



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101657190 B

(45) 授权公告日 2013.09.11

- (21) 申请号 200880012327.3
- (22) 申请日 2008.04.18
- (30) 优先权数据
10-2007-0038467 2007.04.19 KR
- (85) PCT申请进入国家阶段日
2009.10.16
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/KR2008/002216 2008.04.18
- (87) PCT申请的公布数据
W02008/130158 EN 2008.10.30
- (73) 专利权人 东亚制药株式会社
地址 韩国首尔市
- (72) 发明人 郭贤姬 李建日 朴容满 孙美京
梁熙昌 金泰亨 金胤池 金炳文
李圣熙 姜寿亨 刘武姬
- (74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290
代理人 张淑珍 王维玉
- (51) Int. Cl.
A61K 9/52 (2006.01)
- (56) 对比文件
WO 2005/102293 A1, 2005.11.03, 权利要求
第10页第17行-第11页第16行, 第25-30

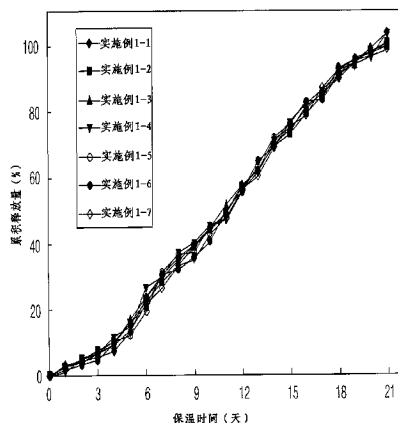
页实施例。
WO 2005/110425 A1, 2005.11.24, 第5页第
11-27行, 第8页第10-23行, 第9页第20-
27行。
WO 2005/102293 A1, 2005.11.03, 权利要求
第10页第17行-第11页第16行, 第25-30
页实施例。
WO 2005/110425 A1, 2005.11.24, 第5页第
11-27行, 第8页第10-23行, 第9页第20-
27行。
US 4389330 A, 1983.06.21, 摘要, 第3栏,
实施例1-2, 权利要求。
KR 2003-0081179 A, 2003.10.17, 第3页第
20-26行, 第4页第22行-第5页第6行, 实施
例。
WO 2005/009356 A2, 2005.02.03, 全文。
吴伟等. 氟尿嘧啶聚丙交酯微球的制备及体
外特性. 《中国药师》. 2000, 第3卷(第6期),
第326-327页。
宋凤兰等. 基因重组人干扰素- α 微球的制
备及理化性质研究. 《中国药房》. 2007, 第18卷
(第10期), 第752-754页。

审查员 艾欣

权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称
一种适用于对葡萄糖控制肽进行控释的可生
物降解的微球组合物及其制剂

(57) 摘要
本发明公开了一种能以可控方式释放葡萄糖
调节肽的可生物降解的微球, 所述的微球包含可
生物降解的聚合物载体, 在该载体中包封有葡萄
糖调节肽。本发明还公开了所述微球的制备方法。
除了确保所包封药物的高包封率和高稳定性外,
所述的微球既没有初期突释效应也不会释放不完
全, 并且能在长时间内使药物进行零级释放, 因而
改善了药物的治疗效果。



CN 101657190 B

1. 一种制备含有葡萄糖调节肽的可生物降解的聚合物微球的方法,包括:
步骤 1:将有机溶剂加入到聚合物中,得到聚合物溶液;
步骤 2:将葡萄糖调节肽分散于步骤 1 中所述的聚合物溶液中,得到药物分散体,然后将醇或醇与有机酸的混合物加入到所述的药物分散体中,得到分散有药物的溶液;以及
步骤 3:由步骤 2 中所述的分散有药物的溶液形成微球;
其中,按照所述醇与所述聚合物溶液的体积比为 1:1 至 1:6 的比例使用步骤 2 中所述的醇,
其中,步骤 2 中所述的醇选自于由甲醇、乙醇、异丙醇和丁醇所组成的组,以及
其中,步骤 1 中所述的聚合物选自于由聚 L-乳酸、D-乳酸-乙醇酸共聚物、L-乳酸-乙醇酸共聚物和 D, L-乳酸-乙醇酸共聚物所组成的组。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的有机溶剂选自于由二氯甲烷、乙酸乙酯和氯仿所组成的组。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,步骤 2 中所述的醇为甲醇。
4. 如权利要求 1 所述的方法,步骤 2 中所述的分散有药物的溶液还包含添加剂。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中,所述的添加剂选自于由下列物质所组成的组:聚乙二醇、Labrafil、Labrasol、中链甘油三酯、卵磷脂、N-甲基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、Tween、Span、Cremophor、泊洛沙姆、Brij 和 Sunsoft818H。
6. 如权利要求 4 所述的方法,其中,所述添加剂用量为所述溶液体积的 0.01% 至 15% (w/v)。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的步骤 3 通过如下步骤来进行:将步骤 2 中所述的分散有药物的溶液分散于含有乳化剂的水溶液中;用搅拌器或均质机形成所述微球;以及用冷冻干燥或真空干燥的方式将所述微球进行干燥。
8. 如权利要求 7 中所述的方法,其中,所述的乳化剂选自于由 Triton、Brij、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇所组成的组。
9. 如权利要求 7 所述的方法,其中,所述的乳化剂在有机溶剂中达到饱和,所述的有机溶剂选自于由二氯甲烷、乙酸乙酯和氯仿所组成的组。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的步骤 3 通过用喷雾干燥机将步骤 2 中所述的分散有药物的溶液喷雾来进行。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中,在注入时,将所述的喷雾干燥机的温度设定为 115°C 至 125°C,在喷出时,将温度设定为 80°C 至 90°C。
12. 如权利要求 10 所述的方法,其中,所述的喷雾干燥之后进行另外的冷冻干燥或真空干燥。

一种适用于对葡萄糖控制肽进行控释的可生物降解的微球 组合物及其制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可生物降解的聚合物微球,该微球包含可生物降解的聚合物载体,在该载体中包封有葡萄糖调节肽,所述微球能够以可控的方式释放葡萄糖调节肽;本发明还涉及所述微球的制备方法。

背景技术

[0002] 在口服给药后,多数蛋白类药物和肽类药物在胃部酸性环境中或是酶的降解作用下会失去其活性结构。另外,它们通过胃粘膜或肠粘膜的吸收速率非常低。由于这些原因,蛋白类药物或肽类药物通常以非口服的途径进行给药,即注射给药。由于多数非口服给药的蛋白类药物或肽类药物在体内的半衰期短且生物利用度低,所以蛋白类药物或肽类药物的非口服给药必须反复进行。此外,在很多情况下,其给药过程可能会持续很长时间例如数月。为避免此类问题,人们对缓释制剂进行了积极的研究,得到了其中包封有蛋白类药物或肽类药物的可生物降解的聚合物载体的使用,该聚合物载体可在其生物降解的过程中从中释放出蛋白类药物或肽类药物 (Heller, J. 等人, Controlled release of water-soluble macromolecules from bioerodible hydrogels, *Biomaterials*, 4, 262-266, 1983; Langer, R., New methods of drug delivery, *Science*, 249, 1527-1533, 1990; Langer, R., *Chem. Eng. Commun.*, 6, 1-48, 1980; Langer, R. S. 和 Peppas, N. A., *Biomaterials*, 2, 201-214, 1981; Heller, J., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1(1), 39-90, 1984; Holland, S. J.; Tighe, B. J. 和 Gould, P. L., *J. Controlled Release*, 155-180, 1986)。

