[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 38/18
A61K 31/765

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98813864.6

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1171635C

[22] 申请日 1998.3.7 [21] 申请号 98813864.6
[86] 国际申请 PCT/KR1998/000043 1998.3.7
[87] 国际公布 WO1999/044631 英 1999.9.10
[85] 进入国家阶段日期 2000.9.6
[71] 专利权人 株式会社大熊制药
地址 韩国京畿道
[72] 发明人 李承烨 姜镇锡 沈点顺 林承旭 韩承熙 李秉光 刘泳孝 郑钟根
审查员 黄 磊

[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
代理人 李华英

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 含有人表皮生长因子的局部用组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种含有人表皮生长因子(hEGF)的局部用组合物。更具体地说，本发明涉及一种局部用组合物，它是使用在 37℃、60rpm 下粘度为 4－10cps 的聚氧乙烯－聚氧丙烯共聚物(通用名：Poloxamer)作为局部用制剂的基质而制得的，用该共聚物作为基质的目的是改善 hEGF 的伤口愈合能力。本发明的局部用组合物可以充分展现出 hEGF 的伤口愈合作用，因此可以用于治疗皮肤损伤，包括伤口、切口、烧伤等。

ISSN1008-4274

1、一种局部用组合物，它包含伤口愈合有效量的人表皮生长因子，和在 37℃、60rpm 下粘度为 4-10cps 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。

2、按照权利要求 1 的局部用组合物，其中人表皮生长因子的含量为 1-100μg/ml。

3、按照权利要求 1 的局部用组合物，其中聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物在 37℃、60rpm 下的粘度为 4-6cps。

4、按照权利要求 1 的局部用组合物，其中作为聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的分子量为 10,000-15,000 的共聚物的用量为 5-10wt%。

5、按照权利要求 4 的局部用组合物，其中作为聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的分子量为 10,000-15,000 的共聚物的用量为 5-7.5wt%。

6、按照权利要求 1 的局部用组合物，其中作为聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的分子量为 7,000-10,000 的共聚物的用量为 7.5-15wt%。

7、按照权利要求 6 的局部用组合物，其中作为聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的分子量为 7,000-10,000 的共聚物的用量为 7.5-12.5wt%。

含有人表皮生长因子的局部用组合物

技术领域

本发明涉及一种含有人表皮生长因子（下文中称作“hEGF”）的局部用组合物。更具体地说，本发明涉及一种局部用组合物，它包含在37℃、60rpm下粘度为4-10cps的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物（商品名：泊咯沙姆（Poloxamer）），该共聚物是作为天然产hEGF或重组人表皮生长因子（rhEGF）的局部用制剂的基质。本发明的局部用组合物可用于治疗皮肤损伤，包括伤口、切口、烧伤等。

背景技术

hEGF是一种由带3个二硫键的53个氨基酸残基组成的多肽〔参见：Cohen, S.，《生物化学杂志》237:1555-1562，1962年；Savage, C.R.，《生物化学杂志》248: 7669-7672，1973年〕。据报道，hEGF在控制哺乳动物表皮和皮肤生长中有非常重要的作用〔参见：Sporn, M.B.等，《自然》（伦敦）313: 745-747，1985年；Sporn M.B.等，《新英格兰医学杂志》303: 878-880，1980年〕。它还在分子水平上与伤口的愈合过程有关〔参见：Buckley, A.等，《美国国家科学院院报》82: 7340-7344，1985年〕。从那时以来，已进行了大量有关用hEGF使皮肤伤口复原的研究。

