稳定并能够缓释延效。

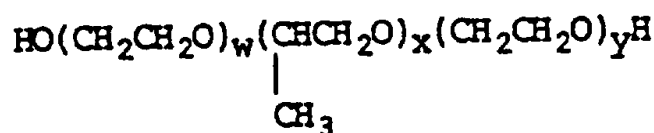
1. 保持给动物服用的促生长激素的流动性和它的生物活性的方法，该方法包括：

(a) 形成水、促生长激素和含有平均分子量约为 1,100~40,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物的嵌段共聚物的混合物，其中嵌段共聚物的用量能足以防止给动物服用的生长激素的沉淀；和

(b) 给动物服用该混合物。

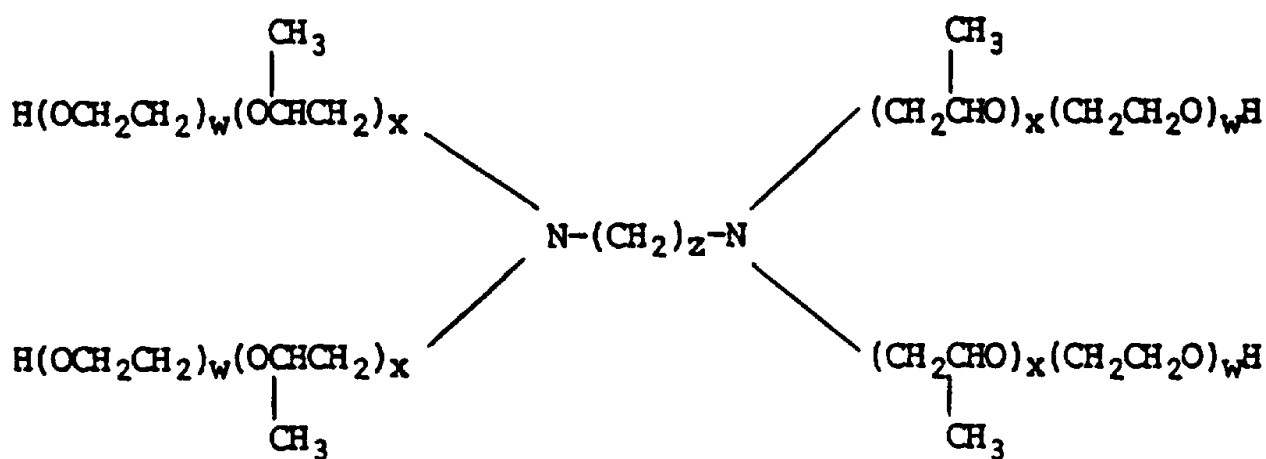
2. 按照权利要求 1 的方法，其中所述含有聚氧乙烯-聚氧丙烯单元的聚合物系选自下述结构式

式 1



和

式 2



其中 Z 为整数 2 ~ 6，并且式 1 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,100 ~ 15,500，式 2 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,600 ~ 40,000，W、X 和 Y 为符合上述限制的任何整数。

3. 按照权利要求 1 的方法，其中聚氧乙烯—聚氧丙烯嵌段共聚物的用量占混合物总重量约 0.05% ~ 50%。

4. 按照权利要求 1 的方法，其中聚氧乙烯单元数至少应为上述嵌段共聚物总单元数的 50%。

5. 按照权利要求 4 的方法，其中聚氧乙烯单元数应约为上述嵌段共聚物总单元数的 70%。

6. 按照权利要求 1 的方法，其中上述嵌段共聚物的平均分子量约为 11,000 ~ 12,000。

7. 按照权利要求 1 的方法，其中嵌段共聚物、水和具有生理活性的多肽配方的混合物还含有一缓冲剂。

8. 按照权利要求 1 的方法，其中混合物被施予植入动物内的药物释放贮存装置中。

9. 按照权利要求 1 的方法，其中混合物可以通过皮下注射或肌肉注射给予。

10. 按照权利要求 1 的方法，其中上述的促生长激素可以是人、牛、鸟、猪、马和羊的促生长激素。

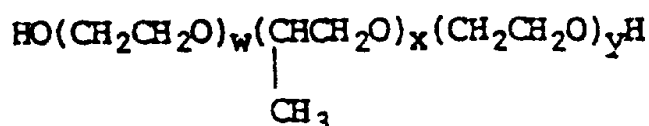
11. 按照权利要求 10 的方法，其中上述促生长激素是促进猪生长的激素。

12. 促进动物体生长的方法，该方法包括给动物服用包括由有效量促生长激素，水和约 0.05 ~ 50% (重量) 嵌段共聚物的混合物，其中的嵌段共聚物含有平均分子量为约 1100 ~ 40,000