[0003] 目前,作为蛋白类药物或肽类药物的聚合物载体使用的脂肪族聚酯由于其生物相容性被认可从而得到 FDA 的批准使用。它们在药物输送或手术缝合方面被广泛地用作载体。脂肪族聚酯的具体实例包括:聚 L-乳酸、聚乙醇酸、D-乳酸-乙醇酸共聚物、L-乳酸-乙醇酸共聚物、D, L-乳酸-乙醇酸共聚物(以下写作“PLGA”)、聚己内酯、聚戊内酯、聚羟基丁酸酯和聚羟基戊酸酯 (Peppas, L. B., *Int. J. Pharm.*, 116, 1-9, 1995)。

[0004] 随着近年来作为新型疗法的高分子量肽或蛋白质的发展,人们在以可控的方式将其从聚合物载体中释放方面进行了各种各样的尝试。然而包含包封有蛋白类药物的聚酯微球的剂型存在着如下缺陷:初期突释效应 (initial burst release effect)、由于各种因素造成的一定时间内的释放速率不受控制、或是包封药物的释放不完全。

[0005] 例如,模型蛋白类药物诸如牛血清白蛋白、溶菌酶等在开始阶段会大量释放,但显示最终的释放率约为 50% (Crotts, G. 和 Park, T. G., *J. Control. Release*, 44, 123-134, 1997; Leonard, N. B., Michael, L. H., Lee, M. M., *J. Pharm. Sci.*, 84, 707-712)。至于使用了其中包封有重组人生长激素的脂肪族聚酯载体的微球,其开始阶段释放的药量为 30% 至 50%,但微球中剩余的药量为 40% 至 60% (Yan, C. 等人, *J. Control. Release*, 32, 231-241, 1994; Kim, H. K. 和 Park, T. G., *Biotechnol. Bioeng.*, 65, 659-667, 1999)。

[0006] 药物的初期突释效应归因于聚集或者吸收于微球表面或孔隙的蛋白类药物在开始阶段通过迅速扩散而释放的事实。

[0007] 在微球的制备过程中,蛋白类药物可能会在水和有机溶剂之间的界面发生变性,并因此形成导致不稳定释放的不可逆的聚集体。为避免蛋白类药物的界面诱导变性,已经报道了在微球的制备中使用表面活性剂(例如非离子型表面活性剂 Tween、Pluronic F68、Brij 35 等)和稳定剂(例如甘露醇、明胶、海藻糖、羧甲基纤维素等)或是无水有机溶剂(Gombotz, W. R. ;Healy, M. , Brown, L. , 美国专利 No. 5019400)。

[0008] 为解决一定时间内不可控的药物释放速率以及所包封的药物释放不完全的问题,近期的许多研究都与制备药物缓释微球的替代方法有关,此类方法包括以两种或多种具有不同降解速率的聚合物按预定比例形成的混合物的形式将药物进行包封(Ravivarapu, H. B. ;Burton, K. ;Deluca, P. P. , Eur J Pharm Biopharm, 50(2), 263-270, 2000 ;韩国专利申请 No. 1998-0062142) 或者是将两种或多种分别在其中包封有药物的具有不同降解速率的聚合物微球按预定比例进行混合(美国专利 No. 4897268),从而使药物自微球中的初期释放和持续释放都能得到控制。然后在用常规方法制备的微球中,从具有高降解速率的聚合物中降解的产物(例如乳酸和乙醇酸)降低了 pH 值,从而促进了具有低降解速率的聚合物的降解,导致分别包封于各自的聚合物中的药物的释放速率与计算得到的释放速率有着很大的不同。进一步地,从制造工艺和经济的角度来看,为一种剂型制备两种或多种微球都是不利的(韩国专利申请 No. 2000-0036178)。

[0009] 作为微球的制备技术,相分离法(美国专利 No. 4673595、韩国专利申请 No. 2007-0031304)、喷雾干燥法(韩国专利申请 No. 2003-0023130)以及有机溶剂蒸发法(美国专利 No. 4389330)是为人所共知的。在相分离法当中,二氯甲烷溶剂与硅油、庚烯和乙醇共同使用,但它们全部要被除去,因此从经济角度考虑是不利的。至于喷雾干燥法,由于其需要在高温下(例如 60℃ 或更高温度)与有机溶剂一起对肽类药物或蛋白类药物进行喷雾干燥,可能引起肽类药物或蛋白类药物的变性。由于这些原因,有机溶剂蒸发法在制备肽类药物或蛋白类药物方面应用最为广泛。在该方法中,技术上最为重要的因素之一就是包封率(韩国专利申请 No. 2003-0081179)。

[0010] 因此,需要有一种微球制备方法满足如下要求:既没有初期突释效应也不会使药物释放不完全;使得药物进行零级释放;简便易行且经济上有利;以及确保所包封的药物具有高包封率和高稳定性。

[0011] 葡萄糖调节肽属于具有治疗潜力的一组肽,可治疗胰岛素依赖型糖尿病、妊娠期糖尿病或非胰岛素依赖型糖尿病、肥胖和脂代谢紊乱(美国专利 No. 6506724)。葡萄糖调节肽的实例包括:Exendin-3、Exendin-4 以及它们的同系物和激动剂;以及胰高血糖素、胰高血糖素样肽(例如 GLP-1、GLP-2)以及它们的同系物和激动剂(韩国专利申请 No. 2006-7015029)。

[0012] 从蜥蜴墨西哥毒蜥(Heloderma horridum)或希拉毒蜥(Heloderma suspectum)的唾液分泌物中分离出来的 Exendin-4 是一种由 39 个氨基酸残基组成的具有生理活性的肽。Exendin-4 会刺激胰岛素自胰岛 β 细胞中的分泌,降低升高的胰高血糖素分泌以及引起食欲下降,因此具有治疗糖尿病和肥胖的用途(Eng. J. 等人,1990 ;Raufman, J. P. ,1992 ;Goeke, R. ,1993 ;Thorens, B. ,1993)。

[0013] 为有效治疗和预防糖尿病,人们对用于缓释 exendin-4 的微球进行了研究(韩国专利申请 No. 2006-7023921)。然而,常规方法较为复杂低效,这一点可通过以下几个例子进行证明:相分离法当中所使用并除去的大量有机溶剂、超声方法中由于使用高能量造成的肽的降解以及使用多种辅料,这些辅料包括稳定剂(例如糖)和释放增强剂(例如无机酸和无机盐)。

发明内容

[0014] 因此,本发明的目的是提供一种微球以满足如下要求:既没有初期突释效应也不会使药物释放不完全;不论稳定释放时间的长短,使得药物进行零级释放;其制备简便易行且经济上有利;以及确保所包封的药物具有高包封率和高稳定性。本发明的目的还在于提供所述微球的制备方法,该方法既不使用有机溶剂和高能处理(如超声破碎),也不使用释放促进剂,且简便易行。

