

日夜两用生长激素微针贴片的制备及体外评价

游嘉欢^{1,2}, 韩金鹏¹, 傅君芬^{3*}, 张宇琪^{1,4*}, 顾臻^{1,5,6,7,8*} (1.浙江大学药学院, 浙江省先进递药系统重点实验室, 杭州 310058; 2.沈阳药科大学无涯创新学院, 沈阳 110016; 3.浙江大学医学院附属儿童医院内分泌科, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 杭州 310003; 4.浙江大学医学院附属第二医院烧伤与创面修复科, 杭州 310009; 5.浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科, 杭州 310016; 6.浙江大学金华研究院, 浙江 金华 321299; 7.浙江大学医学中心, 浙江省系统与精准医学实验室, 良渚实验室, 杭州 311121; 8.浙江大学高分子科学与工程学系, 高分子合成与功能构造教育部重点实验室, 杭州 310027)

摘要: 目的 制备日夜两用生长激素微针贴片, 模拟人体生理状态下内源性生长激素分泌的昼夜差异, 实现生长激素给药时间和用量的优化, 同时有效减轻皮下注射给药疼痛感, 提高患者使用依从性。方法 采用铸膜法制备微针贴片, 通过光学显微镜和扫描电子显微镜观察微针表面形貌。经体外释放试验确定含生长激素微针制备的最佳工艺条件, 包括优化紫外交联时间和交联剂含量。通过微针力学强度测试和体外透皮试验验证微针贴片有效穿透皮肤的可行性, 通过圆二色光谱测定药物的稳定性。通过调试负载不同剂量生长激素制备日用和夜用微针贴片。结果 在显微镜下观察到微针排列整齐, 针体完整、尖锐, 微针在药物释放前后形貌无明显差异。工艺优化结果表明, 当紫外交联时间为 7 min, 交联剂用量为 1.5% 时, 微针贴片可以有效穿透离体大鼠皮肤, 同时实现了生长激素在 12 h 内稳定释放, 且微针释放出的蛋白药物构象无明显变化。通过在针体中负载不同剂量生长激素, 制备了日用和夜用生长激素微针贴片。结论 本研究制备的微针能够顺应生理状态下生长激素分泌的昼夜差异, 实现了适宜时间释放适量生长激素的目标, 未来可进一步优化微针药物负载量以满足不同患者的实际使用需求, 以期实现个体化治疗。

关键词: 药物递送; 生长激素; 微针; 经皮递送; 日夜两用

中图分类号: R283.6 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)08-1006-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.08.001

引用本文: 游嘉欢, 韩金鹏, 傅君芬, 等. 日夜两用生长激素微针贴片的制备及体外评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(8): 1006-1012.

Microneedle Patch for Daytime and Nighttime Transdermal Delivery of Growth Hormone

YOU Jiahuan^{1,2}, HAN Jinpeng¹, FU Junfen^{3*}, ZHANG Yuqi^{1,4*}, GU Zhen^{1,5,6,7,8*} (1.Key Laboratory for Advanced Drug Delivery Systems of Zhejiang Province, College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Wuyu College of Innovation, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3.Department of Endocrinology, The Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, Hangzhou 310003, China; 4.Department of Burns and Wound Repair, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; 5.Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China; 6.Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321299, China; 7.Zhejiang Laboratory of Systems & Precision Medicine, Liangzhu Laboratory, Zhejiang University Medical Center, Hangzhou 311121, China; 8.MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design microneedle patches for daytime and nighttime administration of growth hormone to stimulate the circadian rhythm of endogenous growth hormone secretion under human physiological state, effectively alleviate the pain of subcutaneous injection and improve the compliance of patients. **METHODS** Microneedle patches were prepared by the casting method. The surface morphology of microneedles was observed by the optical microscope and scanning electron microscope. The optimum process conditions for the preparation of microneedles were determined by *in vitro* release experiments, including optimizing the UV irradiation duration and the content of the crosslinking agent. The mechanical strength test and *ex vivo* penetration experiment were applied to verify whether the microneedles can effectively penetrate the skin and achieve transdermal drug delivery. The biostability of the protein drug was determined by the circular dichroism spectroscopy.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2021FZZX001-47); 转化医学国家重大科技基础设施(上海)开放课题项目(TMSK-2021-410)

