



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102228676 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 02

(21) 申请号 201110189767. X

(22) 申请日 2011. 07. 07

(71) 申请人 白求恩医科大学制药厂

地址 130011 吉林省长春市高新区创新路  
358 号

(72) 发明人 王巍

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有  
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

A61K 38/01 (2006. 01)

A61K 47/34 (2006. 01)

C12P 21/06 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61K 31/198 (2006. 01)

A61K 31/375 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种肝水解肽注射液药物组合物

(57) 摘要

本发明公开一种肝水解肽注射液药物组合物,由肝水解肽溶液、维生素 C、门冬氨酸钾镁注射液、聚乙二醇 200 制成,克服了“肝水解肽注射液”的活力刺激指数较低,治疗效果有限的缺欠。本发明还提供了该药物的制备方法,工艺简单,适用于工业化生产。

1. 一种肝水解肽注射液药物组合物,其特征在于是由以下原料制成的:

浓度为 9.2~12.2mg/ml 的肝水解肽溶液 1000ml、维生素 C 2~5g、门冬氨酸钾镁注射液 20~30ml、聚乙二醇 200 10~20g;

所述的门冬氨酸钾镁注射液为每 1ml 含 L- 门冬氨酸 85mg :钾 11.4mg :4.2mg。

2. 权利要求 1 所述肝水解肽注射液组合物的制备方法,包括如下步骤:

1) 肝水解肽溶液

牛或猪的肝脏,去除结缔组织后,按 0.83~0.85 :1 的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至 37~40℃,用 HCL 调 PH 值为 2.0~2.5,按 3g/ 升加入胃蛋白酶,水解 10~15 小时,水解液用 NaOH 调节 PH 值为 6.2~6.4,加 1g/ 升硅藻土,90℃,加热 30 分钟,小型板框压滤机压滤,用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤,8000 分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为 9.2~12.2mg/ml ;

2) 在步骤 1 制备的肝水解肽溶液 1000ml 中加入 2~5g 的维生素 C、加入 20~30ml 的门冬氨酸钾镁注射液、加入 10~20g 的聚乙二醇 200,分装后 121℃ 高压灭菌 20 分钟,得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。

## 一种肝水解肽注射液药物组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种治疗肝炎、肝硬化疾病的药物组合物,进一步讲是提供了一种肝水解肽注射液药物组合物,属于生化药学技术领域。

### 背景技术

[0002] 现有的“肝水解肽注射液”为我国处方类药物,肌肉注射,用于慢性肝炎、肝硬化等疾病的辅助治疗,是由健康牛、猪的肝脏经酶水解提取制得的含有多肽类、核酸类、氨基酸类物质的无菌水溶液。肝水解肽能促进蛋白质合成,减少蛋白质分解,促进正常肝细胞的增殖和再生,对四氯化碳诱导的肝细胞损伤有较好的保护作用,降低谷丙转氨酶,促进病变组织恢复;但该药物对于肝炎、肝硬化疾病的治疗效果还是非常有限,根据国家药品标准中促肝细胞生长素活性测定法(MTT法)测定,肝水解肽注射液具有体外促进人肝细胞生长的活力,但活力刺激指数为仅为2.9左右。

### 发明内容

[0003] 本发明公开一种肝水解肽注射液药物组合物,克服了“肝水解肽注射液”的活力刺激指数较低,治疗效果有限的缺欠。本发明还提供了该药物的制备方法,工艺简单,适用于工业化生产。

[0004] 本发明提供的肝水解肽注射液组合物,其特征是由以下原料制成的:

浓度为9.2~12.2mg/ml的肝水解肽溶液1000ml、维生素C 2~5g、门冬氨酸钾镁注射液20~30ml、聚乙二醇200 10~20g。

[0005] 所述的门冬氨酸钾镁注射液为每1ml含L-门冬氨酸85mg:钾11.4mg:4.2mg。

[0006] 本发明提供肝水解肽注射液组合物的制备方法,包括如下步骤:

#### 1、肝水解肽溶液

牛或猪的肝脏,去除结缔组织后,按0.83~0.85:1的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至37~40℃,用HCL调PH值为2.0~2.5,按3g/升加入胃蛋白酶,水解10~15小时,水解液用NaOH调节PH值为6.2~6.4,加1g/升硅藻土,90℃,加热30分钟,小型板框压滤机压滤,用0.45μm微孔过滤膜过滤,8000分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为9.2~12.2mg/ml;

2、在步骤1制备的肝水解肽溶液1000ml,加入2~5g的维生素C,加入20~30ml的门冬氨酸钾镁注射液,加入10~20g的聚乙二醇200,分装后121℃高压灭菌20分钟,经检验合格得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。

[0007] 以下实验表明本发明药物体外促进人肝细胞生长活力大为提高:

