

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/12

A61K 9/127 A61K 9/14

A61K 9/72 A61K 31/195



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812566.5

[43] 公开日 2004 年 8 月 4 日

[11] 公开号 CN 1518441A

[22] 申请日 2002. 6. 24 [21] 申请号 02812566. 5

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 22 [33] US [31] 09/888,126

[86] 国际申请 PCT/US2002/020280 2002. 6. 24

[87] 国际公布 WO2003/000202 英 2003. 1. 3

[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 22

[71] 申请人 先进吸入药剂研究公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 詹妮弗·L·施米特克 陈东浩

理查德·P·巴泰基

戴维·A·爱德华兹

杰弗里·S·赫凯奇

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 10 页 说明书 62 页 附图 4 页

[54] 发明名称 具有快速释放性质的吸入式微粒

[57] 摘要

本发明一般地涉及包含微粒的制剂及其肺部给药，其中，所述微粒中含有磷脂、生物活性剂以及赋形剂。本发明公开了吸入型干粉胰岛素制剂。还公开了改进的制剂，其中包含 DPPC、胰岛素和柠檬酸钠，所述制剂对糖尿病的治疗很有用。本发明还涉及生物活性剂的肺部给药方法，包括向需要治疗或诊断的病人的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中包含生物活性剂或其任意组合，其中，药剂能够从所给予的微粒中迅速释放。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
2. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
3. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
4. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
5. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
6. 一种包含微粒的制剂，所述微粒中含有按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。
7. 如权利要求 6 所述的制剂，其中所述微粒中含有质量在约 1.5 mg 到约 20 mg 之间的胰岛素。
8. 如权利要求 6 所述的制剂，其中所述微粒中含有质量约为每容器 1.5 mg 的胰岛素。
9. 如权利要求 6 所述的制剂，其中所述微粒中含有质量约为每容器 5 mg 的胰岛素。

10. 如权利要求 6 所述的制剂, 其中所述微粒中含有剂量在约 42 IU 到约 540 IU 之间的胰岛素。
11. 如权利要求 10 所述的制剂, 其中所述微粒中含有剂量为约 42 IU 的胰岛素。
12. 如权利要求 10 所述的制剂, 其中所述微粒中含有剂量在约 84 IU 到约 294 IU 之间的胰岛素。
13. 如权利要求 6 所述的制剂, 其中所述微粒的振实密度小于约 0.4 g/cm^3 。
14. 如权利要求 13 所述的制剂, 其中所述微粒的振实密度小于约 0.1 g/cm^3 。
15. 如权利要求 6 所述的制剂, 其中所述微粒的中值几何直径在约 5 微米到约 30 微米之间。
16. 如权利要求 15 所述的制剂, 其中所述微粒的中值几何直径在约 7 微米到约 8 微米之间。
17. 如权利要求 6 所述的制剂, 其中所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 5 微米之间。
18. 如权利要求 17 所述的制剂, 其中所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 3 微米之间。
19. 如权利要求 17 所述的制剂, 其中所述微粒的空气动力学直径在约 3 微米到约 5 微米之间。

20. 如权利要求 6 所述的制剂，其中所述微粒中还包含氨基酸。
21. 如权利要求 20 所述的制剂，其中所述的氨基酸为亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸或其任意组合。
22. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。
23. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。
24. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。
25. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。
26. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。

27. 一种治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放很迅速。
28. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述需要治疗的患者患有糖尿病。
29. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述微粒中含有质量在约 1.5 mg 到约 20 mg 之间的胰岛素。
30. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述微粒中含有质量约为每容器 1.5 mg 的胰岛素。
31. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述微粒中含有质量约为每容器 5 mg 的胰岛素。
32. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述微粒中含有剂量在约 42 IU 到约 540 IU 之间的胰岛素。
33. 如权利要求 32 所述的方法，其中，所述微粒中含有剂量为约 42 IU 的胰岛素。
34. 如权利要求 32 所述的方法，其中，所述微粒中含有剂量在约 84 IU 到约 294 IU 之间的胰岛素。
35. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述微粒的振实密度小于约 0.4 g/cm^3 。
36. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述微粒的振实密度小于约 0.1 g/cm^3 。

37. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述微粒的中值几何直径在约 5 微米到约 30 微米之间。
38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述微粒的中值几何直径在约 7 微米到约 8 微米之间。
39. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 5 微米之间。
40. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 3 微米之间。
41. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 3 微米到约 5 微米之间。
42. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述通过肺部给药给予微粒包括将所述微粒运送至肺部深处。
43. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述通过肺部给药给予微粒包括将所述微粒运送至气道中部。
44. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述通过肺部给药给予微粒包括将所述微粒运送至气道上部。
45. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述微粒中还包含氨基酸。
46. 如权利要求 45 所述的方法, 其中, 所述的氨基酸为亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸或其任意组合。

47. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

48. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

49. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

50. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

51. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

52. 一种将有效量的胰岛素运送至肺系统的方法，包括：

a) 提供大量微粒，所述微粒中含有按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及

b) 通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予所述微粒，所述微粒来自于装有所述大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放很迅速。

53. 如权利要求 52 所述的方法，其中，所述微粒中含有质量在约 1.5 mg 到约 20 mg 之间的胰岛素。

54. 如权利要求 52 所述的方法，其中，所述微粒中含有质量约为每容器 1.5 mg 的胰岛素。

55. 如权利要求 52 所述的方法，其中，述微粒中含有质量约为每容器 5 mg 的胰岛素。

56. 如权利要求 52 所述的方法，其中，所述微粒中含有剂量在约 42 IU 到约 540 IU 之间的胰岛素。

57. 如权利要求 56 所述的方法，其中，所述微粒中含有剂量为约 42 IU 的胰岛素。

-
58. 如权利要求 56 所述的方法, 其中, 所述微粒中含有剂量在约 84 IU 到约 294 IU 之间的胰岛素。
59. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 所述微粒的振实密度小于约 0.4 g/cm^3 。
60. 如权利要求 59 所述的方法, 其中, 所述微粒的振实密度小于约 0.1 g/cm^3 。
61. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 所述微粒的中值几何直径在约 5 微米到约 30 微米之间。
62. 如权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述微粒的中值几何直径在约 7 微米到约 8 微米之间。
63. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 5 微米之间。
64. 如权利要求 63 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 1 微米到约 3 微米之间。
65. 如权利要求 63 所述的方法, 其中, 所述微粒的空气动力学直径在约 3 微米到约 5 微米之间。
66. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 运送至肺系统包括运送至肺部深处。
67. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 运送至肺系统包括运送至气道中部。
68. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 运送至肺系统包括运送至气道上部。

69. 如权利要求 52 所述的方法, 其中, 所述微粒中还包含氨基酸。
70. 如权利要求 69 所述的方法, 其中, 所述的氨基酸为亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸或其任意组合。
71. 如权利要求 6 所述的制剂, 其中, 所述微粒中还包含转变温度低的磷脂。
72. 如权利要求 27 所述的方法, 其中, 所述微粒中还包含转变温度低的磷脂。
73. 一种用于胰岛素给药的试剂盒, 包括两个或更多个容器, 其中, 所述容器中包含选自由如下微粒构成的组的单位剂量:
- a) 含有按重量计 60 % DPPC, 30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒;
 - b) 含有按重量计 40 % DPPC, 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒;
 - c) 含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC, 30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒;
 - d) 含有按重量计 75 % DPPC, 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒;
 - e) 含有按重量计 80 % DPPC, 10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒;
 - f) 含有按重量计 75 % DPPC, 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠的微粒。
74. 如权利要求 73 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒中还包括指导如何使用所述两个或更多个容器的说明书。

75. 如权利要求 73 所述的试剂盒, 其中, 所述一个或更多个容器中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计 40% 到 60% DPPC, 30% 到 50% 胰岛素以及 10% 柠檬酸钠; 以及所述一个或更多个容器中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计 75% 到 80% DPPC, 10% 到 15% 胰岛素以及 10% 柠檬酸钠。
76. 如权利要求 73 所述的试剂盒, 其中, 所述一个或更多个容器中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计 60% DPPC, 30% 胰岛素以及 10% 柠檬酸钠; 以及所述一个或更多个容器中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计 80% DPPC, 10% 胰岛素以及 10% 柠檬酸钠。
77. 一种包含微粒的制剂, 所述微粒中含有按重量计 60% DPPC, 30% 胰岛素以及 10% 柠檬酸钠, 其中, 制备所述制剂的方法包括:
- a) 制备 DPPC 溶液;
 - b) 制备胰岛素和柠檬酸钠溶液;
 - c) 将步骤 a) 和步骤 b) 的溶液加热至 50°C;
 - d) 将步骤 c) 中加热后的溶液进行组合, 从而使得总溶质浓度大于 3 克/升; 以及
 - e) 对步骤 d) 中形成的溶液进行喷雾干燥, 以制备微粒。
78. 如权利要求 77 所述的方法, 其中, 步骤 d) 中所述的溶质浓度为 15 克/升。
79. 一种试剂盒, 包括至少两个容器, 每个容器中都含有不同量的适于吸入的干粉胰岛素。

具有快速释放性质的吸入式微粒

技术领域

本发明涉及具有快速释放性质的吸入式微粒。

背景技术

生物活性剂例如治疗剂、诊断剂和预防剂的肺部给药，提供了一种口腔给药、透皮给药及非肠道给药等方式以外的很有吸引力的给药方式。也就是说，肺部给药通常可以在不需要医学介入（自身给药）的情况下完成，可以避免常常与注射疗法相伴而来的痛苦，而且，生物活性剂的酶促降解和 pH 介导的降解（在口腔疗法中经常碰到）的量可以被显著减少。此外，肺部为药物的吸收提供了巨大的粘膜表面，而且被吸收的药物不存在肝脏的首过效应。而且，已经有证据表明，可以通过肺部给药或吸入而获得多种分子（例如大分子）的较高的生物利用度。一般来说，肺部深处或肺泡是吸入的生物活性剂的首要靶点，特别是对于那些需要系统给药的药剂而言更是如此。

在大部分的疗法中，生物活性剂在进入局部和/或系统循环后的释放动力学或释放图谱是一个很关键的考虑因素，包括那些采用肺部给药的疗法。也就是说，很多疾病或状况需要给予控释或缓释水平的生物活性剂，以提供有效的治疗。一般来说，这可以通过多剂量疗法或者通过使用一种可缓释所述药物的系统而实现。

但是，对肺系统给予生物活性剂时，所述药剂可能会在给药后迅速释放。例如，Patton 等人的美国专利 5,997,848 描述了通过肺部给予干粉形式的制剂以后，胰岛素的吸收情况。在灵长类动物身上，胰岛素水平在约 30 分钟内达到峰值，而人类则在约 20 分钟内达到峰值。此外，Heinemann、Traut 和 Heise 在 *Diabetic Medicine* (14: 63-72 (1977)) 中指出：在健康的志愿者身上通过输入葡萄糖而进行的评估表明，吸入后所产生的作用在约 30 分钟内达到最大值的一半。

糖尿病是严重影响人类健康的最常见的代谢类疾病。它可以被定义为慢性高血糖症的状态，也就是血糖过高，其原因是胰岛素作用的相对或绝对缺乏。胰岛素是由胰腺朗罕氏胰岛内的 B 细胞生产和分泌的一种多肽类激素。胰岛素可以促进葡萄糖的利用、蛋白质的合成以及中性脂的形成和储存。葡萄糖进入肌肉时一般需要胰岛素。葡萄糖，或称“血糖”，是为人类和其他许多物种提供能量的糖类的主要来源。多余的葡萄糖以糖元的形式储存在人体中，必要时，糖元将被代谢为葡萄糖以满足人体的需要。

与糖尿病相关的高血糖症所产生的原因是：由于胰岛素水平相对较低或者根本没有，因此导致葡萄糖利用不足以及由蛋白质所生产的葡萄糖过多。糖尿病患者通常需要每天注射胰岛素，而且常常是多次注射，这会给患者带来痛苦。这种痛苦导致许多 II 型糖尿病患者拒绝注射胰岛素，即使是在需要注射的时候。

因此，需要适合于有效吸入的制剂，其中包括生物活性剂例如胰岛素，其中，该制剂中生物活性剂的释放效果至少要相当于现有的治疗药或预防药，特别是对于糖尿病的治疗。

也需要适合于运送至肺部以及快速释放至系统和/或局部循环的制剂。希望此类制剂能够促进患者更好地配合治疗，并且可以改善对疾病的治疗和控制。

发明概述

本发明公开了一种制剂，其中包含含有如下成分的微粒：按重量计，约 40 % 到约 60 % DPPC，约 30 % 到约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。

本发明公开了一种制剂，其中包含含有如下成分的微粒：按重量计，约 75 % 到约 80 % DPPC，约 10 % 到约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。

本发明也公开了用于治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括：通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计，约 40 % 到约 60 % DPPC，约 30 % 到约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。该方法对于治疗糖尿病特别有用。如果需要的话，可以通过一个单独的、呼吸致动的步骤给予所述微粒。

本发明也公开了用于治疗需要胰岛素的人类患者的方法，包括：通过肺部给药，向需要治疗的患者的呼吸道内给予有效量的微粒，所述微粒中含有如下成分：按重量计，约 75 % 到约 80 % DPPC，约 10 % 到约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠，其中，胰岛素的释放较为迅速。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。该方法对于治疗糖尿病特别有用。如果需要的话，可以通过一个单独的、呼吸致动的步骤给予所述微粒。

此外，本发明公开了向肺系统中给予有效量胰岛素的方法，包括提供大量含有如下成分的微粒：按重量计，约 40 % 到约 60 % DPPC，约 30 % 到约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予微粒，所述微粒来自于装有大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放较为迅速。对于快速释放特别有用的是包含转变温度较低的磷脂的制剂。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。

本发明也公开了向肺系统中给予有效量胰岛素的方法，包括提供大量含有如下成分的微粒：按重量计，约 75 % 到约 80 % DPPC，约 10 % 到约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；通过同时分散并吸入微粒，而向人类受试者的呼吸道内给予微粒，所述微粒来自于装有大量微粒的容器，其中，胰岛素的释放较为迅速。

对于快速释放特别有用的是包含转变温度较低的磷脂的制剂。在一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在又一个实施例中，所述微粒中含有按重量计 80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。

本发明也公开了一种试剂盒，包括两个或更多个容器，其中包含选自此处所描述的胰岛素制剂的单位剂量。例如，所述制剂可以是含有如下成分的微粒：按重量计，约 60 % DPPC，约 30 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 40 % DPPC，约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 40 % 到约 60 % DPPC，约 30 % 到约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 80 % DPPC，约 10 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 75 % 到约 80 % DPPC，约 10 % 到约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠。在一个实施例中，所述容器中可以包含含有如下成分的微粒：按重量计，60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在同一试剂盒中含有不同制剂的容器的组合，也是本发明的一个特征。例如，所述试剂盒中可以包括两个或更多个容器，其中包含单位剂量的微粒，所述微粒中含有 40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；以及一个或更多个容器，其中包含单位剂量的微粒，所述微粒中含有按重量计，75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中，所述试剂盒中包括一个或更多个容器，其中包含单位剂量的微粒，所述微粒中含

有 60 % DPPC, 30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠; 以及一个或更多个容器, 其中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计, 80 % DPPC, 10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。在另一个实施例中, 所述试剂盒中包括一个或更多个容器, 其中包含微粒制剂, 所述微粒中含有 60 % DPPC, 30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠; 以及一个或更多个容器, 其中包含单位剂量的微粒, 所述微粒中含有按重量计 75 % DPPC, 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。

本发明也公开了一种试剂盒, 包括至少两个容器, 每个容器中都含有不同量的适于吸入的干粉胰岛素。

另一方面, 本发明公开了一种制剂, 其中包含含有如下成分的微粒: 按重量计 60 % DPPC, 30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠, 其中, 制备所述制剂的方法包括: 制备 DPPC 溶液; 制备胰岛素和柠檬酸钠溶液; 将每种溶液加热至 50℃; 将两种溶液组合在一起, 从而使得总溶质浓度大于 3 克/升 (例如 5、10 或 15 克/升); 以及对组合后的溶液进行喷雾干燥, 以制备微粒。在一个实施例中, 组合后的溶液的溶质浓度为 15 克/升。