的聚氧乙烯-聚氧丙烯单元。

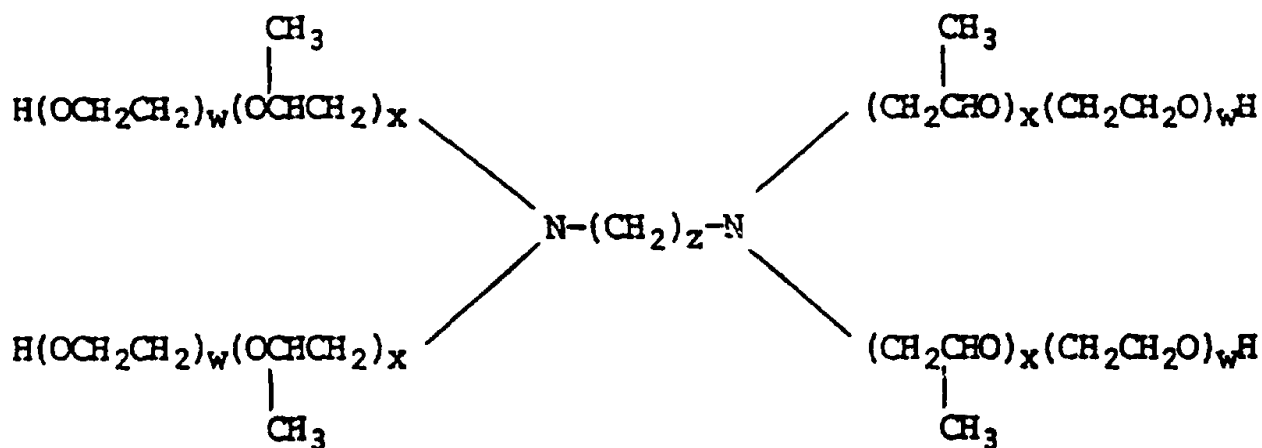
13. 按照权利要求12的方法, 其中上述含有聚氧乙烯-聚氧丙烯单元的聚合物系选自下述结构式:

式 1



和

式 2



其中 z 为 2~6 的整数, 并且其中式 1 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,100~15,500, 式 2 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,600~40,000, w 、 x 和 y 为满足上述限制的任何整数。

14. 按照权利要求12的方法, 其中生长激素的用量约为混合物总重量的 0.05%~10%。

15. 按照权利要求12的方法, 其中水的用量约为混合物总重量的 50%~99.9%。

16. 按照权利要求12的方法，其中促生长激素系选自人、猪、马、牛、鸟和羊的促生长激素。

17. 按照权利要求16的方法，其中的促生长激素是猪的促生长激素。

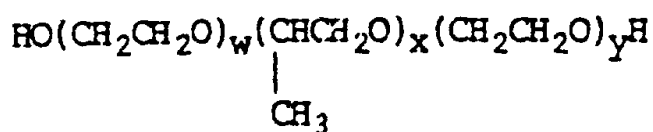
18. 按照权利要求12的方法，其中的混合物可通过皮下注射或肌肉注射给予。

19. 按照权利要求12的方法，其中的混合物可通过植入释放装置的方式给予。

20. 给动物服用促进生长的配方，该配方为包含水、有效量的促生长激素和含有聚氧乙烯—聚氧丙烯单元并具有平均分子量约为1,100~40,000的嵌段共聚物的混合物。

