

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 1/00
C07K 1/14 C07K 1/28
C07K 1/30 C07K 14/62
A61K 38/28

[21] 申请号 96195951.7

[43]公开日 1998 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 1192218A

[22]申请日 96.6.4

[30]优先权

[32]95.6.7 [33]US[31]08/484,220

[86]国际申请 PCT/US96/07963 96.6.4

[87]国际公布 WO96/40730 英 96.12.19

[85]进入国家阶段日期 98.1.26

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 J·C·巴克 B·A·莫泽

W·E·施雷德

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 酰化蛋白粉的制备

[57]摘要

一种提取粉末状酰化蛋白质的方法，特别适用于难以通过等电位沉淀法从蛋白质水溶液中制备的酰化蛋白质，该方法包括调节水溶液使之接近蛋白质等电位 pH 值，同时提供合适的醇浓度，以使蛋白质在所调节的 pH 值下以可滤的颗粒物形态沉淀。

权 利 要 求 书

1. 一种从水相混合物中提取粉末状酰化蛋白质方法，该方法包括将蛋白质的水溶液 pH 值调节到使溶液中所含蛋白质转化为不溶性的，然后向水相蛋白质混合物中加入足够量的醇，促使蛋白质在所述 pH 值下以可滤的颗粒形态沉淀。

2. 权利要求 1 的方法，其中蛋白质是用脂肪酸衍生物酰化了的蛋白质。

3. 权利要求 1 的方法，其中酰化蛋白质包括难以用等电位沉淀法从蛋白质水溶液中分离出来的蛋白质。

4. 权利要求 3 的方法，其中酰化蛋白质选自脂肪酸酰化胰岛素原，脂肪酸酰化胰岛素和脂肪酸酰化胰岛素类似物。

5. 权利要求 4 的方法，其中水溶液的 pH 值调节到大约 4.0 到 6.0 左右。

6. 权利要求 5 的方法，其中酰化蛋白质是 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素。

7. 权利要求 6 的方法，其中醇是乙醇，其加入量产生的浓度按水相混合物体积计为 20% 到 35%（体积）。

8. 权利要求 7 的方法，其中醇浓度为 25% 到 30%（体积）。

9. 一种从蛋白质水溶液中提取粉末状酰化蛋白质的方法，该方法包括调节该水溶液使之接近蛋白质的等电位 pH 值，并提供合适的醇浓度以助于蛋白质在该 pH 值下以可滤的颗粒形式沉淀。

10. 权利要求 9 的方法，其中酰化蛋白质是难以用等电位沉淀法从所述水溶液中分离的酰化蛋白质。

11. 权利要求 10 的方法，其中酰化蛋白质选自脂肪酸酰化胰岛素原，脂肪酸酰化胰岛素和脂肪酸酰化胰岛素类似物。

12. 权利要求 10 的方法，其中水溶液被调节到 pH 约 4.0 到 6.0。

13. 权利要求 12 的方法，其中酰化蛋白质是 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素。

14. 权利要求 13 的方法，其中醇是乙醇，其加入量产生的醇浓度按水相混合物体积计为 25% 到 30%（体积）。

15. 一种粉末状酰化蛋白质，其制备方法是(a)调节酰化蛋白质水溶液达到或接近蛋白质的等电位 pH 值，与(b)向该酰化蛋白质水溶液组合物中提供合适的醇浓度以助于在该 pH 值下形成可滤的蛋白质颗粒，接着通过水相蛋白质组合物的过滤和干燥来回收沉淀出的蛋白质粉末的可滤颗粒。