再一方面, 本发明公开了一种制剂, 其中包含含有如下成分的微粒: 按重量计 75 % DPPC, 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠, 其中, 制备所述制剂的方法包括: 制备 DPPC 溶液; 制备胰岛素和柠檬酸钠溶液; 将每种溶液加热至 50℃; 将两种溶液组合在一起, 从而使得总溶质浓度大于 3 克/升 (例如 5、10 或 15 克/升); 以及对组合后的溶液进行喷雾干燥, 以制备微粒。在一个实施例中, 组合后的溶液的溶质浓度为 15 克/升。

再一方面, 本发明公开了一种制剂, 其中包含含有如下成分的微粒: 按重量计 40 % DPPC, 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠, 其中, 制备所述制剂的方法包括: 制备 DPPC 溶液; 制备胰岛素

和柠檬酸钠溶液；将每种溶液加热至 50℃；将两种溶液组合在一起，从而使得总溶质浓度大于 3 克/升（例如 5、10 或 15 克/升）；以及对组合后的溶液进行喷雾干燥，以制备微粒。在一个实施例中，组合后的溶液的溶质浓度为 15 克/升。

在另一个实施例中，上述微粒中含有质量为约 1.5 mg 到约 20 mg 的胰岛素（例如，1.0、1.5、2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20 或 25 mg）。在另一个实施例中，任何一种上述微粒中的胰岛素剂量在约 42 IU 到约 540 IU 之间。对于治疗人类而言，另一个有效剂量在约 155 IU 到约 170 IU 之间。在另一个实施例中，上述微粒的振实密度小于约 0.4 g/cm³，和/或中值几何直径为约 5 微米到约 30 微米之间，和/或空气动力学直径在约 1 微米到约 5 微米之间。

本发明具有很多优点。例如，适于吸入的微粒可以被设计为具有可控的释放图谱，具体地说，是较快的释放图谱。这一较快的释放图谱使得所给予的生物活性剂，具体地说是胰岛素，在肺部的滞留期缩短，并减少了治疗水平的生物活性剂存在于局部环境和系统循环中的时间。药剂的迅速释放，为目前正广泛应用的注射疗法提供了一种理想的替代方案，而对于需要迅速释放所述药剂的治疗剂、诊断剂和预防剂而言，例如在糖尿病的治疗中所使用的胰岛素，它们使用的正是注射疗法。此外，本发明还提供了向肺系统给药的方法，其中，吸入疗法中常见的药剂的较高初始释放被增强，具有很高的初始释放。因此，可以改善病人的配合情况以及舒适程度，这不仅仅是由于减少了给药频率，而且还因为提供了一种对病人而言更易接受的疗法。

这一干粉给药系统可以通过一个很小很方便而且不贵的给药设备有效地进行给药。此外，简单方便的吸入器以及室温下稳定的粉末，可以为目前的注射疗法提供很有吸引力的替代方案。

该系统有可能通过增强病人接受胰岛素治疗的意愿，而有助于改善糖尿病病人的血糖控制。

附图说明

图 1 是服用吸入型胰岛素的受试者的葡萄糖输入速度 (GIR) - 时间图。在这幅图中，服用 84 IU 吸入型胰岛素的受试者的药代动力学曲线以空心的正方形表示；服用 168 IU 吸入型胰岛素的受试者的药代动力学曲线以实心的正方形表示；服用 294 IU 吸入型胰岛素的受试者的药代动力学曲线以空心的圆圈表示。

图 2 是服用了吸入型胰岛素 (168 IU)、皮下注射赖脯胰岛素 (IL; 15 IU) 或皮下注射常规可溶性胰岛素 (RI; 15 IU) 的受试者的葡萄糖输入速度 (GIR) - 时间图。在这幅图中，服用 15 IU 赖脯胰岛素的受试者的药代动力学曲线以空心的三角形表示；服用 15 IU 常规可溶性胰岛素的受试者的药代动力学曲线以实心的三角形表示；服用 168 IU 吸入型胰岛素的受试者的药代动力学曲线以实心的正方形表示。

图 3 是一幅柱状图，示出了吸入型胰岛素 (AI; 84 IU、168 IU 或 294 IU)、赖脯胰岛素 (IL; 15 IU) 或常规可溶性胰岛素 (RI; 15 IU) 的起效，以至早期 50% GIR_{max} 的时间 (单位分钟) 的形式进行测定。

图 4 是一幅柱状图，示出了吸入型胰岛素 (84 IU)、赖脯胰岛素 (IL; 15 IU) 或常规可溶性胰岛素 (RI; 15 IU) 的 $GIR-AUC_{0-3 \text{ 小时}}$ 。

图 5 是一幅柱状图，示出了在给药后的最初三小时或十小时内，吸入型胰岛素 (84 IU) 的生物效能，表示为赖脯胰岛素 (IL; 15 IU) 或常规可溶性胰岛素 (RI; 15 IU) 的生物效能的百分比。

图 6 是一幅柱状图，示出了吸入型胰岛素（AI; 84 IU、168 IU 或 294 IU）、赖脯胰岛素（IL; 15 IU）或常规可溶性胰岛素（RI; 15 IU）的 GIR-AUC，是作为时间的函数进行的评估，其中的每一个数据点代表一种剂量。

图 7 示出了吸入型胰岛素（AI; 84 IU、168 IU 或 294 IU）的剂量范围内的剂量反应。

在参考本发明描述得更为具体的优选实施例以及附图之后，本发明的上述目的和其他目的、特征以及优点将会变得更为明显。

具体实施方式

本发明涉及能够快速释放生物活性剂（具体地说是胰岛素）的微粒。本发明也公开了利用这些微粒治疗疾病以及通过肺系统给药的方法。因此，这些微粒具有快速释放的性质。此处所使用的术语“快速释放”，是指通常在给药后的最初两个小时内观察到的增强了的药代动力学反应，更好的是在最初的一小时内。快速释放也指活性剂的释放，具体地说是吸入的胰岛素，其中，有效水平的制剂的释放时间至少要与现有的皮下注射活性剂（具体地说，是胰岛素 lispro 和常规可溶性胰岛素）的释放时间相同，最好是更短。

在一个实施例中，快速释放微粒是利用胰岛素、柠檬酸钠和磷脂制成的。目前认为，选择适当的磷脂会影响释放图谱，下面将对此进行更为详尽的解释。在一个优选实施例中，快速释放的特征是，释放时间变短并且释放出来的制剂水平更高。

本发明的微粒具有独特的药物释放性质。下面将会提到，释放速率是可以控制的，Sujit Basu 等人 2000 年 8 月 23 日提交的标题为“Modulation of Release From Dry Powder Formulations”的美国专利申请 09/644,736 中，对此进行了进一步的描述。

可以根据制剂中生物活性剂释放的半数时间（half-time）对药物的释放速率进行描述。此处所使用的术语“半数时间”是指微粒中所含有的药物初始有效载荷释放 50% 所需要的时间。迅速或快速的药物释放速率通常小于 30 分钟，其范围在约 1 分钟到约 60 分钟之间。

也可以通过释放常数来描述药物释放速率。可以通过下列方程之一来表示一级释放常数：

$$M_{pw(t)} = M_{(\infty)} * e^{-k*t} \quad (1)$$

或者

$$M_{(t)} = M_{(\infty)} * (1 - e^{-k*t}) \quad (2)$$

其中， k 是一级释放常数。 $M_{(\infty)}$ 是药物释放系统，例如干粉，中药物的总质量； $M_{pw(t)}$ 是时刻 t 时保留在干粉中的药物质量。 $M_{(t)}$ 是时刻 t 时从干粉中释放出来的药物质量。上述关系可以表示如下：

$$M_{(\infty)} = M_{pw(t)} + M_{(t)} \quad (3)$$

方程式(1)、(2)、(3)可以通过药物释放量（也就是质量）来表示，或者通过指定体积的释放介质中释放出来的药物浓度来表示。

例如，方程式（2）可以表示为：

$$C_{(t)} = C_{(\infty)} * (1 - e^{-k*t}) \quad (4)$$

其中， k 是一级释放常数。 $C_{(\infty)}$ 是释放介质中药物的理论最大浓度， $C_{(t)}$ 是时刻 t 时从干粉释放到释放介质中的药物浓度。

通过一个有名的方程式，给出了一级释放动力学的“半数时间”或 $t_{50\%}$ ，

$$t_{50\%} = 0.693 / k \quad (5)$$

利用一级释放常数和 $t_{50\%}$ 表示的药物释放速率，可以通过下述方程式进行计算：

$$k = - \ln (M_{pw(t)} / M_{(\infty)}) / t \quad (6)$$

或者，

$$k = - \ln [(M_{(\infty)} - M_{(t)}) / M_{(\infty)}] / t \quad (7)$$

可以通过调节微粒的热学性质或物理状态转变，而控制或优化药物从微粒中释放出来的速度。本发明微粒的一个特征是其基质转变温度。正如此处所使用的，术语“基质转变温度”（matrix transition temperature）是指微粒由分子运动性较低的玻璃态或固态，向更加无定形的、橡胶状的或熔融的状态或类似流体的相转变的温度。正如此处所使用的，“基质转变温度”是指微粒的结构完整性减小，从而使得药物可以从微粒中更快地释放出来时的温度。在基质转变温度以上，微粒结构发生改变，使得药物分子的运动性增加，从而可以更快地释放。与此相反，在基质转变温

度以下，药物微粒的运动性受到限制，从而使得释放速度变慢。“基质转变温度”可能涉及不同相变温度，例如，熔融温度 (T_m)、结晶温度 (T_c) 和玻璃转变温度 (T_g)，它们代表固体内有序性和/或分子运动性的改变。正如此处所使用的，术语“基质转变温度”是指微粒基质的复合 (composite) 或主要转变温度，药物在该温度以上时的释放速率要大于在该温度以下时的释放速率。

从实验角度讲，可以通过现有技术中的方法确定基质转变温度，具体地说，可以通过差式扫描量热法 (DSC)。可以用来描述微粒或干粉的基质转变行为的其他技术包括：同步加速器 X-射线衍射和冰冻蚀刻电子显微术。

可以利用基质转变温度来制造具有预期药物释放动力学的微粒以及优化微粒配方，使其具有预期的药物释放速率。可以制备具有指定的基质转变温度的微粒，可以通过体外或体内释放试验、药代动力学研究及现有技术中公知的其他技术，来测试微粒的药物释放性质。基质转变温度和药物释放速率之间的关系一旦被建立起来，就可以通过形成并给予具有相应基质转变温度的微粒，而获得预期释放速率或目标释放速率。可以通过调节所给予微粒的基质转变温度而改变或优化药物释放速率。

本发明的微粒中包括一种或多种材料，这些材料单独使用或组合在一起，有助于或能够使微粒具有可产生预期或目标药物释放速率的基质转变温度。下面将进一步描述合适的材料或材料组合的性质和实例。例如，为了使药物具有较快的释放速率，当被组合使用时，能够产生较低的基质转变温度的材料是优选的。此处所使用的术语“较低的转变温度”是指微粒的基质转变温度低于或约等于受试者的生理体温。具有较低的转变温度的微粒，其结构完整性往往较为有限，而且通常更加无定形、橡胶状、处于熔融状态或类似流体。

不希望被限制于对作用机制的任何一种具体解释，通常认为，对于基质转变温度较低的微粒而言，当暴露于体温（通常在37℃左右）和较高的湿度（肺部的湿度接近100%）下时，微粒基质的完整性经历了转变；而且，这些微粒的组成成分往往具有较高的分子运动性，从而使得药物可以迅速释放，使之可以被人体吸收。

可以通过设计和制造包含由相变温度较高的材料组成的混合物的微粒，而调整或调节所得到的微粒的基质转变温度以及给定药物的相应释放图谱。

将合适量的材料组合在一起以生产具有预期转变温度的微粒，可以通过实验手段加以确定（determined），例如，通过制备具有不同比例理想材料的微粒，测定混合物的基质转变温度（例如通过DSC），选择具有预期基质转变温度的组合物，以及进一步优化所用材料的比例（该步骤是可选的）。

可以考虑材料相互之间的混溶性（miscibility）。在其他条件相同的情况下，相互之间能够混溶的材料往往会得到中间的总体基质转变温度（overall matrix transition temperature）。另一方面，相互之间能够混溶的材料所得到的总体基质转变温度，一般来讲，或者是主要决定于其中一种成分，或者会产生两相释放性质（biphasic release property）。

在一个优选实施例中，微粒中包含一种或多种磷脂。对所述磷脂或磷脂组合物进行选择，以使微粒具有具体的药物释放性质。适于给人类受试者进行肺部给药的磷脂是优选的。在一个实施例中，磷脂对于肺部是内源性的。在另一个实施例中，磷脂对于肺部不是内源性的。

微粒中磷脂的含量按重量计可以在约 1 % 到约 99 % 之间。微粒中磷脂的含量优选为按重量计约 10 % 到约 80 %。在另一个实例中，微粒中磷脂的含量约为 40 % 到 80 %，例如 35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 % 或 85 %。在另一个实例中，所述磷脂为 DPPC。

磷脂的实例包括但不限于：磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇或其组合。也可以使用经修饰的磷脂，例如其头部基团被修饰的磷脂，例如被烷基化或经聚乙二醇（PEG）修饰的磷脂。

在一个优选实施例中，微粒的基质转变温度与相变温度有关，由在制备微粒时所用的磷脂或磷脂组合的熔融温度（ T_m ）、结晶温度（ T_c ）和玻璃转变温度（ T_g ）所确定。 T_m 、 T_c 和 T_g 是现有技术中公知的术语。例如，Phospholipid Handbook (Gregor Cevc, editor, 1993, Marcel-Dekker, Inc.) 中就讨论了这些术语。

可以从文献中得到磷脂或磷脂组合的相变温度。列出了磷脂的相变温度的文献包括：例如，Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) Catalog 或者 Phospholipid Handbook (Gregor Cevc, editor, 1993, Marcel-Dekker, Inc.)。在不同的文献中所列出的转变温度的值可能会有小的变化，这可能是由实验条件的差异造成的，例如水分含量。

从实验上讲，可以通过现有技术中公知的方法确定相变温度，具体地说，可以通过差式扫描量热法。其他可以用于表征磷脂或磷脂组合相行为的技术包括：同步加速器 X-射线衍射和冰冻蚀刻电子显微术。

将合适量的两种或更多种磷脂组合在一起以生产具有预期相变温度的微粒，已经在文献中有所记载，例如，在 *Phospholipid Handbook* (Gregor Cevc, editor, 1993, Marcel-Dekker, Inc.) 中。磷脂相互之间的混溶性可以在 *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL) Catalog 中找到。

用于生产具有预期或目标基质转变温度的微粒的磷脂的量，可以通过实验手段加以确定，例如，通过制备由不同比例的感兴趣的磷脂所组成的混合物，测定每种混合物的转变温度，并选择具有预期转变温度的混合物。磷脂的混溶性对磷脂混合物基质转变温度的效果，可以通过如下手段加以测定：将第一种磷脂与其他的磷脂进行组合，所述的其他磷脂与第一种磷脂的混溶性不相同，并测定组合物的转变温度。

也可以使用由一种或多种磷脂与其他材料所形成的组合物，以获得预期的基质转变温度。实例包括聚合物和其他生物材料，例如脂类、鞘脂类、胆固醇、表面活性剂、多聚氨基酸、多糖、蛋白质、盐等。可以通过上面描述的方法确定选定的量和混溶性参数，以获得预期或目标基质转变温度。

一般来说，在制备具有快速释放性质的微粒时，磷脂、磷脂的组合以及磷脂与其他材料的组合是优选的，它们可以产生不高于患者生理体温的基质转变温度。此处，此类磷脂或磷脂组合被认为具有较低的转变温度。表 1 中列出了转变温度较低的磷脂的几个合适的实例。所示出的转变温度是通过 *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL) Catalog 获得的。

选自肺部内源性磷脂的具有头部基团的磷脂是优选的，例如：磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇或其组合。

上述材料可以单独使用或组合在一起使用。也可以使用其他相变温度不高于患者体温的磷脂，或者单独使用，或者与其他磷脂或材料组合在一起使用。

表 1

	磷 脂	转变温度/℃
1	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DLPC)	-1
2	1,2-二(十三烷)酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	14
3	1,2-二豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)	23
4	1,2-二(十五烷)酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	33
5	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)	41
6	1-豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	35
7	1-豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	40
8	1-棕榈酰-2-豆蔻酰 -sn-甘油-3-磷酸胆碱	27
9	1-硬脂酰-2-豆蔻酰 -sn-甘油-3-磷酸胆碱	30
10	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸 (DLPA)	31
11	1,2-二豆蔻酰-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸]	35
12	1,2-二豆蔻酰-sn-甘油-3-[磷酸-rac-(1-甘油)] (DMPG)	23
13	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[磷酸-rac-(1-甘油)] (DPPG)	41
14	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DLPE)	29

