



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102802670 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号	201180014449. 8	<i>A61K 31/19</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2011. 01. 19	<i>A61K 31/185</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61K 8/97</i> (2006. 01)
	61/296, 052 2010. 01. 19 US	<i>A61K 8/73</i> (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		<i>A61P 17/00</i> (2006. 01)
	2012. 09. 18	<i>A61Q 19/00</i> (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2011/021773 2011. 01. 19

(87) PCT申请的公布数据
W02011/091084 EN 2011. 07. 28

(71) 申请人 巴斯夫公司
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M·恰范

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 史文静 黄革生

(51) Int. Cl.
A61K 47/42 (2006. 01)
C07K 17/08 (2006. 01)
A61K 31/13 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 18 页

(54) 发明名称
用于皮肤护理中的稳定化蛋白酶

(57) 摘要
公开了一项涉及合成用作皮肤护理剂的源自植物的固定化和交联的蛋白酶的发明。所得到的稳定化蛋白酶将因为其固定化性质而最少限度地渗透皮肤。该蛋白酶将因其交联性质并且在某些实施方案中归因于其借助物理添加剂的稳定作用而保留活性。本发明尤其涉及在局部皮肤应用中使用的连接的木瓜蛋白酶产物。

1. 一种稳定化蛋白酶产物, 包含
与卡波姆交联的蛋白酶, 其中所述蛋白酶的伯胺与卡波姆的羧基交联并且其中所述蛋白酶的胺经胺反应性交联试剂进一步交联。
2. 如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述稳定化蛋白酶还包含物理稳定剂。
3. 如权利要求 2 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述物理稳定剂是糖或糖聚合物。
4. 如权利要求 3 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述稳定化蛋白酶包含 0.1% 和 5% 之间的物理稳定剂。
5. 如权利要求 3 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述糖或糖聚合物选自藻酸钠、海藻糖、甘露醇、甘油、黄原胶、蔗糖和山梨醇。
6. 如权利要求 5 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述物理稳定剂是藻酸钠。
7. 如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述蛋白酶选自木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶和猕猴桃蛋白酶。
8. 如权利要求 7 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述蛋白酶是木瓜蛋白酶。
9. 如权利要求 7 所述的稳定化蛋白酶, 其包含 0.1% 和 5% 之间的所述蛋白酶。
10. 如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述胺反应性交联试剂选自自己二亚氨酸二甲酯 (DMA)、辛二酸双 (磺基琥珀酰亚胺) 酯 (BS3)、辛二亚氨酸二甲酯 (DMS)、庚二亚氨酸二甲酯 (DMP) 和辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS)。
11. 如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶, 其中所述蛋白酶是木瓜蛋白酶并且所述胺反应性交联试剂是 DMA。
12. 如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶产物, 还包含防腐剂体系。
13. 如权利要求 12 所述的稳定化蛋白酶产物, 其中所述防腐剂体系包含苯氧乙醇和苯甲酸。
14. 如权利要求 12 所述的稳定化蛋白酶产物, 其中所述防腐剂体系包含 diocide。
15. 一种形成稳定化蛋白酶的方法, 包括:
进行初级交联反应以将与所述蛋白酶的伯胺与卡波姆的羧基交联; 并且
借助胺反应性交联试剂在所述蛋白酶上进行二级交联反应。
16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述初级交联反应使用交联试剂碳二亚胺 1- 乙基 -3(3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐和 N- 羟基磺基琥珀酰亚胺实施。
17. 如权利要求 15 所述的方法, 其中用于进行二级交联反应的交联试剂是一种选自自己二亚氨酸二甲酯 (DMA)、辛二酸双 (磺基琥珀酰亚胺) 酯 (BS3)、辛二亚氨酸二甲酯 (DMS)、庚二亚氨酸二甲酯 (DMP) 和辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) 的交联试剂。
18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中所述用于进行二级交联反应的交联试剂是 DMA。
19. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述二级交联反应借助按重量计 1% 至 5% 的胺反应性交联试剂进行。
20. 如权利要求 15 所述的方法, 还包括在进行所述二级交联反应后添加物理稳定剂。
21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中所述物理稳定剂是藻酸钠。
22. 一种治疗干燥、老化或受损皮肤的方法, 包括施加包含一种或多种如权利要求 1 所述的稳定化蛋白酶的化妆品组合物至所述皮肤。
23. 一种伤口或烧伤清创的方法, 包括局部施加包含一种或多种如权利要求 1 所述的

稳定化蛋白酶的组合物。

用于皮肤护理中的稳定化蛋白酶

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2010 年 1 月 19 日提交的美国临时申请 No. 61/296, 052 的优先权。

[0003] 概述

[0004] 公开了一项发明,其涉及合成用作皮肤护理剂的源自植物的固定化和交联的蛋白酶。所得到的稳定化蛋白酶将因为其固定化性质而最少限度地渗透皮肤。该蛋白酶将因其交联性质并且在某些实施方案中归因于其借助物理添加剂的稳定作用而保留活性。本发明尤其涉及在局部皮肤应用中使用的连接的木瓜蛋白酶产物。

[0005] 背景

[0006] 蛋白酶的活性在表皮稳态方面是重要的。因此,当施加至皮肤时,蛋白酶具有多种潜在益处,但是受某些限制作用影响。木瓜蛋白酶是一种源自番木瓜和某些其他植物的有力蛋白酶。然而,它在溶液状态下迅速丧失活性。这是因为与全部蛋白酶相似,木瓜蛋白酶自我消化以及经历变性。此外,当使用常规木瓜蛋白酶产物作为与皮肤渗透和皮肤刺激相关的局部皮肤护理剂时,可以遭遇伴随这些木瓜蛋白酶产物的其他难题。高度地希望的是开发在皮肤护理中使用的没有此类限制的蛋白酶产物,并且更具体地,木瓜蛋白酶产物。

[0007] 为克服常规技术中的上述难题,本发明的示例性实施方案提供借助本文所述的技术改良的稳定的交联蛋白酶产物,并且尤其提供改良的稳定的交联蛋白酶产物。

[0008] 例如,在本发明的一些实施方案中,为了获得稳定的交联木瓜蛋白酶产物、将木瓜蛋白酶在初级交联反应中固定在聚合物如例如卡波姆或卡波普上,并且随后通过添加具有胺反应性的低分子量同源双功能交联试剂(例如己二亚氨酸二甲酯(DMA, Dimethyl adipimidate)、辛二酸双(磺基琥珀酰亚胺)酯(BS3, Bis(Sulfosuccinimidyl) suberate)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS, Dimethyl Suberimidate)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP, Dimethyl pimelimidate)和辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS, Disuccinimidyl suberate))进行二级交联反应。

[0009] 在本发明的其他示例性实施方案中,进行初级交联反应和二级交联反应以获得稳定的交联木瓜蛋白酶产物,并且随后稳定的交联木瓜蛋白酶使用物理稳定剂例如糖或糖聚合物进一步稳定。例如,藻酸钠可以根据本发明的示例性实施方案用作物理稳定剂。

[0010] 以上交联的稳定化木瓜蛋白酶产物仍可以通过包括在某些防腐剂体系或水包油制剂中的以上稳定化木瓜蛋白酶产物被进一步稳定化。

[0011] 根据本发明的示例性实施方案的固定化、交联和稳定化蛋白酶(例如木瓜蛋白酶)复合物的益处包括但不限于:

[0012] 1. 最小的皮肤渗透作用,

[0013] 2. 在溶液中或干燥形式下保留蛋白酶活性

[0014] 3. 最小的皮肤刺激作用,和

[0015] 4. 易于配制。

[0016] 在本发明的其他实施方案中,描述了包含稳定化蛋白酶的化妆品组合物、个人护理组合物和药物组合物。

[0017] 附图简述

[0018] 以下附图仅出于说明目的而提供, 并且不意图是限制性的。

[0019] 图 1 说明用于形成根据本发明的稳定的交联蛋白酶的交联反应。

[0020] 图 2 说明根据本发明的示例性实施方案的稳定的交联木瓜蛋白酶产物, 所述产物已经历过图 1 中说明的交联反应。

[0021] 图 3 说明在多个温度下贮存根据本发明的示例性实施方案的稳定化木瓜蛋白酶的样品多达 12 周后第 0 天活性的百分比。

[0022] 图 4 说明在多个温度下贮存无 DMA 样品多达 12 周后第 0 天活性的百分比。

[0023] 图 5 说明 Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线。

[0024] 图 6(a) 说明根据本发明的示例性实施方案在多个温度下贮存稳定化木瓜蛋白酶样品多达 12 周后保留的第 0 天活性的百分比。

[0025] 图 6(b) 说明在多个温度下贮存无 DMA 样品多达 12 周后保留的第 0 天活性的百分比。

[0026] 图 7 是说明在根据本发明的示例性实施方案的稳定的交联木瓜蛋白酶产物中不存在游离的活性木瓜蛋白酶的图表。

[0027] 图 8 是说明含有 0.2% BS3 的样品和不含任何 BS3 的对照样品在不同温度下 1 周后的活性百分比的图表。

[0028] 图 9 是说明稳定化木瓜蛋白酶样品在有和没有 0.1% 藻酸盐的情况下 4 周后的保留活性的百分比的图表。

[0029] 图 10 是 Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线。

[0030] 图 11 是说明糖或糖聚合物对在 25°C 和 40°C 下 10 天后的游离木瓜蛋白酶的稳定性的影响的图表。

[0031] 图 12 是说明 0.4% 木瓜蛋白酶在 2 周后保留的活性的百分比的图表。

[0032] 图 13(a) 说明已经由 DMA 交联并且已经与藻酸钠进一步反应的稳定的交联木瓜蛋白酶产物。

[0033] 图 13(b) 是说明在多个温度下贮存 1% DMA 样品多达 12 周后保留的活性的百分比的图表。

[0034] 图 13(c) 是说明在多个温度下贮存无 DMA 样品多达 12 周后第 0 天活性的百分比的图表。

[0035] 图 14 是说明 DMA 对连接的木瓜蛋白酶的活性保留的影响的曲线图。

[0036] 图 15 是说明在不同温度下 12 周后的连接木瓜蛋白酶样品中的活性的图表。

[0037] 图 16 是 Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线。

[0038] 图 17 是说明在制剂中保留的(含 DMA 的)连接木瓜蛋白酶的活性的曲线图。

[0039] 图 18 是说明在制剂中保留的(不含 DMA 的)连接木瓜蛋白酶的活性的曲线图。

[0040] 图 19 是说明在制剂内保留的连接木瓜蛋白酶的活性的曲线图。

[0041] 图 20 是在安慰剂制剂中的 Sigma 木瓜蛋白酶的标准曲线。

[0042] 图 21 是说明在油和水制剂中保留的连接木瓜蛋白酶的活性的曲线图。

[0043] 详述

[0044] 除非另外限定, 否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的

普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或检验本发明,然而现在描述合适的方法和材料。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用方式完整地并入。在矛盾的情况下,本说明书(包括定义)将居主导。此外,所述材料、方法和实施例仅是说明性的并且不意图是限制性的。

[0045] 本发明的其他特征和优点将从以下详细描述并且从权利要求书中是显而易见的。如对本领域技术人员而言将显而易见的,本文所述的具体特征和实施方案可以与任何其他特征或实施方案组合。

[0046] 表皮由几个层(strata)或层组成。最外层一角质层由死亡的细胞组成,所述细胞已经在几天范围内从该层下方向上移行。这些死亡细胞通常借助一个称作表皮脱屑的过程从皮肤表面撒落,所述过程刺激新细胞在更深水平下生长。较年幼的皮肤在这个过程中比老化或受损的皮肤更高效。因此,老化的皮肤显得晦暗、厚和较无光泽(less toned)。这可以因环境因素而恶化,如暴露于阳光;激素影响,如雄激素、雌激素和表皮生长因子;和维生素缺乏如维生素A和D的缺乏。蛋白酶活性是脱屑过程中的关键因素。因此,为化妆效果(如皮肤光滑和抗老化)施加蛋白酶至皮肤是合乎需要的。然而,蛋白酶在化妆品和其他应用中的用途已知具有三个主要限制:不稳定性、可能有变应原性和皮肤渗透作用。