作者简介: 游嘉欢, 女 E-mail: youjiahuan2022@126.com *通信作者: 顾臻, 男, 博士, 教授 E-mail: guzhen@zju.edu.cn 张宇琪, 女, 博士, 研究员 E-mail: yqzhang21@zju.edu.cn 傅君芬, 女, 博士, 教授 E-mail: fjf68@zju.edu.cn

Two types of microneedle patches for daytime and nighttime administration respectively were assessed by loading different doses of growth hormone. **RESULTS** The microneedles were orderly arranged with the complete and sharp needles observed by the microscope, and there was insignificant morphology change after drug release. Through the optimization of process conditions, when the UV irradiation duration was 7 min and the content of the crosslinking agent was 1.5%, the microneedle patch could effectively penetrate the rat skin and realize the stable release of growth hormone within 12 h, and the conformational change in the released protein drug was insignificant. By loading different doses of growth hormone into the microneedle patches, daytime and nighttime dosing patches had been prepared. **CONCLUSION** In this study, the daytime and nighttime microneedle patches loading different dosages of growth hormone were prepared, which can comply with the circadian rhythm of growth hormone secretion in human physiological state, optimize the relationship between the administration time and dose of growth hormone, and realize on-demand releasing of growth hormone. In the future, the drug loading of microneedle patches can be further optimized to meet the personalized needs of people and realize individualized treatment.

KEYWORDS: drug delivery; growth hormone; microneedle; transdermal delivery; daytime and nighttime dosing

人生长激素(human growth hormone, hGH)是在人类脑垂体前叶中由生长激素细胞合成、储存和分泌的一种肽类激素,能通过作用于生长激素受体或激活胰岛素样生长因子的转录而发挥生理作用,促进人体生长发育,并调节糖类、脂肪、蛋白质、矿物质等代谢^[1-2]。hGH在生理状态下分泌有显著的昼夜节律性^[3-4],夜晚分泌总量约为日间总量的3~4倍,并且在夜晚入睡后2 h左右出现明显分泌高峰,其分泌量可达到1 d分泌总量的一半以上^[5-6]。

由于微针具有使用疼痛感弱、可自行给药、药物释放可控等优点,在过去的十几年中已经广泛应用于大分子药物的透皮给药^[7-8]。现有研究表明,微米尺寸的微针能够有效穿透角质层但不易刺激神经末梢^[9]。通过调节微针聚合物基质的处方即可调控药物在数小时至数天内释放,释放出的大分子药物能够通过区域毛细血管和淋巴网被迅速吸收,避免了口服给药造成的首过效应和皮下注射造成的依从性差等问题^[10]。

对于hGH缺乏的患者,及时给予激素补充治疗常常能够产生较好的疗效^[11-12],临床上普遍使用皮下注射外源性重组人生长激素的手段^[13],目前国内上市的产品包括长效水针剂、短效水针剂和短效粉针剂。每日1次的皮下注射制剂虽然制备工艺简单,使用方便,但由于皮下注射的hGH血浆半衰期仅3.4 h^[14],与人正常生理状态下机体节律性地分泌内源性hGH差异较大,因此需要使用较大剂量才能很好地发挥药效^[15-16]。另一方面注射给药会给患者带来疼痛不适,尤其对于hGH缺乏的儿童患者,会面临给药困难,患者依从性差的问题^[17-18]。已有调查表明,一半以上的生长激素缺乏患者对每日注射hGH治疗表现出较差的依从性^[19],导致治疗难以达到预期效果^[20]。此外,目前全球范围内有多个hGH长效制剂已进入临床

试验阶段,虽然其有效性和安全性已得到初步证实,但是长效制剂存在不易于调整给药剂量的问题,难以满足不同患者的用药需求^[21-22]。

为了解决上述问题,本实验采用紫外光交联法制备了日夜两用的微针贴片组合用于早晚不同剂量的hGH给药。这种给药方式不仅能顺应人体hGH分泌量的昼夜节律变化,还可以避免注射疼痛,提高患者依从性。