本发明的微粒，具体地说是快速释放的微粒，是通过肺部给药的。此处所使用的术语“肺部给药”是指运送到呼吸道。此处所定义的术语“呼吸道”（respiratory tract）涵盖气道上部，包括口咽部和喉部；以及气道下部，包括气管以及后面分叉形成的支气管和细支气管（例如终末细支气管和呼吸细支气管）。气道上部和下部合称为气道（conducting airway）。然后终末细支气管分化为呼吸细支气管，后者通向最终的呼吸区域，也就是肺泡或肺部深处。肺部深处或肺泡通常是用于系统给药的吸入型治疗剂的预期靶标。

此处所使用的术语“肺部 pH 范围”是指可以在患者的肺部出现的 pH 范围。在人体中，该 pH 范围通常在约 6.4 到约 7.0 之间，例如从 6.4 到约 6.7。R.A. Parent 在“Comparative Biology of the Normal Lung”，CRC Press, (1991)中报道了气道壁液体（ALF）的 pH 值，在 6.44 到 6.74 之间。

治疗剂、预防剂或诊断剂，此处也可以被称为“生物活性剂”、“药剂”或“药物”。微粒中治疗剂、预防剂或诊断剂的量，按重量计可以在约 0.1 % 到约 95 % 之间。在一个实施例中，微粒中治疗剂、预防剂或诊断剂的量按重量计为 100 %。在其他的实施例中，微粒中生物活性剂的量约为 10 % 到 50 %，例如 5 %，10 %，15 %，20 %，25 %，30 %，35 %，40 %，45 %，50 % 或 55 %。

也可以使用生物活性剂的组合。药物分散于其中的微粒是优选的。合适的生物活性剂包括那些可以局部给药、系统给药或两者皆可的药剂。此处所使用的术语“生物活性剂”是一种药剂或其药学上可接收的盐，当其在体内释放时，具有预期的生物学活性，例如在体内的治疗、诊断和/或预防的性质。

生物活性剂的实例包括但不限于：具有治疗、诊断或预防活性的合成的无机和有机化合物、蛋白质和肽、多糖和其他糖类、脂类以及 DNA 和 RNA 核酸序列。可以使用较宽分子量范围内的药剂，例如在 100 到 500,000 克/摩尔之间或更大。

药剂可以具有多种生物学活性，例如血管活性剂，神经活性剂，激素，抗凝血剂，免疫调节剂，细胞毒剂，预防剂，抗生素，抗病毒剂，反意（antisense），抗原，抗肿瘤剂以及抗体。

蛋白质包括完整蛋白、突变型蛋白及其活性片段，例如胰岛素、免疫球蛋白、抗体、细胞因子（例如淋巴因子、单核因子、趋化因子）、白介素、干扰素（ β -IFN, α -IFN 以及 γ -IFN）、促红细胞生成素、核酸酶、肿瘤坏死因子、集落刺激因子、酶（例如超氧化物歧化酶、组织纤维蛋白原激活因子）、肿瘤抑制因子、血液蛋白、激素及激素类似物（例如生长激素、促肾上腺皮质激素以及促黄体生成素释放激素（LHRH））、疫苗（例如肿瘤、细菌和病毒抗原）、抗原、凝血因子；生长因子；粒细胞集落刺激因子（“G-CSF”）；肽包括蛋白抑制剂、蛋白拮抗剂、蛋白兴奋剂（protein agonist）、降血钙素；核酸包括：例如反意分子、寡核苷酸及核酶。也可以给予多糖，例如肝素。一种特别有用的生物活性剂是胰岛素，包括但不限于：Humulin®, Lente® (Humulin® L; 人胰岛素锌悬浮液)，Humulin® R (常规可溶性胰岛素(RI))，Humulin® Ultralente® (Humulin® U)以及 Humalog® 100 (赖脯胰岛素(insulin lispro) (IL))，Eli Lilly 公司（Indianapolis, IN; 100 U/ml）出品。

用于肺内局部给药的生物活性剂包括那些用于治疗哮喘、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、肺气肿或囊肿性纤维化的药剂。例如，可以给予用于治疗例如囊肿性纤维化等疾病的基因，也可以给予用于哮喘的 beta 类固醇兴奋剂（beta agonists steroids）、抗胆碱能药以及白细胞三烯调节剂（leukotriene modifiers）。

其他的具体生物活性剂包括：硫酸雌素酮、硫酸沙丁胺醇、副甲状腺激素相关肽、生长激素抑制素、尼古丁、可乐宁、水杨酸盐/酯、色甘酸钠、沙美特罗（Salmeterol）、福莫特诺（formeterol）、L-多巴、甲基多巴肼或其组合、gabapentin、氯氮（clorazepate）、氯甲酰氮草（carbamazepine）以及安定。

核酸序列包括基因、反义分子以及核酶，所述反义分子可以，例如，与互补DNA结合从而抑制转录。

微粒中可以包括多种诊断剂中的任何一种，以便在对患者给药后，对药剂进行局部或全身运送。例如，可以使用显影剂，包括可以购得的用于正电子发射层析X射线摄影法（PET）、计算机辅助层析X射线摄影法（CAT）、单光子发射计算机化层析X射线摄影法、X射线、荧光透视法以及磁共振成像（MRI）的制剂。

在MRI中用作造影剂（contrast agent）的合适材料的实例包括：目前可以获得的螯合钆，例如二乙烯三胺五乙酸（DTPA）和gadopentotate dimeglumine，以及铁、镁、锰、铜和铬。

适用于CAT和X射线的材料的实例包括：用于静脉给药的基于碘的材料，例如以泛影葡胺和脑影酸盐为代表的离子化单体，以及离子化二体，例如ioxagalte。

可以通过现有的标准技术以及可以购得的设备对诊断剂进行检测。

微粒中还可以包含羧酸，该羧酸与药剂和脂（具体地说是磷脂）不同。在一个实施例中，该羧酸包括至少两个羧基。羧酸包括该羧酸的盐以及两种或更多种羧酸和/或其盐的组合。在一个优选实施例中，该羧酸是亲水性羧酸或其盐。合适的羧酸包括但不

限于：羟基二羧酸，羟基三羧酸等。优选为柠檬酸及柠檬酸盐，例如柠檬酸钠。也可以使用羧酸和/或其盐的组合物或混合物。

微粒中羧酸的含量按重量计可以在约 0 % 到约 80 % 之间。微粒中羧酸的含量优选为约 10 % 到约 20 %，例如 5 %，10 %，15 %，20 % 或 25 %。

适用于本发明的微粒还可以包含氨基酸。在一个优选实施例中，所述氨基酸是疏水的。合适的天然疏水氨基酸包括但不限于：亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸和色氨酸。也可以使用疏水氨基酸的组合物。非天然氨基酸包括 beta-氨基酸。也可以使用 D 型、L 型构象的疏水氨基酸及其外消旋混合物。合适的疏水氨基酸包括氨基酸衍生物或类似物。此处所使用的氨基酸类似物包括具有如下结构式的 D 型或 L 型构象的氨基酸： -NH-CHR-CO- ，其中 R 是脂肪基、取代的脂肪基、苯基、取代的苯基、芳香基或取代的芳香基，其中 R 不对应于天然氨基酸的侧链。此处所使用的脂肪基包括直链、支链或环状的 C1-C8 的烃基，包括完全饱和的，含有一个或两个杂原子例如氮、氧或硫的，以及/或者含有一个或多个不饱和单元的。芳香基或芳基包括碳环芳香基，例如苯基和萘基，以及杂环芳香基，例如咪唑基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡唑基、吡喃基、哌啶基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、喹啉基、异喹啉基 (isoquinoliny1) 以及吡啶基 (acridintyl)。

可以购得多种合适的氨基酸、氨基酸类似物及其盐。其他的可以通过现有技术中公知的方法加以合成。例如，Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991 中，描述了一些合成技术。

疏水性通常是就氨基酸在非极性溶剂和水之间的分配而定义的。疏水性氨基酸是那些偏爱非极性溶剂的氨基酸。氨基酸的相对疏水性可以通过一个疏水性尺度加以表示,在此尺度下,甘氨酸的值为 0.5。在此尺度下,偏爱水的氨基酸的值在 0.5 以下,而偏爱非极性溶剂的氨基酸的值则在 0.5 以上。此处所使用的术语“疏水性氨基酸”是指在该疏水性尺度下的值大于或等于 0.5 的氨基酸,换句话说,是指分配于非极性酸中的倾向至少相当于甘氨酸的氨基酸。

可以使用的氨基酸的实例包括但不限于:甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸。优选的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸和色氨酸。也可以使用疏水性氨基酸的组合物。而且,也可以使用疏水性和亲水性(优先分配于水中)氨基酸的组合物,其中,组合物总体是呈疏水性的。也可以使用一种或多种氨基酸的组合物。

本发明的微粒中氨基酸的量按重量计可以在约 0% 到约 60% 之间。微粒中氨基酸的量优选为按重量计在约 5% 到约 30% 之间。本发明的微粒中疏水性氨基酸的盐的量按重量计可以在约 0% 到约 60% 之间。微粒中氨基酸盐的量优选为按重量计在约 5% 到约 30% 之间。在下述专利申请中描述了制备以及运送包含氨基酸的微粒的方法:1999 年 8 月 25 日提交的标题为“Use of Simple Amino Acids to Form Porous Particles”的美国专利申请 09/382,959,以及 2000 年 8 月 23 日提交的标题为“Use of Simple Amino Acids to Form Porous Particles”的美国专利申请 09/644,320,在此以引用的方式将这两项专利申请中的全部教导包括在本文中。

在又一个实施例中，微粒中也可以包括其他材料，例如缓冲盐、葡聚糖、多糖、乳糖、海藻糖、环式糊精、蛋白质、肽、多肽、脂肪酸、脂肪酸酯、无机化合物、磷酸盐/酯。

在本发明的一个实施例中，微粒中还可以包含聚合物。聚合物的使用可以进一步延长释放。优选为具有生物相容性或生物可降解性的聚合物。例如，1999年2月23日授权的Edwards等人的美国专利5,874,064中，就描述了此类聚合物，在此以引用的方式将该专利中的全部教导包括在本文中。

在另一个实施例中，微粒中包括不同于前述带电磷脂之一的表面活性剂。此处所使用的术语“表面活性剂”是指优先吸收至不相融的两相之间的界面上的任何制剂，例如在水和有机聚合物溶液之间的界面，水/空气界面或有机溶剂/空气界面。表面活性剂通常具有亲水性部分和亲脂性部分，从而使得在被吸收至微小微粒上之后，它们倾向于将基团递送到不吸引相似包被的微粒部分的外部环境中，从而减少微粒的聚集。表面活性剂也可以促进治疗剂或诊断剂的吸收，并提高制剂的生物利用度。

可以用于制备本发明的微粒的合适的表面活性剂包括但不限于：十六烷醇；脂肪醇，例如聚乙二醇（PEG）；聚氧乙烯基-9-十二烷基醚；表面活性脂肪酸，例如棕榈酸或油酸；甘胆酸盐；枯草菌表面活性剂；a poloxomer；山梨糖醇酐脂肪酸酯，例如山梨糖醇酐三油酸酯（Span 85）；以及四丁酚醛。

微粒中表面活性剂的量按重量计可以在约0%到约60%之间。微粒中表面活性剂的量优选为按重量计在约5%到约50%之间。

应当理解，当微粒中包含羧酸、多价盐、氨基酸、表面活性剂或其任意组合时，微粒的这些成分与带电磷脂之间可能会发生相互作用。

微粒，此处也称为粉末，可以以适于吸入的干粉的形式存在。在一个具体实施例中，微粒的振实密度（tap density）可以小于约 0.4 g/cm^3 。此处，振实密度小于约 0.4 g/cm^3 （例如 0.4 g/cm^3 ）的微粒被称为“空气动力学上较轻的微粒”。更为优选的是振实密度小于约 0.1 g/cm^3 （例如 0.1 g/cm^3 ）的微粒。

空气动力学上较轻的微粒具有优选的大小，例如，体积中值几何直径（volume median geometric diameter）（VMGD）至少约 5 微米（ μm ）。在一个实施例中，VMGD 为约 5 μm 到约 30 μm （例如 5、10、15、20、25 或 30 μm ）。在本发明的另一个实施例中，微粒的 VMGD 为约 9 μm 到约 30 μm 。在其他的实施例中，微粒的中值直径、质量中值直径（MMD）、质量中值表面直径（mass median envelope diameter）（MMED）或质量中值几何直径（mass median geometric diameter）（MMGD）至少为约 5 μm ，例如，从约 5 μm 到约 30 μm （例如 5、10、15、20、25 或 30 μm ），或从约 7 μm 到约 8 μm （例如 6 μm 、7 μm 或 8 μm ）。

空气动力学上较轻的微粒的“质量中值空气动力学直径”（mass median aerodynamic diameter）（MMAD），此处也称为“空气动力学直径”，最好在约 1 μm 到约 5 μm 之间（例如 1、2、3、4 或 5 μm ）。在本发明的一个实施例中，MMAD 在约 1 μm 到约 3 μm 之间。在另一个实施例中，MMAD 在约 3 μm 到约 5 μm 之间。

在本发明的另一个实施例中，微粒的表面质量密度（envelope mass density），此处也称为“质量密度”，小于约 0.4 g/cm^3 。各向

同性微粒的表面质量密度被定义为微粒的质量除以可将该微粒包裹起来的最小球体的表面体积。

可以通过本领域技术人员熟悉的仪器测定振实密度，例如 Dual Platform Microprocessor Controlled Tap Density Tester (Vankel, NC) 或者 GeoPycTM instrument (Micrometrics Instrument Corp., Norcross, GA 30093)。振实密度是对表面质量密度的标准度量。可以利用如下文献中的方法确定振实密度：USP Bulk Density and Tapped Density, United States Pharmacopia convention, Rockville, MD, 10th Supplement, 4950-4951, 1999。对较低的振实密度有贡献的特征包括不规则的表面构造以及多孔结构。

微粒的直径，例如它们的 VMGD，可以通过电带感应设备 (electrical zone sensing instrument) 例如 Multisizer IIe (Coulter Electronic, Luton, Beds, England)，或者激光衍射设备（例如 Helos, Sympatec, Princeton, NJ 制造）进行测定。用于测定微粒直径的其他设备在现有技术中是公知的。样品中微粒直径的范围将依赖与多种因素，例如微粒的组成以及合成方法。可以对样品中微粒大小的分布进行选择，从而可以在呼吸道的预期位点获得最佳的沉积效果。

从实验上讲，可以通过重力沉降法确定空气动力学直径，其中，全部微粒沉降到一定距离的时间被用于直接推断微粒的空气动力学直径。一种间接测定质量中值空气动力学直径 (MMAD) 的方法是多阶液体撞击器 (multi-stage liquid impinger) (MSLI)。

可以通过下述方程式计算空气动力学直径 d_{aer} ：

$$d_{aer} = d_g \sqrt{\rho_{tap}}$$

其中， d_g 是几何直径，例如 MMGD； ρ 是粉末密度。

振实密度小于约 0.4 g/cm^3 ，中值直径至少约 $5 \mu\text{m}$ ，空气动力学直径在约 $1 \mu\text{m}$ 到约 $5 \mu\text{m}$ 之间(最好在约 $1 \mu\text{m}$ 到约 $3 \mu\text{m}$ 之间)的微粒，更能够逃脱口咽部的惯性和重力沉积，并将气道或肺部深处作为其靶点。使用更大的、更加多孔的微粒是很有利的，因为与更小的、更密实的气溶胶微粒，例如目前用于吸入疗法的微粒，相比，它们能够更有效地分散为气溶胶。