[0047] 本发明基于,至少部分地基于这样的发现:蛋白酶可以借助某些交联反应来稳定以形成蛋白酶卡波姆共聚物,在本文也称作“稳定化蛋白酶”。此类稳定化蛋白酶包含与卡波姆交联的蛋白酶,其中蛋白酶的伯胺与卡波姆的羧基交联并且其中蛋白酶的胺经胺反应性交联试剂进一步交联。在本发明的一个实施方案中,稳定化蛋白酶还包含物理稳定剂,例如糖或糖聚合物。

[0048] 还公开了一种形成此类稳定化蛋白酶产物的方法,其中进行初级交联反应以将与所述蛋白酶的伯胺与卡波姆的羧基交联并且通过胺反应性交联试剂进行二级交联反应。

[0049] 蛋白酶

[0050] 蛋白酶是催化蛋白质分解的酶。蛋白酶,本身作为蛋白质,具有自我降解的倾向并且在本质上是稳定的。这种蛋白质本质也使得它们具有变应原性。另外,因为它们降解蛋白质的能力,所以它们可以渗透至表皮的更深层并且对下层造成损伤。用于本发明中的合适蛋白酶包括木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶和奇异果蛋白酶。

[0051] 无花果蛋白酶是从无花果(榕属(Ficus)树的果实)的胶乳中分离的非特异性巯基蛋白酶。无花果蛋白酶最常见地从无花果(Ficus carica)和脱毛榕木(Ficus glabatra)获得。然而,无花果蛋白酶也可以从其他榕属物种(如印度榕(Ficus elastica)和Ficus insipida)的果实中分离。菠萝蛋白酶是从菠萝(凤梨(Ananas comosus))的茎和/或果实分离的巯基蛋白酶。奇异果蛋白酶,也称猕猴桃蛋白酶,是一种从猕猴桃果实(硬毛猕猴桃(Actinidia deliciosa))获得的半胱氨酸蛋白酶。木瓜蛋白酶是一种从番木瓜(Carica papaya)和山地番木瓜(Vasconcellea cundinamaricensis)、最经常地从绿色未成熟果实的胶乳中获得的半胱氨酸蛋白酶。这些蛋白酶按重量计以约0.1%和5%之间的浓度存在。

[0052] 卡波姆

[0053] 蛋白酶首先固定在卡波姆上。卡波姆是具有高分子量的丙烯酸的均聚物,所述丙烯酸与几种多元醇烯丙基醚(例如烯丙基醚季戊四醇、蔗糖的烯丙基醚或丙烯的烯丙基

醚)中的任一种交联。合适卡波姆的例子是卡波姆 910、卡波姆 934、卡波姆 934p、卡波姆 940 和卡波姆 941,其中数字后缀表示聚合物链的平均分子量。如本文所用,“固定化”蛋白酶或“连接的”蛋白酶指已经通过初级交联反应与卡波姆反应的蛋白酶。适用于这种初级交联反应的交联剂是能够将羧基与伯胺偶联的试剂。合适交联剂的一个例子是水溶性碳二亚胺 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺。EDC 是用来将羧基与伯胺偶联的零长度交联剂。EDC 与羧酸基团反应以产生 O-酰基异脲基团,该基团与游离的胺基团反应后形成交联键。EDC 在这个实施方案中是在反应期间转变成双取代脲的初级交联剂。NHS 是一种增加交联速率并且在交联反应期间保持不变的酸酯和催化剂。

[0054] 化学交联剂

[0055] 一旦固定在卡波姆上,则固定化蛋白酶与胺反应性交联试剂在二级交联反应中反应以形成蛋白酶卡波姆共聚物,在本文也称作“稳定化蛋白酶”。交联试剂优选地是低分子量交联试剂,从而该交联试剂将在二级交联反应中完全反应或近乎完全反应。可以使用的合适交联试剂的例子包括亚氨酯交联试剂如己二亚氨酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)和二甲基 3,3 二硫代双(dimethyl 3,3dithiobis)。胺反应性交联试剂可以按重量计以范围从约 0.05%至约 5%、优选地约 1%和 5%之间的多个浓度提供。在某些实施方案中,使用 DMA。

[0056] 物理稳定剂

[0057] 在化学交联后,固定化和交联的蛋白酶任选地用物理稳定剂例如糖或糖聚合物进一步稳定。合适的糖或糖聚合物的例子是藻酸钠、海藻糖、甘露醇、甘油和黄原胶。在一个实施方案中,使用藻酸钠。这种物理稳定剂可以按重量计约 0.1%和 5%之间的浓度包含。

[0058] 在图 1 中显示用于形成本发明稳定化蛋白酶的一个实施方案的交联反应的图示。在图 2 中显示稳定化木瓜蛋白酶产物的图示。

[0059] 应用 / 制剂

[0060] 本发明的稳定化蛋白酶具有最小的皮肤渗透作用,以溶液或干燥形式保留蛋白酶活性,具有最小的皮肤刺激作用并且相对易于在制剂中提供。因此,与常规技术的蛋白酶产物相比,本发明的示例性实施方案提供更稳定和安全得多的蛋白酶产物,特别是稳定化木瓜蛋白酶产物实施方案。

[0061] 稳定化蛋白酶适用于化妆品和个人护理制剂中,例如,剥脱制品、抗皱纹和 / 或抗老化制品、沐浴添加剂、护发制品、液体皂和销售皂、清洁溶液、湿润清洁布、油剂或粉剂、抗痤疮制品。稳定化蛋白酶特别适于通过施加本发明的一种或多种稳定化蛋白酶至需要治疗的干燥、老化或受损皮肤来治疗干燥、老化或受损的皮肤。

[0062] 化妆品和 / 或个人护理制剂可以为例如油包水或水包油乳液、醇性或含醇制剂、离子型或非离子型两性脂质的囊泡状分散体或凝胶的形式。示例性化妆品和 / 或个人护理制剂包含按重量计约 0.5%和 5%之间、优选地约 1%和 3%之间的稳定化蛋白酶。

[0063] 本发明的稳定化蛋白酶也适于药物应用,例如,清创应用。清创是从伤口(例如溃疡伤口或烧伤)除去死亡或受损组织以辅助愈合。在本发明的一个实施方案中,将本发明的一种或多种稳定化蛋白酶施加至需要清创的皮肤伤口或烧伤。用于治疗伤口或烧伤的包含稳定化蛋白酶的示例性制剂和产品包括绷带 / 敷料、贴剂、洗涤溶液剂、油膏剂或凝胶剂或合成性组织。在某些实施方案中,清创组合物,例如绷带、敷料或贴剂,可以任选地包括抗

微生物药。对于清创应用,在药物组合物中包括的稳定化蛋白酶的量将是有效清除坏死组织和使伤口中的脓液化并且在合理时间内(例如,在七天时间内)实现基本上除去全部此类物质的量。

[0064] 除皮肤护理应用之外,本发明的稳定化蛋白酶也可以适于本领域已知的其中将希望有稳定形式蛋白酶的其他应用中。一个示例性应用是口腔护理组合物。

[0065] 包含稳定化蛋白酶的局部用组合物可以进一步包含在化妆品制剂、个人护理制剂或药物制剂中常规使用的多种其他成分,只要它们没有不可接受地更改本发明的益处。任选常规成分类别的非限制性例子包括香料、颜料、着色剂、精油、收敛剂、抗老化剂、抗痤疮剂、抗结块剂、消泡剂、抗微生物剂、抗氧化剂、粘合剂、pH 调节剂、皮肤漂白剂和光亮剂、皮肤调理剂、防晒剂、防腐剂、抗炎剂、润湿剂、增稠剂和维生素。

[0066] 对于化妆品、个人护理和/或药物应用的某些实施方案,需要随稳定化蛋白酶进一步包括防腐剂体系。酶已知在苛刻条件(如较高温度和存在不相容性的化学品如强力乳化剂)下变性。与稳定化蛋白质一起使用并且特别适用于稳定化木瓜蛋白酶的两个示例性防腐剂体系是:

[0067] (a) 苯氧乙醇 + 苯甲酸

[0068] (b) Diocide(苯氧乙醇 + 辛二醇 + 己二醇的掺合物)

实施例

[0069] 本发明在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制在权利要求书中描述的本发明范围。

[0070] 实施例 1

[0071] 通过进行初级交联反应产生了保留其蛋白酶活性并且比含有游离木瓜蛋白酶更安全的稳定的木瓜蛋白酶产物,在所述初级交联反应中,使用碳二亚胺 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)连同 N-羟基磺基琥珀酰亚胺(NHS)一起,使 1%木瓜蛋白酶与卡波姆交联。接下来,随后进行二级交联反应,在所述二级交联反应中,固定化木瓜蛋白酶与己二亚氨酸二甲酯(DMA)反应以进一步交联了交联的木瓜蛋白酶,从而形成稳定的交联木瓜蛋白酶产物。按重量计,DMA 以 1%浓度提供并且木瓜蛋白酶以 1%浓度提供。

[0072] 产生三个(3)实验性实验批次的以上稳定化木瓜蛋白酶产物以确定 1% DMA 在经过 12 周的贮存期后对初级交联木瓜蛋白酶的酶活性/稳定性的影响。表 1 中描述了用于开展这些实验的反应条件。

[0073] 表 1

[0074]

使用 Invitrogen E6639 EnzChek®试剂盒时酶活性的分析方案				
木瓜蛋白酶标准曲线				
STD#	储备液(U/mL)	储备液(1 U/mL)	分析缓冲液	
1	1	1000	0	
2	0.5	500	500	
3	0.25	250	750	
4	0.1	100	900	
5	0.05	50	950	
6	0.01	10	990	
7	0.005	5	995	
8	0	0	1000	
制备 1 单位/mL 的木瓜蛋白酶储备液				
10 mg Sigma 木瓜蛋白酶				

[0075]

25 ml dl 1×消化缓冲液	
材料及缓冲液要求	
0.1 M 碳酸氢钠, pH 8.3	
1×消化缓冲液: PBS pH6 + 50μl TX-100	
BODIPY TRX 酪蛋白的 1 Mg/ml 储备液= 1 小瓶底物并溶解于 0.2 ml 碳酸氢盐缓冲液中	
10μg/mL BODIPY 酪蛋白工作溶液:	
在 50 ml falcon 中添加 19.8 ml 消化缓冲液中的 0.2 mL 储备液底物	
测定法:	20 μl 的 STD/样品
	80 μl 的 1X 消化缓冲液
	100 μl 的 10μg/mL BODIPY 酪蛋白工作溶液
样品	50μl 连接的木瓜蛋白酶与含有 0.1%Triton X-100 的 50μl 1X
方法	消化缓冲液混合
在室温孵育平板 1 小时, 伴以温和搅拌。使平板避光。	
在荧光微量平板读数仪中读取荧光。使用标准荧光滤光器, 激发 530/25nm, 发射 620/40nm。	

[0076] 下文在表 2(a)–5(b) 中描述三个独立实验室批次的结果, 所述的实验室批次用于确定在多个温度下在 12 周时间内具有 1% DMA 和没有 DMA 的固定化木瓜蛋白酶的保留活性。表 2(a) 描述了连接的固定化木瓜蛋白酶在还含有 1% DMA 的实验样品中的保留活性的百分比。表 2(b) 描述了固定化木瓜蛋白酶在不包括 DMA 的对照样品中的保留活性的百分比。实验样品和对照样品是基本上相同的, 除了对照样品不含任何 DMA 之外。

[0077] 表 2(a)–以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶

[0078]

时间	4C	25C	40C	50C
	100	100	100	100
2 周	103.927	106.806	92.670	75.654
4 周	101.832	98.168	69.372	26.70

[0079]

6 周	97.906	95.812	55.236	13.089
0 周	96.073	92.670	36.911	2.356
12 周	95.812	84.296	12.923	2.068