1 材料

1.1 仪器

ME204/02 电子天平(梅特勒-托利仪器上海有限公司); Synergy H1 酶标仪(美国BioTek公司); F10-200100L36-001 UV-LED 固化设备(东莞尔谷光电科技有限公司); SK-L180-Pro 水平型数显摇床(北京大龙兴创实验仪器股份公司); ZSA0850T 连续变倍体视显微镜(重庆重光实业有限公司); J-1500-150ST 圆二色光谱仪(日本JASCO公司); ZQ-990B 电子拉力试验机(东莞市智取精密仪器有限公司); Nova Nano 450 扫描电子显微镜(美国FEI公司)。

1.2 药物与试剂

hGH(上海源叶生物科技有限公司,批号:A18GS145673); *N*-乙烯基吡咯烷酮(*N*-vinylpyrrolidone, NVP,上海易恩化学技术有限公司,批号:RH310121); 二甲基丙烯酸乙二醇酯(ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA,阿拉丁试剂有限公司,批号:I2001232); 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮[2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, I2959,阿拉丁试剂有限公司,批号:G2121264]; NOA-86H(美国Norland公司); 磷酸盐缓冲液(PBS,上海碧云天生物技术有限公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20211118)。

2 方法

2.1 微针贴片的制备

按文献^[23]方法将 1 mL NVP 单体和适量交联剂 EGDMA 混合均匀, 称取 15 mg 光引发剂 I2959 溶解于上述混合液, 最后加入 hGH 充分混匀后倒入微针模具。采用真空脱气的方法抽真空 10 min, 使溶液填满微针模具后, 除去上层多余溶液, 在 $34 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 强度紫外照射下预交联 5 s, 再于表面滴加紫外固化材料 NOA-86H, 经 $95 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 强度紫外照射使微针基质化学交联固化, 从模具中完整揭出, 即可获得微针贴片。制作流程示意图见图 1。

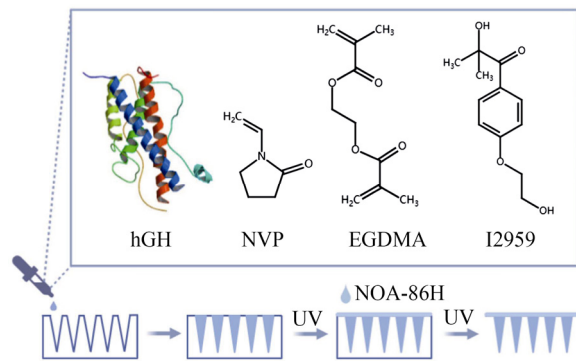


图 1 hGH 微针贴片制作流程示意图

Fig. 1 Schematic of the fabrication process of the hGH loading microneedle patch

2.2 微针形貌表征

按“2.1”项下方法制得微针贴片, 在光学显微镜下观察并拍照。在扫描电子显微镜下分别观察在 PBS 中释放 12 h 前后的微针表面形貌。

2.3 微针制备工艺条件的优化

2.3.1 紫外交联时间的优化 以门冬胰岛素作为交联度优化试验中的模型蛋白加入 NVP 基质, 充分混匀后按“2.1”项下方法制备成微针贴片。交联剂 EGDMA 用量为 1.5%, 分别调整紫外交联过程照射时长为 3, 5, 7, 9, 11 min。将制成的微针贴片裁剪成 10×10 的阵列, 以 1 mL pH 7.4 的 PBS 为释放介质, 每组设 3 个复孔, 置于转速 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床上。于 0, 5, 15, 30 min 和 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 分别取释放液 $20 \mu\text{L}$, 于 4°C 冰箱中保存, 12 h 释放结束后统一用 BCA 试剂盒测定模型蛋白释放量, 用酶标仪检测待测液在 562 nm 处的吸光度, 计算模型蛋白累积释放百分率, 并绘制释放曲线。

2.3.2 交联剂含量的优化 按“2.1”项下方法制

备含模型蛋白的微针贴片, 紫外交联时间为 7 min, 分别调节交联剂 EGDMA 用量为 0.5%, 1.5%, 3.0%, 5.0% 和 7.0%, 同“2.3.1”项下方法测定模型蛋白累积释放百分率, 并绘制释放曲线。