16. 权利要求 15 的粉末状酰化蛋白质，其中该酰化蛋白质包括难以由

等电位沉淀从水溶液中分离出来的蛋白质。

17. 权利要求 16 中的粉末状酰化蛋白质，其中酰化蛋白质选自脂肪酸酰化胰岛素原，脂肪酸酰化胰岛素和脂肪酸酰化胰岛素类似物。

5 18. 权利要求 17 的粉末状酰化蛋白质，其中水溶液被调节到 pH 约 4.0 到 6.0。

19. 权利要求 18 的酰化蛋白质，其中醇是乙醇，其加入量产生的醇浓度按水相蛋白质组合物体积计为 25% 到 30%（体积）。

说明书

酰化蛋白粉的制备

发明背景

1. 发明领域

本发明主要涉及一种以粉末状回收酰化蛋白质的方法,特别是那些难以通过沉淀或结晶作用并进而从水溶液中过滤出来的酰化蛋白质,尤其是可回收某些酰化胰岛素原,酰化胰岛素或酰化胰岛素类似物。另外,本发明还特别涉及到从水溶液中提取自由流动粉末状酰化胰岛素原,胰岛素和胰岛素类似物。

2. 有关技术描述

用胰岛素治疗来模仿正常人体中内生胰岛素分泌的型式是一个长期的目标。每天对胰岛素的生理需求是不定的,可以分为两个阶段:(a)吸收阶段,需要一剂用量的胰岛素来降低与膳食有关的血糖, (b) 后吸收阶段,需要持续量的胰岛素调整肝糖的产生以维持最佳的稳定血糖。因此,有效治疗一般涉及到两种外生胰岛素配合使用: 利用大剂量注射提供速效进食时间胰岛素和每天注射一次或两次来供给起长效作用的基底胰岛素。

近来,一类酰化胰岛素有望用于长效基底胰岛素治疗,这类酰化胰岛素是通过有选择的用活化脂肪酸衍生物,带游离氨基的单体胰岛素,包括胰岛素原、胰岛素和某些胰岛素类似物进行酰化而制得的。有效的脂肪酸衍生物包括至少具有 6 个碳原子链长的活性脂肪酸型化合物以及那些在链上含有 8 到 21 个碳原子的脂肪酸衍生物。用棕榈酸衍生物一酰化的正常人胰岛素是特别有希望的候选者,属于此类的胰岛素在日本专利申请 1-254,699 中已有介绍。

正像那些经验丰富的专家对此工艺所了解的那样,回收固体蛋白质,尤其是自由流动粉末状蛋白质的方法,在多方面的应用是有优点的,虽然不是最主要的优点。制备粉末状蛋白质,可扩大贮存和配给。更确切的说,应大量生产用于胰岛素治疗的多种组合物以满足需求。很早以前偶然发现,正常胰岛素包括牛胰岛素、猪胰岛素和人胰岛素,可以通过沉淀或者更准确地说以结晶方法,从较稀的胰岛素水溶液中以锌的络合物或以钠晶体来提取。一般说来,所谓锌胰岛素是由含锌离子的缓冲水溶液中结晶出来并通过过滤分离而得到。

遗憾的是，意在通过过滤提取用长链脂肪酸衍生物酰化的胰岛素并未取得成功。事实上，许多使脂肪酸酰化的胰岛素生成结晶的试验一律未获得成功。曾认为在这类胰岛素单体上所含的长链脂肪酸部分具有疏水特性而造成上述困难，特别是干扰了生成合格晶体所需要的蛋白质-蛋白质间的相互反应。因此，必须寻找其他途径来制备这类固体粉末状酰化胰岛素。

一种技术上可行的生产酰化蛋白质如粉末状酰化胰岛素的方法，是将蛋白质水溶液冻干。虽然制备粉末状脂肪酸酰化的胰岛素可采用这种方法，但生产大量商用胰岛素采用冻干技术很不方便。对于大容量的冻干操作，操作人员的安全和产品管理都存在很多问题。

其他可能的对策涉及到等电位沉淀法。早已知道，当介质 pH 值调节到接近蛋白质的等电位点时，水溶液中蛋白质的溶解性变小。这种普遍现象早被运用在蛋白质纯化和提取工艺中。一旦降低可溶性，这类蛋白质往往可从形成的悬浊液中利用重力沉降或真空助滤和压力助滤来提取。

遗憾的是，当试图用简单的调节酰化蛋白质水溶液 pH 值接近等电位点的方法来提取脂肪酸酰化蛋白质时却生成了类似乳浊液的组合物，用重力沉降或真空助滤或压力助滤很难使固-液分离，故必须找到一种新方法