[0080] 表 2(b)– 固定化木瓜蛋白酶 (无 DMA)– 对照

[0081]

时间	4C	25C	40C	50C
0 周	100	100	100	100
2 周	96.419	68.286	53.708	25.064
4 周	91.049	57.545	47.826	8.440
6 周	90.537	45.013	26.087	2.558
8 周	85.166	27.877	12.788	0.256
12 周	78.772	21.043	6.115	0.305

[0082] 表 3(a)– 以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶

[0083]

时间	4C	25C	40C	50C
0 周	100	100	100	100
2 周	107.320	110.000	87.530	65.430
4 周	95.620	92.650	65.430	29.76
6 周	91.420	87.210	56.540	10.430
8 周	87.240	84.230	30.120	1.340
12 周	85.350	80.460	10.870	1.000

[0084] 表 3(b)– 固定化木瓜蛋白酶 (无 DMA)– 对照

[0085]

时间	4C	25C	40C	50C
0 周	100	100	100	100
2 周	92.340	63.450	62.870	20.870

4 周	88.010	53.450	44.620	5.670
6 周	84.320	44.670	28.980	1.650
8 周	81.760	22.970	10.960	0.430
12 周	72.350	17.650	4.300	0.010

[0086] 表 4(a) – 以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶

[0087]

时间	4C	25C	40C	50C
----	----	-----	-----	-----

[0088]

0 周	100	100	100	100
2 周	99.000	99.980	92.670	68.520
4 周	97.620	96.210	62.650	22.01
6 周	96.420	92.510	52.980	10.650
8 周	90.610	82.100	31.000	2.420
12 周	88.010	80.110	10.650	0.890

[0089] 表 4(b) – 固定化木瓜蛋白酶 (无 DMA) – 对照

[0090]

时间	4C	25C	40C	50C
0 周	100	100	100	100
2 周	98.870	71.820	50.980	27.870
4 周	86.340	52.340	41.620	5.750
6 周	80.730	40.210	22.320	1.230
8 周	81.530	20.410	11.876	0.910
12 周	75.610	15.620	3.110	0.030

[0091] 表 5(a) – 批次 1 (表 3)、批次 2 (表 4) 和批次 3 (表 5) 的以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶的保留活性%的平均值

[0092]

时间	4C	25C	40C	50C
----	----	-----	-----	-----

0 周	100	100	100	100
2 周	103.4	105.6	91.0	69.9
4 周	98.4	95.7	65.8	26.2
6 周	95.2	91.8	54.9	11.4
8 周	91.3	86.4	32.7	2.0
12 周	89.7	81.6	11.5	1.3

[0093] 表 5(b)– 批次 1(表 3)、批次 2(表 4) 和批次 3(表 5) 的 (无 DMA) 固定化木瓜蛋白酶的保留活性%的平均值

[0094]

时间	4C	25C	40C	50C
0 周	100	100	100	100
2 周	95.88	67.85	55.85	55.85
4 周	88.47	54.44	44.69	44.69

[0095]

6 周	85.20	43.30	25.80	25.80
8 周	82.82	23.75	11.87	11.87
12 周	75.58	18.10	4.51	4.51

[0096] 从表 2(a)–5(b) 的结果可见,在实验样品中以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶的活性在多个温度下显著地大于对照样品中未与 DMA 反应的固定化木瓜蛋白酶的活性。因此,已经历过初级交联反应以使木瓜蛋白酶与卡波姆交联并且随后经历与 1% DMA 二级交联反应的木瓜蛋白酶明显比已经历过初级交联反应但未经与 DMA 二级交联反应的木瓜蛋白酶对照样品更稳定。另外,图 3 和图 4 说明了表 2(a)–5(b) 的结果,即,已经以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶的活性在多个温度下显著地大于对照样品中未与 DMA 反应的固定化木瓜蛋白酶的活性。

[0097] 如下文在表 6 和表 7 中描述,基于每单位固定化木瓜蛋白酶样品的荧光变化确定实验样品和对照样品中的木瓜蛋白酶活性。形成如图 5 中所显示的 Sigma 木瓜蛋白酶活性标准曲线以辅助定量根据本实施例以 1% DMA 交联的固定化木瓜蛋白酶的活性。如上文指出,使用 **EnzChek®** 蛋白酶分析试剂盒 (E-6639) 来获得这条标准曲线和每单位本发明实验样品的荧光变化。

[0098] 表 6– 具有 1% DMA 和没有 DMA(对照) 的固定化木瓜蛋白酶的荧光值

[0099]

具有或没有 1%DMA 的连接木瓜蛋白酶样品(12 周样品)								
	4C							
1	LP-1%DM A	1:8	5674	5432	5876	5660.7	4415	0.458
2	LP-对照	1:8	4598	5165	5120	4961.0	3715	0.385
	25C							
1	LP-1%DM A	1:8	5432	4987	4976	5131.7	3886	0.403
2	LP-对照	1:8	2204	2252	2359	2271.7	1026	0.103

[0100]

	40C							
1	LP-1%DM A	1:8	1903	1885	1849	1879.0	633	0.062
2	LP-对照	1:8	1580	1571	1575	1575.3	329	0.030
	50C							
1	LP-1%DM A	1:8	1334	1345	1474	1384.3	138	0.010
2	LP-对照	1:8	1274	1315	1324	1304.3	58	0.001

[0101] 表 7- 以单位 /ml 测量的具有 1% DMA 的 1% 固定化木瓜蛋白酶和无 DMA 的固定化木瓜蛋白酶（对照）的活性

[0102]

	活性 单位/ml	单 位 /ml			
0 周	LP-1%DMA	3.82	3.82	3.82	3.82
数据 041608	LP-对照	4.91	4.91	4.91	4.91
		4C	25C	40C	50C
2 周	LP-1%DMA	3.97	4.08	3.54	2.89
数据 043008	LP-对照	3.77	2.67	2.1	0.98
4 周	LP-1%DMA	3.89	3.75	2.65	1.02
数据 051408	LP-对照	3.56	2.25	1.87	0.33
6 周	LP-1%DMA	3.74	3.66	2.11	0.5
数据 052808	LP-对照	3.54	1.76	1.02	0.1
8 周	LP-1%DMA	3.67	3.54	1.41	0.09
数据 061108	LP-对照	3.33	1.09	0.5	0.01
12 周	LP-1%DMA	3.66	3.22	0.49	0.08
数据 070208	LP-对照	3.08	0.82	0.24	0.01

[0103]

[0104] 在其他实验中,在4℃、25℃和45℃的温度下在12周内将交联的1%木瓜蛋白酶随1% DMA 一起贮存并且交联的1%木瓜蛋白酶不与 DMA 一起贮存,以确定这些木瓜蛋白酶样品在这些温度下的稳定性。使用 Invitrogen **EnzChek®** 分析试剂盒, N = 3,通过木瓜蛋白酶活性测定法获得这个实验的结果。

[0105] 如图 6(a) - 图 6(b) 中所示,用 DMA 交联固定化木瓜蛋白酶显著改进产物在 25℃ 和 45℃ 的稳定性,与其中连接的木瓜蛋白酶不与 DMA 一起贮存的对照样品相比。图 6(a) 说明在贮存含有由 DMA 交联的连接木瓜蛋白酶的样品多达 12 周后所保留的活性的百分比。图 6(b) 说明贮存多达 12 周的对照样品,所述对照样品含有不含 DMA 的连接木瓜蛋白酶。进一步指出,如 6(a) 图中所示,确定了由 DMA 交联的连接木瓜蛋白酶在 4℃ 和 25℃ 下持续 12 周时保留超过约 80% 的活性并且在 45℃ 保留约 50% 的活性。

[0106] 在其他实验中,如图 7 中所显示,实施了稳定化木瓜蛋白酶中游离的活性木瓜蛋白酶的测定。该实验的结果是,确定在已经根据本发明的示例性实施方案的在初级交联反

应中通过 EDC/NHS 交联并且随后在二级交联反应中通过 1% DMA 进一步交联的木瓜蛋白酶中不存在游离的活性木瓜蛋白酶。另一方面,在未交联的对照样品的木瓜蛋白酶中存在显著的游离木瓜蛋白酶活性。

[0107] 实施例 2

[0108] 在实施例 2 中,作为用作二级交联剂的 DMA 的替代,使用 0.2% 的交联剂 BS3 在二级交联反应中交联固定化木瓜蛋白酶产物。在表 8-10 中说明并且在下文讨论用于确定随 0.2% BS3 一起贮存的固定化木瓜蛋白酶实验样品和不随 BS3 一起贮存的固定化木瓜蛋白酶对照样品的活性百分比的操作方案、反应物、反应条件和结果。

[0109] 表 8

[0110]

使用 Invitrogen E6639 EnzChek 试剂盒时酶活性的分析方案
木瓜蛋白酶标准曲线

[0111]

STD #	储备液(U/ml)	储备液(1 U/ml)	分析缓冲液	
1	1	1000	0	
2	0.5	500	500	
3	0.25	250	750	
4	0.1	100	900	
5	0.05	50	950	
6	0.01	10	990	
7	0.005	5	995	
8	0	0	1000	
制备 1 单位/ml 的木瓜蛋白酶储备液				
10 mg Sigma 木瓜蛋白酶				
25 ml dl 1×消化缓冲液				
材料及缓冲液要求:				
0.1 M 碳酸氢钠, pH 8.3				
1×消化缓冲液: PBS pH6 + 50μl TX-100				
BODIPY TRX 酪蛋白的 1 Mg/ml 储备液= 1 小瓶底物并溶解于 0.2 ml 碳酸氢盐缓冲液中				
10μg/ml BODIPY 酪蛋白工作溶液:				
在 50 ml falcon 中添加 19.8 ml 消化缓冲液中的 0.2 mL 储备液底物				
测定法: 20μl 的 STD/样品				
80μl 的 1×消化缓冲液				
100μl 的 10μg/mL BODIPY 酪蛋白工作溶液				
样品: 50μl 连接的木瓜蛋白酶与含有 0.1%Triton X-100 的 50μl 1X 消化缓冲液混合				

[0112]

方法:

在室温孵育平板 1 小时, 伴以温和搅拌。使平板避光。

在荧光微量平板读数仪中读取荧光。使用标准荧光滤光器, 激发 530/25nm, 发射 620/40nm。

管#	样品 ID 连接的木瓜蛋白酶样品	滤光器稀释度	样品	1X 消化缓冲液
1	LP-BS3 4C	1:4	50	150
2	LP-BS3 25C	1:4	50	150
3	LP-BS3 40C	1:4	50	150
4	LP-BS3 50C	1:4	50	150
5	LP-无 BS3 4C	1:4	50	150
6	LP-无 BS3 25C	1:4	50	150
7	LP-无 BS3 40C	1:4	50	150
8	LP-无 BS3 50C	1:4	50	150
		1:4	50	150
产生具有或没有 0.2%BS3 的连接木瓜蛋白酶样品				

[0113] 表 9

[0114]

管#	样品 ID	稀 释 系 数	读 数 1	读 数 2	读 数 3	平均 值	平均 - 阴性对照	单 位/ml	单 位/ml
1	LP-BS3 4C	1:4	10954	10883	12916	11584.3	10231	1.034	4.14
2	LP-BS3 25C	1:4	12196	12865	12959	12673.3	11320	1.156	4.62
3	LP-BS3 40C	1:4	13135	13636	14267	13679.3	12326	1.268	5.07
4	LP-BS3 50C	1:4	11009	11025	11031	11021.7	9668	0.971	3.89
	LP-无 BS3								
5	4CLP-无 BS3	1:4	8174	19586	12	9257.3	7904	0.775	3.10
6	25C	1:4	5345	12494	13	5950.7	4597	0.406	1.62
	LP-无 BS3								

[0115]

7	40C	1:4	3191	7654	12	3619.0	2265	0.146	0.58
	LP-无 BS3								
8	50C	1:4	2383	5583	14	2660.0	1306	0.039	0.16

[0116] 表 10

[0117]