实验方法:促肝细胞生长素溶液国家药品标准:促肝细胞生长素活性测定法(MTT法,标准编号:WS-10001-(HD-0860)-2002)。

[0008] 试验样品

#### 1.1 供试品:

原配方：肝水解肽溶液，含多肽 11 mg/ml。

[0009] 维生素 C：用 RPMI-1640 培养液制成的每 1ml 中含维生素 C 50  $\mu$ g 的溶液。

[0010] 门冬氨酸钾镁：用 RPMI-1640 培养液制成的每 1ml 中含 L- 门冬氨酸 25.5  $\mu$ g、钾 3.42  $\mu$ g、镁 1.26  $\mu$ g 的溶液。

[0011] 实施例 1 制剂；

实施例 2 制剂；

实施例 3 制剂；

实施例 4 制剂；

1.2 对照品：注射用促肝细胞生长素，规格为 20mg

2. 材料

2.1 仪器：CO<sub>2</sub> 培养箱、水平台式离心机、酶标仪、甩板机、细胞培养瓶、细胞培养板、一次性针头滤器。

2.2 试剂：

氯化钠、氯化钾、无水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、RPMI-1640 MEDIUM、碳酸氢钠、盐酸、氢氧化钠、小牛血清、胰蛋白酶、EDTA 二钠、MTT、二甲基亚砜、人肝细胞株。

[0012] 方法

3.1 试剂的配制：

3.1.1 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.3) 取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.2g、磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1.15g 及磷酸二氢钾 0.2g，加超纯水 1000ml 溶解后，高压灭菌。

[0013] 3.1.2 RPMI-1640 培养液 取碳酸氢钠 2.00g 及 RPMI-1640 10.0g 加超纯水约 800ml 溶解后，用 1mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 6.9，加超纯水稀释至 1000ml，过滤除菌。

[0014] 3.1.3 10% 小牛血清培养液 取上述 RPMI-1640 培养液 900ml，加已灭活的新生小牛血清 100ml。0.25% 胰蛋白酶 - 乙二胺四醋酸二钠消化液取 0.25g 胰蛋白酶及 0.02g 乙二胺四醋酸二钠，加 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 100ml 溶解后，用 5.6% 碳酸氢钠调节 pH 值至 7.2，过滤除菌，-20℃ 保存。

[0015] 3.1.4 噻唑蓝 (MTT) 溶液 取 MTT 50mg，加 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 10ml 溶解后，过滤除菌（保存于冷处，使用不超过二周）

3.2 测定方法：

3.2.1 供试品溶液的制备 取供试品适量，用 RPMI-1640 培养液制成每 1ml 中含多肽 100  $\mu$ g 的溶液。

[0016] 3.2.2 测定法：用 10% 小牛血清培养液培养 SMMC-7721 细胞至对数增长期，用 0.25% 胰蛋白酶 - 乙二胺四醋酸二钠消化液消化，加 10% 小牛血清培养液稀释至每 1ml 中含  $(2.5 \times 10^4) \sim (5 \times 10^4)$  个细胞，将上述细胞悬液在 96 孔细胞培养板上铺板，每孔 100  $\mu$ l，其中留 3 孔加 10% 小牛血清培养液 100  $\mu$ l 作为空白对照，置 37℃，5% 二氧化碳饱和水汽培养箱中培养 3~4 小时使其贴壁。供试品组，每孔加供试品溶液 100  $\mu$ l，每批供试品均做 3 孔，细胞对照组和空白对照组每孔分别加 RPMI-1640 培养液 100  $\mu$ l，置 37℃，5% 二氧化碳饱和水汽培养箱中培养 48 小时，结束培养前 4 小时取出培养板，吸去培养液，每孔加入 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.3) 洗一次，然后再在每孔中加入上述磷酸盐缓冲液 (pH7.3) 100  $\mu$ l 和 MTT 溶液 20  $\mu$ l，继续培养。培养结束后，吸出培养液，每孔加入 100  $\mu$ l

二甲基亚砜,摇匀,在酶标仪上以 550nm 的波长处分别测定其吸收度 A 值。

[0017]

供试品组 3 孔吸收度平均值 (A<[T]> 一空白对照组 3 孔吸收度平均值 (A<[O]>)

刺激指数=

对照组 3 孔吸收度平均值 (A<[R]> 一空白对照组 3 孔吸收度平均值 (A<[O]>)

4. 试验结果：

肝水解肽注射液活力测定

品名	平均 OD 值	S I (活力刺激指数)
注射用促肝细胞生长素	1.016	4.542
原配方	0.677	2.913
维生素 C	0.089	0.388
门冬氨酸钾镁	0.078	0.336
实施例 1	1.210	5.238
实施例 2	1.085	4.735
实施例 3	1.312	5.748
实施例 4	1.181	5.170
实施例平均	1.197	5.223