尽管hEGF在体外显示出良好的刺激表皮细胞分化的活性，但要开发用于治疗表面伤口的含有hEGF的制剂却非常困难，因为当hEGF在临床上应用于伤口时仅显示出一点点治疗伤口的作用。hEGF在活体中没有显示出所需的充分的治疗伤口作用的原因是，hEGF作为蛋白质在室温下是非常不稳定的，特别是有水存在时更是如此，它的半衰期小于1小时，远远短于在伤口部位诱导细胞DNA合成所需的迟滞时间，这段时间约为8-12小时〔参见：《外科研究杂志》43: 333，1987年〕。而且，当hEGF应用于皮肤上时，由于伤口部位存在的蛋白酶对

hEGF 的变性和分解作用而使得 hEGF 丧失其生物活性。

为了提供所需的 hEGF 的伤口愈合作用，需要通过在对伤口愈合来说最重要的头几天里随时将 hEGF 涂敷到伤口部位来连续保持 hEGF 的有效水平〔参见:《外科研究杂志》43: 333，1987 年,《实验与临床医学杂志》108: 103，1986 年〕。关于这点，已进行了研究试图开发出可连续释放 hEGF 至伤口部位的持续释放制剂。

作为这些研究的结果之一，美国专利说明书第 4,944,948 号公开了使用中性磷脂、阴电荷磷脂和胆固醇的 hEGF/脂质体凝胶制剂，它能连续释放 hEGF 至伤口部位；EP 公开号第 EP 0312208 号公开了包含可药用的各种水溶性或水可膨胀的聚合物作为基质的含水制剂，以稳定地释放 hEGF。

然而，尽管上述在先出版物公开了可连续 12 小时或更长时间释放 hEGF 的制剂，但它们不适合在工业上应用，因为它们的缺点是在伤口部位只有一点点伤口愈合作用。

特别是在 EP 出版物 0312208 中，通过使用聚合物作为基质制备可连续 12 小时或更长时间释放 hEGF 的凝胶制剂，在高浓度下，hEGF 从凝胶中缓慢释放并连续释放到伤口部位,另外该凝胶制剂自身也可通过在伤口部位形成涂层以在伤口部位形成适宜的湿润条件并防止病原有机体侵入伤口部位而提供伤口愈合作用。但是，由于该凝胶制剂在室温下的粘度非常高，达到 1000-12,000,000cps，当其通过摩擦应用到伤口部位时，这种摩擦可能在伤口部位引起刺激。很难将该制剂应用于具有大面积损伤并遭受严重疼痛的伤口，诸如烧伤伤口处。此外，该凝胶制剂在伤口部位形成过度涂层，物理上抑制了表皮细胞通过 hEGF 的促有丝分裂活性而导致的迁移，由此阻滞了 hEGF 对伤口愈合的作用。因此，所述在先出版物公开的凝胶制剂存在严重的缺点，即：当其在临床上应用于伤口部位时，hEGF 的伤口愈合作用不能充分实现。

如上所述，由于在先技术中的 hEGF 局部用制剂在伤口部位没有显示出所需的充分的伤口愈合作用，因此非常期望开发出能在活体中充分显示出 hEGF 的伤口愈合作用的局部用制剂。

因此，本发明人已进行了大量研究，以开发出能在活体中显示出充分的伤口愈合作用的局部用制剂。结果，我们已确定，使用在37℃、60rpm下粘度为4-10cps的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的hEGF局部用制剂可显示出所需的良好的hEGF伤口愈合作用，由此完成了本发明。

本发明的公开

因此，本发明涉及一种局部使用的含有hEGF的组合物。

更具体地说，本发明涉及一种局部用组合物，它包含作为活性成分的hEGF和一种作为局部用制剂基质的、在37℃、60rpm下粘度为4-10cps的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。

在本说明书中，粘度由量纲“达因/秒/cm^2”指示。除非另有说明，否则在本文中提到的该量纲是用Brookfield粘度计测得的，单位为厘泊（cps）。除非另有说明，否则所有的粘度值是在37℃、60rpm下测得的。