与更小的微粒相比，更大的、空气动力学上较轻的微粒，优选为 VMGD 至少约 $5 \mu\text{m}$ 的微粒，在避免被肺泡巨噬细胞吞噬以及从肺部清除方面也可能是更成功的，这是由于巨噬细胞胞质溶胶空间的限制，使得超过一定尺寸的微粒被排除在外。当微粒直径超过约 $3 \mu\text{m}$ 时，随着直径的增加，肺泡巨噬细胞对微粒的吞噬作用急剧减小。Kawaguchi, H., et al., *Biomaterials* 7: 61-66 (1986); Krenis, L. J. and Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 107: 748-750 (1961); and Rudt, S. and Muller, R. H., *J. Contr. Rel.*, 22: 263-272 (1992)。对于在统计上具有各向同性形状的微粒而言，例如表面粗糙的球体，微粒的表面体积大约相当于一个巨噬细胞将微粒完全吞噬所需的胞质溶胶的体积。

微粒可以由适当的材料制成，可以具有适当的表面粗糙程度、直径和振实密度，以便运送至呼吸道的选定区域，例如肺部深处或者气道的上部或中部。例如，密度更高或更大的微粒可以用于气道上部的给药，或者，样品中由不同大小的微粒构成的混合物（其中提供了相同或不同的治疗剂），可以在一次给药中对肺部的不同目标区域进行给药。对于气道上部和中部的给药而言，空气动力学直径在约 $3 \mu\text{m}$ 到约 $5 \mu\text{m}$ 之间的微粒是优选的。对于肺部深处的给药而言，空气动力学直径在约 $1 \mu\text{m}$ 到约 $3 \mu\text{m}$ 之间的微粒是优选的。

在一个实施例中，本发明的微粒的空气动力学直径为约 1.3 微米，2 巴/16 毫巴压力下的平均几何直径为约 7.5 微米。在另一个实施例中，微粒中小于约 3.4 微米的微粒的细粒分数（fine particle fraction）（FPF）为约 44-45%，这可以通过 2 stage Anderson Cascade Impactor (ACI) assay 检测出来。在另一个实施例中，微粒中小于约 5.6 微米的微粒的细粒分数为约 63-66%。利用 2 stage ACI assay 测定细粒分数的方法，对于本领域技术人员来说是公知的。下面给出了此类实验的一个实例。通过使用 reduced Thermo Anderson Cascade Impactor with two stages 测定细粒分数（FPF）。称取 10 毫克粉末，装入 2 号羟丙基甲基纤维素（HPMC）胶囊中。利用单步的、呼吸致动的干粉吸入器分散粉末，以 60 L/分操作 2 秒钟。对平台（stages）进行选择，以便收集具有如下两种有效截止直径（effective cutoff diameter）（ECD）的微粒：（1）在 5.6 微米和 3.4 微米之间以及（2）小于 3.4 微米，并与多孔滤过材料配合，收集沉积的粉末。通过重量分析法确定沉积在每个平台上的质量。然后，FPF 被表示为装入胶囊内的总质量的一部分。

在另一个实施例中，本发明的微粒在 1 巴下的平均几何直径为约 7 微米到约 8 微米，通过 RODOS 测定。在另一个实施例中，微粒中小于约 3.3 微米的微粒的细粒分数为约 35% 到约 40%，约 40% 到约 45% 或者约 45% 到约 50%，按本文中所描述的方法通过三平台 ACI 实验测定。

在正常的呼吸状况下，气溶胶的惯性撞击和重力沉降是其在气道和肺泡内沉积的主要机理。Edwards, D.A., J. Aerosol Sci., 26:293-317 (1995)。这两种沉积机理的重要性随着气溶胶的质量，而不是微粒（或表面）体积，而成比例增加。由于气溶胶在肺部沉积的位点是由气溶胶的质量决定的（至少对于平均空气动力学

直径大于约 $1\ \mu\text{m}$ 的微粒), 因此, 在所有其他物理参数都相同的情况下, 通过增加微粒表面的不规则性和微粒的多孔性而减小振实密度, 可以使具有更大微粒表面体积的微粒运送至肺部。

与实际的表面球体直径 (envelope sphere diameter) 相比, 振实密度较低的微粒的空气动力学直径较小。空气动力学直径 d_{aer} 与表面球体直径 d 通过下述公式相互关联 (Gonda, I., "Physico-chemical principles in aerosol delivery," in Topics in Pharmaceutical Sciences 1991 (eds. D.J.A. Crommelin and K.K. Midha), pp. 95-117, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1992)):

$$d_{\text{aer}} = d \sqrt{\rho}$$

其中, 表面质量 ρ 的单位是 g/cm^3 。在人肺部的肺泡区域产生最大沉积的单分散气溶胶微粒 ($\sim 60\%$) 是空气动力学直径约为 $d_{\text{aer}} = 3\ \mu\text{m}$ 。Heyder, J. et al., J. Aerosol Sci., 17:811-825 (1986)。由于它们较小的表面质量密度, 空气动力学上较轻的微粒 (其中包含在肺部深处沉积最多的单分散吸入型粉末) 的实际直径 d 是,

$$d = 3 \sqrt{\rho} \ \mu\text{m} \quad (\text{其中 } \rho < 1 \text{ g}/\text{cm}^3)$$

其中, d 总是大于 $3\ \mu\text{m}$ 。例如, 表面质量密度 $\rho = 0.1 \text{ g}/\text{cm}^3$ 的空气动力学上较轻的微粒, 将会在表面直径大至 $9.5\ \mu\text{m}$ 的微粒中表现出最大的沉积。微粒尺寸的增大, 减少了微粒间的粘附力。Visser, J., Powder Technology, 58:1-10。因此, 微粒的尺寸较大, 除了对较低的吞噬损失有所贡献之外, 还增大了表面质量密度较低的微粒在肺部深处分散为气溶胶的效率。

可以计算空气动力学直径，以提供在肺部的最大沉积，而此前是通过使用很小的微粒而实现这一点的，所述很小的微粒的直径小于约 5 微米，优选为在约 1 微米和约 3 微米之间，这些微粒后面将遇到吞噬作用。选择那些直径更大但足够轻的微粒（因此是“空气动力学上较轻”的），也会得到相同的肺部给药效果，但尺寸更大的微粒不会被吞噬。与表面光滑的微粒相比，使用那些表面粗糙或不均匀的微粒可以改善给药效果。

可以通过诸如过滤或离心之类的方法制造或分离合适的微粒，以提供具有预先选定的尺寸分布的微粒样品。例如，样品中多于约 30 %、50 %、70 % 或 80 % 的微粒的直径，可以在选定的至少约 5 μm 的范围内。例如，选定的范围可以是在约 5 μm 到约 30 μm 之间，或者最好在约 5 μm 到约 15 μm 之间，其中，一定比例的微粒必须落在该选定的范围内。在一个优选实施例中，至少一部分微粒的直径在约 9 μm 到约 11 μm 之间。或者，也可以将微粒样品制备成至少约 90 %、或最好约 95 % 或约 99 % 的微粒的直径落在选定的范围内。微粒样品中空气动力学上较轻的、直径更大的微粒的比例越高，其中所包含的治疗剂或诊断剂对肺部的给药效果就越好。直径较大的微粒通常是指平均几何直径至少约 5 μm 的微粒。

可以通过喷雾干燥法制备微粒。例如，喷雾干燥混合物，此处也称为“进料溶液”或“进料混合物”，被导入喷雾干燥器，所述喷雾干燥混合物中包括生物活性剂以及一种或多种带电脂类，所述带电脂类所携带的电荷同与其相关联的生物活性剂所携带的电荷相反。

例如，当使用蛋白质生物活性剂时，该可以将该制剂溶于缓冲体系中，其 pH 值可以高于或低于该制剂的 pI 值。具体地说，例如，可以将胰岛素溶于水性缓冲体系（例如柠檬酸、磷酸、乙

酸等)或者 0.01N 的 HCl 中。可以通过适当的碱溶液(例如 1N 的 NaOH)将所得到的溶液的 pH 值调节到预期大小。在一个优选实施例中, pH 值可以被调节到约 7.4。在该 pH 值下, 胰岛素分子带有净负电荷($pI = 5.5$)。在另一个实施例中, pH 值可以被调节到约 4.0。在该 pH 值下, 胰岛素分子带有净正电荷($pI = 5.5$)。此外, 如果需要的话, 可以将溶液加热到其沸点以下的温度, 例如约 50℃。阳离子磷脂通常被溶于有机溶剂或溶剂组合物中。然后, 将这两种溶液混合在一起, 并将所得到的混合物进行喷雾干燥。

可以存在于喷雾干燥混合物中的合适的有机溶剂包括但不限于醇类, 例如乙醇、甲醇、丙醇、异丙醇、丁醇等。其他的有机溶剂包括但不限于: 全氟化碳、二氯甲烷、氯仿、醚、乙酸乙酯、甲基特丁基醚(methyl tert-butyl ether)等。可以存在于进料混合物中的水性溶剂包括水和缓冲溶液。有机溶剂和水性溶剂都可以存在于被导入喷雾干燥器的喷雾干燥混合物中。在一个实施例中, 优选的乙醇-水溶剂是乙醇: 水的比例在约 50: 50 到约 90: 10 之间。混合物的 pH 可以是中性、酸性或碱性。也可以加入 pH 缓冲液。pH 范围优选为在约 3 到约 10 之间。

被喷雾干燥的混合物中所使用的有机溶剂的总量, 按重量计通常大于约 98%。被喷雾干燥的混合物中固体的量, 按重量计可以在约 1.0% 到约 1.5% 之间变化。

在喷雾干燥过程中使用包含有机溶剂和水性溶剂的混合物, 使得我们可以将亲水和疏水成分组合使用, 而同时不要求形成脂质体或其他结构或复合体, 以助于微粒中此类成分组合物的溶解。

例如，下述文献中描述了合适的喷雾干燥技术：K. Masters in “Spray Drying Handbook,” John Wiley & Sons, New York, 1984。一般来讲，在喷雾干燥过程中，灼热气体例如热空气或热氮气中的热，被用于气化小液滴中的溶剂，所述小液滴是通过将连续的液体进料进行雾化而形成的。其他的喷雾干燥技术是现有技术中公知的。在一个优选实施例中使用了旋转喷雾器（rotary atomizer）。使用旋转喷雾法的合适的喷雾干燥器的实例包括 Mobile Minor spray dryer, Niro Denmard 制造。灼热气体可以是，例如，空气、氮气或氦气。

本发明的微粒最好通过如下条件获得：喷雾干燥时，流入温度在约 100℃ 和约 400℃ 之间，流出温度在约 50℃ 和约 130℃ 之间。

可以将喷雾干燥微粒的表面构造（surface texture）制造得较为粗糙，从而减少微粒聚集并改善粉末的流动性。制造出来的喷雾干燥微粒可以具有某些特征，这些特征能够改善经干粉吸入器的烟雾化，并使微粒在口腔、咽喉和吸入设备中的沉积更少。

在适于通过肺系统给药的组合物中，可以使用本发明的微粒。例如，此类组合物中可以包括微粒以及药学上可以接受的载体，用于对患者给药，优选为通过吸入给药。所述微粒可以与其他通过类似方法制造的微粒共同运送，后者可以含有或不含有另一种药物。2001 年 6 月 8 日提交的美国专利申请 09/878,146 中，描述了共同运送微粒的方法，在此以引用的方式将该专利申请的全部教导包括在本文中。所述微粒也可以与不含治疗剂的更大的载体微粒共同运送，后者的质量中值直径可以，例如，在约 50 μm 到约 100 μm 之间。微粒可以单独给药，也可以存在于任何一种合适的药学上可以接受的载体例如液体（如盐水）或者粉末之中，用于对呼吸系统给药。

其中包括药剂，例如一种或多种药物，的微粒，被给予到需要治疗、预防或诊断的患者的呼吸道内。对呼吸系统给予微粒时，可以采用现有技术中公知的方法。例如，通过吸入装置给予微粒。在一个优选实施例中，通过干粉吸入器（DPI）给予微粒。也可以使用定量吸入器（MDI），喷雾器或安装技术（installation technique）。

现有技术中已有多种合适的吸入设备和方法，可以用于对患者的呼吸道给药。例如，下列专利中描述了合适的吸入器：1976年8月5日授权的 Valentini 等人的美国专利 4,069,819，1991年2月26日授权的 Valentini 等人的美国专利 4,995,385，以及 1999年12月7日授权的 Patton 等人的美国专利 5,997,848。其他的实例包括但不限于：Spinhaler® (Fisons, Loughborough, U.K.), Rotahaler® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Technology Park, North Carolina), FlowCaps® (Hovione, Loures, Portugal), Inhalator® (Boehringer-Ingelheim, Germany), 以及 Aerolizer® (Novartis, Switzerland), diskhaler (Glaxo-Wellcome, RTP, NC), 以及现有技术中已知的其他吸入器。优选为通过干粉吸入器给予干粉形式的微粒。

在一个实施例中，干粉吸入器是简单的、呼吸致动的设备。下述专利申请中描述了合适的吸入器的一个实例：David A. Edwards 等人 2001 年 4 月 16 日提交的标题为 “Inhalation Device and Method” 的美国专利申请，律师案卷号为 00166.0109.US00。在此以引用的方式将该专利申请的全部内容包括在本文中。该肺部给药系统是特别合适的，因为它可以通过有效的干粉给药方式，将小分子、蛋白质和肽类药物运送至肺部深处。特别适合运送的是独特的多孔微粒，例如此处描述的胰岛素微粒，它们的质量密度较低，几何直径相对较大，并且空气动力学特征很理想 (Edwards et al., 1998)。可以通过简单的吸入设备有效地分散和吸

入这些微粒，由于粘附力较小，因此微粒可以很容易地解聚。具体地说，这些微粒独特的性质使它们具有了同时被分散和吸入的能力。

在一个实施例中，容器的体积至少为约 0.37cm^3 。在另一个实施例中，容器的体积至少为约 0.48cm^3 。在又一个实施例中，容器的体积至少为约 0.67cm^3 或 0.95cm^3 。本发明也可使用胶囊类容器，例如表明了具体尺寸的胶囊，例如 2、1、0、00 或 000。例如，可以从 Shionogi (Rochville, MD) 获得合适的胶囊。例如，可以从 Hueck Foils (Wall, NJ) 获得合适的泡罩 (blister)。适用于本发明的其他容器以及其他体积，在现有技术中都是公知的。

容器中包裹 (enclose) 或储存着微粒和/或包含微粒的呼吸组合物。在一个实施例中，微粒和/或包含微粒的呼吸组合物以粉末的形式存在。如现有技术中所述，容器中填充有微粒和/或包含微粒的组合物。例如，可以使用真空填充 (filling) 或填压 (tamping) 技术。一般来讲，可以通过现有技术中公知的方法，以粉末来填充容器。在本发明的一个实施例中，被包裹或储存在容器中的微粒的质量至少为约 5 毫克。在另一个实施例中，被包裹或储存在容器中的微粒的质量中，包括质量为至少约 1.5 毫克至至少约 20 毫克的生物活性剂。

呼吸道给药的微粒，最好沿着气道上部 (口咽部和喉部)、气道下部以及终末细支气管运行，其中，气道下部包括气管以及后面分叉形成的支气管和细支气管，终末细支气管分化为呼吸细支气管，后者通向最终的呼吸区域，也就是肺泡或肺部深处。在本发明的一个优选实施例中，大部分质量的微粒沉积在肺部深处。在本发明的另一个实施例中，微粒主要运送至气道中部。也可以运送至气道上部。

在本发明的一个优选实施例中，将微粒运送至肺系统是通过一个单步的、呼吸致动的步骤完成的，如下述文献中所述：2000年6月9日提交的标题为“High Efficient Delivery of a Large Therapeutic Mass Aerosol”的美国专利申请 09/591,307，以及2001年6月8日提交的标题为“Highly Efficient Delivery of a Large Therapeutic Mass Aerosol”的美国部分继续专利申请 09/848,146。在此以引用的方式将其全部教导包括在本文中。在一个实施例中，在呼吸致动的设备里，分散和吸入同时发生在一次吸入过程中。下述专利申请中描述了合适的吸入器的一个实例：David A. Edwards 等人 2001 年 4 月 16 日提交的标题为“Inhalation Device and Method”的美国专利申请，律师案卷号为 00166.0109.US00。在此以引用的方式将该专利申请的全部内容包括在本文中。在本发明的另一个实施例中，储存在吸入器容器中的微粒中 50% 质量的微粒，通过一个单步的、呼吸致动的步骤，被运送至受试者（subject）的呼吸系统中。

在又一个实施例中，通过将容器内所包裹的微粒经一次呼吸运送至受试者的呼吸道内，而给予至少 1.5 毫克或至少 5 毫克或至少 10 毫克的生物活性剂。可以给予多至 15 毫克的生物活性剂。

此处所使用的术语“有效量”是指获得预期的治疗或诊断效果或功效所需的量。药物的实际有效量可以随着所使用的具体药物或其组合，所制备的具体组合物，给药方式，患者的年龄、体重、病况以及有待治疗的症状或病况的严重程度而变化。给予具体患者的剂量可以由本领域技术人员通过常规手段而加以确定（例如通过合适的常规药理方案）。在一个实施例中，剂量范围为约 40 IU 到约 540 IU，取决于患者的具体情况。同样，优选的剂量范围为约 84 IU 到约 294 IU，取决于患者的具体情况。吸入型胰岛素的另一个有效剂量范围是约 155 IU 到约 170 IU。此处所

使用的一个有用的换算系数是，27 IU 对应于 1 毫克生物活性剂，具体地说是胰岛素。

在具体的治疗实践中，也可以对气溶胶剂量、配方和给药系统进行选择，例如，下列文献中就描述了这方面的内容：Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313, 1990; Moren, "Aerosol dosage forms and formulations," in: Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Moren, et al., Eds, Esevier, Amsterdam, 1985.