2.4 微针机械性能的考察

2.4.1 力学强度的测定 按“2.1”项下方法制备 hGH 微针贴片, 选择紫外交联时间 7 min, 交联剂用量为 1.5%。将制成的微针贴片浸没在 PBS 中, 于转速 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床上释放 12 h, 过夜干燥后分别将释放前后的微针贴片裁剪成 2×2 的阵列, 固定在电拉力实验机的载物台上, 设置压缩速度为 $0.1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, 记录 2 组微针的力-位移曲线, 最后将结果换算成每根微针的断裂力。

2.4.2 体外透皮试验 实验前 1 d 将健康 SD 大鼠脱毛, 当天颈椎脱臼法处死并进行背部皮肤剥离, 用脱脂棉擦去皮下脂肪后, 经蒸馏水反复冲洗干净。角质层侧朝上固定在泡沫板上, 分别用释放前后的 hGH 微针贴片对皮肤进行垂直按压, 停留 1 min 后移除微针, 用台盼蓝染液对穿刺后皮肤样本染色 3 min, 用蒸馏水冲洗, 除去表面浮色, 在光学显微镜下观察并拍照。

2.5 药物活性的考察

按“2.1”项下方法分别制备含模型蛋白和 hGH 的微针贴片, 其中紫外交联时间 7 min, 交联剂用量为 1.5%。分别将制成的微针贴片浸没在 PBS 中释放 12 h。取释放液经超滤后测定模型蛋白和 hGH 在 190~260 nm 紫外范围内的圆二色光谱图, 并与未经处理的模型蛋白和 hGH 的谱图进行对比。

2.6 生长激素微针贴片的制备及体外释放

按“2.1”项下方法制备微针贴片, 调节 hGH 浓度使日片含药量 $50 \mu\text{g}$, 夜片含药量 $200 \mu\text{g}$ 。选择紫外交联时间 7 min, 交联剂用量为 1.5% 作为微针制备交联参数。将制成的微针贴片裁剪成 10×10 的阵列, 同“2.3.1”项下方法测定 hGH 累积释放量并绘制释放曲线。

3 结果

3.1 微针形貌表征

通过光学显微镜观察微针贴片, 结果见图 2。微针针体为四棱锥状, 针长 $1\ 200 \mu\text{m}$, 底部边长 $500 \mu\text{m}$, 底部间距 $700 \mu\text{m}$, 阵列完整, 针尖锐利。通过扫描电子显微镜观察, 对比 12 h 释放前后的微针的针体结构, 结果见图 3。释放前后针体形貌无明显差异, 证明微针在接触体液 12 h 后仍能保

持结构完整,可帮助确定微针贴片在使用后可以较为完整地 从皮肤中移除。

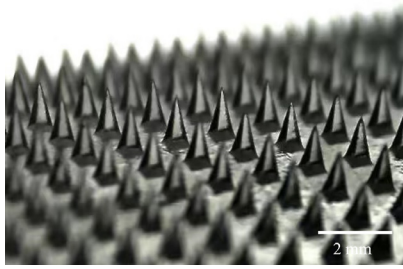


图 2 微针阵列排布情况(14×)
Fig. 2 Arrangement of microneedle arrays(14×)

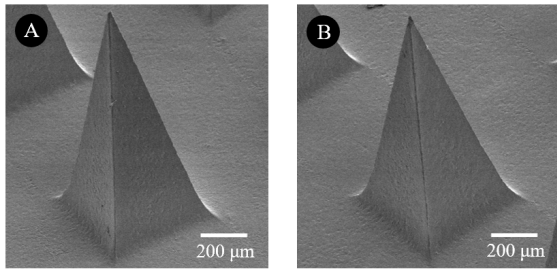


图 3 微针扫描电镜图像(70×)
A-释放前; B-释放后。
Fig. 3 Scanning electron microscopy images of microneedles (70×)
A-before release; B-after release.

3.2 交联参数对药物释放的影响

由于 NVP 与 EGDMA 均有不饱和双键,所以在光引发剂的参与下,通过紫外光照射就能发生紫外交联反应,聚合成高分子网络结构,微针基质由液态转化为固态,将蛋白质药物包载在网络结构中。交联度关系到微针高分子网络的致密程度,会影响微针中药物的释放速度和最终释放百分率。紫外交联时间长短和交联剂用量都会对微针的交联度造成影响。交联度高,微针硬度大,NVP 体系网络致密,药物释放慢,终末释放百分率小;交联度低,微针硬度小,NVP 体系网络疏松,药物释放快,终末释放百分率大。为了优化微针制备过程中的交联参数,本实验探究了紫外交联时间长短和交联剂用量对药物释放的影响。