在 1 周后保留的活性 -4C 活性%	无 BS3	0.2% BS3
4C	99.957	99.912
25C	52.389	111.643
40C	18.847	122.479
50C	5.052	93.851

[0118] 从表 10 和图 8 的结果可见,已经用 0.2% BS3 进一步交联的固定化 1%木瓜蛋白酶的活性在多个温度下显著地大于对照样品中未与 BS3 反应的固定化木瓜蛋白酶的活性。

[0119] 实施例 3

[0120] 在这个实施例中,1%稳定化木瓜蛋白酶和 0.1%藻酸钠组合。下文讨论用于确定随 0.1%藻酸钠一起贮存的稳定化木瓜蛋白酶的实验样品和不随藻酸钠一起贮存的稳定化木瓜蛋白酶产物的对照样品的活性百分比的操作方案、反应物、反应条件和结果。

[0121] 表 11

木瓜蛋白酶标准曲线	
制备 5 单位/mL 的木瓜蛋白酶储备液	
10 mg Sigma 木瓜蛋白酶 5ml dl 1X 消化缓冲液	
材料及缓冲液要求:	
1×分析缓冲液: 50 mM 碳酸盐 pH 8.5	
底物: 1X 分析缓冲液中的 2mg/ml 琥珀酰化酪蛋白, 将 5 ml 分析缓冲液 TNBSA	
工作溶液: 100μl TNBSA 储备液中的 1 小瓶(10 mg)溶解至 14.9 ml 分析缓冲液	
测定	50μl 的 STD/样品
法:	

[0122]

[0123]

100μl 底物(2mg/ml), 将平板在室温孵育 20 分钟
50μl TNBSA 溶液, 将平板在室温孵育 20 分钟。
读取在 450 nm 的光密度
测试的样品(4 周连接的木瓜蛋白酶样品-在 101607 木瓜蛋白酶浓度 1%上制备)
未处理 4C 0.1%藻酸盐 4C
未处理 25C 0.1%藻酸盐 25C
未处理 50C 0.1%藻酸盐 50C

[0124] 表 12

[0125]

标准木瓜蛋白酶	值 1	值 2	平均数	阴性	平均阴性对照吸光度 450 nm
3	1.636	1.677	1.6565	0.676	0.9805
2	1.161	1.16	1.1605	0.427	0.7335
1	0.554	0.55	0.552	0.232	0.32
0.5	0.245	0.245	0.245	0.12	0.125
0.25	0.123	0.127	0.125	0.071	0.054
0.1	0.073	0.075	0.074	0.049	0.025
0.05	0.06	0.06	0.06	0.042	0.018
0	0.054	0.061	0.0575	0.031	0.0265

[0126] 表 13

[0127] 测试的样品 (4 周连接的木瓜蛋白酶样品 - 在 101607 木瓜蛋白酶浓度 1% 上制备)

[0128]

值 1 值 2 平 均 阴 性 平均-阴 单位/ml

[0129]

			数		性对照	
未 处 理	1.455	1.15	1.3025	0.7145	0.588	1.754939546
4C						

0.1%藻酸	1.328	1.329	1.3285	0.6123	0.7162	2.132999115
盐 4C						

未 处 理	0.758	0.629	0.6935	0.5605	0.133	0.413152462
25C						

0.1%藻酸	0.936	0.9	0.918	0.563	0.355	1.0678266
盐 25C						

未 处 理	0.691	0.778	0.7345	0.734	0.0005	0.022412268
50C						

0.1%藻酸	0.791	0.746	0.7685	0.6776	0.0909	0.289000295
盐 50C						

第 1 周

单 位

第 0 周活性%

/ml

第 0 周	第 1 周	第 1 周	第 1 周	第 1 周	第 1 周-25C	第 1 周
单 位	-4C	-25C	-50C	-4C		-50C
/ml						

未处理	2.690	2.292	0.777	0.143	85.22	28.9	5.31
藻酸盐	2.795	2.581	1.546	0.986	92.36	55.32	35.26

第 2 周

单 位

第 0 周活性%

/ml

第 0 周	第 2 周	第 2 周	第 2 周	第 2 周	第 2 周-25C	第 2 周
单 位	-4C	-25C	-50C	-4C		-50C
/ml						

[0130]

未处理	2.690	2.113	0.673	0.032	78.56	25	1.2
藻酸盐	2.795	2.550	2.795	0.894	91.23	45	32

第 3 周

	单 位					第 0 周活性%	
	/ml						
	第 0 周	第 3 周	第 3 周	第 3 周	第 3 周	第 3 周-25C	第 3 周
	单 位	-4C	-25C	-50C	-4C		-50C
	/ml						
未处理	2.6902	1.89	0.60	0.03	70.24	22.32	1.03
藻酸盐	2.7950	2.24	1.13	0.59	80.23	40.32	21.01

第 4 周

	单 位					第 0 周活性%	
	/ml						
	第 0 周	第 4 周	第 4 周	第 4 周	第 4 周	第 4 周-25C	第 4 周
	单 位	-4C	-25C	-50C	-4C		-50C
	/ml						
未处理	2.690	1.7549	0.4132	0.0224	65.2394	15.3588	0.8332
藻酸盐	2.795	2.1330	1.0678	0.2890	76.3148	38.2049	10.3399

第 0 周活性%

未处理	第 4 周	第 4 周	第 4 周
	-4C	-25C	-50C
0.1%藻酸盐	65.239	15.359	0.833

76.315 38.205 10.340

[0131] 从表 13 的结果可见,已经随 0.1%藻酸钠一起贮存的稳定化木瓜蛋白酶的活性在多个温度下在 4 周内显著地大于对照样品中未随藻酸钠一起贮存的稳定化木瓜蛋白酶的活性。因此,与 0.1%藻酸钠反应的连接的木瓜蛋白酶比上文提到的不包括藻酸钠的木瓜蛋白酶对照样品显著更稳定。另外,图 9 说明表 13 的结果:具有藻酸钠的稳定化木瓜蛋白酶的活性在多个温度下在 4 周内显著地大于对照样品中不包括藻酸钠的交联木瓜蛋白酶的

活性。

[0132] 另外,如图 10 中所示,使用吸光度和单位 /ml 形成 Sigma 木瓜蛋白酶活性标准曲线以辅助定量与 0.1%藻酸钠在一起的连接的 1%木瓜蛋白酶的活性。

[0133] 在其他实验中,如图 11 中所示,实施糖或糖聚合物在 25℃和 40℃下数天后对游离木瓜蛋白酶的稳定性的影响。所包含的糖或糖聚合物是 0.1%藻酸钠、5%海藻糖、5%甘露醇、5%甘油、0.1 黄原胶、0.1% HA、5%蔗糖、5%山梨醇和无糖对照。从这个结果中指出,发现 0.1%藻酸钠对游离的木瓜蛋白酶具有稳定作用。还在本发明的稳定化木瓜蛋白酶上观察到 0.1%藻酸钠的这种稳定作用。

[0134] 在其他实验中,如图 12 中所示,测定了用 0.4%木瓜蛋白酶制成的稳定化木瓜蛋白酶在 2 周后保留的活性的百分比。在这些实验的一些样品中,连接的木瓜蛋白酶用藻酸钠处理,在一些样品中,连接的木瓜蛋白酶用酞处理,在一些样品中,连接的木瓜蛋白酶用酞和藻酸钠处理,并且在一些样品中,连接的木瓜蛋白酶完全不用以上任何物质处理。如可以从图 12 中发现,用藻酸钠和酞同时处理的样品在两周的每周后具有最大的保留活性%,并且完全不做处理的样品在两周的每周后具有最低的保留活性%。

[0135] 实施例 4

[0136] 在实施例 4 中,固定化木瓜蛋白酶与 1% DMA 反应以进行二级交联,并且为进一步稳定性与 0.1%藻酸钠反应,并且被包括作为包含 1.2%苯氧乙醇+0.2%苯甲酸的防腐剂体系的一部分。在表 14 中显示并且下文讨论用于确定根据本发明一个实施方案的稳定化木瓜蛋白酶实验样品和连接的木瓜蛋白酶产物(不含 DMA 或藻酸钠)的对照样品的活性%的操作方案、反应物、反应条件和结果。

[0137] 表 14

[0138] 使用 InvitrogenE6639EnzChek 试剂盒时酶活性的分析方案

[0139] 木瓜蛋白酶标准曲线

[0140]

STD#	储备液(U/mL)	储备液(1 U/mL)	分析缓冲液
1	1	1000	0
2	0.5	500	500
3	0.25	250	750
4	0.1	100	900
5	0.05	50	950
6	0.01	10	990
7	0.005	5	995
8	0	0	1000

[0141] 制备 1 单位 /mL 的木瓜蛋白酶储备液

[0142] 10mg Sigma 木瓜蛋白酶

[0143] 25ml dl 1× 消化缓冲液

[0144] 材料及缓冲液要求:

[0145] 0.1M 碳酸氢钠, pH8.3

[0146] 1× 消化缓冲液 :PBS pH6+50 μl TX-100

[0147] BODIPY TRX 酪蛋白的 1mg/ml 储备液 = 1 小瓶底物并溶解于 0.2ml 碳酸氢盐缓冲液中 10 μg/mL BODIPY 酪蛋白工作溶液 :

[0148] 在 50ml falcon 中添加 19.8ml 消化缓冲液中的 0.2mL 储备液底物

[0149] 测定法 :20 μl 的 STD/ 样品

[0150] 80 μl 的 1× 消化缓冲液

[0151] 100 μl 的 BODIPY 酪蛋白的 10 μg/mL 工作溶液

[0152]

样品:	1% DMA 样品	对照
	1%木瓜蛋白酶 600(ESP)	1%木瓜蛋白酶 600(ESP)
	1%DMA	无 DMA
	0.1%藻酸盐	0.1%藻酸盐
	1.2%苯氧乙醇	1.2%苯氧乙醇
	0.2%苯甲酸	0.2%苯甲酸

[0153] 样品 :25 μl 连接的木瓜蛋白酶与含有 0.1% Triton X-100 的 50 μl 1× 消化缓冲液混合方法 :

[0154] 在室温孵育平板 1 小时, 伴以温和搅拌。使平板避光。

[0155] 在荧光微量平板读数仪中读取荧光。使用标准荧光滤光器, 激发 590/25nm, 发射 620/40nm

[0156] 表 15

具有不同浓度的其他交联剂的连接木瓜蛋白酶样品(12 周样品)				
4C				
1	LP-1%DMA	1:8	25	175
2	LP-对照	1:8	25	175
25C				
1	LP-1%DMA	1:8	25	175
2	LP-对照	1:8	25	175
45C				
1	LP-1%DMA	1:8	25	175
2	LP-对照	1:8	25	175

[0157]

[0158] 具有或没有 1% DMA 的连接木瓜蛋白酶样品 (12 周样品)

[0159]

4C									
1	LP-1%DMA	1:8	5321	5467	5562	5450.0	4223	0.580	4.64
2	LP-对照	1:8	4578	4879	5098	4851.7	3625	0.485	3.88
25C									
1	LP-1%DMA	1:8	5098	5291	5120	5169.7	3943	0.535	4.28
2	LP-对照	1:8	2789	2908	2871	2856.0	1629	0.169	1.35
45C									
1	LP-1%DMA	1:8	2987	2871	3091	2983.0	1756	0.189	1.51
2	LP-对照	1:8	1765	1775	1879	1806.3	579	0.002	0.02
12 周数据		4C	25C	45C					
LP-1%DMA		4.638	4.283	1.511					

[0160]