[0015] 为达到上述目的,本发明提供了可生物降解的聚合物微球,所述微球包含可生物降解聚合物载体,在所述载体中包封有葡萄糖调节肽,所述微球能够以可控的方式释放葡萄糖调节肽。

[0016] 同样地,本发明还提供了可生物降解的聚合物微球的制备方法。

[0017] 除了在其制备过程中简便易行且经济上有利、以及确保所包封的药物具有高包封率和高稳定性外,本发明中的微球显示能使药物(例如 exendin-4)进行零级释放,并因此使得药物在体外和体内得以在三周至四周的时间内从中进行稳定的释放,既没有初期突释效应也不会使药物释放不完全。

附图说明

[0018] 图 1 表示通过本发明实施例 1 中的药物分散方法制备的微球的体外释放模式图。

[0019] 图 2 表示在本发明实施例 4-8 中制备的微球的体外释放模式图。

[0020] 图 3 表示在对比例 1 和对比例 2 中制备的微球的体外释放模式图。

[0021] 图 4 表示在实施例 1-1 中制备的微球的体内释放模式图。

[0022] 图 5 为由在实施例 1-1 中制备的微球所得到的 exendin-4 通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析得到的色谱图。

具体实施方式

[0023] 下文对本发明进行详细说明。

[0024] 本发明与对葡萄糖调节肽进行控释的可生物降解的聚合物微球有关,该微球包含可生物降解的聚合物载体,在所述载体中包封有葡萄糖调节肽。

[0025] 适用于本发明的葡萄糖调节肽的实例包括:天然的、重组的或合成的 exendin-3、exendin-4 以及它们的同系物和激动剂;胰高血糖素、胰高血糖素样肽(例如 GLP-1、GLP-2)以及它们的同系物和激动剂。其中,优选合成的 exendin-3、exendin-4 以及它们的同系物和激动剂。最优选合成的 exendin-4。

[0026] 所述微球中葡萄糖调节肽的含量随给药途径、剂量和蛋白质性质而变化。

[0027] 适于用作可生物降解的聚合物载体的物质为可生物降解的聚酯聚合物。当用作微

球的支架 (scaffold) 且其中含有葡萄糖调节肽时,可生物降解的聚酯聚合物逐渐地降解而释放出葡萄糖调节肽。可生物降解的聚酯聚合物的实例包括但不限于:聚 L- 乳酸、聚乙醇酸、D- 乳酸 - 乙醇酸共聚物、L- 乳酸 - 乙醇酸共聚物、D, L- 乳酸 - 乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚戊内酯、聚羟基丁酸酯和聚羟基戊酸酯。只要是可生物降解的聚酯聚合物在本领域中经常使用,就不在本发明中对其使用强加以任何特别的限定。该聚合物优选自于由下列物质所组成的组:聚 L- 乳酸、D- 乳酸 - 乙醇酸共聚物 (poly-D-lactic acid-co-glycolic acid)、L- 乳酸 - 乙醇酸共聚物 (poly-L-lactic acid-co-glycolic acid)、D, L- 乳酸 - 乙醇酸共聚物 (poly-D, L-lactic acid-co-glycolic acid, PLGA) 以及这些物质的组合。更为优选 D, L- 乳酸 - 乙醇酸共聚物 (PLGA) 自身、或其与聚 L- 乳酸的组合。

[0028] 另外,本发明还与对葡萄糖调节肽进行控释的可生物降解的聚合物微球的制备方法有关。

[0029] 可生物降解的聚合物微球的制备方法包括:

[0030] 将有机溶剂加入到聚合物中,得到聚合物溶液(步骤 1);

[0031] 将葡萄糖调节肽分散于步骤 1 所述的聚合物溶液中,得到分散体 (dispersion),然后将醇或醇与有机酸的混合物加入到该分散体中,得到分散有药物的溶液 (drug-dispersed solution) (步骤 2);以及

[0032] 由步骤 2 中所述的分散有药物的溶液形成微球(步骤 3)。

[0033] 该方法的详细说明将逐步给出。

[0034] 首先,步骤 1 为制得聚合物溶液。

[0035] 在步骤 1 中,将聚合物溶解于有机溶剂中。该聚合物为可生物降解的,且可用作载体,优选可生物降解的聚酯聚合物。只要是可生物降解的聚合物载体在其中具有高溶解度且可通过蒸发容易地将其除去,可以使用任何挥发性的有机溶剂而不作特别的限定。在本发明中,有机溶剂不仅起到用于溶解聚合物的增溶剂的作用,还起到将葡萄糖调节肽均匀分散于聚合物溶液的分散剂的作用。

[0036] 适用于本发明的有机溶剂的实例包括:二氯甲烷、乙酸乙酯、氯仿、丙酮、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、N- 甲基吡咯烷酮、二氧六环、四氢呋喃、乙酸乙酯、甲乙酮、乙腈以及这些物质的组合,其中优选二氯甲烷、乙酸乙酯和氯仿,最优选二氯甲烷。

[0037] 然后,步骤 2 为制得分散有药物的溶液。

[0038] 在步骤 2 中,将葡萄糖调节肽分散于所述的聚合物溶液中。该葡萄糖调节肽如上文所述。优选加入合成的 exendin-4 以得到药物分散体 (drug dispersion)。在该药物分散体中,葡萄糖调节肽与所述聚合物的比例 (w/w) 选自足以溶解葡萄糖调节肽的范围。

[0039] 然后,将醇单独溶解于药物分散体中,或者将醇与有机酸的组合溶解于药物分散体中。醇和有机酸起到了增溶剂的作用,能够溶解所述的聚合物和葡萄糖调节肽。可进一步添加稳定剂或表面活性剂。

[0040] 在本发明的方法中,以如下顺序进行药物分散体的制备非常重要:在聚合物中加入有机溶剂、加入葡萄糖调节肽、加入醇或醇与有机酸的混合物。当加入的顺序发生改变时,即,当在聚合物中加入有机溶剂以及醇或醇与有机酸的混合物之后,再将葡萄糖调节肽溶解;或是当将葡萄糖调节肽在醇或醇与有机酸的混合物中形成的溶液加入到聚合物溶液中时,所得到的微球会显示出不完全的释放模式。

[0041] 本发明中有用的醇为甲醇、乙醇、异丙醇和丁醇,优选甲醇,原因在于其对所述可生物降解的聚合物载体和葡萄糖调节肽的高溶解度。用于溶解药物分散体的醇优选使用尽可能少的用量,但必须足以溶解药物分散体。可根据醇的种类确定用量。就甲醇而言,药物分散体与醇的比例(v/v)的优选范围为1:1至6:1,更优选3:1至4:1以完全溶解药物分散体。

[0042] 另外,只要是能够溶解所述的聚合物载体和葡萄糖调节肽,可以使用任何有机酸而不作特别的限定。适用于本发明的有机酸的实例包括:草酸、草酰乙酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸、乙酸、丁酸、软脂酸、酒石酸、抗坏血酸、尿酸、磺酸、亚磺酸、甲酸、柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸以及核酸,优选乙酸、甲酸及其组合。类似于醇,根据有机酸的种类确定有机酸的用量。