来提取这类粉末状酰化胰岛素。

本发明提供一种通过沉淀和过滤制备自由流动粉末状酯化蛋白质的简单的方法，特别适用于某些难以用沉淀和过滤来分离和提取的脂肪酸酰化蛋白质。故本发明是提供一种从水溶液中提取自由流动粉末状脂肪酸胰岛素的方法。具体的说，本发明提供一种制备粉末状脂肪酸酰化胰岛素的流程，用于较大规模生产技术中。本发明也适用于制备粉末状蛋白质。

发明的描述

在本发明中所采用的全部氨基酸的缩写均被美国专利和商标局作为规定列于 37C.F.R § 1.822 (B) (2) 中。

这里应用的术语“胰岛素”和“正常胰岛素”表示人胰岛素、猪胰岛素或者牛胰岛素。胰岛素具有三个游离氨基： B^1 -苯基丙氨酸， A^1 -甘氨酸和 B^{29} -赖氨酸。在位置 A^1 和 B^1 处的游离氨基为 α -氨基，在位置 B^{29} 处的游离氨基是 ϵ -氨基。

这里应用的术语“胰岛素原”是适当交联的蛋白质，其化学式为：



其中：

A 系胰岛素的 A 链或其官能衍生物

B 系胰岛素的 B 链或其具有 ϵ -氨基的官能衍生物

C 系联接在胰岛素原上的缩氨酸。优选地，胰岛素原为人胰岛素的 A 链，人胰岛素的 B 链，而 C 为自然联接的缩氨酸。当胰岛素原属于天然序列时，胰岛素原具有三个游离氨基：苯基丙氨酸(1)(α -氨基)，赖氨酸(29)(ϵ -氨基)和赖氨酸(64)(ϵ -氨基)。

这里应用的术语“胰岛素类似物”是显示胰岛素活性的适度交联的蛋白质，其化学式：



式中：

A 系胰岛素的 A 链或胰岛素 A 链的官能衍生物；

B 为胰岛素的 B 链或胰岛素的 B 链的官能衍生物，此 B 链具有 ϵ -氨基和至少 A 或 B 链之一含有来自天然系列的氨基酸变体；

优选的胰岛素类似物包括下列胰岛素；

在 B²⁸ 位置上的氨基酸残基为 Asp, Lys, Leu, Val, 或 Ala；

在 B²⁹ 位置上的氨基酸残基为 Lys 或 Pro；

在 B¹⁰ 位置上的氨基酸残基为 His 或 Asp；

在 B¹ 位置上的氨基酸残基为 Phe, Asp, 或单独缺失的，或与位置 B² 上的残基联合缺失的；

在 B³⁰ 位置上的氨基酸残基是 Thr, Ala, 或缺失的；

在 B⁹ 位置上的氨基酸残基为 Ser 或 Asp, 只要 B²⁸ 或 B²⁹ 位置是 Lys。

在普通熟练技工掌握的标准生物化学术语中，优先选择的胰岛素类似物为 Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素 (B²⁸ 为 Lys; B²⁹ 为 Pro); Asp^{B28}-人胰岛素(B²⁸ 系 Asp); Asp^{B1}-人胰岛素, Arg^{B31,B32}-人胰岛素, Asp^{B10}-人胰岛素, Arg^{A0}-人胰岛素, Asp^{B1},Glu^{B13}-人胰岛素, Ala^{B26}-人胰岛素以及 Gly^{A21}-人胰岛素。

术语“酰化”表示引入的一个或多个酰基以共价结合到蛋白质的游离氨基上。

术语“脂肪酸”表示饱和或非饱和的 C₆—C₁₂ 脂肪酸。术语“活化的脂肪酸酯”表示利用常规技术活化的脂肪酸。该常规技术已在 Methods of Enzymology, 25:494-499(1972)和 Lapidot in I.of Lipid Res., 8:142-145(1967)中作过介绍，其公开内容引于此以供参考。优选的脂肪酸为饱和脂肪酸，包括肉豆蔻酸(C₁₄)，十五烷酸(C₁₅)，棕榈酸(C₁₆)，十七烷酸(C₁₇)，和硬脂酸(C₁₈)，最优选的脂肪酸是棕榈酸。活化的脂肪酸酯包括介质的衍生物如