实施本发明的最佳方式

在本发明中用作基质的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物在37℃、60rpm下的粘度为4-10cps，优选为4-6cps。当聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的粘度小于4cps时，聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物固有的物理愈合作用降低，hEGF的释放速率过快，从而降低了其伤口愈合作用。另一方面，聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的粘度大于10cps也是不期望的，因为这时聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物在伤口部位形成过度涂层，抑制了由hEGF刺激的表皮细胞的迁移，由此降低了伤口愈合作用。

在本发明中，通过使用粘度为4-10cps的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物将hEGF配制成用于治疗伤口的局部用制剂，由该聚合物形成的涂层不会在伤口愈合过程中充当物理屏障，并且可显示出固有的物理愈合作用，并可进一步诱导hEGF的充分的伤口愈合作用。因此，当本发明的局部用制剂应用于伤口部位时，可显示出良好的伤口愈合作用。

聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的粘度是根据温度以及聚合物的分子量和含量确定的。因此，为了得到在37℃、60rpm下粘度为4-10cps的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，优选使用占组合物总重5-10wt%的、分子量约为10,000-15,000的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，或者使用占组合物总

重 7.5-15wt%的、分子量约为 7,000-10,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物.

更优选的是，通过使用占该组合物总重 5-7.5wt%的、分子量约为 10,000-15,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物或者使用占该组合物总重 7.5-12.5wt%的、分子量约为 7,000-10,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物在 4-6cps 的范围内调节粘度。

在本发明的局部用组合物中，既可以使用天然产 hEGF、也可以使用重组 hEGF 作为活性成分 hEGF. hEGF 在该组合物中的含量优选为 0.01-1,000μg/ml，特别是 1-100μg/ml.

由于如上所述组成的本发明的局部用组合物在室温下以液体状态存在，因此作为药理学活性成分的 hEGF 可以均匀地分散在聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物基质中。因此，与在先技术中的凝胶制剂相反，当本发明的组合物应用于伤口部位时，它显示出良好的活性成分渗透到伤口部位的作用，并且它可以在伤口部位处均匀展开，以增加皮肤与 hEGF 的接触面积，由此提供优秀的伤口愈合作用。此外，由于本发明的组合物为具有低粘度的液体状态，因此它还有一个优点是：它可以配制成喷雾剂，该喷雾剂可以通过简单的喷洒而不是摩擦应用于伤口部位，从而不会对伤口造成物理刺激。

除了活性成分 hEGF 和作为基质的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物以外，本发明的组合物还可含有制备局部用制剂时常用的可药用添加剂，例如稳定剂、赋形剂等。

如果需要，本发明的组合物可以以冻干形式储存，然后在使用时溶解于适宜的溶剂。因此，本发明的组合物可以长期稳定储存。

本发明通过下列实施例和实验作了更具体的解释。但是，应当理解：本发明并不以任何方式局限于这些实施例。

实施例 1

hEGF	5mg
泊咯沙姆（Poloxamer） 188	10g
对氧苯甲酸甲酯	200mg
磷酸氢二钠	340.23mg

氯化钠	832.77mg
磷酸	适量
净化水	适量
总量	100ml

按照常规方法，使用上述组分及所给用量制备该溶液。具体地说，用磷酸氢二钠、氯化钠和磷酸制备磷酸盐缓冲液。将 Poloxamer 188 加入到所得磷酸盐缓冲液中并通过搅拌使其分散于其中。然后，向其中加入作为防腐剂的对氧苯甲酸甲酯和作为活性成分的 hEGF，得到 100ml 按照本发明的局部用溶液。

实施例 2

hEGF	5mg
Poloxamer 407	7.5g
对氧苯甲酸甲酯	200mg
磷酸氢二钠	340.23mg
氯化钠	832.77mg
磷酸	适量
净化水	适量
总量	100ml

使用所给用量的磷酸氢二钠、氯化钠和磷酸制备磷酸盐缓冲液。将 Poloxamer 407 加入到所得磷酸盐缓冲液中并通过搅拌使其分散于其中。然后，向其中加入作为防腐剂的对氧苯甲酸甲酯和作为活性成分的 hEGF，得到 100ml 按照本发明的局部用溶液。