如上所述，可以通过释放常数描述药物的释放速率。一级释放常数可以通过下述方程式表示：

$$M_{(t)} = M_{(\infty)} * (1 - e^{-k*t}) \quad (1)$$

其中，k 是一级释放常数。 $M_{(\infty)}$ 是药物释放系统，例如干粉，中药物的总质量。 $M_{(t)}$ 是在时刻 t 时，从干粉中释放出来的药物质量。

方程式（1）可以通过释放出来的药物的量（例如质量）表示，或者，也可以通过在规定体积的释放介质中释放出来的药物浓度表示。例如，方程式（1）可以表示为：

$$C_{(t)} = C_{(\infty)} * (1 - e^{-k*t}), \text{ 或者, 释放}_{(t)} = \text{释放}_{(\infty)} * (1 - e^{-k*t}) \quad (2)$$

其中，k 是一级释放常数。 $C_{(\infty)}$ 是药物在释放介质中的最大理论浓度。 $C_{(t)}$ 是在时刻 t 时，从干粉中释放至释放介质中的药物浓度。

通过释放常数表示的药物释放速率可以通过下述方程式进行计算：

$$k = - \ln (M_{(\infty)} - M_{(t)}) / M_{(\infty)} / t \quad (3)$$

表 5 中所列出的释放常数使用了方程式 (2)。

此处所使用的术语“一个”是指一个或多个。

此处所使用的术语“名义剂量”(nominal dose)是指存在于用于给药的微粒中的生物活性剂的总质量，代表了给药时所能获得的生物活性剂的最大量。

申请人所使用的术语基于干粉气溶胶的肺部给药，所述气溶胶包括较大的多孔微粒，其中每一个微粒都能包括位于多孔基质内的药物和赋形剂。这些微粒在几何上较大，但质量密度较小，空气动力学尺寸也较小。这产生了易于分散的粉末。此处所描述的包括较大的多孔微粒的干粉气溶胶的易分散性，使得我们可以通过简单的、呼吸致动的基于胶囊的吸入器，对蛋白质治疗剂进行有效的系统给药。

本发明也描述了一种试剂盒，包括至少两个容器，每个容器中含有不同量的适于吸入的胰岛素干粉。所述粉末可以是但不限于此处所描述的任何一种此类胰岛素干粉。此外，本发明也描述了一种试剂盒，包括两个或更多个容器，含有两个或更多个单位剂量，其中包含微粒，微粒中包含此处所描述的生物活性剂制剂。依赖于制剂中生物活性剂的生物利用度，制剂中所含有的生物活性剂的量，可以比运送至受试者血流中的生物活性剂的量更大。例如，如下面的实例部分中所述，给予受试者的容器中可以含有 42 IU，84 IU 等单位剂量，但是，如果生物利用度小于 100%，那么只有一部分生物活性剂到达了受试者的血液。

在一个实施例中，所述生物活性剂是胰岛素。例如，所述制剂可以是含有如下成分的微粒：按重量计，约 60 % DPPC，约 30 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 40 % DPPC，约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 40 % 到约 60 % DPPC，约 30 % 到约 50 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 80 % DPPC，约 10 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 75 % DPPC，约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，约 75 % 到约 80 % DPPC，约 10 % 到约 15 % 胰岛素以及约 10 % 柠檬酸钠。所述制剂可以是含有如下成分的微粒：按重量计，60 % DPPC，30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，40 % DPPC，50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，40 % 到 60 % DPPC，30 % 到 50 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，80 % DPPC，10 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，75 % DPPC，15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠；或者，按重量计，75 % 到 80 % DPPC，10 % 到 15 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸钠。可以通过多种不同方法获得预期的剂量。例如，容器的大小可以被改变，和/或装入容器的制剂的体积和/或配方（例如，胰岛素的百分比）也可以被改变，以获得预期的剂量。预期的剂量可以是容器中所包含的剂量，或者是能够被受试者利用的剂量（例如释放至受试者血流中的量）。当容器没有被制剂填满时，容器的剩余空间可以空着，或者用填料装到 100 % 填满。

此处所描述的试剂盒可以用于对需要生物活性剂的受试者给予生物活性剂，例如胰岛素。当所述生物活性剂是胰岛素时，给予受试者的剂量可以由患者或医务人员改变，例如，通过增大或减小装有含胰岛素微粒的容器（例如胶囊）的数目，从而增大或减小胰岛素的单位剂量。当患者需要比常规剂量更大的胰岛素剂量时，该患者可以自行服用额外的容器，或容器的不同组合，

从而将胰岛素的剂量提高至预期量。相反地，如果患者需要更少的胰岛素时，该患者可以自行服用更少的容器，或容器的不同组合，从而将胰岛素的剂量减少至预期量。该试剂盒中也可以包括说明书，用于指导如何使用试剂盒中的试剂（例如含有制剂的容器）。通过使用该试剂盒，可以获得精确的剂量。

实例

材料

在大鼠的体内研究中，用于喷雾干燥的大部分胰岛素是从 BioBras (Belo Horizonte, Brazil) 或 Sigma (Saint Louis, MO) 获得的。在体外研究以及人的体内研究中，Humulin®, Lente® (Humulin® L 人胰岛素锌悬浮液), Humulin® R (常规可溶性胰岛素(IR)), Humulin® Ultralente® (Humulin® U) 以及 Humalog® 100 (赖脯胰岛素(insulin lispro) (IL)), 是从 Eli Lilly 公司 (Indianapolis, IN; 100 U/ml) 获得的。这些溶液均储存在 2 - 8°C。

质量中值空气动力学直径 - MMAD (μm)

利用喷雾器/空气分散器 (Aerosizer/Aerodisperser) (Amherst Process Instrument, Amherst, MA) 确定质量中值空气动力学直径。将约 2 mg 的粉末制剂加入到空气分散器中，通过飞行时间 (time of flight) 测定法确定空气动力学直径。

细粒分数

细粒分数可以用作表征分散化粉末的气溶胶表现的一种方式。细粒分数描述了空气传播的微粒的尺寸分布。利用 Cascade impactors 进行重量分析，是测定空气传播的微粒的尺寸分布或细粒分数的一种方法。Andersen Cascade Impactor (ACI) 是八平台

的冲击器，可以按照空气动力学尺寸将气溶胶分为 9 个不同的部分。每个平台的尺寸分界值（cutoff）依赖于 ACI 操作时的流速。

可以利用二平台折叠 ACI（2 stage collapsed ACI）测定细粒分数。二平台折叠 ACI 仅由八平台 ACI 的上面两个平台构成，可以收集两个不同的粉末部分。ACI 由多个平台构成，这些平台则由一系列喷嘴和撞击表面（impaction surface）。在每一个平台上，气溶胶气流通过喷嘴撞击到表面上。在气溶胶气流中，惯性足够大的那些微粒将撞击到平板上。那些惯性不够大的微粒将不会撞击到平板上，它们仍然保留在气溶胶气流中，并被携带至下一个平台。ACI 的每一个后续平台中，气溶胶在喷嘴中的速度更大，从而使得更小的微粒可以在每一个后续平台上收集起来。

本发明的微粒可以通过细粒分数表征。使用二平台折叠 Andersen Cascade Impactor 确定细粒分数。具体地说，对二平台折叠 ACI 进行校正，从而使得一号平台所收集的粉末部分是由空气动力学直径小于 5.6 微米并且大于 3.4 微米的微粒构成的。通过了一号平台并沉积在收集过滤器中的粉末部分，是由空气动力学直径小于 3.4 微米的微粒构成的。此类校正中，气流约为 60 L/min。

也可以使用三平台 ACI 确定细粒分数。按照如下步骤进行三平台 ACI 分析。组装一台带屏蔽物（screen）的三平台 Andersen Cascade Impactor（ACI）（Andersen Instruments, Inc., Smyrna, GA），用于确定细粒分数。该装置中使用了有效截止直径为 9.0、4.7 和 3.3 微米（流速为 28.3 ± 2 L/min）的 ACI 平台 0、2 和 3。每一个平台都包括撞击平板（impaction plate）、屏蔽物以及喷射板（jet plate）。所用的屏蔽物是不锈钢 150 微米孔，5 层烧结的 Dynapore laminate (Martin Kurz & Co, Inc., Mineola, NY)。用甲醇冲洗屏蔽物，待其干燥，然后浸入 HPLC 等级的水中，并立即置

于该装置的固体撞击平板上。预先称好的 81 mm 玻璃纤维过滤器 (Andersen Instruments, Inc., Smyrna, GA) 被用作该装置的过滤介质。

在 18 到 25℃ 以及 20 - 40 % 的相对湿度下, 进行三平台 Andersen Cascade Impactor 分析。流过该装置的气流速率被校正到 28.3 ± 2 L/min。将胶囊中装满粉末并放置在吸入设备内部。然后, 利用吸入器刺破胶囊, 并将其放置于 ACI 的吹口适配器 (mouthpiece adaptor) 处。将空气泵激活约 4.2 秒, 以便将粉末从胶囊中取出。ACI 被隐藏 (dissembled) 起来, 并将玻璃纤维过滤器称重。用过滤器上沉积的粉末质量除以装入胶囊中的粉末的总质量, 得到小于 3.3 微米的细粒分数 (FPF)。

此处所使用的术语 “FPF < 5.6” 和 “小于 5.6 微米的细粒分数”, 是指样品中空气动力学直径小于 5.6 微米的微粒所占的分数。可以用二平台折叠 ACI 的一号平台和收集过滤器上沉积的微粒质量, 除以称重后装入胶囊中用于运送至仪器中的微粒质量, 得到 FPF (< 5.6)。

此处所使用的术语 “FPF (<3.4)” 和 “小于 3.4 微米的细粒分数”, 是指空气动力学直径小于 3.4 微米的微粒所占的分数。可以用二平台折叠 ACI 的收集过滤器上沉积的微粒质量, 除以称重后装入胶囊中用于运送至仪器中的微粒质量, 得到 FPF (< 3.4)。

此处所使用的术语 “FPF (<3.3)” 和 “小于 3.3 微米的细粒分数”, 是指空气动力学直径小于 3.4 微米的微粒所占的分数。可以用三平台折叠 ACI 的收集过滤器上沉积的微粒质量, 除以称重后装入胶囊中用于运送至仪器中的微粒质量, 得到 FPF (< 3.3)。

“小于 5.6 的 FPF” 已经被证明与能够进入患者肺部的粉末分数有关，而“小于 3.4 的 FPF”（使用二平台 ACI）或“小于 3.3 的 FPF”（使用三平台 ACI）已经被证明与能够到达患者肺部深处的粉末分数有关。这些关系提供了一种数量上的指标，可以用于微粒的优化。

体积中值几何直径 - VMGD (μm)

利用 RODOS 干粉分散器(Sympatec, Princeton, NJ)和 HELOS 激光衍射计 (Sympatec) 测定体积中值几何直径。将粉末装入 RODOS 入口，并通过由控制在 2 巴的压缩空气流所产生的剪切力进行雾化(aerosolize)。接下来，气溶胶可以被导入 HELOS 的测量区域，在此处，它将来自激光束的光散射掉，并产生 Fraunhofer 衍射图样，用于推断微粒尺寸的分布以及确定中值。

当注明时，体积中值几何直径是利用 Coulter Multisizer II 确定的。将约 5 – 10 mg 粉末制剂加入到 50 mL 的 isoton II 溶液中，直到微粒的一致性 (coincidence) 在 5% 到 8% 之间。

大鼠血浆胰岛素水平的确定

使用人胰岛素特异的 RIA 试剂盒 (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, catalog #HI-14K) 对大鼠血浆胰岛素进行定量测定。分析表明与大鼠胰岛素的交叉反应小于 0.1%。对试剂盒分析步骤进行修改，以便适应于从大鼠中得到的体积较小的血浆，其灵敏度约为 5 $\mu\text{U/mL}$ 。

胰岛素制剂的制备

按如下步骤制备表 2 中所列出的粉末制剂。将脂溶于乙醇中，将胰岛素、亮氨酸和/或柠檬酸钠溶于水中，从而制备喷雾干燥前

的溶液。然后,将乙醇溶液与水溶液混合,乙醇/水的比例为 60/40。用于喷雾干燥的溶液的最终总溶质浓度在 1 g/L 到 3 g/L 之间变化。例如,将 600 mg DPPC 溶于 600 mL 乙醇中,将 100 mg 柠檬酸钠和 300 mg 胰岛素溶于 400 mL 水中,然后将这两种溶液混合,得到 1 升的共溶剂(cosolvent),其总溶质浓度为 1 g/L(w/v),从而制得 DPPC/柠檬酸/胰岛素(60/10/30)的喷雾干燥溶液。可以将三倍量的每种溶质溶于同样体积的乙醇和水中,从而制得溶质浓度更高的 3 g/L(w/v)的溶液。

所述溶液可以用于制备干粉。使用了 Niro 喷雾器便携式喷雾干燥器(Niro Atomizer Portable Spray Dryer)(Niro, Inc., Columbus, MD)。具有不同压力(1 到 5 巴)的压缩空气进入位于干燥器上方的旋转喷雾器(2,000 到 30,000 rpm)中。通过电子定量泵(electronic metering pump)将不同速率(20 到 66 mL/min)的液体进料连续泵入喷雾器中。测定流入和流出的温度。手动控制流入温度,流入温度可以在 100℃和 400℃之间变化,并被确定在 100、110、150、175 或 200℃,控制范围为 5℃。流出温度取决于流入温度以及其他因素,例如气体进料和液体进料的速率(在 50℃和 130℃之间变化)。将一个容器与旋流器紧密连接,以便收集粉末产品。

含胰岛素粉末的物理特性列于表 3 中。MMAD 和 VMGD 按照上面所述的方法确定。

表 3 中列出的数据示出了含胰岛素制剂的物理特性,这些数据对于确定制剂的可呼吸性(respirability)有一定预见作用。也就是说,如同前面所讨论的,按照本文所提供的方法制备的粉末所具有的较大的几何直径、较小的空气动力学直径以及较低的密度,使得这些微粒很适于呼吸。

表 2 胰岛素粉末制剂

粉末制剂编号	成 分 (%)						
	DPePC	DSePC	DPPG	DPPC	亮氨酸	柠檬酸	胰 岛 素
1				70	10		20
2		70			20		10
3		70			10		20
4	50						50
5			40			10	50
6	70				10		20
7	50						50
8	54.5						45.5
9	50				10		40
10	70				10		2
11	70				8	2	20
12				40		10	50
13†				60		10	30
13A†				60		10	30