羟基苯丙三氮杂环(HOBT), N-羟基琥珀酰亚胺及其衍生物, 优选的活性酯为 N-琥珀酰亚胺基棕榈酸盐。

术语“交联”表示在半胱胺酸残基之间形成二硫化物键。适当交联的胰岛素原, 胰岛素, 胰岛素类似物含有三个二硫化物桥。第一二硫化物桥连在 A 链的位置 6 和位置 11 上的半胱胺酸残基之间。第二二硫化物桥将 A 链位置 7 的半胱胺酸残基与 B 链位置 7 的半胱胺酸相连。第三二硫化物桥将 A 链位置 20 上的半胱胺酸联接到 B 链位置 19 的半胱胺酸上。

术语“沉淀”涉及一种过程, 在此过程中, 在液体中产生易于滤出的颗粒物, 它与由于溶液中溶质的溶解度的简单改变而导致生成的稳定悬浊物和/或类似乳化物的两相混合物不同。这种可滤出的颗粒物本身称为“沉淀物”。

用语“易可滤的”和其它类似用语均与条件有关, 在此条件下, 固-液混合物或浆液中的颗粒可通过死端式过滤以及通过能形成易操作的含残余水物质, 即滤饼的有关技术而达到分离, 残余水不会使滤饼呈浆泥状, 而呈固体状。在死端式过滤中, 送入浆液, 其滤出液基本上垂直穿过滤器的平面, 这与“错流”或“切流”过滤不同, 其主液流是平行流过滤器表面。重要的是, 本发明的方法产生一种酰化蛋白质浆液, 它可利用死端式过滤和相关的技术在平均或均值滤速超过 $5 \text{ l/m}^2/\text{hr}(\text{LMH})$ 下过滤, 通常平均或均值滤速超过 20 LMH 。过滤终点一般是使滤饼能满足固体操作。这样的滤速对工业生产规模的运行经济是很关键的。

术语“含水的”是指含潜溶剂体系以及只用水作为溶剂。

本发明涉及一种从含水混合物中提取粉末状酰化蛋白质的方法, 尤其是那些难以利用等电位沉淀从含酰化蛋白质水溶液中分离和提取的酰化蛋白质。该法包括调节酰化蛋白质水溶液 pH 值至使溶液中蛋白质变成不溶的, 然后将足够量的醇加到蛋白质含水混合物中使之在上述 pH 值下形成可滤性蛋白质颗粒沉淀物。

另一方面, 本发明涉及到一种粉末状酰化蛋白质, 特别是难以用等电位沉淀从水溶液中分离出的酰化蛋白质。尤其涉及到粉末状脂肪酸酰化的胰岛素原, 脂肪酸酰化的胰岛素或脂肪酸酰化的胰岛素类似物, 通过调节酰化胰岛素蛋白质水溶液的 pH 值使蛋白质在水溶液中变成不溶性的, 然后向蛋白质水溶液中加入足够量的醇使其在上述 pH 值下形成可过滤的粒状蛋白质沉淀。之后, 通过过滤与干燥来提取无锌粉末状酰化蛋白质。利用本方法制备优选的粉末状酰化蛋白质包括 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素和

B28-N^ε-棕榈酰-Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素(B28 为酰化的 Lys 和 B29 是 Pro)。

应用胰岛素原，胰岛素和胰岛素类似物制备酰化蛋白质系本发明的主要中心点，它可以利用公认的缩氨酸合成技术中任意一种方法，包括经典法(溶液法)，固相法，半合成法，以及最近的重组 DNA 法。例如，Chance 等人的美国专利申请号 07/388,201，欧洲专利申请号 383472，Brange 等人的欧洲专利申请 214826，以及 Belagaje 等人的美国专利 5,304,473 所公布的各种胰岛素原与胰岛素类似物的制备方法，均列于此处做参考。本发明中胰岛素类似物的 A 链和 B 链也可经由一个类似胰岛素原的母体分子用重组 DNA 技术制备，见 Frank 等人，缩氨酸：合成—结构—功能，美国第七届缩氨酸专题讨论会文集 Eds. D. Rich & E. Gross (1981)，列在此处作参考。