在交联反应进行过程中,紫外照射时间越长,通常交联反应越彻底,但同时紫外交联时间长短会潜在影响微针中蛋白质药物的生物活性。因此为了确定最佳交联时间,本研究绘制了在紫外交联过程中经过不同紫外照射时间所制得微针的药物累积释放曲线,结果见图 4。结果表明经紫外交联 3 min 的微针 12 h 累积释放率>70%,在 5~9 min 内时,模型蛋白的释放曲线无明显差异。但在制

备中观察到仅经过 3 min 和 5 min 紫外交联的微针存在硬度不佳的问题,因此综合考虑微针硬度及紫外照射对蛋白质药物活性的影响,认为 7 min 为微针制作最优的紫外交联时间。

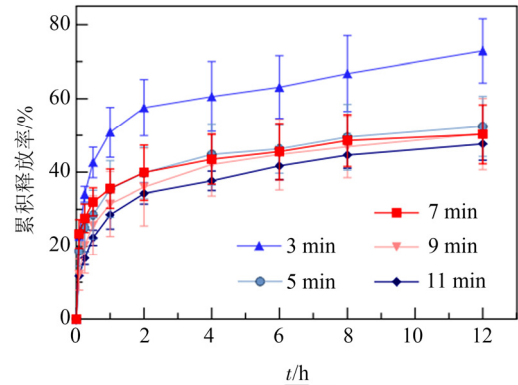


图 4 1.5%交联剂条件下采用不同紫外交联时间制备的微针药物释放情况(n=3)
Fig. 4 Drug release of hGH from microneedles prepared with different UV crosslinking durations under the condition of 1.5% crosslinking agent(n=3)

交联剂用量越多,微针基质网络越致密。为了确定交联剂用量,本研究绘制了使用不同交联剂用量制得微针的药物累积释放曲线,结果见图 5。结果表明随着交联剂用量增加,模型蛋白释放速率降低,12 h 的累积释放量减少。本研究希望微针中药物能在 12 h 内结束释放且有较大的累积释放率,因此 EGDMA 含量 0.5%和 1.5%的微针符合要求。但实验中发现含 0.5%交联剂的微针在 PBS 浸泡 12 h 后针体较为脆弱,为了避免造成在结束使用后针体难以完整的从皮肤中移除的问题,本实验选择 1.5%交联剂用量进行 hGH 微针制备。

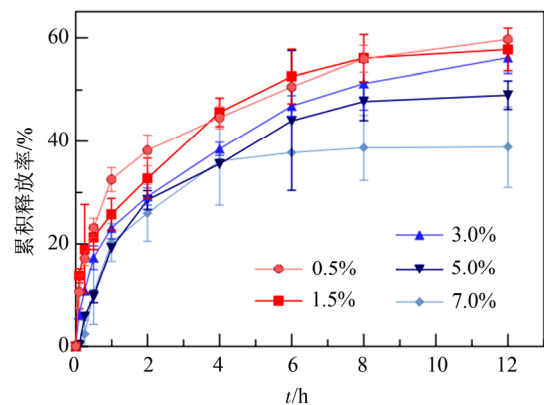


图 5 紫外交联 7 min 条件下采用不同交联剂含量制备的微针药物释放情况(n=3)
Fig. 5 Drug release of hGH from microneedles prepared with different crosslinking agent contents under the condition of 7 min UV crosslinking duration(n=3)

3.3 微针力学强度及透皮能力

为了确定微针在接触体液 12 h 后是否仍能保持一定的力学强度, 保证微针能够顺利从皮肤中完整移除, 本实验探究了药物释放前后微针力学性能和透皮能力。微针的力学性能测试结果见图 6, 释放后微针断裂力比释放前略有下降, 释放前微针断裂力约为每针 $(0.90\pm 0.01)\text{N}$, 释放后为每针 $(0.79\pm 0.02)\text{N}$ 。这可能是由于针体内大部分 hGH 扩散进入溶液, 同时液体进入网络结构使针体膨胀, 网络结构疏松导致。