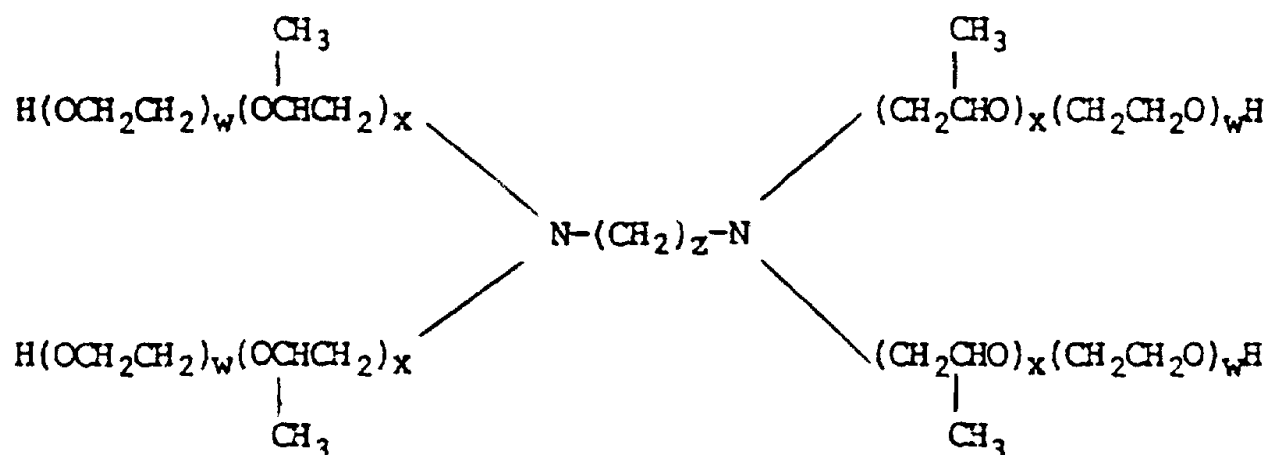
21. 按照权利要求20所述的促进生长的配方，其中的嵌段共聚物系选自下述结构式：

式 1



和

式 2



其中 z 为 2~6 的整数，并且其中式 1 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,100~15,500，式 2 嵌段共聚物的平均分子量约为 1,600~40,000， w 、 x 和 y 为满足上述限制的整数。

22. 按照权利要求 20 所述的促进生长的配方，其中的聚氧乙烯—聚氧丙烯嵌段共聚物的用量约为 0.05%~50%（重量），上述促生长激素的用量约为 0.05%~10%（重量），上述水的用量约为 50%~99.9%（重量），其中所有重量百分比均是根据促进生长配方的总重量计算的。

23. 按照权利要求 20 所述的促进生长的配方，其中的混合物可以另外含有一种油。

24. 按照权利要求 23 所述的促进生长的配方，其中的油可以选自矿物油、芝麻油、豆油或花生油。

25. 按照权利要求 20 所述的促进生长的配方，其中的混合物可以另外含有辅助剂。

25. 按照权利要求 25 所述的促进生长的配方，其中的辅助剂

可以选自蜂蜡和单硬脂酸铝。

27. 按照权利要求20所述的促进生长的配方，其中的混合物的pH值为5~11。

28. 按照权利要求20所述的促进生长的配方，其中的混合物还另外可含有一缓冲剂。

促生长激素的稳定化方法

本发明是关于保持给动物服用的促生长激素的流动性和保持它的生物活性的方法。长期服用促生长激素的一个主要问题是由于形成了在水介质中不溶解的物质，所以生物利用度会降低。这些不溶解物质的形成堵塞了管道系统、膜和各种植入释放装置的输出系统。由于上述不溶解物质的形成，常常使得体系最终发生故障。

服用生长激素的另一问题是需要多次给药，因而使所需的劳力费用增高。而且，用作为人类食物消费的许多动物，尤其是反刍动物（如牛和羊）在围栏肥育之前要长期放牧在草原，因此用注射的方法给予激素实际上是不可能的，并且经济上也是不现实的。

为了给动物提供能长期释放有效成分的药物，先前的工作包括将药物加到聚合的基质中，而使有效成分浸入动物的周围组织中。美国专利 No. 3, 737, 521 公开了这一能持续释放具有生物作用的药物配方。该专利叙述了在能生育的小母牛的颈部组织植入颈植入片，该植入片能够释放具有生理活性的，能阻断动情期的孕甾酮，该植入片包含一种固体的主要成分为含甾类激素的直链聚醚氨基甲酸乙酯聚合基质。

美国专利 No. 4, 235, 988 公开了另一已知的缓释方式。该专利叙述了主要由有效量的生物活性成分和亲水性直链聚氧化烯—聚氨基甲酸乙酯嵌段共聚物所组成的释放方式。