[0043] 只要添加剂能够溶解药物分散体并且可溶于用于药物分散体的溶剂,就不对其强加任何特别的限定。例如可使用聚乙二醇(SolutolHS-15TM、TPGSTM、GelucireTM)、油类(LabrafilTM、LabrasolTM、MediumChain Triglyceride(中链甘油三酯)TM)、蛋白类(凝集素)、表面活性剂(N-甲基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、TweenTM、SpanTM、CremophorTM、泊洛沙姆TM、BrijTM、Sunsoft 818HTM)以及羟丙基甲基纤维素。其在增溶剂中的浓度范围为0.01%至15%(w/v),优选0.1%至12.5%(w/v)。

[0044] 最后,步骤3为从步骤2中所述的分散有药物的溶液中形成微球。

[0045] 通过将所述的分散有药物的溶液在含有乳化剂的水溶液中进行分散或是使用喷雾干燥机可实现微球的形成。

[0046] 当将所述的分散有药物的溶液在含有乳化剂的水溶液中进行分散时,使用搅拌器和均质机来形成微球,随后将微球进行干燥。本发明中有用的乳化剂可以是可分散于有机溶剂中的亲油性乳化剂或者是可分散于水性溶剂中的亲水性乳化剂。亲水性乳化剂的实例包括:Tween、Triton、Brij、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇,优选聚乙烯醇。所使用的乳化剂在有机溶剂中可以是饱和的或不饱和的。该有机溶剂优选二氯甲烷、乙酸乙酯或氯仿,最优选二氯甲烷。所述乳化剂在水溶液中的浓度范围为0.01%至5.0%(w/v),优选0.5%至2%(w/v)。

[0047] 在该步骤中,可以通过冷冻干燥或真空干燥来进行干燥。所得到的微球可通过冷冻干燥时的离心分离进行收集,或者是在最终干燥以前通过真空干燥时的真空过滤系统进行收集。

[0048] 根据本方法制备的微球为水包油(O/W)类型,其平均尺寸范围为5 μ m至70 μ m,并优选10 μ m至30 μ m,该尺寸范围适于注射。通过控制油相的体积比,即,所述分散有药物的溶液与溶解有乳化剂的水相的体积比,可以将颗粒尺寸设定为各种数值。

[0049] 就喷雾干燥而言,可通过从喷雾干燥机将所述分散有药物的溶液喷雾的方法简单地制备微球。为提高制备效率,在注入时,将喷雾干燥机的温度设定为115 $^{\circ}$ C至125 $^{\circ}$ C,在喷出时,将温度设定为80 $^{\circ}$ C至90 $^{\circ}$ C。其后经喷雾干燥的微球可经过另外的干燥过程如冷冻干燥或真空干燥以除去其中残留的溶剂。

[0050] 进一步地,本发明中的可生物降解的聚合物微球可通过包含如下步骤的方法进行制备:

[0051] 将有机溶剂加入到聚合物中,得到聚合物溶液(步骤1);

[0052] 将步骤 1 中的聚合物溶液用含有表面活性剂的葡萄糖调节肽水溶液乳化,得到初级乳液(primary emulsion)(步骤 2');以及

[0053] 由步骤 2' 中所述的初级乳液形成微球(步骤 3')。

[0054] 在步骤 1 中,将聚合物溶解于有机溶剂中。该聚合物为可生物降解的并可用作载体,优选可生物降解的聚酯聚合物。只要是对于可生物降解的聚合物载体具有高溶解度并可通过蒸发容易地除去,可以使用任何挥发性溶剂而不作特别的限定。在本发明中,该有机溶剂不仅起到使聚合物溶解的增溶剂的作用,而且还起到将葡萄糖调节肽均匀分散于聚合物溶液的分散剂的作用。

[0055] 适用于本发明的有机溶剂的实例包括:二氯甲烷、乙酸乙酯、氯仿、丙酮、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二氧六环、四氢呋喃、乙酸乙酯、甲乙酮、乙腈以及这些物质的组合,优选二氯甲烷、乙酸乙酯和氯仿,最优选二氯甲烷。

[0056] 在步骤 2' 中,将含有表面活性剂的葡萄糖调节肽水溶液加入到聚合物溶液中,随后用搅拌器或均质机进行乳化以得到初级乳液。合成的 exendin-4 可作为优选的葡萄糖调节肽进行使用。在聚合物溶液中加入含有表面活性剂的葡萄糖调节肽水溶液,形成了水包油包水(W/O/W)类型的复乳(double emulsion)微球。

[0057] 在步骤 2' 中,只要是可将葡萄糖调节肽溶解于水溶液中,葡萄糖调节肽水溶液中可含有任何表面活性剂。在本发明中可用的表面活性剂的实例包括:Tween、Triton、Brij、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。

[0058] 可通过如下步骤实现微球的形成:将步骤 2' 中的初级乳液分散于含有乳化剂的水溶液中;用搅拌器或均质机进行搅拌,以及干燥。本发明中有用的乳化剂可以是可分散于有机溶剂中的亲油性乳化剂或者是可分散于水性溶剂中的亲水性乳化剂。亲水性乳化剂的实例包括:Tween、Triton、Brij、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇,优选聚乙烯醇。所使用的乳化剂在有机溶剂中可以是饱和的或不饱和的。该有机溶剂优选二氯甲烷、乙酸乙酯或氯仿,最优选二氯甲烷。乳化剂在水溶液中的浓度范围为 0.01%至 5.0% (w/v),优选 0.5%至 2% (w/v)。

[0059] 在该步骤中,可借助冷冻干燥或真空干燥来进行干燥。所得到的微球可通过冷冻干燥时的离心分离进行收集,或者是在最终干燥以前通过真空干燥时的真空过滤系统进行收集。

[0060] 根据本发明制备的微球在以可控的方式释放 exendin-4 方面是一种有用的试剂,其具有如下优点:既没有初期突释效应也不会使药物释放不完全;保持 exendin-4 的零级释放;由于其简便的制备方法确保所包封的 exendin-4 具有高包封率和高稳定性;以及在体外和体内在三周或四周的时间内从中稳定地释放 exendin-4。

[0061] 实施例

[0062] 可通过下面的实施例更好地理解本发明,这些实施例是为阐明本发明而给出,不应被理解为对本发明的限定。

[0063] 实施例 1:根据聚合物种类与混合比例进行微球的制备(水包油 O/W 型乳液)

[0064] 将 300mg 聚合物(Boehringer Ingelheim)完全溶解于二氯甲烷中。将 9mg 的 exendin-4(American Peptide)分散于该聚合物溶液中得到 exendin-4 分散体。所使用的聚合物如表 1 所示,为一种聚合物产品或是两种不同的聚合物产品以各种混合比例混合而

成的混合物。向每种具有不同聚合物种类与混合比例的药物分散体中加入预定量的甲醇（醇与药物分散体的体积比为 1 : 4），得到分散有药物的溶液。取 10ml 每种分散有药物的溶液，使用 250ml 用二氯甲烷饱和的、1% (w/v) 的聚乙烯醇水溶液，通过搅拌器或均质机将其进行乳化以形成微球。在室温和大气压下搅拌数小时而将二氯甲烷缓慢地挥发到空气中的同时，将微球进行固化。在离心分离之后，将由此收集到的微球用蒸馏水进行洗涤，并在 -70℃ 进行冷冻，然后在室温和 50mTorr 的压力下，用 adVantage 冷冻干燥机 (VirTis, NY, U. S. A) 进行 3 天的冷冻干燥，从而得到能够以可控的方式释放 exendin-4 的水包油 (O/W) 型微球。