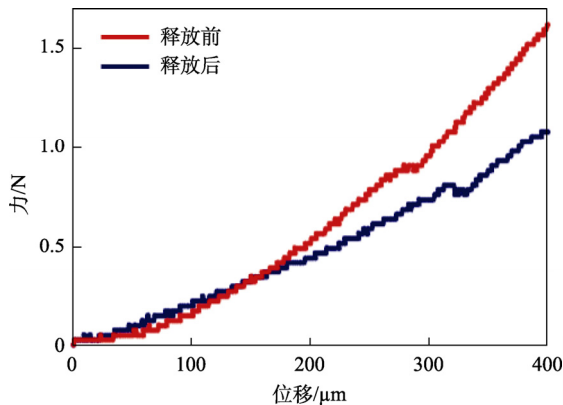


图 6 微针的力学性能评价

Fig. 6 Mechanical evaluation of microneedles

台盼蓝是常用的细胞活性染料, 可将细胞膜不完整的细胞染成蓝色, 而胞膜完整的细胞则不易被染色。因此将微针按压进入皮肤后移除微针并用台盼蓝染色, 即可观察到皮肤表面是否有细胞受损, 进而验证微针能否穿透角质层达到透皮给药的目的^[24]。染色结果显示释放前后的微针均可顺利刺破离体大鼠皮肤, 结果见图 7。虽然释放后的微针断裂力比释放前有所下降, 但其透皮能力均符合要求, 因此认为 hGH 微针贴片经 12 h 使用后应可完整移除。

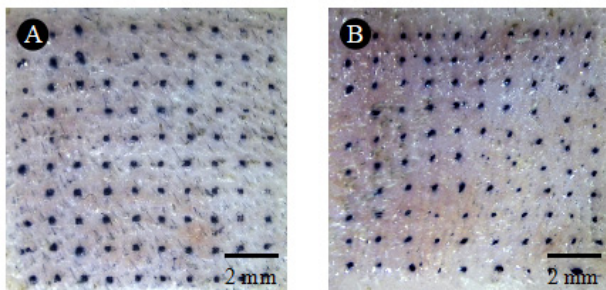


图 7 微针的离体透皮试验结果

A-释放前; B-释放后。

Fig. 7 Ex vivo skin penetration test

A-before release; B-after release.

3.4 经微针释放的药物活性

圆二色光谱可以用来测定多肽药物的二级结构, 通过比较未处理的药物与释放液中药物的圆二色光谱图即可得知多肽药物的构象在微针制作过程中是否发生改变。实验结果表明, 释放液中模型蛋白及 hGH 二级结构均无明显变化, 因此认为微针交联过程未对蛋白药物活性造成显著影响, 光谱结果见图 8。

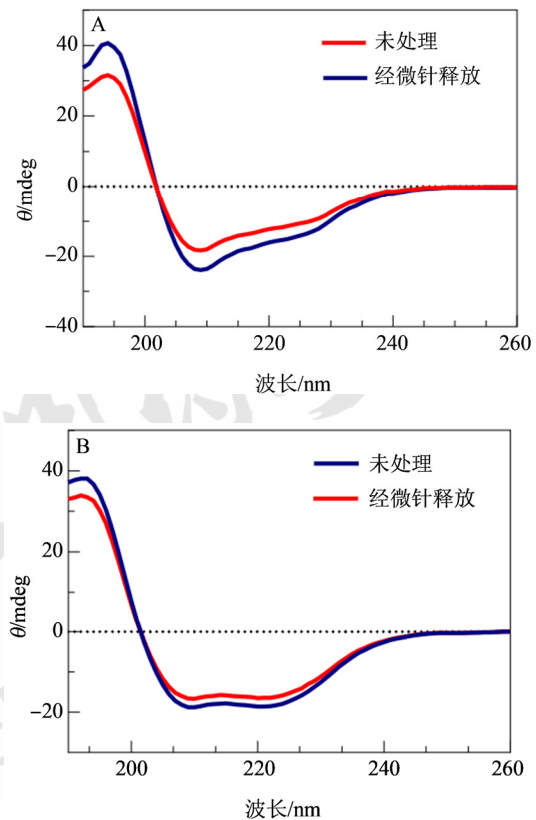


图 8 药物的圆二色光谱图

A-模型蛋白; B-人生长激素。

Fig. 8 Circular dichroism spectrum of drugs

A-model protein; B-hGH.