	LP-对照	3.880	1.350	0.019
		4C	25C	45C
	活性单位/ml	单 位		
		/ml		
0 周数据	LP-1%DMA	4.87	4.87	4.87
	LP-对照	4.61	4.61	4.61
2 周数据	LP-1%DMA	5.01	5.25	4.31
	LP-对照	4.81	2.67	2.1
4 周数据	LP-1%DMA	5.12	4.98	3.11
	LP-对照	4.67	2.01	1.87
6 周数据	LP-1%DMA	4.98	4.61	2.31
	LP-对照	4.18	1.76	1.02
8 周数据	LP-1%DMA	4.81	4.44	1.98
	LP-对照	4.01	1.35	0.5
12 周数据	LP-1%DMA	4.64	4.28	1.51
	LP-对照	3.88	1.35	0.02
	贮存后保留的活性%			
		4C	25C	45C
2 周数据	LP-1%DMA	102.87	107.80	88.50
	LP-对照	104.34	57.92	45.55
4 周数据	LP-1%DMA	105.13	102.26	63.86
	LP-对照	101.30	43.60	40.56

[0161]

6 周数据	LP-1%DMA	102.26	94.66	47.43
	LP-对照	90.67	38.18	22.13
8 周数据	LP-1%DMA	98.77	91.17	40.66
	LP-对照	86.98	29.28	10.85
12 周数据	LP-1%DMA	95.24	87.94	31.02
	LP-对照	84.16	29.28	0.43

[0162] 如上文指出,根据本发明示例性实施方案的实验样品包含 1% DMA、1%木瓜蛋白酶 600 (ESP)、0.1%藻酸钠、1.2 苯氧乙醇 +0.2%苯甲酸。对照样品包含与实验性制剂样品完全相同的组分,除了对照样品不包括 DMA 之外。下文描述了在 12 周时间内在多种温度下 DMA 对连接的木瓜蛋白酶的保留活性的影响的结果。另外,在图 13(a) 中显示 DMA、连接的木瓜蛋白酶和藻酸钠的化学。

[0163] 从以上数据和图 13(b)、13(c)、图 14 及图 15 中可以发现,与不含有任何 DMA 的对照样品相比,连接的木瓜蛋白酶与 1% DMA 的交联显著地改善连接的木瓜蛋白酶产物在多种温度下在 12 周时间内的稳定性。

[0164] 另外,如上文在表 15 中所述,基于每单位连接的木瓜蛋白酶样品的荧光变化确定实验样品和对照中的木瓜蛋白酶活性。形成如图 16 中所显示的 Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线,以辅助定量根据本实施例用 1% DMA 进一步交联的固定化 1%木瓜蛋白酶的活性。如上文指出,使用 **EnzChek®** 蛋白酶分析试剂盒 (E-6639) 来获得这条标准曲线和根据本发明示例性实施方案的含有 DMA 的固定化木瓜蛋白酶的实验样品和不含 DMA 的对照样品的每单位样品荧光变化。

[0165] 实施例 5

[0166] 在另一个示例性实施方案中,固定化木瓜蛋白酶与 5% DMA 反应以便进一步交联,并且与 0.1%藻酸钠反应,并且被包括作为包含 1.2%苯氧乙醇 +0.2%苯甲酸的防腐剂体系的一部分。下文描述这个实施方案的操作方案和结果。安慰剂制剂含有实验制剂的全部组分,除 DMA 之外。

[0167] 表 16

[0168]

11 周制剂

样品

	稀 释 系 数	读 数 1	读 数 2	读 数 3	平 均 数	平 均 - 阴 性 对 照	单 位/ml	单 位 /ml
--	------------	-------	-------	-------	-------	------------------	--------	------------

4C

963030/1	1:4	1245	1342	1290	1292.3	151	0.055	0.22
963030/3	1:4	1677	1549	1682	1636.0	495	0.244	0.97

25C

963030/1	1:4	1245	1232	1310	1262.3	121	0.039	0.15
963030/3	1:4	1581	1621	1590	1597.3	456	0.222	0.89

45C

963030/1	1:4	1245	1154	1167	1188.7	48	-0.002	-0.01
963030/3	1:4	1576	1582	1501	1553.0	412	0.198	0.79

11 周制剂

样品

963030/1	0.22	0.15	-0.01
963030/3	0.97	0.89	0.79

	配 方 编 号	4C	25C	45C
--	------------	----	-----	-----

0 周样品	安 慰 剂	963030/ 1	0.98	0.98	0.98
-------	-------	--------------	------	------	------

[0169]

	5%DM	963030/	1.09	1.09	1.09
	A 样品	3			
			4C	25C	45C
2 周样品	安慰剂	963030/	0.85	0.82	0.41
		1			
	5%DM	963030/	1.12	1.21	1.05
	A 样品	3			
			4C	25C	45C
4 周样品	安慰剂	963030/	0.61	0.71	0.31
		1			
	5%DM	963030/	1.02	1.02	0.92
	A 样品	3			
			4C	25C	45C
8 周样品	安慰剂	963030/	0.44	0.31	0.15
		1			
	5%DM	963030/	1.00	0.95	0.85
	A 样品	3			
			4C	25C	45C
11 周样品	安慰剂	963030/	0.22	0.15	-0.01
		1			
	5%DM	963030/	0.97	0.89	0.79
	A 样品	3			
	第 0 周活性%				
			4C	25C	45C
2 周样品	安慰剂	963030/	86.73	83.67	41.64

[0170]

1					
5%DM 963030/ 102.75 111.01 96.33					
A 样品 3					
4C 25C 45C					
4 周样品	安慰剂	963030/	62.24	72.45	31.64
1					
5%DM 963030/ 93.58 93.58 84.40					
A 样品 3					
8 周样品					
安慰剂 963030/ 44.90 31.63 15.31					
1					
5%DM 963030/ 91.74 87.16 77.98					
A 样品 3					
11 周样品					
安慰剂 963030/ 22.47 15.75 -0.74					
1					
5%DM 963030/ 89.38 81.60 72.67					
A 样品 3					

[0171] 从以上数据表和图 17-19 中可以发现,与不含有任何 DMA 的对照样品相比,固定化木瓜蛋白酶与 5% DMA 的交联显著地改善固定化木瓜蛋白酶产物在多种温度下在 12 周时间内的稳定性。

[0172] 另外,如在以上数据表中所述,基于每单位固定化木瓜蛋白酶样品的荧光变化确定实验样品和对照中的木瓜蛋白酶活性。形成如图 20 中所显示的在安慰剂制剂中 Sigma 木瓜蛋白的酶标准曲线,以辅助定量根据本实施方案用 5% DMA 交联的固定化 1%木瓜蛋白酶的活性。如上文指出,使用 **EnzChek®** 蛋白酶分析试剂盒 (E-6639) 来获得这条标准曲线和根据本发明示例性实施方案的含有 DMA 的连接木瓜蛋白酶的实验样品和不含 DMA 的对照样品的每单位样品荧光变化。

[0173] 实施例 6-8

[0174] 以下代表可以使用一种或多种稳定化蛋白酶制得的制剂的非限制性实施例。本领域已知多种相似的制剂,可以向其中容易地以多种浓度并入一种或多种稳定化蛋白酶。

[0175] 实施例 6

[0176] 一种示例性弹性乳膏剂凝胶具有例如下表中所示的组成：

[0177]

相	%	供应商	原料	INCI 命名
A	63.300	本地	去离子水	水
A	0.050	本地	EDTA 二钠	EDTA 二钠
A	1.100	Clariant	Aristoflex AVC/USA	丙烯酰二甲基牛磺酸铵/VP 共聚物
A	0.150	Clariant	Aristoflex HMB	丙烯酰二甲基牛磺酸铵/山嵛醇聚醚-25 甲基丙烯酸酯交联聚合物
A	3.000	本地	丁二醇	丁二醇
A	2.000	本地	丙三醇	丙三醇
B	15.000	Momentive	Velvesil DM	聚二甲基硅氧烷和鲸蜡硬脂基聚二甲基 硅氧烷交联聚合物
B	3.000	Dow Corning	Dow Corning 1413	聚二甲基硅氧烷
C	1.200	Seppic	Simulgel NS	丙烯酸羟乙酯/丙烯酰二甲基牛磺酸钠共 聚物和角鲨烷和聚山梨酯 60
D	3.000	BASF	本发明的稳定化木 瓜蛋白酶	
D	1.000	BASF	Germazide PSB	苯氧乙醇、氯苯甘醚、苯甲酸、丁二 醇、山梨酸
E	2.000	Alzo	CUPL PIC	PPG-2 异鲸蜡醇聚醚-20 乙酸酯
E	2.000	Firmenich, Inc.	Hedione	二氢茉莉酮酸甲酯
F	0.100	BASF	Cloisone Red 424C	云母和二氧化钛和洋红
F	0.100	BASF	Timica Silver Sparkle 5500	云母和二氧化钛
F	3.000	本地	水	水

[0178]

[0179] 在一个主要容器中，合并相 A。均匀混合并且转动混合 (sweep-mix) 直至粉末水合

并且批料均匀。当相 A 均匀时,添加相 B 至主要容器,同时均匀混合。混合直至均一。添加相 C 至主要容器,同时均匀混合。混合直至均一。添加相 D 至主要容器,同时均匀混合。混合直至均一。加温相 E 成分至 150℃至 40℃直至熔化。预混相 E 并且添加至主要容器,同时均匀混合。预混相 F。混合直至全部微粒悬浮并且不存在团块。在添加期间继续混合。添加相 F 至主要容器,同时均匀混合。在添加后关闭均匀混合器并且旋转混合直至均一。

[0180] 实施例 7

[0181] 一种示例性洗剂具有例如下表中所示的组成:

[0182]

相	%	供应商	原料	INCI 命名
A	85.50	本地	去离子水	水
A	0.050	本地	EDTA 二钠	EDTA 二钠
A	3.0	本地	1,3-丁二醇	丁二醇
A	1.0	Clariant	AristoflexAVC/USA	丙烯酸二甲基牛磺酸铵/VP 共聚物
B	8.0	Inolex	Lexol GT 865	辛酸/癸酸甘油三酯
B	0.25	Arlacel 165V	Croda	硬脂酸甘油酯和 PEG-100 硬脂酸酯
C	3.0		本发明的稳定化木瓜蛋白酶	
D	1.2	BASF	Germazide PSB	苯氧乙醇和氯苯甘醚和苯甲酸和丁二醇和山梨酸
F	3.000	本地	水	水

[0183] 混合相 A 直至均匀,同时加热至 65-70℃。在单独的容器中,预混相 B。加热至 70-75℃或直至均匀。当相 A 和 B 均处于所需的温度时,添加相 B 至相 A 并且均匀混合直至均一。当相 AB 是均匀时,开始冷却。在 35-30℃添加相 C 并且在合适的混合器中混合直至均一。在均质混合器下添加预混合的相 D 至相 ABC。混合直至均一。

[0184] 实施例 8

[0185] 在这个实施方案中,在 O/W 制剂中连接的木瓜蛋白酶在多种温度下稳定多达 12 周。在 0.1% Triton X-100, n = 3 中悬浮制剂后,使用 Invitrogen EnzChek 分析试剂盒,通过木瓜蛋白酶活性测定法获得结果。

[0186] 如 21 图中所示,连接的木瓜蛋白酶产物由水包油制剂进一步稳定。在 45℃下 12 周后,约 75%活性保留。发现制剂在测试的全部温度下是稳定的。这些结果表明,当交联的木瓜蛋白酶产物包含于油和水制剂中时,这种产物甚至进一步稳定。

[0187] 已经描述本发明的示例性实施方案的情况下,应当进一步指出,对于本领域技术人员轻易显而易见的是,可以产生多种修改而不脱离由所附权利要求书的界限和范围限定的本发明的精神和范围。