实验 1

在动物伤口模型中根据基质种类对比 hEGF 的伤口愈合作用

将大鼠背部的毛发剃掉并在其上涂抹脱毛剂（由 Il Dong Pharm.生产的 Neet Cream）以除净毛发。然后，经肌内途径给大鼠注射 0.5g/kg 剂量的链霉素（由 Chong Kun Dang Corp.生产）。经腹膜内途径给大鼠注射 40mg/kg 剂量的戊巴比妥钠将其麻醉。利用手术剪刀在一个直径为 10mm 的面积上去除表皮和真皮而导致伤口。然后，考虑到该伤口部位是开放的，

因此将从导致伤口开始1天后伤口的大小看作是起始伤口面积。

根据所使用的基质的种类，将测试动物共分成11组：未经处理的对照组，实验组（Poloxamer + hEGF组，聚乙烯吡咯烷酮 + hEGF组，葡聚糖 + hEGF组，明胶 + hEGF组和聚甲基丙烯酰胺 + hEGF组）和另一仅施用了基质的对照组（Poloxamer 组，聚乙烯吡咯烷酮组，葡聚糖组，明胶组和聚甲基丙烯酰胺组）。自导致伤口开始1天后，每只测试动物的伤口部位每次用 0.5ml 用量的测试药物进行处理，一天两次。在实验组中，用其中每100ml溶液含有5mg hEGF的制剂作为测试药物，它们用与实施例2相同的方法制备，只是制备时改变所用基质的种类和用量。在基质对照组中，使用按照与实施例2相同的方法制备但排除了hEGF的制剂。每天，伤口用测试药物处理并测量皮肤伤口部位的面积。之后，通过计算按照处理天数所测得的伤口面积与导致伤口后测得的起始伤口面积的比值得到通过这几日处理后的伤口剩余率。通过数日处理后的伤口剩余率和处理的天数用线性回归进行分析，以计算50％愈合时间（HT_{50}），即显示出50％伤口剩余率的天数。所得结果显示在下表1中。

表1. 基于水溶性聚合物基质种类的伤口处理天数的对比（单位：天）

	含量（wt%）			
实验组	5	10	15	20
Poloxamer*, hEGF	3.3	3.8	4.8	5.3
聚乙烯吡咯烷酮, hEGF	4.9	5.2	5.1	5.6
葡聚糖, hEGF	4.8	5.1	5.5	5.6
明胶, hEGF	5.4	5.2	5.3	5.8
聚甲基丙烯酰胺, hEGF	5.1	5.1	5.4	5.7
对照组	7.3			
Poloxamer*	4.8	5.2	5.8	6.3
聚乙烯吡咯烷酮	5.5	5.8	5.8	6.2
葡聚糖	5.4	5.7	6.2	6.2
明胶	5.8	6.1	6.3	6.5
聚甲基丙烯酰胺	5.9	6.1	6.4	6.2

注：Poloxamer 是聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的通用名，Poloxamer407 的平均分子量为 10,000-15,000.

从上表 1 中可以看出，当 Poloxamer407 作为聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物以 5-10wt%的量用作本发明的基质时，它显示出非常好的伤口愈合作用，伤口愈合天数为 3.3-3.8 天。与此相反，使用其余的水溶性聚合物基质仅提供了轻微的伤口愈合作用。

实验 2

在动物伤口模型中基于聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物含量的 hEGF 的伤口愈合作用

为了确定基于已在实验 1 中确认显示出最佳伤口愈合作用的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的含量的 hEGF 伤口愈合作用，按照与实验 1 相同的方法使用按照实施例 2 方法生产的测试制剂。将测试动物分成未经处理的对照组，含有 2.5、5.0、7.5、10.0 和 12.5wt%Poloxamer 的组，以及含有不同含量的 Poloxamer 和作为活性成分的 hEGF 的组。由此确定了基于基质含量的伤口愈合作用。