3.5 hGH 微针贴片体外释放

为了模拟人生理状态下昼夜节律性分泌 hGH 的特点, 本实验通过调节微针中 hGH 负载量制作成日用和夜用微针贴片, 夜片 12 h 累积释放量约为日片的 4 倍, 结果见图 9。结果显示 2 组微针贴片中 hGH 在 PBS 中能持续释放 > 8 h, 并在 12 h 基本结束释放。其中夜片 2 h 内累积释放量占总释放量 > 50%, 符合人体 hGH 分泌量在入睡后 2 h 出现高峰的特点。并且微针中的药物利用度可尝试通过离心使药物富集在针尖等方法进一步提高。

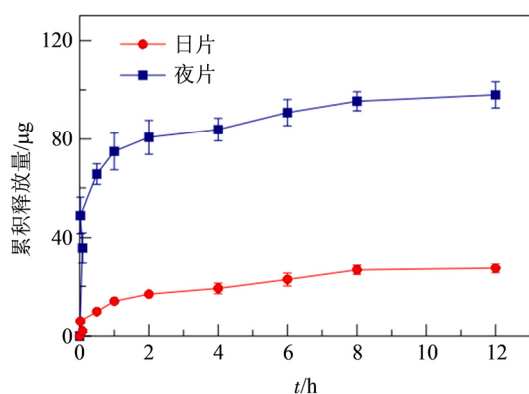


图 9 1.5%交联剂含量和紫外交联 7 min 条件下制备的 hGH 夜片和日片药物释放情况($n=3$)

Fig. 9 Drug release of growth hormone day and night patches under the condition of 1.5% crosslinking agent and 7 min UV crosslinking duration($n=3$)

4 讨论

本研究开发了一种 hGH 经皮递药系统,旨在改善每日 1 次的 hGH 皮下注射用药剂量较大,且难以顺应生理状态下 hGH 昼夜节律性分泌特点的问题,同时一定程度避免了注射给患者带来的痛苦,提高患者依从性。

本研究选用 NVP 作为微针基质,其单体在室温下为液体,可以很简便地将 hGH 均匀分散在基质体系中。紫外交联固化后的微针针体坚硬,可顺利穿透皮肤,使用后可完整取出,避免了长期使用过程中基质物质在体内残留累积,对人体产生不良反应。为了保持微针中的 hGH 生物活性,并使其在所需时间内稳定释放,本研究通过体外药物释放试验,考察了紫外交联时间长短和交联剂用量 2 个参数对药物释放的影响。结果发现在紫外交联时间为 7 min,交联剂用量为 1.5%时微针硬度较好,此时药物能在所需时间内稳定释放,且能够保持结束时累积释放百分率稳定。因此在临床使用过程中可根据患者的需求灵活调整微针中负载的 hGH 剂量,从而满足不同类型患者的用药需求。

在筛选出最佳的交联参数后,可以在微针中负载低剂量和高剂量的 hGH 制备成供日用和夜用的微针贴片,达到模拟正常人生理状态下 hGH 昼夜分泌节律的目的, hGH 缺乏的患者只需在早上使用日片,睡前更换为夜片,即可方便地完成给药过程。

综上所述, hGH 微针制备过程简单,能够顺应人体对 hGH 昼夜节律性的生理需求,使用方便,

患者依从性好,为 hGH 递送提供了一种新的策略。除此之外, hGH 通过微针释放进入体内后的吸收、分布及代谢过程还需要进行进一步研究。

利益冲突声明

顾臻是 Zenomics 公司、Zencapsule 公司、Lizen 公司、Wskin 公司、ZCapsule 公司和南通微臻医药科技有限公司的联合创始人,张宇琪是南通微臻医药科技有限公司的联合创始人,其他作者均声称无利益冲突。