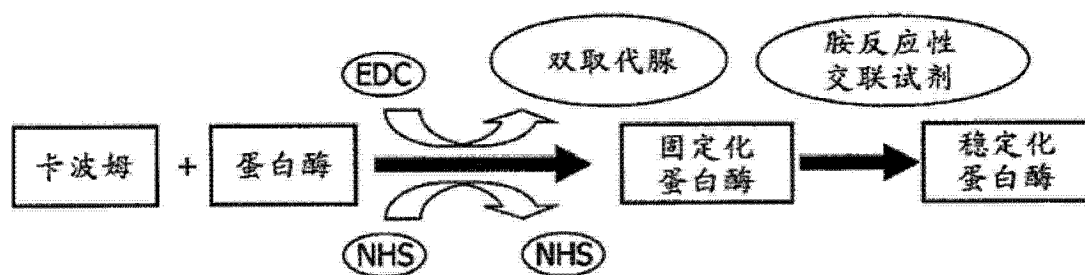


图 1

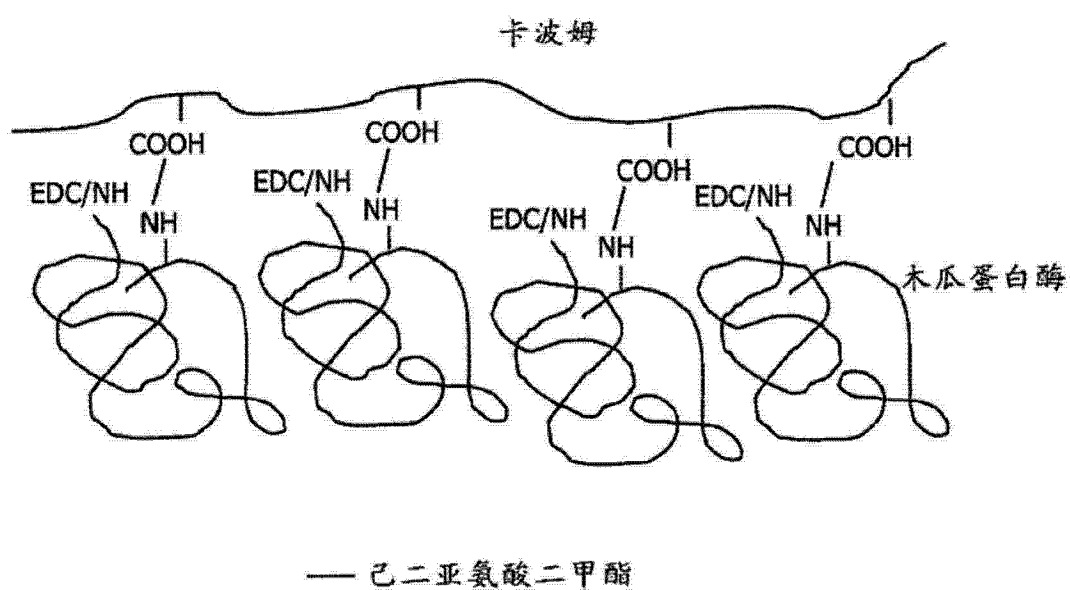


图 2

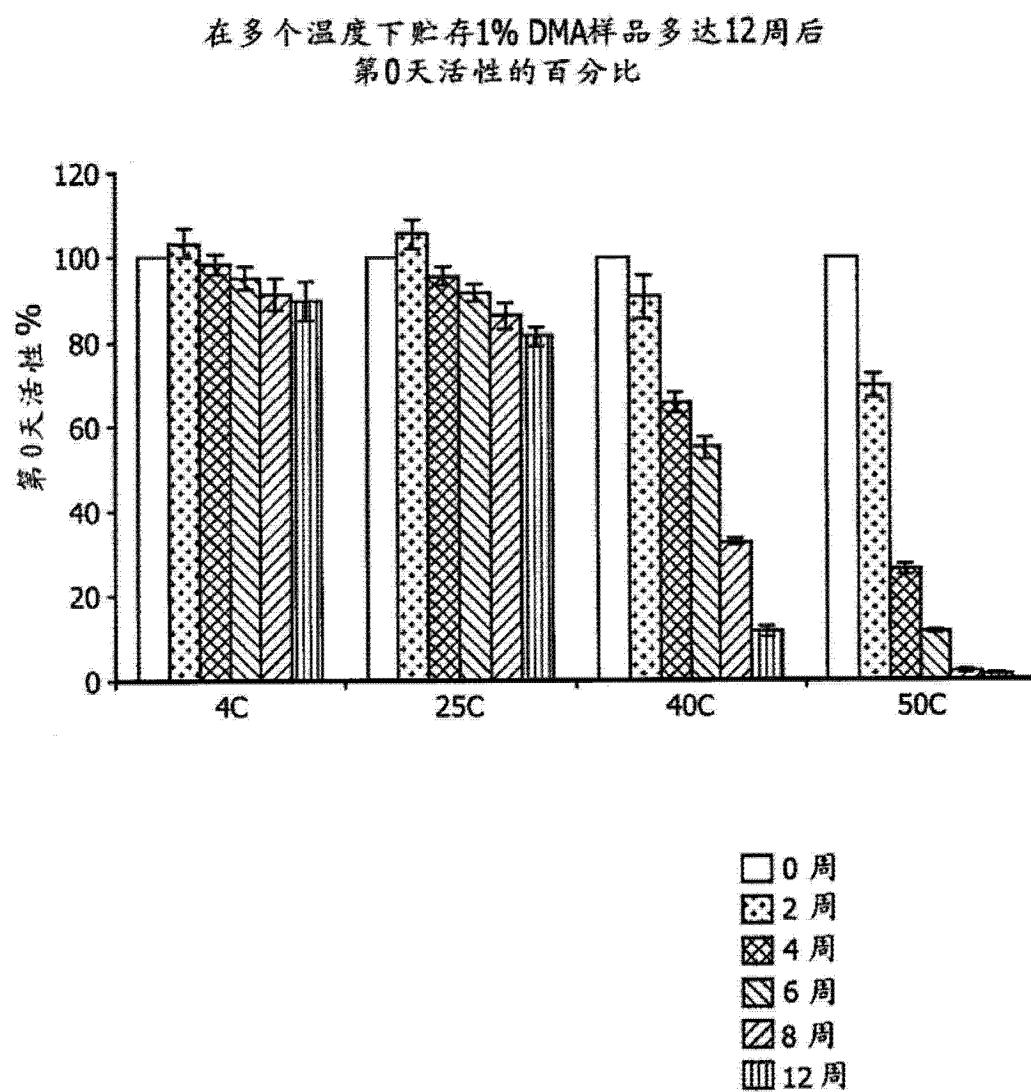


图 3

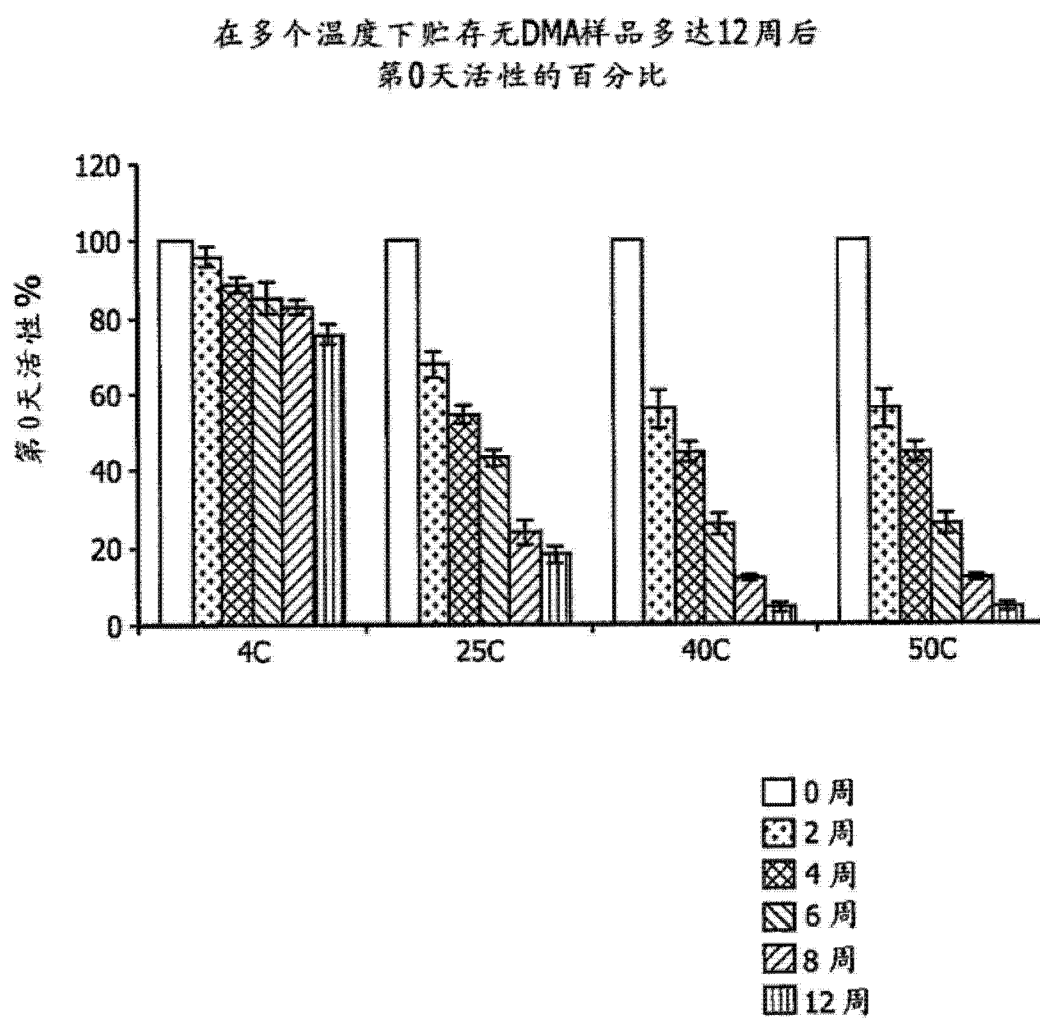


图 4

Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线

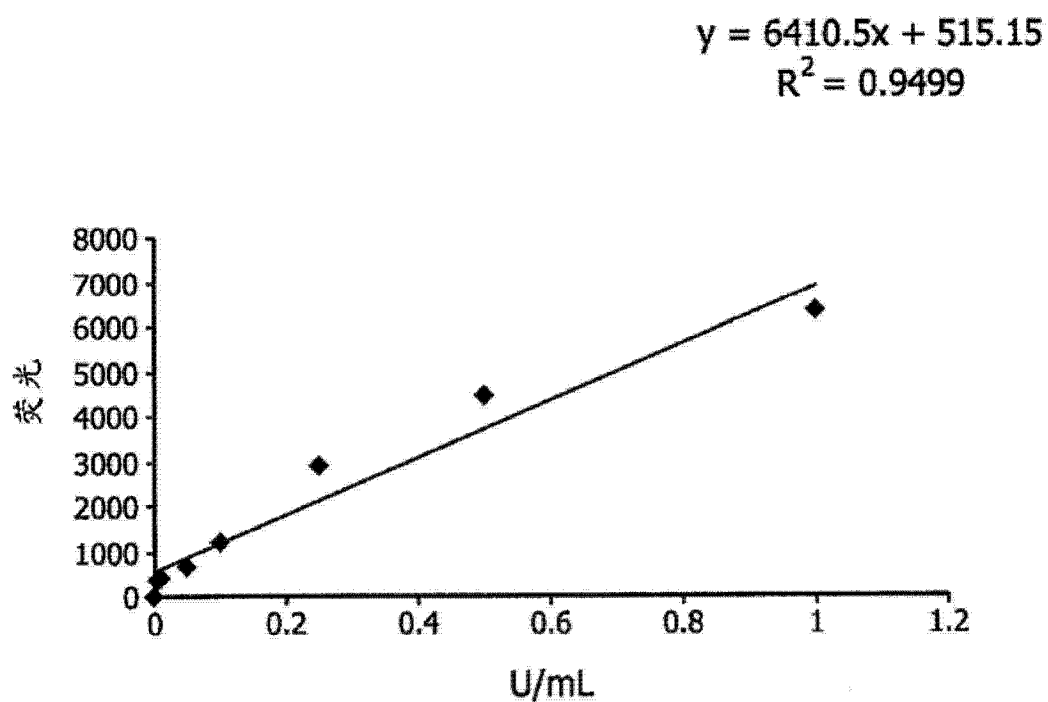


图 5

在多个温度下贮存1% DMA样品多达12周后保留的活性的百分比

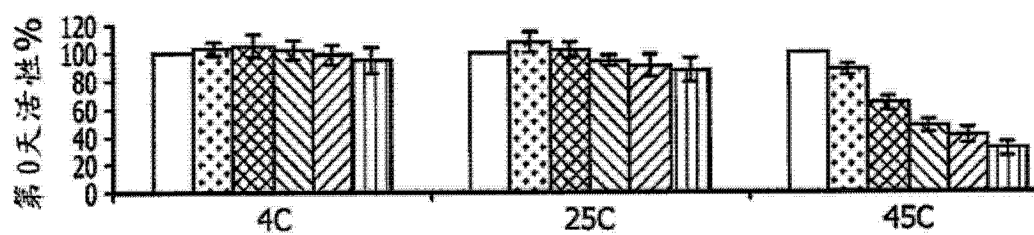


图 6(a)