[0065] 表 1

[0066]

实施例	Exendin-4 (mg)	聚合物 (mg)	聚合物种类	混合比例
1-1	9	300	RG502H	1
1-2			RG502H : R202	90 : 10
1-3			RG502H : R202	80 : 20
1-4			RG502H : RG502	90 : 10
1-5			RG502H : RG502	80 : 20
1-6			RG502H : RG503	90 : 10
1-7			RG502H : RG503	80 : 20

[0067] 实施例 2 : 根据醇与药物分散体的比例进行微球的制备 (水包油 O/W 型乳液)

[0068] 将 300mg 聚合物 (RG502H, Boehringer Ingelheim) 完全溶解于二氯甲烷中。将 9mg 的 exendin-4 (American Peptide) 分散于该聚合物溶液中得到 exendin-4 分散体。向该药物分散体中加入预定量的甲醇（醇与药物分散体的体积比为 1 : 1 至 1 : 7, 如表 2 所示）以得到分散有药物的溶液。用与实施例 1 中相同的方式将其进行乳化和干燥以得到微球。

[0069] 表 2

实施例	MeOH (体积)	Exendin-4 分散体 (体积)	分散有药物的溶液的状态
[0070]	1	1	溶液
		2	溶液
		3	溶液
		4	溶液
		5	溶液
		6	溶液
		7	分散体

[0071] 如表 2 所示，当药物分散体与甲醇的体积比为 7 以上时，无法形成溶液。

[0072] 实施例 3 : 由含有添加剂的分散有药物的溶液进行微球的制备 (水包油 O/W 型乳液)

[0073] 用与实施例 1-1 相同的方式制备微球，所不同的是将占溶液体积 0.1% 或 12.5% 的各种添加剂与分散有药物的溶液进行混合。在表 3 中总结了与溶液进行混合的添加剂及

其体积百分数。

[0074] 表 3

实施例	Exendin-4 (mg)	聚合物 (mg)	添加剂	混合比	
				0.1%	12.5%
3-1	9	300	Solutol HS-15	○	○
3-2			TPGS	○	○
3-3			Gelucire	○	○
3-4			Labrafil	○	○
3-5			Labrasol	○	○
3-6			中链甘油三酯	○	○
3-7			卵磷脂	○	○
3-8			N-甲基吡咯烷酮	○	○
3-9			聚乙烯吡咯烷酮	○	○
3-10			羟丙基甲基纤维素	○	○
3-11			Tween	○	○
3-12			Span	○	○
3-13			Cremophor	○	○
3-14			泊洛沙姆	○	○
3-15			Brij	○	○
3-16			Sunsoft 818H	○	○

[0076] 如表 3 所示,可将具有较宽浓度范围的多种添加剂与分散有药物的溶液进行混合。

[0077] 实施例 4:由未被有机溶剂饱和的乳化剂水溶液进行微球的制备(水包油 O/W 型乳液)

[0078] 用与实施例 1-1 相同的方式制备微球,所不同的是将分散有药物的溶液加入到 250ml 未被二氯甲烷饱和的聚乙烯醇的 1% 水溶液 (w/v) 中,并用搅拌器或均质机乳化。

[0079] 实施例 5:具有不同颗粒尺寸的微球的制备(水包油 O/W 型乳液)

[0080] 用与实施例 1-1 相同的方式制备微球,所不同的是用二氯甲烷饱和的聚乙烯醇的 1% 水溶液 (w/v) 与分散有药物的溶液的体积比(即水相与油相的体积比)按照下表 4 所示进行设定。

[0081] 表 4

实施例	Exendin-4 (mg)	聚合物 (mg)	水相:油相 (v/v)
5-1	9	300	1 : 15
5-2			1 : 30
5-3			1 : 60

[0083] 实施例 6:用干燥法进行微球的制备(水包油 O/W 型乳液)

[0084] 将在实施例 1-1 中通过在室温和大气压下进行数小时的搅拌将二氯甲烷逐渐挥发后固化得到的微球通过真空过滤系统进行过滤,再用蒸馏水洗涤,然后在最终干燥前在室温和 50mTorr 的压力下用 adVantage 干燥机 (VirTis, NY, U. S. A) 进行 3 天的脱水。

[0085] 实施例 7:用喷雾干燥法进行微球的制备(水包油 O/W 型乳液)

[0086] 在实施例 1-1 中得到的分散有药物的溶液未与乳化剂水溶液进行混合,而是以每分钟 2.5ml 的速率被注入喷雾干燥机 (Buchi Mini 喷雾干燥机, B-290),同时,通过 0.7mm 的喷嘴以 400Nl/h 的速率进行喷雾。将由此形成的微球在真空中进行干燥,从而得到能够稳定释放 exendin-4 的微球剂型。在注入时,将喷雾干燥机的温度设定为 $120 \pm 2^\circ\text{C}$,而在喷出时,将温度设定为 $85 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0087] 实施例 8:使用药物水溶液进行微球的制备 (水包油包水 W/O/W 型乳液)

[0088] 将 300mg 聚合物 (RG502H, Boehringer Ingelheim) 完全溶解于二氯甲烷中。向该聚合物溶液中加入 exendin-4 的水溶液,所述的 exendin-4 的水溶液通过将 9mg 的 exendin-4 (American Peptide) 溶解于 0.3ml 聚乙烯醇的 0.5% 水溶液 (w/v) 中而形成,然后用均质机搅拌得到初级乳液。取 10ml 该初级乳液,使用 250ml 用二氯甲烷饱和的、聚乙烯醇的 1% 水溶液 (w/v),通过搅拌器或均质机将其进行乳化以形成微球。在室温和大气压下搅拌数小时而将二氯甲烷缓慢地挥发到空气中的同时,将微球进行固化。在离心分离之后,将由此收集到的微球用蒸馏水进行洗涤,并在 -70°C 进行冷冻,然后在室温和 50mTorr 的压力下,用 adVantage 冷冻干燥机 (VirTis, NY, U. S. A) 进行 3 天的冷冻干燥,从而得到能够以可控的方式释放 exendin-4 的水包油包水 (W/O/W) 型微球。

[0089] 对比例 1:没有药物分散步骤而进行水包油 (O/W) 型微球的制备 (1)

[0090] 向含有 300mg 聚合物 (RG502H, Boehringer Ingelheim) 的二氯甲烷溶液中,加入相当于二氯甲烷溶液体积的四分之一的甲醇,得到聚合物 / 二氯甲烷 / 甲醇溶液。以 exendin-4 与聚合物的重量比为 9 : 300 的比例,将 exendin-4 与聚合物 / 二氯甲烷 / 甲醇溶液进行混合,得到未进行药物分散步骤的分散有药物的溶液。用与实施例 1 中相同的方式由该分散有药物的溶液制备微球。

[0091] 对比例 2:没有药物分散步骤而进行水包油 (O/W) 型微球的制备 (2)