通常，胰岛素原，胰岛素，胰岛素类似物是通过与活化的脂肪酸衍生物诸如活化脂肪酸酯反应而酰化。用脂肪酸酰化正常胰岛素在日本专利申请 1-254,699 中已有披露，也可见 Hashimoto 等人，药物研究，6:171-176(1989)，这里引用作参考。

最好在极性溶剂中的碱性条件下进行酰化，即 pH 值大于 9.0，最好为 10.5 左右。尽管酰化反应可在纯有机极性溶剂中于 pKa 大于或等于 10.75 的碱性条件下进行，但我们选择一种混合的有机与含水溶剂作为反应介质。优先选用的碱有四甲基胍、二异乙基胺或四丁基胺的氢氧化物。一种特别适用的溶剂是乙腈和水，含有约 50%乙腈。其他极性溶剂包括二甲基亚砷，二甲基甲酰胺等。潜溶剂体系还包括丙酮和水，异丙基和水，以及乙醇和水。适合进行反应的时间与温度并不是狭窄的临界条件。温度为 0 到 40℃，反应时间为 15 分钟至 24 小时一般来说应当是适宜的。制备脂肪酸酰化的胰岛素的特别可取的方法描述于共同待决的美国专利申请序列号 08/341231, November 17, 1994，其内容列于此作参考文献。

一旦反应完成，含有酰化蛋白质的反应混合物一般用水稀释并加酸中和碱度。酸以水溶液形式加入到酰化蛋白质中，并使溶液 pH 值降低到低于蛋白质的等电位点。通常该点会使蛋白质处于合适的缓冲水溶液中以便于进一步处理。此处理具体包括采用标准色层分离法，如反相或疏水色层分离，利用错流过滤浓集，通过超滤溶剂更换等。对于酰化胰岛素原，酰化胰岛素与酰化胰岛素类似物，特别是 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素和 B28-N^ε-棕榈酰-Lys^{B28}Pro^{B29}-人胰岛素，pH 值一般应调节到低于 3.0，如需要，最好用酸调节到介于约 1.5 和 2.5 之间。适用的酸包括 HCl，醋酸，甘氨酸，

尤其是柠檬酸。发现使用浓度 50mM 的柠檬酸是适宜的。如有必要，pH 值还能用碱，如用氢氧化钠调节使之保持在所要求的 pH 范围内。

这时经过分离的，最好是经过纯化的酰化蛋白质水溶液，尤其是脂肪酸酰化的胰岛素原，脂肪酸酰化胰岛素或脂肪酸酰化胰岛素类似物的水溶液可以按照本发明方法处理以提取粉末状可溶性蛋白质。根据本发明，加碱来调节蛋白质水溶液的 pH 值，最好是用水溶性碱如氢氧化钠，加入足够量使可溶性的蛋白质变成不溶性的。即将溶液的 pH 值调节到接近酰化蛋白质的等电位点，或称之为等电位 pH 值。在脂肪酸酰化的胰岛素原，脂肪酸酰化胰岛素和脂肪酸酰化胰岛素类似物的情况下，特别是 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素，将 pH 值调节到 4.0 至 6.0 范围内，最好是 4.5 到 5.5 证明是适用的。在此 pH 范围内，酰化蛋白质的净电荷应当最少，并且其溶解度也应最小。在调节 pH 值期间，溶液要搅拌使之完全混合。

特别适合于按本发明方法处理的酰化蛋白质水溶液，当 pH 值调节到接近其等电位 pH 时，则形成类似乳浊液的组合物。这种情况会对大规模处理中采用诸如死端式过滤固/液分离技术提纯蛋白质产生干扰。本发明的核心点是使用醇，特别是乙醇，将其加到含水蛋白质混合液中以有助于形成易于过滤的酰化蛋白质沉淀物。