美国专利 No. 4, 188, 373 和 4, 100, 271，是

关于聚合的药用赋形剂，该赋形剂能够输送药学上有效的化学物质到粘膜上。药用载体为某些聚氧乙烯-聚氧丙烯缩合物的水溶液。这些聚合的药用赋形剂被认为可以增加粘膜对药物的吸收，并且可以延长药物作用二倍或二倍以上。能够加到聚氧乙烯-聚氧丙烯赋形剂中去的药物实例包括用于治疗眼病的药物。虽然治疗眼病的药物范围很广，但是这些药物通常具有低的分子量，因此在给动物服用中不存在降低生物活性和形成不溶解物质的问题。其它有关的专利有美国专利 No. 4,474,751、4,474,752、4,474,753 和 4,478,822。这些专利都是关于含有聚合物的各种药物的释放系统，聚合物为乙二胺、丙二胺、丁二胺、戊二胺和己二胺的四取代衍生物。取代基是聚氧丙烯和聚氧乙烯嵌段共聚物。在该聚合物释放体系中可以应用的药物实例包括抗菌剂、抗炎剂、抗寄生虫剂、抗病毒有效化合物和肽类药物（如胰岛素和生长激素抑制素）。大多数上述药物都具有低的分子量，因此不会形成不溶解物质。上述专利未曾公开稳定处理促生长激素的方法。因此，有必要研究服用中保持促生长激素流动性的方法和以缓释保持生物活性的方法。

本发明提供了保持给动物服用的促生长激素的流动性和保持它的生物活性的方法，该方法包括：

(a) 形成包括水、促生长激素嵌段共聚物的混合物，该嵌段共聚物含有聚氧乙烯-聚氧丙烯单元，并且平均分子量约为 1,100 ~ 40,000，其中嵌段共聚物的用量足以防止给动物服用的促生长激素沉淀；

(b) 给动物服用该混合物。

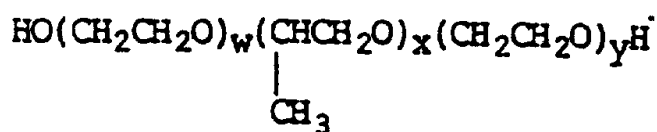
此外，本发明还公开了促进动物生长的方法，该方法包括给动物

服用能促进生长的配方，该配方为有效量的促生长激素与含聚氧乙烯—聚氧丙烯单元的嵌段共聚物的水混合物。令人惊奇的是给动物服用时，该水混合物能保持生长激素的生物活性和稳定性，并且具有缓释延效作用。

最佳实施方案的叙述

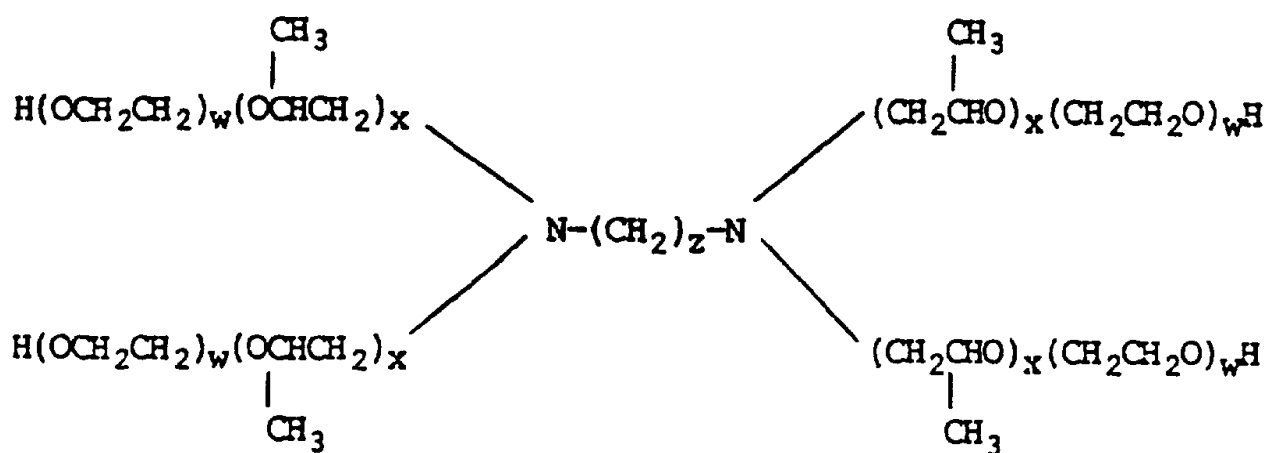
本发明提供了稳定给动物服用的促生长激素的方法。令人惊奇的是，某些聚氧乙烯—聚氧丙烯嵌段共聚物的水溶液可用作促生长激素的稳定剂。另一优点是可使给动物服用的促生长激素获得缓释延效作用。本发明应用的嵌段共聚物可用下述结构式表明：