结论：本发明组合配方药品体外促进人肝细胞生长活力大为提高。

[0018] 在本发明中,维生素 C 作为抗氧剂阻止了肝水解肽中活性成份在成品高温灭菌中的破坏,维生素 C 本身亦具有促进肝细胞的修复与再生的作用;门冬氨酸钾镁是改善肝功能的药品,可加速肝细胞三羧酸循环;聚乙二醇具有良好的生物相容性和两亲性,聚乙二醇 200 可使肝水解肽原料提取过程中被破坏的带有活性的疏水性基团的多肽结构得以伸展,也可以阻止肝水解肽中活性成份在成品高温灭菌中的破坏,从而发挥促肝细胞生长的功能;抗氧剂维生素 C 和助溶剂聚乙二醇 200 也使成品的色泽更好、稳定性大大提高。试验结果表明本发明组合物体外促进人肝细胞生长的活力刺激指数远远大于肝水解肽和维生素 C、门冬氨酸钾镁体外单独试验促进人肝细胞生长的活力刺激指数。

[0019] 本发明的积极效果在于：将肝水解肽溶液与维生素 C、门冬氨酸钾镁注射液及聚乙二醇 200 有机的结合配伍,发挥了它们的协同作用并远远大于它们每个药物的单独作用之和,药品在体外能促进人肝细胞生长,促进人肝细胞生长的活力刺激指数显著提高,根据国家药品标准中促肝细胞生长素活性测定法 (MTT 法) 测定,本发明组合物活力刺激指数为 5.2 左右,远远大于单方“肝水解肽注射液”的活力刺激指数 2.9,可以成为一种新的治疗肝炎、肝硬化疾病的药物组合物,具有明显疗效作用。

[0020] 具体实施方式：

为了便于理解本发明,特例举以下 4 个实施例,其作用被理解为是对本发明的阐释而非对本发明的任何形式的限制。

[0021] 实施例 1

1、肝水解肽溶液

牛的肝脏,去除结缔组织后,按 0.85 :1 的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至 37~40℃,用 HCL 调 PH 值为 2.0~2.5,按 3g/ 升加入胃蛋白酶,水解 10 小时,水解液用 NaOH 调节 PH 值为 6.2~6.4,加 1g/ 升硅藻土,90℃,加热 30 分钟,小型板框压滤机压滤,用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤,8000 分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为 9.2~12.2mg/ml。

[0022] 2、前面得到的肝水解肽溶液 1000ml,加入 5g 的维生素 C,加入 30ml 的门冬氨酸钾镁注射液,加入 15g 的聚乙二醇 200,分装后 121℃ 高压灭菌 30 分钟,经检验合格得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。

#### [0023] 实施例 2

##### 1、肝水解肽溶液

牛的肝脏,去除结缔组织后,按 0.85 :1 的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至 37~40℃,用 HCL 调 PH 值为 2.0~2.5,按 3g/ 升加入胃蛋白酶,水解 10 小时,水解液用 NaOH 调节 PH 值为 6.2~6.4,加 1g/ 升硅藻土,90℃,加热 30 分钟,小型板框压滤机压滤,用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤,8000 分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为 9.2~12.2mg/ml。

[0024] 2、前面得到的肝水解肽溶液 1000ml,加入 2g 的维生素 C,加入 20ml 的门冬氨酸钾镁注射液,加入 10g 的聚乙二醇 200,分装后 121℃ 高压灭菌 30 分钟,经检验合格得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。

#### [0025] 实施例 3

##### 1、肝水解肽溶液

牛的肝脏,去除结缔组织后,按 0.85 :1 的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至 37~40℃,用 HCL 调 PH 值为 2.0~2.5,按 3g/ 升加入胃蛋白酶,水解 10 小时,水解液用 NaOH 调节 PH 值为 6.2~6.4,加 1g/ 升硅藻土,90℃,加热 30 分钟,小型板框压滤机压滤,用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤,8000 分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为 9.2~12.2mg/ml。

[0026] 2、前面得到的肝水解肽溶液 1000ml,加入 5g 的维生素 C,加入 25ml 的门冬氨酸钾镁注射液,加入 20g 的聚乙二醇 200,分装后 121℃ 高压灭菌 30 分钟,经检验合格得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。

#### [0027] 实施例 4

##### 1、肝水解肽溶液

牛的肝脏,去除结缔组织后,按 0.85 :1 的重量份数与注射用水混合后,用高速组织捣碎机匀浆,升温至 37~40℃,用 HCL 调 PH 值为 2.0~2.5,按 3g/ 升加入胃蛋白酶,水解 10 小时,水解液用 NaOH 调节 PH 值为 6.2~6.4,加 1g/ 升硅藻土,90℃,加热 30 分钟,小型板框压滤机压滤,用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤,8000 分子量超滤膜超滤得肝水解肽溶液,测定多肽含量,加注射用水调整溶液多肽浓度为 9.2~12.2mg/ml。

[0028] 2、前面得到的肝水解肽溶液 1000ml,加入 3g 的维生素 C,加入 27ml 的门冬氨酸钾镁注射液,加入 13g 的聚乙二醇 200,分装后 121℃ 高压灭菌 30 分钟,经检验合格得肝水解肽注射液组合物成品药物制剂。