†同一制剂的不同类型 (lots)。

表 3 胰岛素粉末制剂的物理特性

制剂	成分（按重量计）	MMAD (μm) §	VMGD (μm) #	密 度 (g/cc) ‡
1	DPPC/Leu/胰岛素(Sigma)=70/10/20	2.6	13.4	0.038
2	DSePC(Avanti)/Leu/胰岛素 (Sigma)=70/10/20	3.3	10.0	0.109
3	DSePC(Avanti)/Leu/胰岛素 (Sigma)=70/10/20	3.4	13.6	0.063
4	DPePC(Avanti)/胰岛素(Sigma)=50/50	3.2	15.3	0.044
5	DPPG/柠檬酸钠/胰岛素=40/10/50	3.9	11.6	0.113
6	DPePC(Genzyme)/Leu/胰岛素 (Biobras)=70/10/20	2.6	9.1	0.082
7	DPePC(Avanti)/胰岛素(Biobras)=50/50	2.8	11.4	0.060
8	DPePC(Genzyme)/胰岛素(Biobras)=54.5/45.5	2.8	12.6	0.049
9	DPePC(Genzyme)/Leu/胰岛素 (Biobras)=50/10/40	2.2	8.4	0.069
10	DPePC(Avanti)/Leu/胰岛素(Biobras)=70/10/20	3.7	15.5	0.057
11	DPePC(Avanti)/Leu/ 柠 檬 酸 钠 / 胰 岛 素 (Biobras)=70/8/2/20	2.6	15.3	0.029
12	DPPC/柠檬酸钠/胰岛素=40/10/50	3.5	11.6	0.091
13	DPPC/胰岛素/柠檬酸钠 =60/30/10	1.9	8.0	0.056

§ 质量中值空气动力学直径

在 2 巴压力下的体积中值几何直径

‡ 通过 $d_{\text{acr}} = d_g \sqrt{\rho}$ 确定

按重量计含 30 % 胰岛素的微粒的制备和包装方法

下面的实例描述了按重量计含 30 % 胰岛素的微粒（按重量计，DPPC/胰岛素/柠檬酸，60/30/10）的制备。下面的步骤详细描述每批次为一升溶液的制备程序。可以相应地按比例调整每批次产品的制备，从而得到更大体积的进料溶液。对于 1 号 Niro 喷雾干燥器（见下文）而言，每批次喷雾干燥的大小通常约为 24 升。按下述方法制备水溶液。按下述方法制备 0.4 L pH 为 2.5 的柠檬酸缓冲液：将 1.26 克的单水柠檬酸溶于 0.4 L 注射用无菌水中，并用 1.0 N 的 HCl 将 pH 调节至 2.5。然后，将 4.5 克胰岛素溶于该柠檬酸缓冲液中。最后，加入 1.0 N 的氢氧化钠（NaOH），直到将 pH 调节至 6.7。将 9.0 g DPPC 溶于 600 mL 乙醇（200 proof, USP）中，制备有机溶液。

在进行喷雾干燥之前，对水性溶液和有机溶液进行在线过滤（0.22 微米过滤器），然后在线加热至 50℃。将加热后的水性溶液和加热后的有机溶液进行在线静态混合（static mixing），从而制得喷雾干燥的进料溶液。在进行混合时，应使所得到的水性/有机进料溶液中含有最终体积组成为 60 %：40 % 的乙醇：水，其中溶质浓度为 15 g/L。将进料溶液泵入喷雾干燥室的上部（1 号 Niro 喷雾干燥器，Model Mobil Minor 2000），并将进料速率控制在 50 mL/min。在溶液进入喷雾干燥室之后，利用二液体喷雾器（2 liquid atomizer）（Liquid Cap 2850 and Gas Cap 67147, Spraying Systems Inc）将溶液雾化为小液滴，其中，喷雾气体的速率为 70 g/min。处理气体，也就是维持在 -20℃ 露点的灼热氮气，被引入干燥室的上部，其流速控制在 94 kg/hr。当小液滴与灼热的氮气相接触时，液体被蒸发掉，多孔微粒形成。流入的干燥气体（drying gas）的温度为 135℃，流出的处理气体（process gas）的温度为 67.5℃。微粒随着处理气体离开干燥室，并进入下游的

产品过滤器。产品过滤器将多孔微粒从处理气体中分离出来。处理气体从收集器的顶部流出，并被导入排气系统（exhaust system）。过滤器被周期性地施以反向脉冲（reverse pulsed），产品从产品过滤器的底部离开，并在粉末收集器中回收。

所得到的微粒的振实密度为 0.09 g/cm^3 ，通过标准方法测定；1 巴压力下的 VMGD 为 7 到 8 微米，通过 RODOS 测定；<3.3 微米的细粒分数（FPF）为 45-50%，通过带有湿屏蔽物的三平台 ACI 分析得到，具体方法如前所述。

将约 8.7 mg 粉末装入 2 号羟丙基甲基纤维素（HPMC）胶囊中，然后在 Aclar-foil blister cards 中进行包装。将 blister cards 用铝箔袋密封起来，其中包括一个小包装的食品级干燥剂袋，用于防水。

按重量计含 10% 胰岛素的微粒的制备和包装方法

下面的内容描述了按重量计含 10% 胰岛素的微粒（按重量计，DPPC/胰岛素/柠檬酸，80/10/10）的制备。下面的步骤详细描述每批次为一升溶液的制备程序。按下述方法制备水溶液。按下述方法制备 0.4 L pH 为 2.5 的柠檬酸缓冲液：将 0.168 克的单水柠檬酸溶于 0.4 L 注射用无菌水中，并用 1.0 N 的 HCl 将 pH 调节至 2.5。然后，将 0.2 克胰岛素溶于该柠檬酸缓冲液中。最后，加入 1.0 N 的氢氧化钠（NaOH），直到将 pH 调节至 6.7。将 1.2 g DPPC 溶于 600 mL 乙醇（200 proof, USP）中，制备有机溶液。

在进行喷雾干燥之前，对水性溶液和有机溶液进行在线过滤（0.22 微米过滤器），然后在线加热至 50°C 。将加热后的水性溶液和加热后的有机溶液进行在线静态混合（static mixing），从而制得喷雾干燥的进料溶液。在进行混合时，应使所得到的水性/

有机进料溶液中含有最终体积组成为 60%：40% 的乙醇：水，其中溶质浓度为 2 g/L。将进料溶液泵入喷雾干燥室的上部（1 号 Niro 喷雾干燥器，Model Mobil Minor 2000），并将进料速率控制在 45 mL/min。在溶液进入喷雾干燥室之后，利用二液体喷雾器（Liquid Cap 2850 and Gas Cap 67147, Spraying Systems Inc）将溶液雾化成为小液滴，其中，喷雾气体的速率为 21.5 g/min。处理气体，也就是灼热氮气，被引入干燥室的上部，其流速控制在 90 kg/hr。当小液滴与灼热的氮气相接触时，液体被蒸发掉，多孔微粒形成。流入的干燥气体（的温度为 130℃，流出的处理气体的温度为 67.5℃。微粒随着处理气体离开干燥室，并进入下游的产品过滤器。产品过滤器将多孔微粒从处理气体中分离出来。处理气体从收集器的顶部流出，并被导入排气系统。过滤器被周期性地施以反向脉冲，产品从产品过滤器的底部离开，并在粉末收集器中回收。

所得到的微粒的振实密度为 0.06 g/cm³，通过标准方法测定；1 巴压力下的 VMGD 为 7 到 8 微米，通过 RODOS 测定；FPF<3.3 为 35-40%，通过带有湿屏蔽物的三平台 ACI 分析得到，具体方法如前所述。将约 12.4 mg 粉末装入 2 号羟丙基甲基纤维素（HPMC）胶囊中，然后在 Aclar-foil blister cards 中进行包装。将 blister cards 用铝箔袋密封起来，其中包括一个小包装的食品级干燥剂袋，用于防水。

按重量计含 15% 胰岛素的微粒的制备和包装方法

下面的实例描述了按重量计含 15% 胰岛素的微粒（按重量计，DPPC/胰岛素/柠檬酸，75/15/10）的制备。下面的步骤详细描述每批次为一升溶液的制备程序。按下述方法制备水溶液。按下述方法制备 0.4 L pH 为 2.5 的柠檬酸缓冲液：将 1.26 克的单水柠檬酸溶于 0.4 L 注射用无菌水中，并用 1.0 N 的 HCl 将 pH

调节至 2.5。然后，将 2.25 克胰岛素溶于该柠檬酸缓冲液中。最后，加入 1.0 N 的氢氧化钠 (NaOH)，直到将 pH 调节至 6.7。将 11.25 g DPPC 溶于 600 mL 乙醇 (200 proof, USP) 中，制备有机溶液。

在进行喷雾干燥之前，对水性溶液和有机溶液进行在线过滤 (0.22 微米过滤器)，然后在线加热至 50℃。将加热后的水性溶液和加热后的有机溶液进行在线静态混合 (static mixing)，从而制得喷雾干燥的进料溶液。在进行混合时，应使所得到的水性/有机进料溶液中含有最终体积组成为 60%：40% 的乙醇：水，其中溶质浓度为 15 g/L。将进料溶液泵入喷雾干燥室的上部 (1 号 Niro 喷雾干燥器，Model Mobil Minor 2000)，并将进料速率控制在 50 mL/min。在溶液进入喷雾干燥室之后，利用二液体喷雾器 (Liquid Cap 2850 and Gas Cap 67147, Spraying Systems Inc) 将溶液雾化为小液滴，其中，喷雾气体的速率为 62 g/min。处理气体，也就是灼热氮气，被引入干燥室的上部，其流速控制在 110 kg/hr。当小液滴与灼热的氮气相接触时，液体被蒸发掉，多孔微粒形成。流入的干燥气体 (的温度为 128℃，流出的处理气体的温度为 67.5℃。微粒随着处理气体离开干燥室，并进入下游的产品过滤器。产品过滤器将多孔微粒从处理气体中分离出来。处理气体从收集器的顶部流出，并被导入排气系统。过滤器被周期性地施以反向脉冲，产品从产品过滤器的底部离开，并在粉末收集器中回收。所得到的微粒在 1 巴压力下的 VMGD 为 7 到 8 微米，通过 RODOS 测定；FPF<3.3 为 40-45%，通过带有湿屏蔽物的三平台 ACI 分析得到。将约 8.0 mg 粉末装入 2 号羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 胶囊中，然后在 Aclar-foil blister cards 中进行包装。将 blister cards 用铝箔袋密封起来，其中包括一个小包装的食品级干燥剂袋，用于防水。

大鼠体内胰岛素试验

进行下述实验，以测定在将含胰岛素的干粉制剂通过肺部给药给予大鼠后，胰岛素吸收进入大鼠血流的速度和程度。

给予胰岛素的名义剂量为每只大鼠 100 μg 。为了达到名义剂量，给予每只大鼠的粉末的总质量在 0.2 mg 到 1 mg 之间，取决于每种粉末的组成。从 Taconic Farms (Germantown, NY) 获得雄性 Sprague-Dawley 大鼠。在使用时，动物的平均体重为 386 g (± 5 g S.E.M.)。给予动物充足的食物和水。

利用吹入器 (PennCentury, Philadelphia, PA) 向大鼠的肺部送入粉末。将粉末转移至吹入器的样品室。然后，将吹入器的给药管通过口腔插入气管，并往前送，直至给药管的顶部离隆突 (carina) (第一个分叉) 约 1 厘米。来自吹入器样品室的用于运送粉末的空气体积为 3 mL，通过 10 mL 注射器给予。为了尽可能多地将粉末运送至大鼠体内，将注射器再次充满并排出的操作多进行两次，达到每剂量粉末总计排出三次空气。

通过皮下注射，将可注射的胰岛素制剂 Humulin L 给予大鼠，注射体积为 7.2 μL ，名义剂量为 25 μg 胰岛素。在给大鼠服药的前一天，将导管插入大鼠的颈静脉。在取样的时候，将血样从颈静脉导管中取出，并立即转移至 EDTA 包被的管子中。取样时间为给予粉末后的 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8 和 24 小时。在某些情况下，可以加入额外的取样时间 (12 小时)，和/或省略 24 小时的时间点。离心后，从血样中收集血浆。如果在收集后 24 小时内进行分析的话，就将血浆样品储存在 4℃；如果在收集后的 24 小时以后才进行分析的话，就将血浆样品储存在 -75℃。按上述方法测定血浆胰岛素浓度。

表 4 中列出了通过上述分析方法得到的血浆胰岛素水平。

表 4 中的体内释放数据表明，例如，与包含胰岛素和带正电的脂类（DPePC 和 DSePC）的粉末制剂相比，包含胰岛素和脂 DPPC 的粉末制剂（制剂 1 和制剂 13）具有更快的释放速度，而前面一种粉末制剂在 6 到 8 小时之间的水平持续较高。

含胰岛素制剂的体外分析

含有胰岛素的干粉制剂的体外释放，是按照 Gietz et al, in Eur. J. Pharm. Biopharm., 45:259-264 (1998) 中描述的方法进行的，其中做了几处改进。简单地说，向 20 mL 的带有螺旋帽的玻璃闪烁管（screw-capped glass scintillation vial）中，加入约 10 mg 的每一种下述粉末制剂或溶液：Humulin R、Humulin L 或 Humulin U；并通过聚苯乙烯搅拌棒，与 4 mL 热的（37℃）1% 琼脂糖溶液进行混合。然后，将得到的混合物分散至 1 mL 等分试样（aliquot）中，并装入一组（5 个）洁净的 20 mL 玻璃闪烁管中。将干粉在琼脂糖中的分散液放入闭光的干燥室中，室温下冷却使其凝胶化。在约 37℃ 下，在旋转摇床（orbital shaker）上进行释放研究。在预定的时间点上，除去每个管子中原来的释放介质（1.5 mL），并加入新鲜的释放介质（1.5 mL）。这些研究中常用的时间点是 5 分钟，以及 1、2、4、6 和 24 小时。所采用的释放介质由如下物质构成：20 mM 4-(2-羟乙基)-哌嗪-1-乙磺酸（HEPES），138 mM NaCl，0.5% Pluronic（Synperoic PE/F68；防止胰岛素在释放介质中纤维化）；pH 7.4。使用 Piece（Rockford, IL）蛋白质分析试剂盒（参见 Anal. Biochem., 150:76-85 (1985)），以控制胰岛素在释放介质中的浓度，该试剂盒中采用了已知浓度的胰岛素标准。

表 4 大鼠的血浆胰岛素水平

	血浆胰岛素浓度 ($\mu\text{U/mL}$) $\pm$ S.E.M.							
时间 (小时) ↓	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4	制剂 5	制剂 6	制 剂 13A	HumulinL
0	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.3 ± 0.2	5.7 ± 0.7	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
0.25	1256.4 ± 144.3	61.6 ± 22.5	98.5 ± 25.3	518.2 ± 179.2	240.8 ± 67.6	206.8 ± 35.1	1097.7 ± 247.5	269.1 ± 82.8
0.5	1335.8 ± 81.9	85.2 ± 21.7	136.7 ± 37.6	516.8 ± 190.9	326.2 ± 166.9	177.3 ± 7.8	893.5 ± 177.0	459.9 ± 91.6
1	859.0 ± 199.4	85.4 ± 17.6	173.0 ± 28.8	497.0 ± 93.9	157.3 ± 52.5	170.5 ± 32.9	582.5 ± 286.3	764.7 ± 178.8
2	648.6 ± 171.1	94.8 ± 25.0	158.3 ± 39.1	496.5 ± 104.9	167.7 ± 70.5	182.2 ± 75.0	208.5 ± 78.3	204.4 ± 36.7
4	277.6 ± 86.8	52.5 ± 9.1	98.0 ± 24.3	343.8 ± 66.7	144.8 ± 43.8	170.2 ± 56.3	34.9 ± 5.4	32.1 ± 22.6
6	104.0 ± 43.1	33.0 ± 10.7	58.7 ± 4.1	251.2 ± 68.4	95.7 ± 27.3	159.5 ± 43.4	12.3 ± 2.4	11.1 ± 7.5
8	54.4 ± 34.7	30.2 ± 8.1	42.5 ± 17.8	63.2 ± 16.5	52.5 ± 13.7	94.8 ± 23.5	5.2 ± 0.1	5.5 ± 2.1
12				17.2 ± 6.5				
24				5.0 ± 0.0	5.5 ± 0.3			