调节溶液 pH 值和加醇的顺序不是关键性的问题，可以在调节 pH 值以降低蛋白质的可溶性之前将醇加到蛋白质溶液中，最后形成沉淀物，也可以在调节蛋白质溶液的 pH 值后加醇。

专利申请人发现，为获得易过滤沉淀物而需加到酰化蛋白质溶液中的醇的量处在窄的范围内。专利申请人特别发现对于脂肪酸酰化的胰岛素，尤其是 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素，形成易于过滤的沉淀物只与加入适量的醇，特别是乙醇有关，含水蛋白质乳浊液或浆液中最终醇浓度至少达到约 20% 到 35%，最好是约 25% 到 30%。虽然乙醇是所选用的醇，但其他醇类如甲醇和异丙醇在一定条件下可作为替代物。

向蛋白质水溶液中加入过量的醇会干扰形成一种合格的沉淀物，但加醇量不足时，则不足以把调节酰化蛋白质 pH 值所产生的类似乳浊液的组合物转化为易于过滤的浆液或乳浊液。实际醇浓度比要求的高时，蛋白质会再溶解，可能减少产额。为了促进其他脂肪酸酰化蛋白质的沉淀和过滤作用，可利用常规试验来确定加醇量，例如加乙醇的量。

事实上本发明的基本观点是，要制备一种自由流动粉末状酰化蛋白质，特别是从蛋白质水溶液中难以通过等电位沉淀和过滤来分离和制备的

那种酰化蛋白质，在制备时应当具有以下综合条件，(a) pH 应在或接近蛋白质的等电位 pH 值，(b) 足够量的醇浓度促使形成易于过滤的颗粒物有助于蛋白质的沉淀和过滤。如上所述，在 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素情况下，乙醇浓度约为浆液体积的 20%到 35%，最好是大约 25%到 30%对促使蛋白质形成易于过滤的颗粒沉淀物特别有利。

总而言之，制备有所要求的醇(如乙醇)浓度及酰化蛋白质的等电位 pH 值的含水蛋白质混合物的方法不是关键。例如，可用水稀释已调好 pH 但醇浓度高于所需值的蛋白质水溶液以得到这种混合物，即在 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素的情况下可将醇体积浓度超过 35%如 40-45%的乙醇稀释到所要求的浓度范围。最好对醇浓度和 pH 在所需限值内的组合物进行缓慢地搅拌(混合)以促使沉淀物形成。

根据本发明，在处理前，溶液中酰化蛋白质的浓度也不是关键问题。但在酰化胰岛素也包括酰化胰岛素原和酰化胰岛素类似物的情形下，浓度至少应为 1mg/ml 左右，通常最好至少采用浓度为 5mg/ml 的溶液，尽管采用蛋白质浓度高达 35 到 50mg/ml 和更高的溶液，可得到在更满意的滤速下过滤的蛋白质沉淀。如上所述，通过 pH 调节和加醇联合处理产生的蛋白质浆液应具有平均或均值滤速至少约为 5LMH，而最好的均值滤速约为 15LMH。意外的是，当按本发明来处理 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素溶液时，发现均值滤速约为 20LMH 甚至更高。

虽然对于获得最好的结果并没有严格的条件，但过滤期间温度应保持在 20℃到 30℃之间。无论如何过滤时应避免温度为 0℃或低于 0℃，因为这样低的温度会在所要求的高滤速下影响操作。虽然实际上最好是在环境温度下进行过滤，预先的调节 pH 和加乙醇可在高于浆液冰点以上任何温度下完成。

这时含水蛋白质组合物即可进行过滤以分离沉淀的蛋白质。有时，在过滤前进行重力增浓或使含水蛋白质组合物或浆液沉降有利于最大地降低过滤装置的液压负荷。当大规模生产时，例如，批量生产大于 0.5Kg，采用离心过滤含水蛋白质组合物将是有益的，但根据本发明广泛的实践，任何用于液/固分离的手段，包括真空助滤和压力助滤都能用来回收沉淀的蛋白质。规模较小时，例如批量生产低于 0.3 到 0.5Kg，利用装配有多孔烧结陶瓷过滤表面的压力助滤装置过滤具有优越性。通过额定孔径约 5.0μm 的多孔烧结陶瓷过滤证明是十分有效。对用来过滤浆液的设备要求不太高，任何适合于处理药物组合物的各种类型过滤系统都可采用。