式 1



和

式 2



其中 Z 为从 2~6 的整数，式 1 嵌段共聚物的平均分子量约为 1, 100

~15, 500, 式2嵌段共聚物的平均分子量约为1, 600~40, 000, 并且W、X和Y为满足上述限制的任何整数。

式1嵌段共聚物的平均分子量一般约为1, 100~15, 500, 优先选用平均分子量为11, 000~约13, 000的。一般来讲, 聚氧乙烯单元至少应为式1嵌段共聚物单元总数的50%。当聚氧乙烯单元占嵌段共聚物单元总数的70%左右时, 为最好的嵌段共聚物。式1的嵌段共聚物商业上由BASF-Wyandotte Corporation of Wyandotte, Michigan 以商品名“PLURONIC”出售。从分类上说, “PLURONICS”属于末端有伯羟基的聚氧丙烯-聚氧乙烯缩合物。通过将1, 2-环氧丙烷缩合到丙二酵母核上, 接着再将环氧乙烷缩合到聚氧丙烯基体的两端上, 可以得到嵌段共聚物“PLURONICS”。嵌段共聚物“PLURONIC”的实例有:

Pluronic F-68、Pluronic F-77、
Pluronic P-75、Pluronic P-65、
Pluronic L-64、Pluronic F-87、
Pluronic F-88、Pluronic F-98、
Pluronic F-108和Pluronic F-127, 其中Pluronic F-127最好。可以买到的属于式1一类的其他嵌段共聚物, 如由Hoechst AG of Frankfurt, Germany 以商品名“GENAPOL”出售的产品。

式2嵌段共聚物的平均分子量一般为1, 600~约40, 000, 优先选用平均分子量为15, 000~约20, 000的。类似于式1嵌段共聚物, 在式2嵌段共聚物中, 聚氧乙烯单元至少应为单元总数的50%。最好聚氧乙烯单元为嵌段共聚物单元总数的70%左右。

式2嵌段共聚物也可从BASF-Wyandotte Corporation买到。这些嵌段共聚物以商品名“Tetronic®”出售。

上述聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物的量必须足以使促生长激素稳定。由于在配方中还有其他的成分(如水和和其他也可加入的化合物),因此嵌段共聚物的浓度还应该足够的高,以便形成适当的凝胶基质给动物服用。在生长激素的配方中,嵌段共聚物的量通常约为促生长激素水剂配方总重量的0.05%~50%,最好约为水剂配方总重量的1%~30%。

除了作为生长激素的稳定剂之外,上述嵌段共聚物还是输送生长激素良好的载体。上述嵌段共聚物在生理学上是可以接受的,这是它们的一个优点。它们具有溶胶-凝胶变换温度,这是它们的另一优点。在温度为室温(30℃)或低于室温时,嵌段共聚物的水溶液为液态。高于该温度,嵌段共聚物的水溶液形成凝胶。因此,可以在较低的温度下制备适宜动物服用的促生长激素配方。但是在服用以后,嵌段共聚物会形成良好的具有缓释延效作用的多肽凝胶基质。

合适的促生长激素包括能促进人、牛、鸟、羊、马和猪的生长激素。优先选用的激素是促进猪生长的激素。在水剂混合物中,促生长激素的用量应该能有效地加速服用动物的生长。虽然促生长激素的用量可以根据特定的激素、动物的类型和所要求的结果而改变,但是促生长激素的量一般约为水剂混合物总重量的0.05%~10%。促生长激素的用量最好约占水剂混合物总重量的0.10%~5%。

本发明中所用的生长激素,可以应用提取和浓缩技术从各种动物的垂体中得到。通过重新组合DNA的方法来制备生长激素也是适用的。适用于本发明的各种激素的氨基酸排列顺序是已知的。例如,促进