[0092] 用与实施例 1 相同的方式制备微球,所不同的是将 9mg 的 exendin-4 在 0.2ml 甲醇中形成的溶液加入到 300mg 聚合物 (RG502H, Boehringer Ingelheim) 在 0.8ml 二氯甲烷中形成的溶液中,得到未进行药物分散步骤的分散有药物的溶液。

[0093] 实验例 1:微球中 Exendin-4 的包封率

[0094] 取 30mg 每种在实施例 1 和实施例 4-8 中制备的其中包封有 exendin-4 的微球,在聚苯乙烯容器中将其充分溶解于 0.5ml 的 DMSO,并向其中加入 1.5ml 蒸馏水,然后将其搅拌 12 小时以上,以将 exendin-4 提取进入水相。将提取出的 exendin-4 进行定量分析以计算包封率,包封率以实际包封量占理论包封量的百分比的方式表达。

[0095] 将计算结果在下面的表 5 中进行总结。

[0096] 表 5

[0097]

实施例	包封率 (%)
1-1	85
1-2	86

1-3	88
1-4	81
1-5	83
1-6	84
1-7	80
4	84
5-1	85
5-2	85
5-3	84
6	85
7	93
8	83

[0098] 如表 5 所示, 计算得到的本发明中的微球, 其包封率在 80% 以上。

[0099] 实验例 2: 微球平均颗粒尺寸的测量

[0100] 取 30mg 每种在实施例 1 和实施例 4-8 中制备的其中包封有 exendin-4 的微球, 将其分散于含有 0.02% (v/v) Tween 20 的 1L 蒸馏水中, 然后用粒度分析仪测量其平均颗粒尺寸。测量结果列于下面的表 6 中。

[0101] 表 6

[0102]

实施例	平均颗粒尺寸 (μm)
1-1	22
1-2	16
1-3	18
1-4	16
1-5	19
1-6	22

1-7	21
4	26
5-1	8
5-2	25
5-3	65
6	21
7	59
8	16

[0103] 如表 6 所示,根据本发明制备的微球其平均颗粒尺寸范围为 $8\ \mu\text{m}$ 至 $65\ \mu\text{m}$,已经小到足够用于小尺寸注射针头。

[0104] 实验例 3:药物自微球中的体外释放

[0105] 在下面的条件下,对在实施例和比较例中制备的微球进行 exendin-4 体外释放的评价。

[0106] 将置于聚苯乙烯容器中的 30mg 微球分散于含有 0.02% (v/v) Tween20 的、1.5ml 的 PBS (磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4) 中。在 37°C 进行保温 (incubation) 期间,根据保温时间将分散体进行离心分离使微球沉淀。对上清液进行 exendin-4 水平分析以测定 exendin-4 自微球中的释放量。将沉淀出的微球再次分散于新鲜的 PBS 用于随后的分析实验。在图 1 至图 3 中绘制出 exendin-4 自微球中的释放量 (%) 随保温时间的变化情况。

[0107] 图 1 和图 2 表示 exendin-4 自微球中的体外释放量随时间的变化情况,该微球通过本发明中的实施例 1 和实施例 4-8 中的 exendin 分散步骤制备得到;而图 3 表示 exendin-4 自微球中的体外释放量随时间的变化情况,该微球由不包括 exendin 分散步骤的对比例 1 和对比例 2 制备得到。

[0108] 从图 1 和图 2 的曲线中可以明显地看出,通过本发明中的 exendin 分散步骤制备的微球既没有初期突释 (exendin-4 在第一天释放了 3%) 也不会释放不完全,在 21 天内持续进行零级释放。

[0109] 相反,如图 3 所示,在没有 exendin 分散步骤的情况下制备的微球显示出释放不完全的状况,只有 83% (对比例 1) 和 49% (对比例 2) 的药物在 21 天内得到了释放。

[0110] 因此,根据本发明制备的含有 exendin-4 的微球既没有初期突释也不会释放不完全,并且在三周内持续进行 exendin-4 的零级释放,所以其能够有效地用作 exendin-4 的缓释剂。

[0111] 实验例 4:微球的药物动力学评价

[0112] 在下面的条件下,对在实施例和对比例中制备的微球进行 exendin-4 体内释放和药物动力学性质的评价。

[0113] 将预定量的 (对应于 $140\ \mu\text{g}$ 的 exendin-4) 在实施例 1 和实施例 4-8 以及对比例

1 和对比例 2 中制备的微球悬浮于含有 1.5% 的 CMC、0.5% 的 Tween 20 和 0.9% 的 NaCl 的水溶液中,再将悬浮液对五只 Sprague-Dawley 大鼠进行皮下注射,每只的剂量为 0.2ml。随后按预定的时间间隔采取大鼠的血样,并用酶联免疫吸附法 (ELISA) 定量分析 exendin-4 的水平以测定 exendin-4 自微球中的释放情况。图 4 表示 exendin-4 自实施例 1-1 中制备的微球中体内释放的模式图。

[0114] 从图 4 的释放模式图中可以明显地看出,根据本发明制备的微球既没有初期突释也不会释放不完全,并且同体外实验一样,在 20 天的时间内在实验动物体内持续进行零级释放。

[0115] 另外,还用 WinNonlin 程序根据 exendin-4 释放的测量结果计算出药物动力学参数最高血浓度 (C_{max}) 和 0-14 天的曲线下面积 ($AUC_{0-14天}$)。这些参数在下面的表 7 中进行了总结。

[0116] 表 7

[0117]

实施例	C_{max} (ng/ml)	$AUC_{0-14天}$ (天 *ng/ml/mg/kg)
1-1	1.92±0.30	11.85±0.30
1-2	2.78±0.69	9.29±0.57
1-3	1.33±0.20	9.24±0.76
1-4	1.18±0.12	9.63±1.08
1-5	1.04±0.13	8.98±0.62
1-6	2.26±0.37	9.92±0.81
1-7	4.02±0.15	9.31±0.67
4	1.91±0.11	12.05±0.78
5-1	3.13±0.31	9.74±1.08
5-2	1.31±0.11	12.01±0.11
5-3	1.29±0.10	11.07±0.91
6	2.05±0.33	10.84±0.78
7	1.67±0.27	8.31±0.27
8	3.28±0.42	9.40±0.58

对比例 1	0.94 ± 0.17	5.34 ± 0.61
对比例 2	0.85 ± 0.24	5.07 ± 0.20

[0118] 如表 7 所示, 实施例 1-1 至 1-7、实施例 4、实施例 5-1 至 5-3 以及实施例 6-8 中的微球其计算得到的 C_{\max} 和 AUC 值要高于对比例 1 和对比例 2 的值, 这表明根据本发明制备的微球是极好的 exendin-4 控释剂。

[0119] 因此, 在图 4 和表 7 数据的基础上, 本发明所提供的可生物降解的聚合物微球不仅具有极好的包封率, 而且还能在 2-4 周的时间内稳定地完全释放 exendin-4 而没有滞后期。

[0120] 实验例 5: 微球中 Exendin-4 的稳定性分析

[0121] 将 10mg 实施例 1-1 中制备的含有 exendin-4 的微球置于聚苯乙烯容器并充分溶解于 1ml 的 DMSO。将得到的溶液用碳酸氢铵稀释五倍, 然后用反相高效液相色谱进行分析, 观察 exendin-4 的峰和保留时间。结果如图 5 所示。