在多个温度下贮存无DMA样品多达12周后保留
的活性的百分比

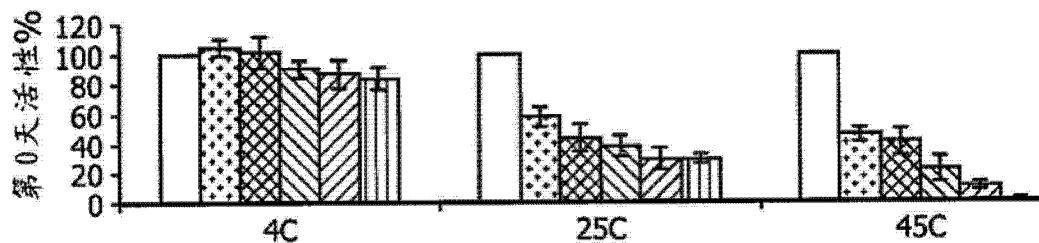
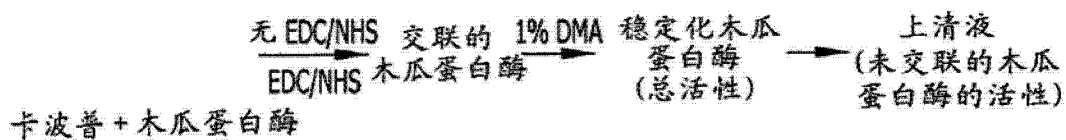


图 6(b)

游离的活性木瓜蛋白酶的测定



(上清液中) 游离木瓜蛋白酶的活性 (总活性%)