人生长激素的氨基酸排列顺序已由 C. H. Li 在 Kirk-Othmer 的“Encyclopedia of Chemical Technology”，第三版第 12 卷第 549~552 页中叙述。牛生长激素的氨基酸排列顺序已由 R. P. Woychik 在 Nucleic Acid Res., 10, 7197 (1982) 中报道。羊生长激素的氨基酸排列顺序已由 C. H. Liu 等在 Arch. Biochem. Biophys., 156, 493~508 (1973) 中记述。猪生长激素的氨基酸排列顺序已由 P. H. Seeburg 等在 DNA, 2, 37, 45 (1983) 中介绍。以上介绍的关于氨基酸排列顺序的所有参考文献在此引入作为参考。除上述的以外，人们还可以应用经过改造的生长激素，这种激素是从氨基酸排列的氨基一端分割出多至 12 个氨基酸后得到的。

将嵌段共聚物和促生长激素分散在水溶液中。加水多少可以依据许多因素（例如服用前和服用后对配方所要求的粘度、生长激素的浓度，配制温度等）而作较大改变。一般来讲，水的量约占生长激素水剂配方总重量的 50%~99.9%，最好约占总重量的 75%~95%。

促生长激素水剂配方可以有选择地含有更有助于缓释延效的各种辅助剂。这些辅助剂的实例有蜂蜡，单硬脂酸铝等。辅助剂最好是单硬脂酸铝。

尽管本发明方法涉及的是水分散剂，但是人们可以有选择地加入各种油类，以便有助于促生长激素缓释延效。该油类的实例有矿物油和植物油（如芝麻油、花生油、豆油等）

本发明中应用的配方水制剂可以通过简单的机械混合而配制。在降低温度下聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可以溶解是已知的。因此，

增溶聚合物最好的方法包括在低于共聚物溶液的溶胶-凝胶温度下，将嵌段共聚物分散在水溶液中。然后搅拌该水混合物，利用声波处理或振荡，以便使聚合物在溶液中更快的增溶。在聚合物水溶液形成以后，加入促生长激素。虽然上述方法是优先选用的，但是加料的顺序可以改变，并且决不要将加料顺序看作是对本发明范围的限制。在将促生长激素和嵌段共聚物分散在水溶液中以后，可以有选择地加入缓冲剂、盐类、辅助剂等，并使其溶解。

由于促生长激素水剂配方是用来给动物服用的，因此pH值对动物来说必须是生理上可以接受的，并且pH值不应影响促生长激素的稳定作用产生不利的影响。一般来讲，促生长激素水剂配方的pH值的范围约为5~11，最好的pH范围约为7~10。可以通过加入有效量的药学上可以接受的缓冲剂来调节水剂配方的pH值，以得到所需的pH值。药学上可以接受的适当的缓冲剂，对于从事该项技术的人员来说通常是熟悉的。

此外，本发明还提供了实现促进动物生长的方法，该方法包括给动物服用有效量的缓释延效配方，该配方含有约0.05%~50%重量的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物（平均分子量约为1,100~50,000）、约0.05%~10%重量的促生长激素和约50%~99.9%重量的水。按照本发明，最好的方法包括给动物服用含有从约1%~30%重量的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物（平均分子量约为11,000~13,000）、约0.5%~5%重量的促进猪生长激素和约75%~95%重量的磷酸盐盐水缓冲溶液。

本发明还提供了能阻止形成不溶解物质并能提高稳定性的促进生长的配方，该配方包括约0.05%~50%重量的嵌段共聚物（该共聚物含有聚氧乙烯-聚氧丙烯单元，并且平均分子量约为1,100

~40,000)、约0.05%~10%重量的促生长激素和约50%~99.9%重量的水。

促生长激素配方是给动物服用的，最好是给反刍动物服用。上述配方可以多种方式服用。在本发明的一个实施方案中，水溶液剂是通过皮下或肌肉注入的。本发明的另一实施方案是施予植入的贮存装置以水剂配方，该装置能够释放有效量的多肽水剂。许多植入动物体内的药物释放方式对于本专业人员来说是熟知的，并且可以考虑应用本发明的配方。