[0122] 图 5 为从实施例 1-1 制备的微球中得到的 exendin-4 的色谱图。如该色谱图所示, 可观察到一个单独的峰, 并且其保留时间与对照样品的保留时间相同。



图 1

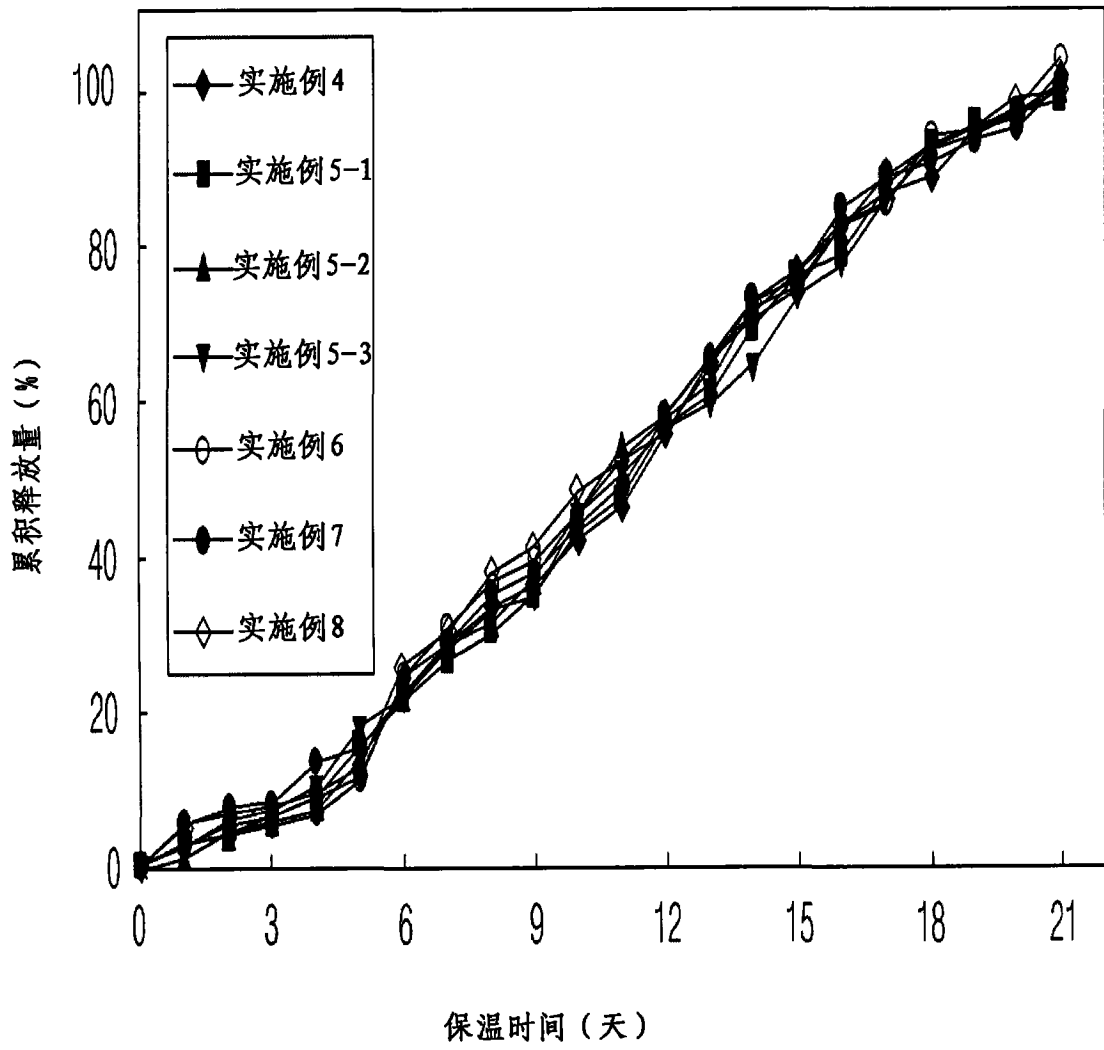


图 2