REFERENCES

- [1] KATO Y, MURAKAMI Y, SOHMIYA M, et al. Regulation of human growth hormone secretion and its disorders[J]. Intern Med, 2002, 41(1): 7-13.
- [2] BROOKS A J, WATERS M J. The growth hormone receptor: Mechanism of activation and clinical implications[J]. Nat Rev Endocrinol, 2010, 6(9): 515-525.
- [3] QUABBE H J, SCHILLING E, HELGE H. Pattern of growth hormone secretion during a 24-hour fast in normal adults[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1966, 26(10): 1173-1177.
- [4] UCHIYAMA M, ISHIBASHI K, ENOMOTO T, et al. Twenty-four hour profiles of four hormones under constant routine[J]. Psychiatry Clin Neurosci, 1998, 52(2): 241-243.
- [5] TAKAHASHI Y, KIPNIS D M, DAUGHADAY W H. Growth hormone secretion during sleep[J]. J Clin Invest, 1968, 47(9): 2079-2090.
- [6] HOLL R W, HARTMAN M L, VELDHUIS J D, et al. Thirty-second sampling of plasma growth hormone in man: Correlation with sleep stages[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1991, 72(4): 854-861.
- [7] YU J C, ZHANG Y Q, YE Y Q, et al. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(27): 8260-8265.
- [8] WANG C, YE Y Q, HOCHU G M, et al. Enhanced cancer immunotherapy by microneedle patch-assisted delivery of anti-PD1 antibody[J]. Nano Lett, 2016, 16(4): 2334-2340.
- [9] YE Y Q, YU J C, WEN D, et al. Polymeric microneedles for transdermal protein delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018(127): 106-118.
- [10] KIM Y C, PARK J H, PRAUSNITZ M R. Microneedles for drug and vaccine delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(14): 1547-1568.
- [11] RICHMOND E, ROGOL A D. Treatment of growth hormone deficiency in children, adolescents and at the transitional age[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016, 30(6): 749-755.
- [12] 黄丽萍. 重组人生长激素治疗矮小症的临床疗效及其安全性[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(9): 105-107.
- [13] WANG C L, FU J F, LIANG L. Advances in the study of drugs to improve growth of children with short stature[J]. Chin J Pract Pediatr(中国实用儿科杂志), 2020, 35(6): 460-464.
- [14] WEBSTER R, XIE R, DIDIER E, et al. PEGylation of somatropin (recombinant human growth hormone): Impact on

- its clearance in humans[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(10): 1340-1351.
- [15] XIAO Q F, WU Y, SHI X N, et al. Effects of different doses of recombinant human growth hormone on bone metabolism, thyroid function and serum levels of ghrelin and IGF-1 in children with idiopathic short stature[J]. *J Third Mil Med Univ(现代生物医学进展)*, 2021(23): 4569-4572, 4582.
- [16] ZHANG Y P, LI J S. Influence of different doses of recombinant human growth hormone on height, weight and serum IGF-1 and IGFBP-3 expressions in children with idiopathic short stature[J]. *Clin Med Eng(临床医学工程)*, 2020(11): 1519-1520.
- [17] CAI Y P, XU M X, YUAN M L, et al. Developments in human growth hormone preparations: Sustained-release, prolonged half-life, novel injection devices, and alternative delivery routes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014(9): 3527-3538.
- [18] LOFTUS J, CHEN Y, ALVIR J M J, et al. Suboptimal adherence to daily growth hormone in a US real-world study: An unmet need in the treatment of pediatric growth hormone deficiency[J]. *Curr Med Res Opin*, 2021, 37(12): 2141-2150.
- [19] FARFEL A, SHALITIN S, MORAG N, et al. Long-term adherence to growth hormone therapy in a large health maintenance organization cohort[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2019(44): 1-5.
- [20] GRAHAM S, WEINMAN J, AUYEUNG V. Identifying potentially modifiable factors associated with treatment non-adherence in paediatric growth hormone deficiency: A systematic review[J]. *Horm Res Paediatr*, 2018, 90(4): 221-227.
- [21] YANG Y X, REN Y L. Research overview of long-acting growth hormone preparations[J]. *Chin Med Biotechnol(中国医药生物技术)*, 2021, 16(5): 459-464.
- [22] MILLER B S, VELAZQUEZ E, YUEN K C J. Long-acting growth hormone preparations - current status and future considerations[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(6): e2121-e2133.
- [23] YU J C, WANG J Q, ZHANG Y Q, et al. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(5): 499-506.
- [24] YAN Q Y, WEN J L, WENG J Q, et al. Preparation and transdermal delivery of huperzine A hydrogel microneedles[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021(12): 3530-3537.

收稿日期: 2022-02-24

(本文责编: 蔡珊珊)