通过下述实例进一步详细叙述本发明，但是不要认为下述实例是本发明所限定的范围。

实 例 1

由0.1摩尔浓度的磷酸氢二钠加0.2% NaN_3 ，可以制得pH为7.3等渗的磷酸盐生理缓冲溶液(PBS)。应用该缓冲液，通过机械混合，可以制得18%(重量)的PLURONIC F127溶液。然后，将约40毫克一份的猪生长激素(IMC Lot No. CF005-CDE-94.1)置于50毫升消毒过的离心管内，并用100微升PLURONIC F127溶液湿润。取另一份约40毫克同样的生长激素，用100微升不含添加剂的PBS溶液湿润，作为对照。将这些离心管于37°C贮存。接着于37°C贮存14天，每只50毫升离心管分别处理如下。首先，将40毫升PBS加到离心管内(规定为开始增溶的时间)。应用杯型超声波破碎器(Cup Sonicator)，使离心管内湿润的物质有效地悬浮/溶解。接着，使得到的悬浮液在室温静置期间旋转。每只离心管离心约5分钟 $\times$ 1900G(规定为结束增溶的时间)。用移液管将得到的上清液几乎全部移出，未溶解的残余物

悬浮在加入的20毫升水中。接着离心，移出上清液，离心管中的残余物于室温下在Savant快速真空浓缩器中干燥，最后容器的压力约为150毫托。从管中取出丸状干燥的残余物，并测定其重量。

从下表可以明显看出，应用本发明的稳定剂，可以显著降低不溶解物质形成的速率。

表 1

	PBS 溶 液	18%(重量)的 PLURONIC F127/PBS 溶液
猪生长激素	IMC Lot No.	IMC Lot No.
(rpGH)	CF005-CDE94.1	CF-005-CDE94.1
天数, 37°C	14	14
增溶时间	1.5	1.5
(小时)		
不溶物占起	67	43
始rpGH的%		
(重量)		

实 例 2

进行下述试验，致力于说明本发明的稳定剂保持生长激素高水平生物活性的能力。

制备第一份溶液(溶液A)：溶液A是由含有重新组合的猪生长激素(IMC Lot No. 01-00 A. 94.1)的磷酸盐盐水缓冲溶液(PBS)所组成，其浓度为1毫升的PBS中含有1毫克重新组合

的猪生长激素。

制备第二份溶液（溶液 B）：溶液 B 同溶液 A，但是溶液 B 另外还含有 5 % 重量的 PLURONIC F 1 2 7。接着将每份溶液放置在蠕动泵内，并于室温下连续循环运行 2 4 小时。然后将两份溶液从运行装置中取出。

为了给予大白鼠不同浓度的生长激素溶液，将各溶液稀释（各浓度见表 2）。制备与溶液 A 相同的不经循环运行的溶液（溶液 C）作为对照组，然后进行稀释。

给大白鼠服用各稀释了的溶液。仅一组大白鼠采用注射途径。在服用该溶液 1 0 天以后，测定每只大白鼠体重的增加。下面表 2 列出了服用的生长激素的剂量、体重增加的百分率和生长激素相应的效力。

下面表 2 的数据说明，含有稳定剂的经循环运行的生长激素（溶液 B）比不含稳定剂的径循环运行溶液（溶液 A）的效力要高，并且与未经循环运行的生长激素溶液（溶液 C）的效力相等。

表 2

溶 液	剂量 (微克)	大白鼠 数	体重增加%		相应的效力* (%)
			平 均	标准偏差 (+/-)	
溶液 A (r pGH+PBS)	6	10	7.1	3.2	21
	12	10	10.2	3.4	
	24	10	12.0	3.3	
溶液 B (r pGH+5%Plu- ronic/PBS)	6	5	9.2	2.1	33
	12	9	9.9	5.3	
	24	10	15.5	1.9	
溶液 C (r pGH+PBS)	6	9	10.2	3.3	33
	12	10	11.4	4.1	
	24	10	13.4	3.6	

* 从溶液 A、B 和 C 的全部剂量范围得来的值。

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	4	倒 6	German g	Germany
	6	11	氨基酸	氨基酸残基
	7	倒 4	溶液。	溶液的缓释延效配方。
	11 表 2	7-8	5 % PIU- ronic	5 % PLU- ORINIC
权利要求书	2	倒 3	的方法，	的有效方法，
	5	5	限制的整数。	限制的任何整数。
		倒 1	2 5 .	2 6.