表 5 胰岛素的体外释放

制剂编号	6 小时时累计释放的胰岛素 %	24 小时时累计释放的胰岛素 %	24 小时时的最大释放量‡ (累计 %)	一级释放常数† (小时 ⁻¹)
Humulin R (溶液)	92.67 ± 0.36	94.88 ± 0.22	91.6 ± 5.42	1.0105 ± 0.2602
Humulin L (溶液)	19.43 ± 0.41	29.71 ± 0.28	36.7 ± 2.56	0.0924 ± 0.0183
Humulin U (溶液)	5.17 ± 0.18	12.65 ± 0.43	46.6 ± 27.0	0.0158 ± 0.0127
2	31.50 ± 0.33	47.52 ± 0.43	48.22 ± 0.46	0.1749 ± 0.0038
3	26.34 ± 0.71	37.49 ± 0.27	38.08 ± 0.72	0.1837 ± 0.0079
4	24.66 ± 0.20	31.58 ± 0.33	31.51 ± 1.14	0.2457 ± 0.0214
5	29.75 ± 0.17	35.28 ± 0.19	33.66 ± 2.48	0.4130 ± 0.0878
6	17.04 ± 0.71	24.71 ± 0.81	25.19 ± 0.52	0.1767 ± 0.0083
7	13.53 ± 0.19	19.12 ± 0.40	19.51 ± 0.48	0.1788 ± 0.0101
8	13.97 ± 0.27	17.81 ± 0.46	17.84 ± 0.55	0.2419 ± 0.0178
9	17.47 ± 0.38	22.17 ± 0.22	21.97 ± 0.64	0.2734 ± 0.0196
10	25.96 ± 0.31	34.94 ± 0.31	35.43 ± 0.90	0.2051 ± 0.0120
11	34.33 ± 0.51	47.21 ± 0.47	47.81 ± 0.85	0.1994 ± 0.0082
12	61.78 ± 0.33	68.56 ± 0.23	65.20 ± 3.34	0.5759 ± 0.0988
13	78.47 ± 0.40	85.75 ± 0.63	84.9 ± 3.81	0.5232 ± 0.0861

‡ 释放_(t) = 释放_(int) * (1 - e^{-k*t})

† 用作对照制剂

表 5 中总结了表 2 中包含胰岛素的粉末制剂的体外释放数据以及一级释放常数。

人体临床试验

下面描述了对具有独特空气动力学性质的新型吸入式工程化胰岛素所进行的人体临床试验，研究了其药代动力学 (PD) 性质、安全性以及耐受性。研究中使用 euglycaemic clamp 评价通过吸入器给予受试者的胰岛素的代谢活性。这种 clamp 可以将胰岛素给予正常的志愿者或糖尿病患者，而不会产生低血糖的危险，下面的文献中详细地描述了该技术：Heinemann et al., Metab. Res., 26:579-583 (1994); 以及 Clemens et al., Clin. Chem., 28: 1899-1904 (1982)。

将吸入型胰岛素的干粉制剂 (60 % DPPC, 30 % 胰岛素以及 10 % 柠檬酸) 与作用较快的赖脯胰岛素 (insulin lispro) 的商品化皮下 (s.c.) 注射液以及作用较快的常规可溶性胰岛素 s.c. 制剂进行比较。选择赖脯胰岛素是由于其起效迅速而且作用的持续时间较短。术语“吸入型胰岛素”、“胰岛素干粉”以及“AI”，在本文中是可以互换使用的。

选择吸入型胰岛素临床试验的受试者

下面所描述的临床试验是按照赫尔辛基-爱丁堡修订本宣言 2000 (Declaration of Helsinki, Edinburgh revision, 2000) 进行适当的医学考虑后进行的，同时也符合 ICH E6 Note for Guidance on Good Clinical Practice。在选择吸入型胰岛素临床试验的受试者时，采用了下面的标准。成年健康男性受试者，年龄在 18 到 45 岁之间，在最近的六个月内不吸烟。被选中的受试者一秒钟用力呼气体积 (FEV_1) > 预测体积的 80 %，体重指数 (body mass index)

为 21-27 kg/m²。此外，被选中的受试者愿意在进行 clamp 程序之前的 24 小时内停止剧烈的体育运动，并具有正常的(4.4 – 6.4 %)糖基化血红蛋白 (HbA_{1C})。

采用下面的标准来明确地排除某些受试者。具有肺病或糖尿病历史或证据的受试者被排除在外。现在或以前具有显著的医学病况 (significant medical condition) 或治疗的受试者也被排除在外。此外，在此前的 90 天内曾参加过药物研究的受试者，在 ECG (心电图) 上表现出显著的临床异常的受试者，以及在常规实验室血液检测中表现出显著的临床异常的受试者也被明确地排除在外。

临床研究的设计

对一个开放标记的 (open-label) 完全随机化的人群，进行三剂量的吸入型胰岛素交叉研究。在 5 个测试期 (分别为 3 至 14 天) 内，通过 euglycaemic clamp (clamp level 5.0 mmol/L，连续 i.v. 输注胰岛素 0.15 mU/kg/min) 12 小时，对研究中的受试者进行药代动力学性质的评估。在 120 分钟的基线期之后，给 12 名健康男性志愿者 (不吸烟，年龄为 28.9 ± 5.9 岁，BMI 23.5 ± 2.3 kg/m²) 服用 AI (84、168 以及 294 IU)、赖脯胰岛素 (IL) (15 IU) 或常规可溶性胰岛素 (RI) (15 IU)。对受试者进行培训，使其可以利用单步的呼吸致动的吸入器，通过一次较深的舒适的吸气进行吸入。

当操作在自动 euglycaemic clamp 的受控环境中进行时，受试者没有血糖过低的危险。

通过临床和实验室评估，对安全性和耐受性进行评价。在服药前会取出一部分血样，在服药后也会定期取出一部分血样，通

过与赖脯胰岛素和常规可溶性胰岛素进行对比，而对每一剂量药物的药代动力学进行评估。具体地说，从每一个受试者体内取出三个血样，用于常规安全性检测，如表 6 所示。此外，在每一个治疗日中，取出多达 21 个血样，每个样品的体积在 2 mL 到 3 mL 之间，用于葡萄糖、血清胰岛素和 C 肽的检测。C 肽是胰岛素的 C 链，对人体而言是内源性的。外源胰岛素中不含有 C 链。因此，通过测定受试者体内的 C 肽，可以得到受试者体内内源胰岛素的水平。在 4 周内取出的血样总体积不超过 500 mL。

表 6 每次访问所收集的血液体积

访问 (visit)	血样	血液体积/mL
访问 1	凝血测试	4
	血液学 (完整安全性图谱)	2
	生物化学 (完整安全性图谱)	2
	HbA _{1c} Contract	2
访问 2、3、4、5、6	血液学 (2 mL x 5 次访问)	10
	葡萄糖检测 (2 mL x 5 次访问)	10
	Euglycaemic clamp 2 mL/小时 (2 mL x 5 次访问 x 14 小时)	140
	研究药物为胰岛素的测试日 (3 mL x 1 次访问 x 15 个样品)	264
	C 肽 (7 个样品) 1*	45
访问 7	凝血测试	4
	生物化学 (完整安全性图谱)	2
	血液学 (完整安全性图谱)	2
血液总量		487

* 3 mL 中包括用于胰岛素和 C 肽样品的足够的血液

完整实验室安全性图谱 (full laboratory safety profile) 中包括血液学检测, 其中包括血红蛋白计数、红细胞计数、总白细胞计数以及血小板计数。如果 WBC (white blood cell) 结果为超过正常范围 10% 或更多, 那么要进行白细胞区别计数。也要测定部分促凝血酶原激酶时间 (Partial Thromboplastin Time) 以及国际标准化比例 (International Normalized Ratio, INR)。此外, 也要进行生物化学检测, 包括电解质 (钠、钾)、肌酸、总蛋白质、胆红素、丙氨酸转氨酶 (ALT)、gamma GT、碱性磷酸酶、脲浓度等。

研究程序

总体时间表和情况

受试者的时间表中包括: 同意, 筛选 (screening), 五个单元内测试期, 四个淘汰期 (washout periods) (单元外) 以及最终的评估。在被限制在单元内时, 以及在服药前的 24 小时内, 不允许进行剧烈的体育活动、吸烟或同时服用药物 (除非医学上要求如此)。从前一天的 22:00 点开始, 直到每个测试期结束, 受试者都需要禁食, 而且从服药前的 12 小时开始, 直到每个测试期结束, 受试者都不能喝咖啡。

筛选和初始评估

在访问 2 之前的 21 天之内, 要对受试者进行筛选, 以便确定参加研究的人选。在受试者表示同意的时候即进入研究。然后, 给受试者分配一个受试者号码并进行随机化。在该评估中, 要按照如下参数进行并记录受试者的资格, 从而对受试者的资格进行评估: 研究中可选/不可选的标准; 人口统计学参数 (生日、性别等); 常规既往病史; 身体检查结果, 包括生命指征、身高和体重; ECG 结果; 血液学、生物化学和尿液分析结果; 药尿检查;

尿继续检查 (urine continue test) 结果; HbA_{1c} 水平; 同时服用的药物 (最近 14 天内的处方药 (POM) 以及最近 2 天内的 OTC); 不良事件; 以及基线肺功能检测。

身体检查由一般性检查构成, 其中包括在初始评估中测定的体重以及身高。生命指征检测包括仰卧血压、心率、呼吸频率以及耳温, 在仰卧位休息 5 分钟后测定。

对每位受试者的相关病史和手术史进行记录。针对每种医学病况是否正在进行也要做出指示。

作为对进入研究的受试者筛选工作的另一个组成部分, 筛选中要测定 12 导联心电图并进行评价, 如果在临床上认为合适的话。

作为受试者筛选工作的一个组成部分, 尿液分析也要进行。尿液分析涉及蛋白质、血液、葡萄糖和酮类的半定量 (dipstick) 分析。

作为受试者筛选工作的一个组成部分, 也要对滥用药物进行尿检, 其中包括: 大麻、巴比妥酸盐、安非他明、苯二氮、吩噻嗪以及可卡因。尿检中也包括检测可铁宁。

通过 IKFE (Mainz, Germany) 进行胰岛素和 C 肽样品的分析。在 FOCUS Clinical Drug Development (GmbH, Neuss, Germany) 进行常规安全性测试并检测 HbA_{1c} (只在访问 1 进行评价)。在 Profil (Neuss, Germany) 进行血糖检测。

使用手控肺活量计 (Schiller Spirovit SP 200) 测定肺功能。对一秒钟用力呼气体积 (FEV₁)、用力肺活量 (forced vital capacity) (FVC) 和用力呼气中期流速 (FEF_{25-75%}) 的实际值和预期值进行校正。

吸入程序

让受试者练习吸入程序，以便使受试者熟悉该程序，在每次吸入胰岛素之前，都要重复进行该练习。具体地说，对受试者进行培训，使其可以利用吸入器，通过一次较深的舒适的吸气进行吸入。在马上就要使用之前，研究人员从 blister card 中取出一个胶囊，并将其放入吸入器中。对每中分配的药剂进行吸入给药的剂量时间进行记录。

测试期，包括给予所研究的药物

在将受试者与一个人工装置（Biostator）相连接以建立 euglycaemic 葡萄糖压片钳之前的较短时间内，进行下述基线评估：参加筛选以来身体状况以及生命指征（仰卧血压、心率、呼吸频率以及耳温）的改变；血液学；自从上次访问以来的不良事件以及肺功能测试。

剂量给药程序

T = -2 小时时，测试期开始，此时受试者的血糖水平受到自动化 euglycaemic 葡萄糖压片钳的控制。该程序从 T = -2 小时持续至 T = 0。

将受试者进行随机化以接收吸入的胰岛素。受试者在 T = -2 小时至 T = 0 之间，按上面所描述的方法进行吸入程序。

在时刻 T = 0 时，受试者根据随机化的指示，接受皮下注射的 15 IU 赖脯胰岛素、常规可溶性胰岛素或一剂吸入型胰岛素。

当受试者接受吸入型胰岛素时，在马上就要使用之前，研究人员从 blister card 中取出一个胶囊（相当于 42 IU/胶囊），并将

其放入吸入器中。受试者必须已经放松，并正常呼吸至少 5 次，以接受所研究的药物的治疗。在正常呼气的末期，吸入器的吹口被放置在嘴中。受试者通过嘴吸气，进行较深的、舒适的吸气，直至他感到肺部已经充满。然后，该患者屏住呼吸约 5 秒钟（通过慢慢数到 5）。

重复进行该程序，直到已经吸入了正确数目的胶囊，以便获得目标胰岛素剂量（参见表 7）。对每个胶囊只允许进行一次呼吸。从吸入第一个胶囊开始（ $T = 0$ ），至吸入最后一个胶囊为止，所用的时间应进行记录。

表 7 预期剂量所需的胶囊数目

剂量 F04-006 IU	胶囊数目
42	1
84	2
126	3
168	4
210	5
252	6
294	7

在下列时刻提取血样，用于检测胰岛素水平：时刻 $T = -2$ 小时， -1 小时， 0 （在给予胰岛素之前）， 5 、 10 、 20 、 30 、 45 分钟， 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 小时，然后每小时取一次，直到 $T = 12$ 小时。在 $T = -2$ 、 0 、 1 、 2 、 4 、 8 和 12 小时提取血样，用于检测 C 肽。

在离开单元之前，进行肺功能测试。如果临床上需要，也可以进行心电图以及对脉和电解质提取血样。

不给予所研究的药物情况下的测试期

在不给予所研究的药物的测试期内，这些访问的程序和评价都按照上述方法进行，但是其中不给予所研究的药物。此外，用于测定胰岛素水平的血样不按上述方法收集，而是在下述时刻进行收集：时刻 $T = -2$ 小时， -1 小时， 0 小时（在给予所研究的药物的测试期内，在该时刻将给予胰岛素），然后每小时取一次，直到 $T = 12$ 小时。在 $T = -2$ 、 0 、 1 、 2 、 4 、 8 和 12 小时提取血样，用于检测 C 肽。在该次访问时不进行肺功能测试。

最终检测

进行下述最终评估并进行记录：身体检查和生命指征；血液学、生物化学和尿液分析结果；同时报告的不良事件汇总；同时服用的药物；临床上如果需要的话，ECG；肺功能测试；以及研究完成状态。

药代动力学

样品处理

按照下述方法处理用于胰岛素和 C 肽检测的样品。采集血样后，将血样置于室温使其凝结，放置至少 30 分钟，但不超过 1 小时。在室温下进行离心（ 2000 g ，10 分钟），然后将血清冰冻储存在带有螺旋帽的聚丙烯管中。每一个具体受试者的样品都储存在专门用于该受试者的容器中。利用 Coat-CoatTM Insulin RIA KIT (Diagnostic Products Corporation TK1N2)，检测每名受试者的胰岛素水平。利用 Human C-peptide RIA (radio-immuno assay)

Kit (Linco Research Inc. HCP 20K) 测定 C 肽水平。利用现有技术中公知的程序来表征血清中胰岛素和 C 肽的浓度 - 时间曲线。

所研究药物的规定单位剂量

研究中所用的药物为：吸入型胰岛素粉末（相当于 42 IU/胶囊的重组人胰岛素）；赖脯胰岛素以及常规可溶性胰岛素（1.5 mL 药筒，每个药筒中含有 100 IU/mL，其中 0.150 mL 用于给药）。用于吸入的胰岛素由本申请人制造并提供，为胶囊形式，其中含有相当于 42 IU/胶囊的重组人胰岛素粉末药物。吸入型胰岛素储存于 25 以下。

结果

如图 1 所示，接受吸入型胰岛素的受试者的葡萄糖输入速度是剂量依赖的。此外，图 2 示出了接受 168 IU 的吸入型胰岛素、赖脯胰岛素或常规可溶性胰岛素的受试者的葡萄糖输入速度。168 IU 吸入型胰岛素的药代动力学性质与赖脯胰岛素和常规可溶性胰岛素的药代动力学性质是相当的。

针对上述研究中所涉及的受试者，也评价了吸入型胰岛素、赖脯胰岛素和常规可溶性胰岛素的起效（onset action）。针对每一个受试者都计算了起效，以 $T_{\max 50\%}$ （单位分钟）来描述。如图 3 所示，与赖脯胰岛素和常规可溶性胰岛素相比，各种剂量的吸入型胰岛素制剂的 $T_{\max 50\%}$ 都更低一些。具体地说，与皮下注射的胰岛素制剂赖脯胰岛素（IL）和常规可溶性胰岛素（RI）相比，AI 表现出更快的起效（早期 $T_{\max 50\%}$ [分钟]：29（84 IU），35（168 IU），33（294 IU），41（IL）和 70（RI）[与 RI 相比，AI（各种剂量）的 $p < 0.01$]）。因此，这些结果表明，吸入型胰岛素制剂具有更快的起效。

此外，在研究中，针对每一名受试者都评估了 $\text{GIR-AUC}_{0-3 \text{ 小时}}$ 。在给药后的第一个三小时（与一顿饭有关的常见时间段）内，84 IU 剂量的吸入型胰岛素表现出与常规胰岛素最为接近的 $\text{GIR-AUC}_{0-3 \text{ 小时}}$ ，如图 4 所示。