表 2. 基于聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物含量的伤口愈合天数的对比（单位：天）

	含量（wt%）				
实验组	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
Poloxamer407，hEGF	5.8	3.3	3.1	3.8	4.8
Poloxamer407	6.4	4.7	4.8	5.3	5.6
对照组	7.2				

从上表 2 中可以看出，当聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的含量为 5-10wt%时，它显示出良好的伤口愈合作用，伤口愈合天数为 3.1-3.8 天。特别是，当聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的含量为 5-7.5wt%时，它显示出非常好的伤口愈合作用，伤口愈合天数为 3.1-3.3 天。

从上述实验 1 和实验 2 得到的结果可以确定，在可常规用作局部用制剂基质的各种聚合物中，只有 5-10wt%、特别是 5-7.5wt%用量的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可诱导优益的 hEGF 伤口愈合作用。

实验 3

基于分子量的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的粘度

从上述实验 1 和实验 2 可以看出，根据聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的含量，伤口愈合作用有很大不同。此外，根据聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的分子量和含量以及温度可以确定其粘度。

因此，为了确定基于聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物分子量的最佳含量，按照下述过程，通过测量每种情况下的粘度来确定显示出最佳伤口愈合作用、含有 5-10wt%用量的 Poloxamer407（平均分子量约为 10,000-15,000）的制剂的粘度，和具有与使用 Poloxamer407 时相同粘度的制剂中，作为低分子量聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的 Poloxamer188（平均分子量约为 7,000-10,000）的含量。

粘度利用 Brookfield Synchro-Lectric 粘度计（型号：RVF，美国）测量，测试制剂按照下述方法制备。根据其含量精确称取 Poloxamer，并边搅拌边将其缓慢加入到含有蒸馏水的烧杯中。继续搅拌直到 Poloxamer 完全溶解。使所得测试溶液放置 5 小时，然后在实验前取出约 200ml 溶液放入 25℃-37℃的恒温箱中，然后使用。将粘度计垂直地装配在含有该溶液的容器中，以 60rpm 的速率旋转 3 分钟，之后记录该粘度计刻度上的数值。该实验重复进行 3 次并得到平均值。

表 3. 基于其含量的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的粘度（单位：cps）

		含量（wt%）					
	温度	5	7.5	10	12.5	15	20
Poloxamer407	25℃	4.5	6	11			
	37℃	4	6	10.6			
Poloxamer188	25℃	4.2	5	7	8.6	10	16
	37℃	3.5	4.1	5	6.5	8	12.5

从上表 3 可以看出，当显示出良好伤口愈合作用的 Poloxamer407 的含量为 5-10wt%时，粘度测得为 4-10cps，而在优选的 5-7.5wt%含量的情况下，粘度为 4-6cps。因此，作为用于治疗伤口的 hEGF 局部用制剂的基质，优选使用在 37℃下粘度为 4-10cps、更优选为 4-6cps

的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。

此外，当高分子 Poloxamer407 的含量为 5-10wt%时，在 37℃下显示出与其相同粘度的低分子量 Poloxamer188 的含量为 7.5-15wt%。而当 Poloxamer407 为更优选的含量 5-7.5wt%时，在 37℃下显示出与其相同粘度的 Poloxamer188 的含量为 7.5-12.5wt%。因此可以确定，为了得到优选的粘度，最好使用 7.5-15wt%用量的、更优选为 7.5-12.5wt%的低分子量 Poloxamer188。

从上述实验得到的结果可以看出，在可以用作局部用制剂基质以控制活性成分的释放速率和物理性保护伤口部位的各种聚合物中，按照本发明，可以使用在 37℃、60rpm 下粘度为 4-10cps、特别是 4-6cps 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物来提供显示出良好伤口愈合作用的局部用制剂。