过滤后回收滤饼并干燥，一般用真空助蒸法干燥。根据本发明的广泛实践，任何用于干燥浓稠的固态膏状物的方法，只要不损害分离出来的蛋白质都可应用。回收滤饼的方法和干燥滤饼的其他方法均应是技术上成熟的且不是关键问题。

5 本发明的酰化胰岛素粉末可作为大批量药材(BDS)用于制备胰岛素治疗的药物组合物，也就是说，满足病人的需要（即生高血糖症的病人）。此类药物组合物中含有有效量的粉末并配入一种或多种药物上合格的赋形剂或载体。为此目的，药物组合物应按标准配方配制，含约 100 单位/mL 或含有效量的酰化胰岛素粉末的类似浓度。这类组合物属于典型的非肠胃吸收的药物，但也未必如此，可采用任一种所熟知的制备普通赋形剂或载体的工艺来制备非肠胃吸收的药物。例如可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences .17 版，Mack 出版公司，Easton, PA, 美国（1985）。举例来说，对于非肠胃吸收的用药形式，可将规定量的蛋白质粉末悬浮或溶解在无毒的适合于注射的液体媒介物中如水相介质，然后再对悬浮液或溶液进行消毒。另一方法是将量过的粉末置于小药瓶中；并将小药瓶和内盛物进行消毒和密封。可同时提供小药瓶或媒介物，供给药前混合用。

20 适应非肠胃吸收用法的药物组合物可使用稀释剂，赋形剂和载体如水和与水混溶的有机溶剂，如甘油，芝麻油，花生油，水相丙二醇，N,N-二甲基甲酰胺等。这类药物组合物的样品包括无菌、等渗压的粉末的盐水溶液，这种粉末盐可用药物上合格的缓冲剂进行缓冲，并不需加热。此外，非肠胃吸收药物的配方中还含有防腐剂如甲醇，以及调节最终产品 pH 的其他试剂如氢氧化钠或盐酸以及稳定剂如锌盐。

25 提出以下示例来描述和解释本项发明。这里仅参照制备粉末状 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素来叙述本发明，但本发明的应用范围不应受本示例的限制。除另有说明外，所有提到的份额和百分数均为重量百分数，所有的温度都以摄氏度来表示。

示例

30 脂肪酸酰化的生物合成人胰岛素（N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素）水溶液（8.8L）含蛋白质浓度 50mg/ml，在 pH2.6、温度 2-8℃ 下用 530ml 10% 的氢氧化钠处理使 pH 值提高到 5.7。接着搅拌调节过 pH 的溶液达到彻底混合，然后在缓慢的搅拌下向每升调过 pH 的溶液中加入 0.46L 无水乙醇（达

到总溶液体积 13L)，促使酰化胰岛素沉淀。酰化蛋白质用配有标称孔径为 5 μ 的不锈钢烧结物的压力助滤器去水。均值滤速测量值约为 25LMH。弃去滤液。然后用 30% 体积的乙醇溶液洗涤滤饼，并从过滤器上取下洗好的滤饼在真空下干燥制成无锌粉末。该粉末具有极好的贮存稳定性，故适合于作为大批量药材。实质上，在滤饼中回收了全部蛋白质，经由滤液的损耗很小。

本项发明的原理，优选实例和操作模式按上述技术要求作了详细的说明，主要以脂肪酸酰化的胰岛素原，胰岛素和胰岛素类似物，特别是以 N-棕榈酰 Lys^{B29} 人胰岛素为参照例，受到保护的本发明并不受限于公开的特
 定内容，因为这些内容是做为实例而不是约束。在不违反本发明权利要求的精神下，可做出变革和修改。