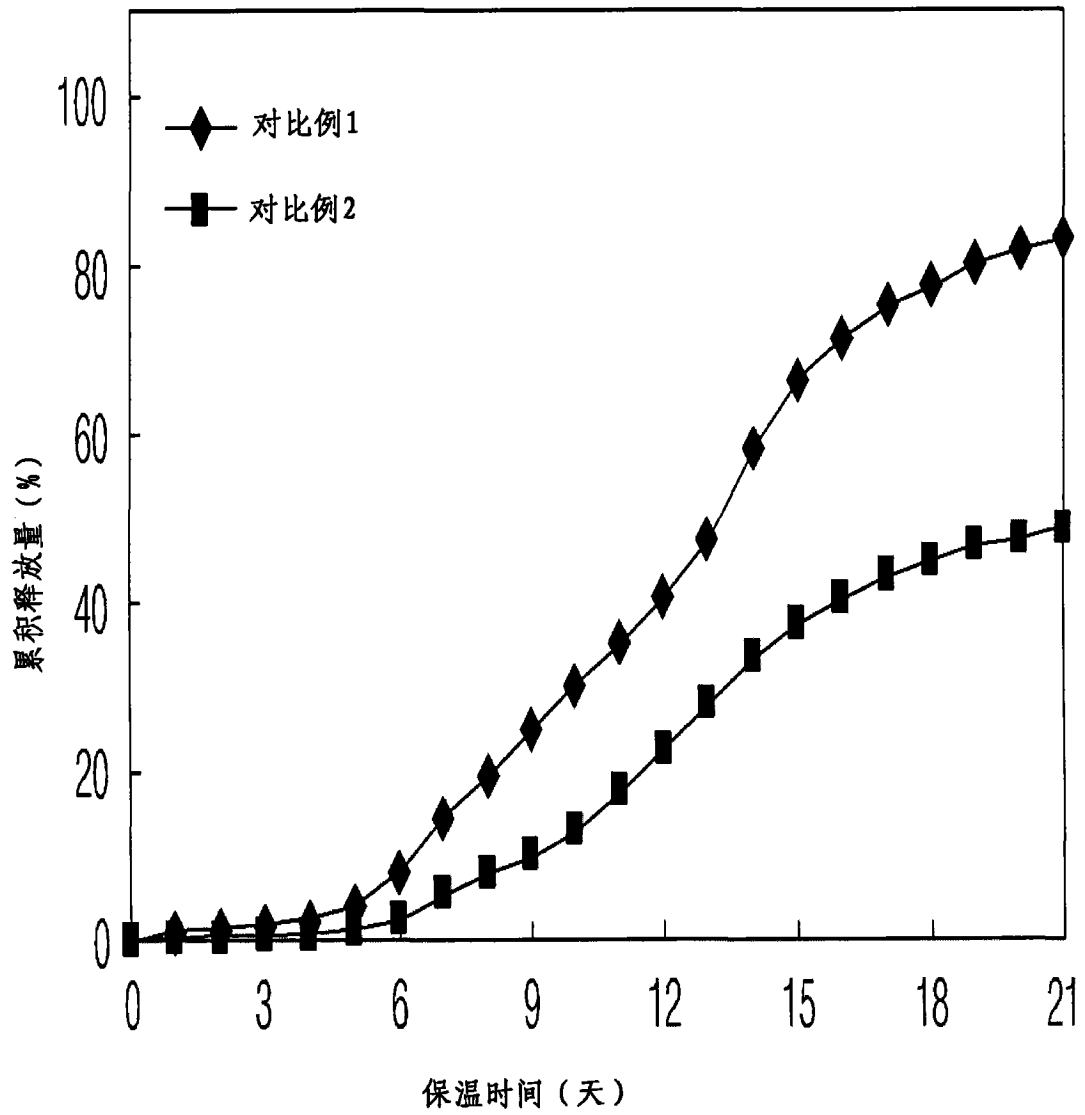


图 3

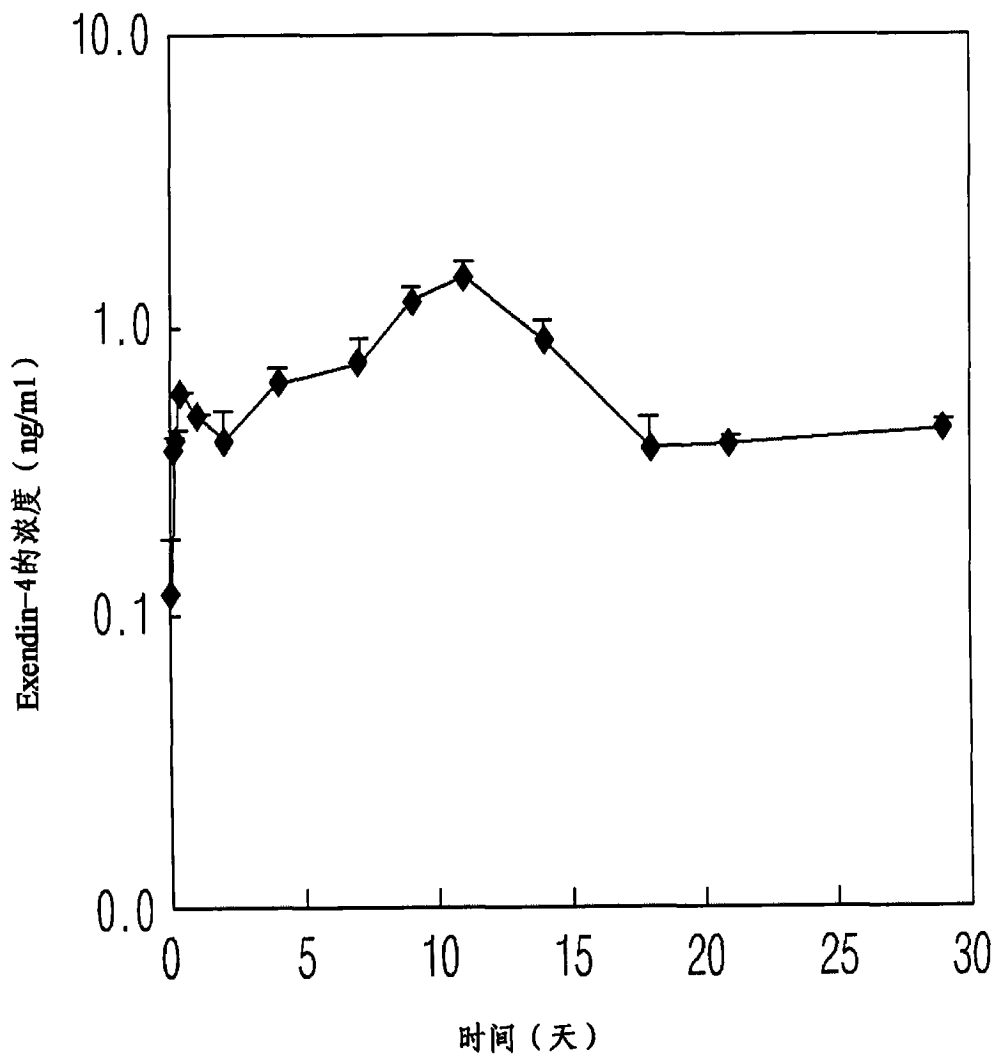


图 4

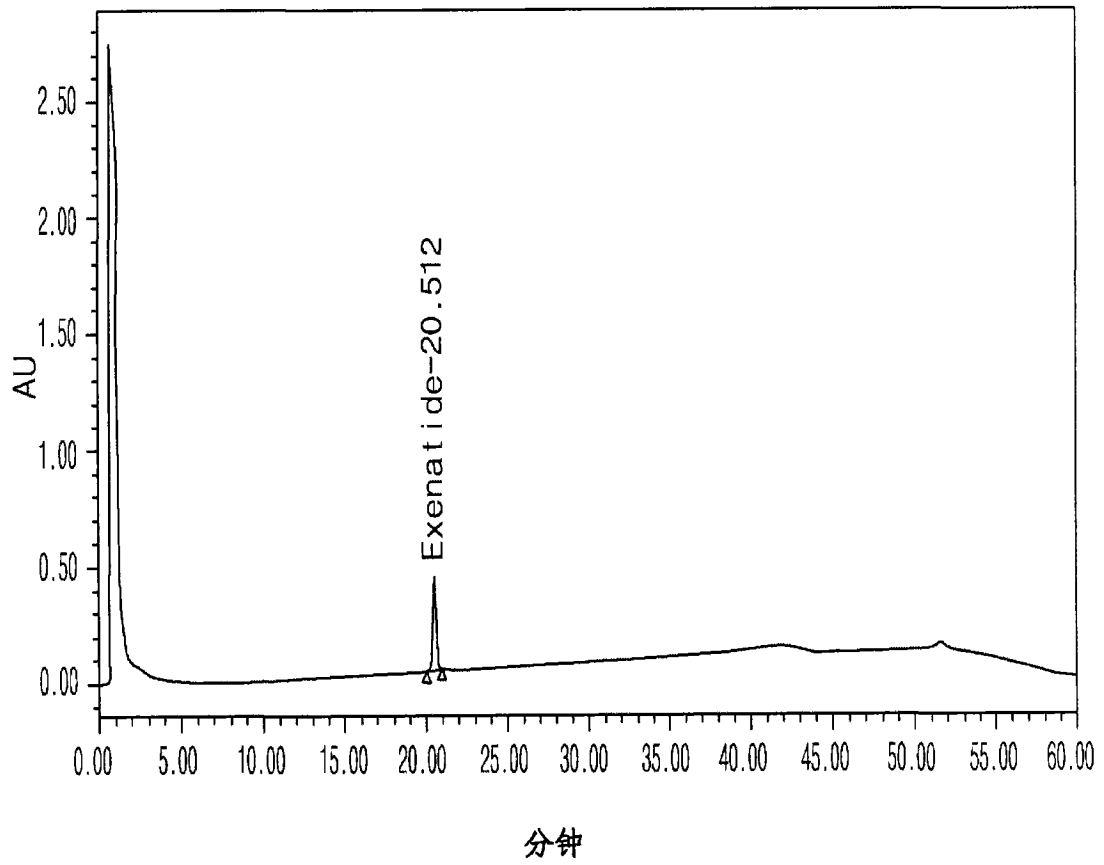


图 5