将 84 IU 吸入型胰岛素的生物效能与赖脯胰岛素和常规可溶性胰岛素的生物效能进行比较。如图 5 所示，在给药后的前三小时内，84 IU 吸入型胰岛素的生物效能相对于常规可溶性胰岛素为 22%，相对于赖脯胰岛素为 14%。在给药后八小时，吸入型胰岛素（84 IU）的生物效能相对于常规可溶性胰岛素的生物效能为 16%，相对于赖脯胰岛素为 18%。

针对每种制剂也计算了 GIR-AUC ，作为时间的函数进行评估，如图 6 所示。

对三种不同浓度的吸入型胰岛素（84 IU、168 IU 和 294 IU 的自然对数）的效果也进行了评价，针对它们在时刻 0 到服药后 10 小时这一时间段内，对每一位受试者的葡萄糖输入速度（ $\text{GIR-AUC}_{0-10 \text{ 小时}}$ 的自然对数）的影响进行评价。该分析揭示了在所研究的吸入型胰岛素浓度范围内的线性剂量反应，如图 7 所示。

最后，针对本研究中所给予的药物的药代动力学性质在不同受试者之间的差异，也通过计算所给予的每种药物的差异系数（variation coefficient）进行了检查。如表 8 所示，基于口腔吸入胰岛素后的 $\text{AUC}_{0-10 \text{ 小时}}$ 的受试者之间的差异表明，其差异系数（CV）与通过皮下注射给药的胰岛素很相似。此外，同一受试者对各种剂量的吸入型胰岛素的 CV 的估计值为 $\text{AUC}_{0-3 \text{ 小时}}$ 20%， $\text{AUC}_{0-10 \text{ 小时}}$ 19%。这些估计值是通过利用对数转换的 AUC 数据的线性混合模型而得到的，其中，受试者为随机效果（random effect），吸入型胰岛素的剂量为固定效果（fixed effect）。

表 8 药物在不同受试者之间的差异

所给予的药物	受试者之间的差异系数(%)
15 IU 赖脯胰岛素	44
15 IU 常规可溶性胰岛素	45
84 IU 吸入型胰岛素	48
168 IU 吸入型胰岛素	41
294 IU 吸入型胰岛素	35

尽管本发明是参照其优选实施例来具体描述的，但本领域的技术人员应该理解，在不脱离由所附权利要求限定的本发明的范围的情况下，可以对其进行形式和细节的各种修改。

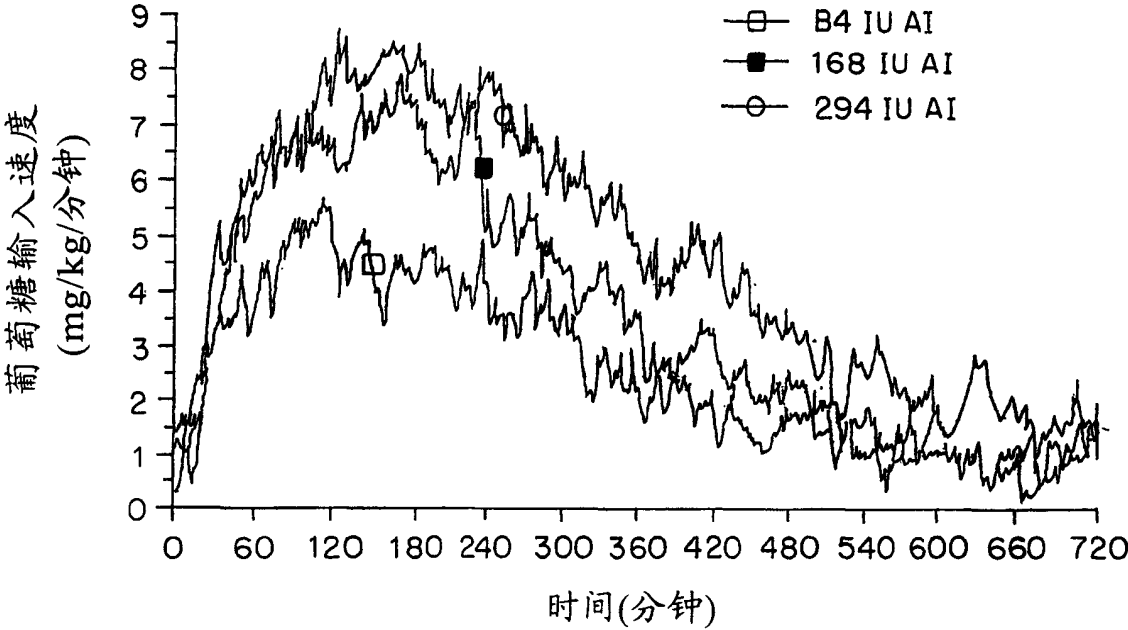


图 1

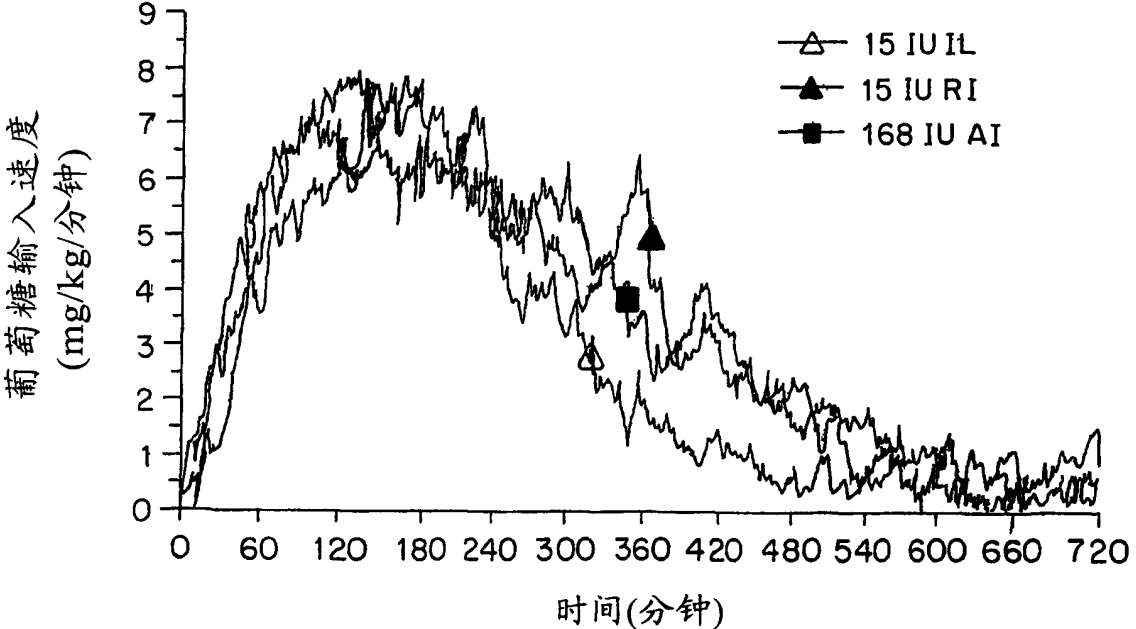


图 2

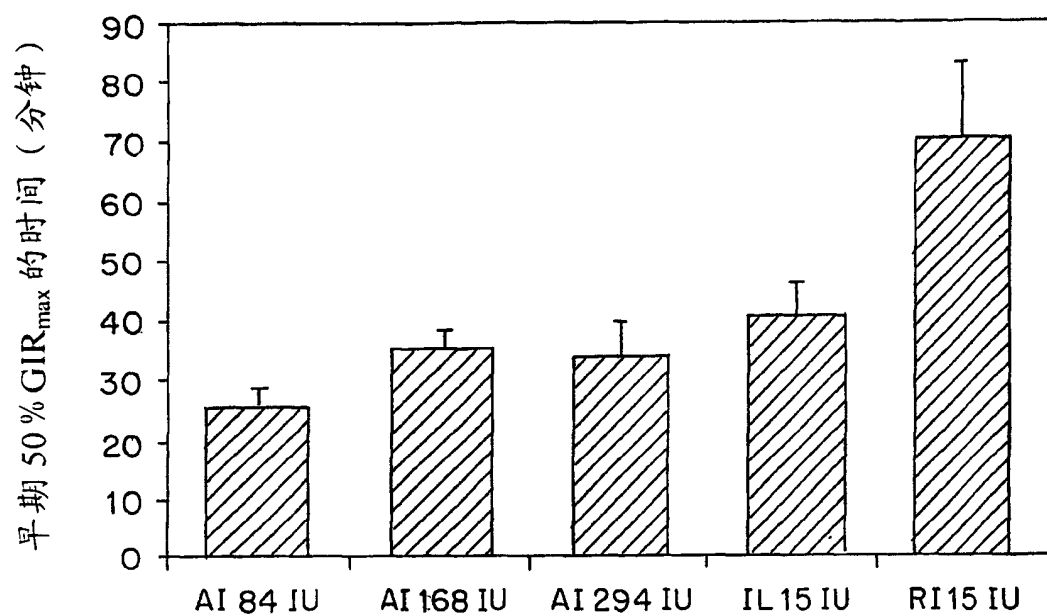


图 3

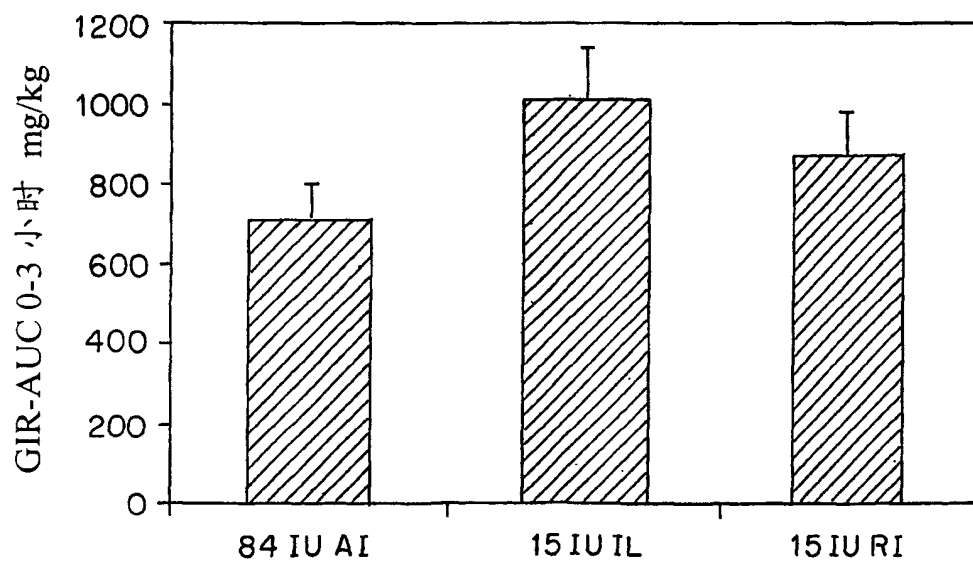


图 4

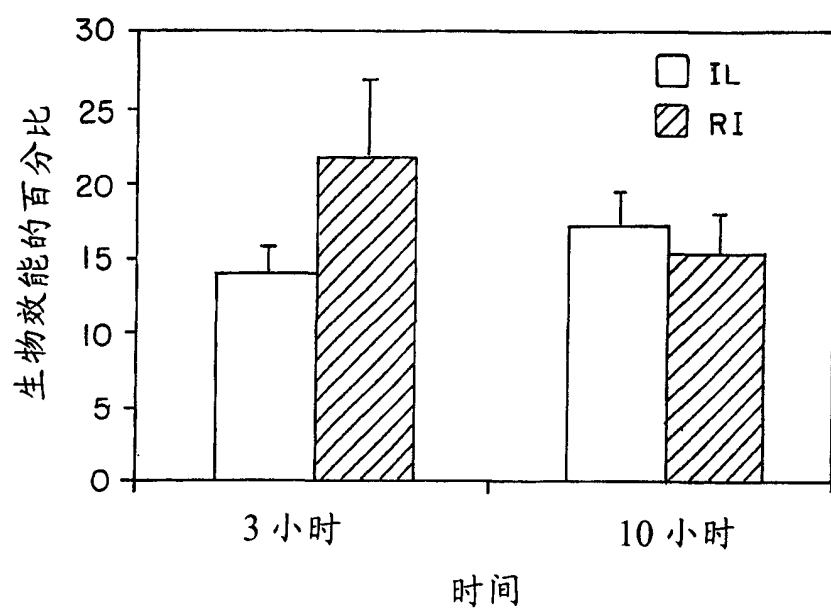


图 5

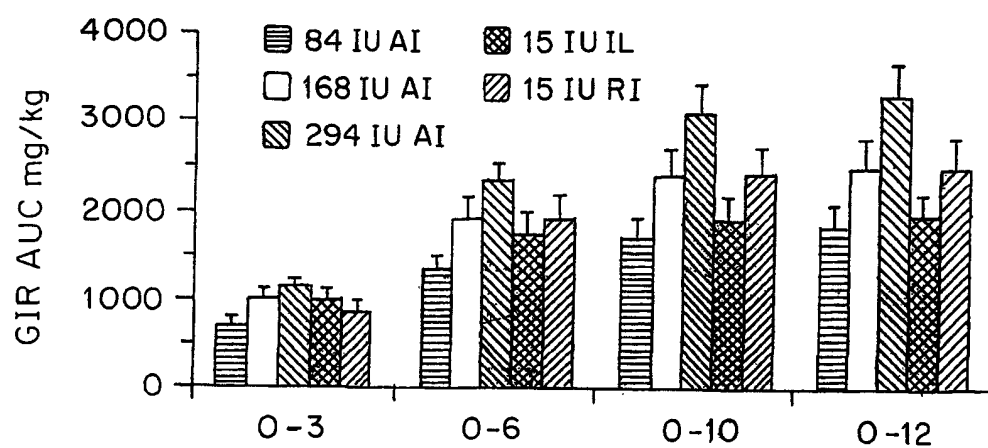


图 6

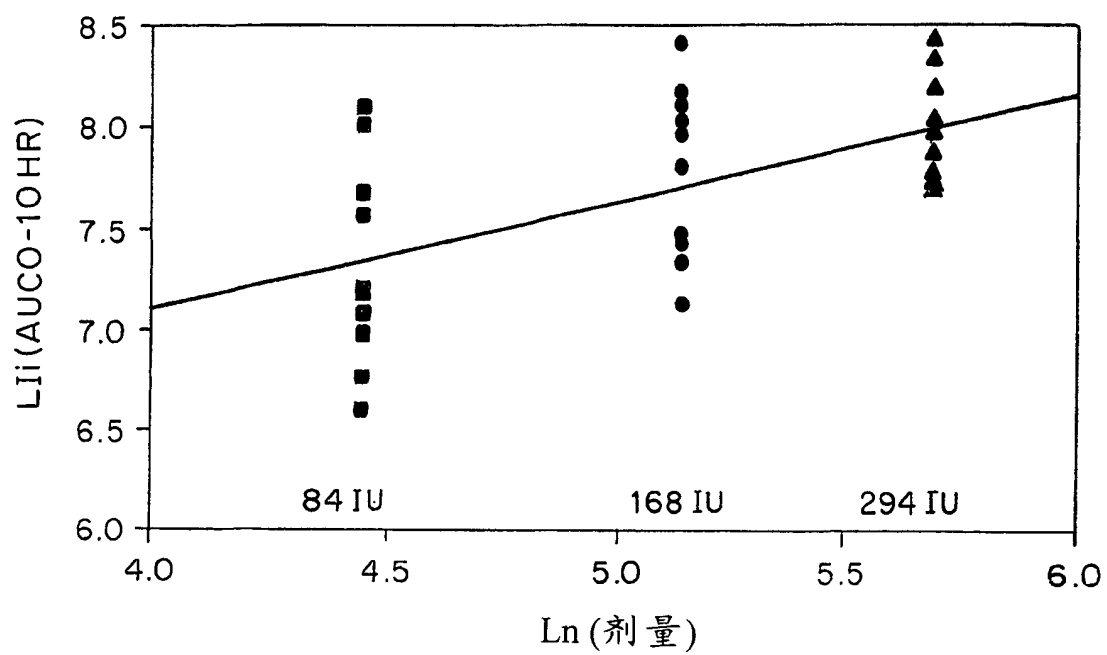


图 7