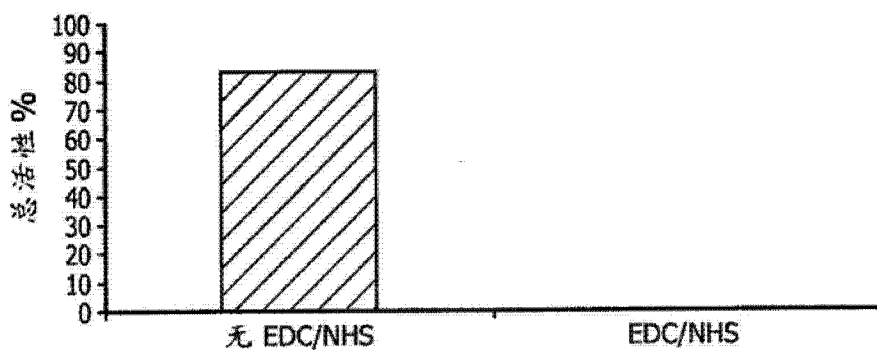


图 7

在不同温度下1周后保留的活性%

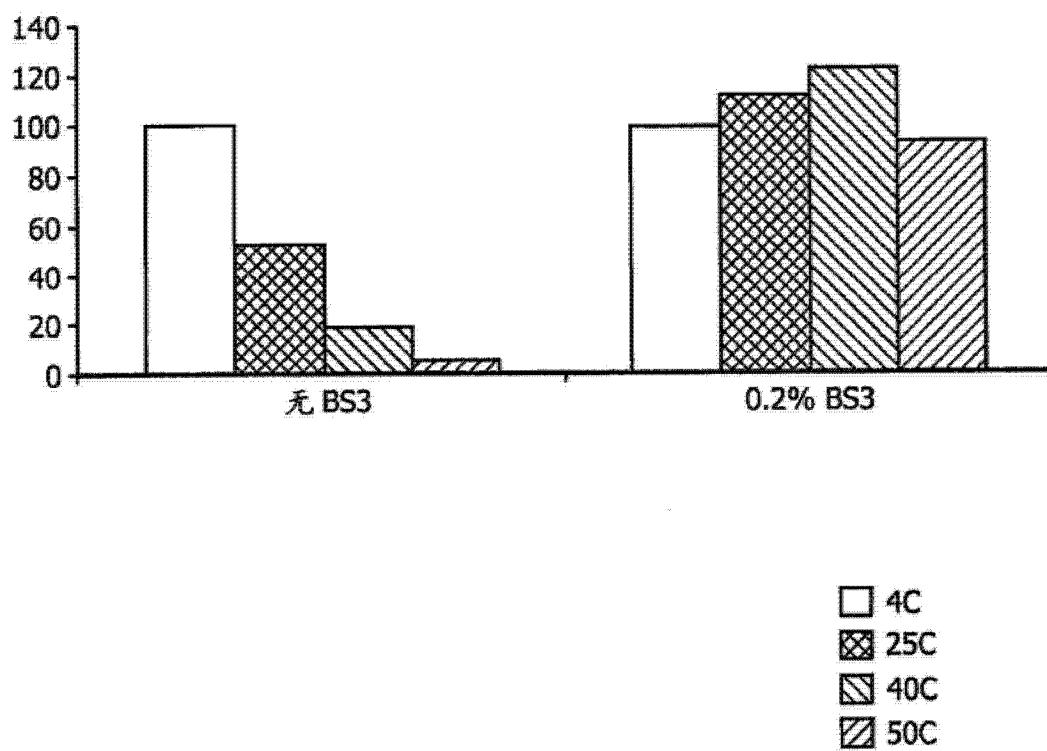


图 8

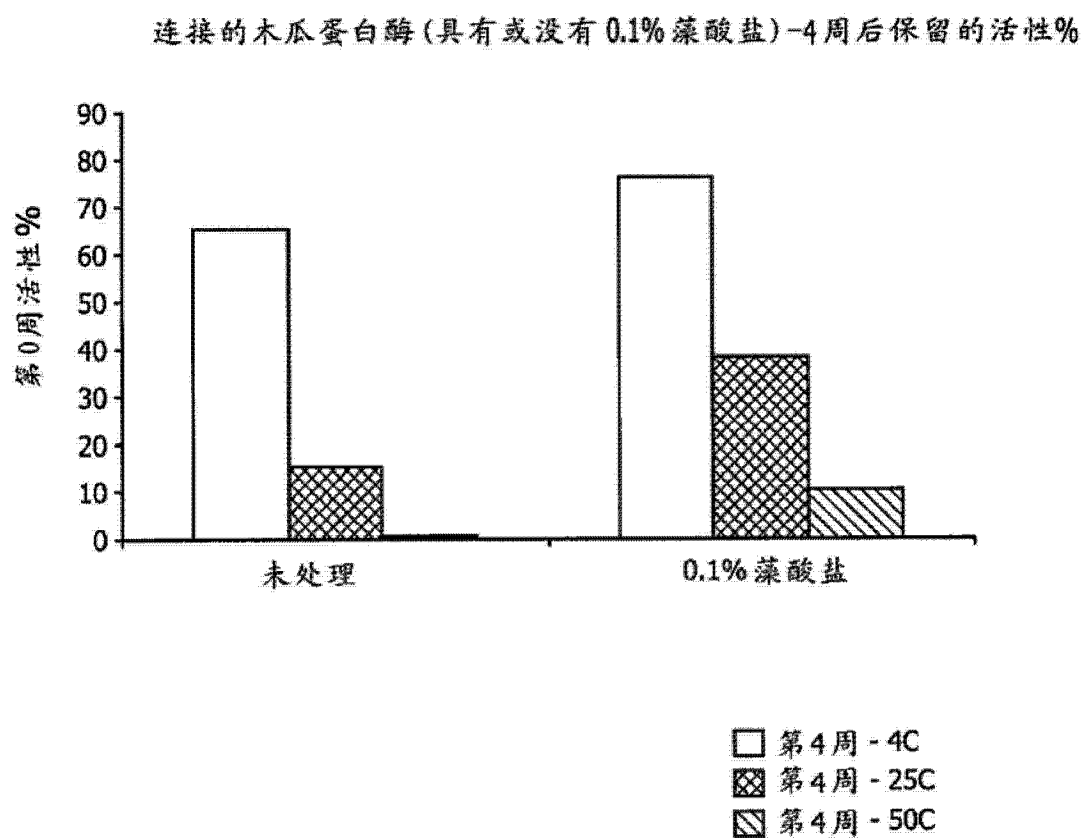


图 9

Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线

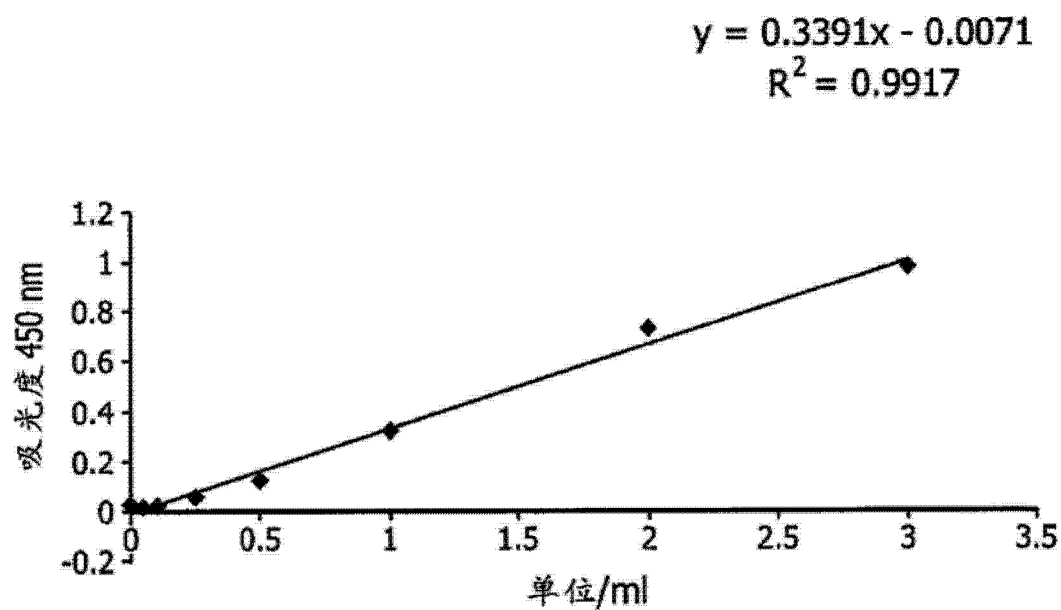


图 10

糖或糖聚合物对在25C和40C下10天后的游离木瓜蛋白酶的稳定性的影响

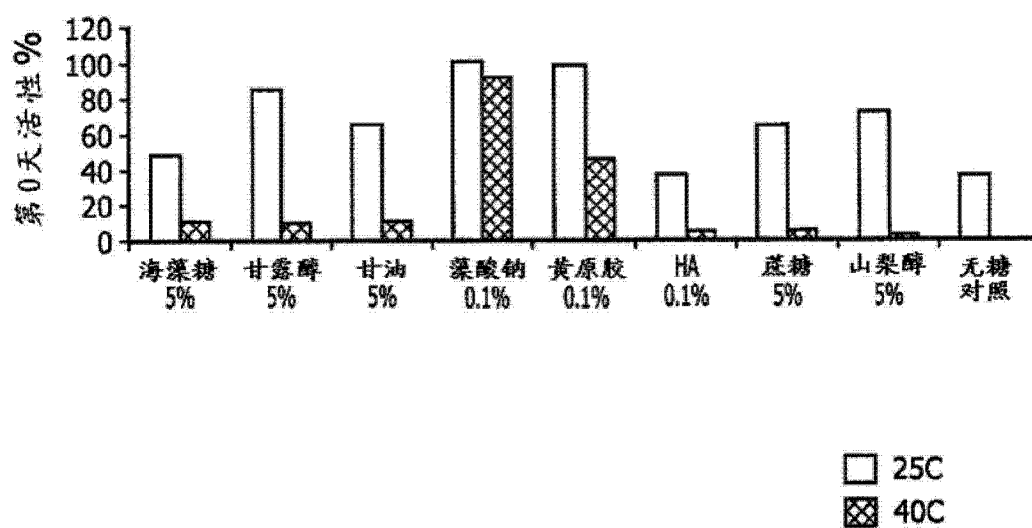


图 11

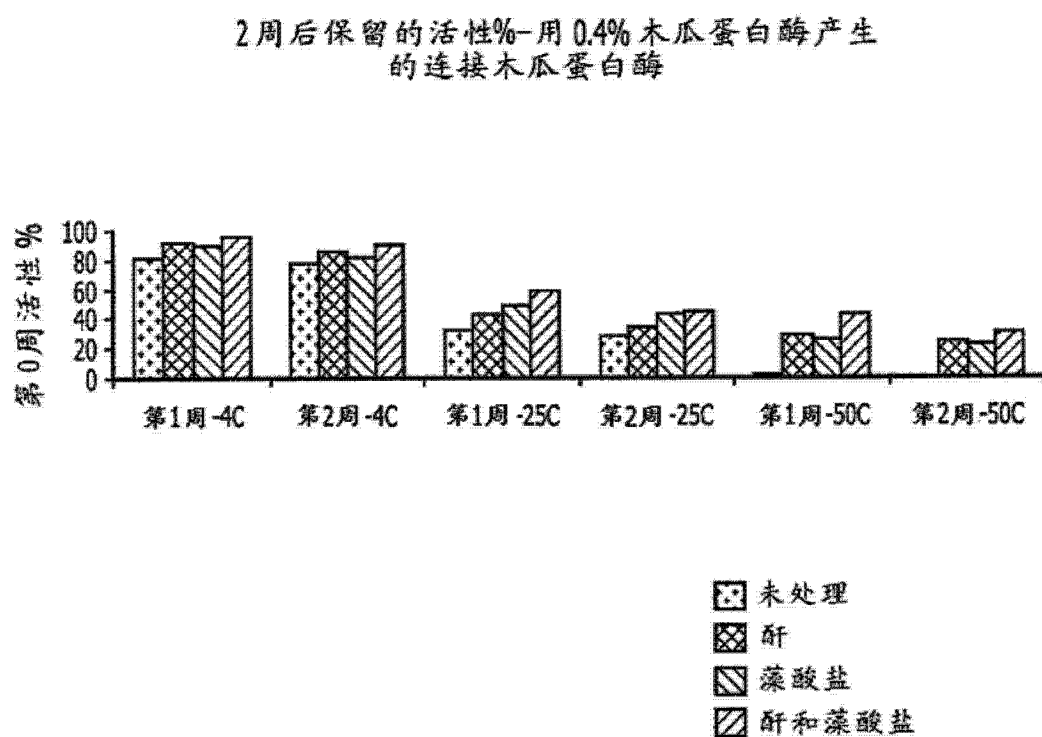


图 12

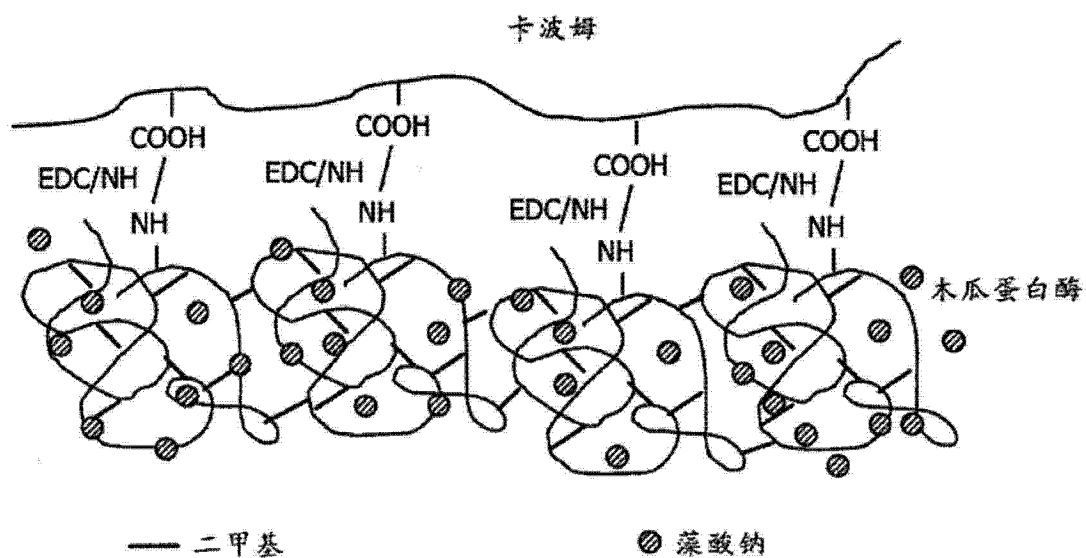


图 13(a)

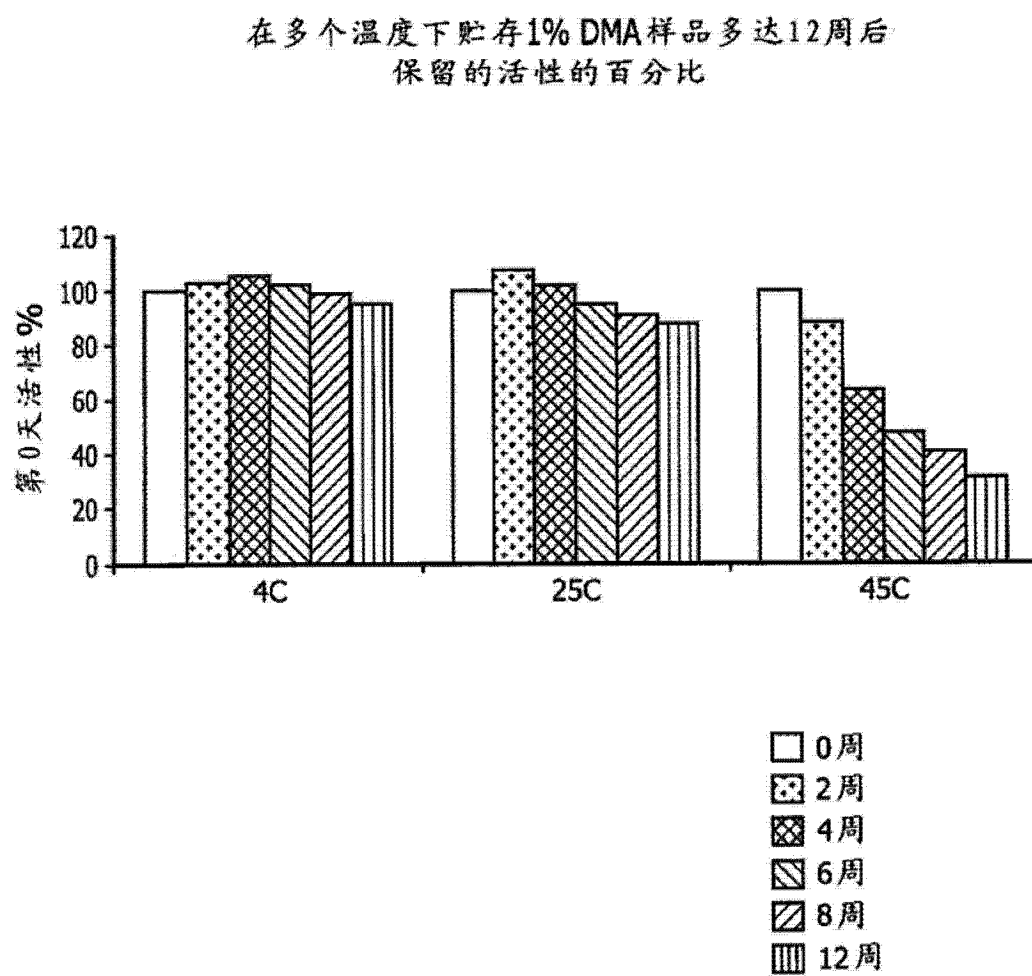


图 13(b)

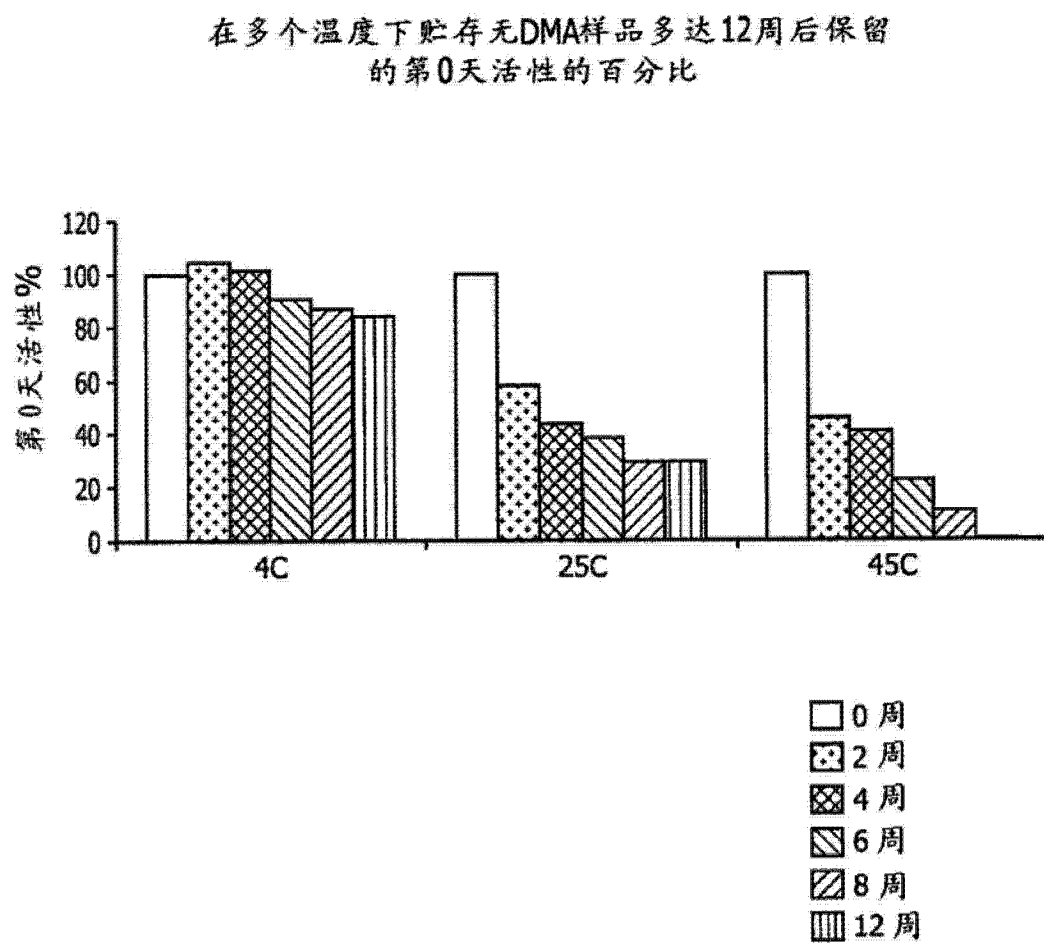


图 13(c)

DMA对连接的木瓜蛋白酶的活性保留的影响

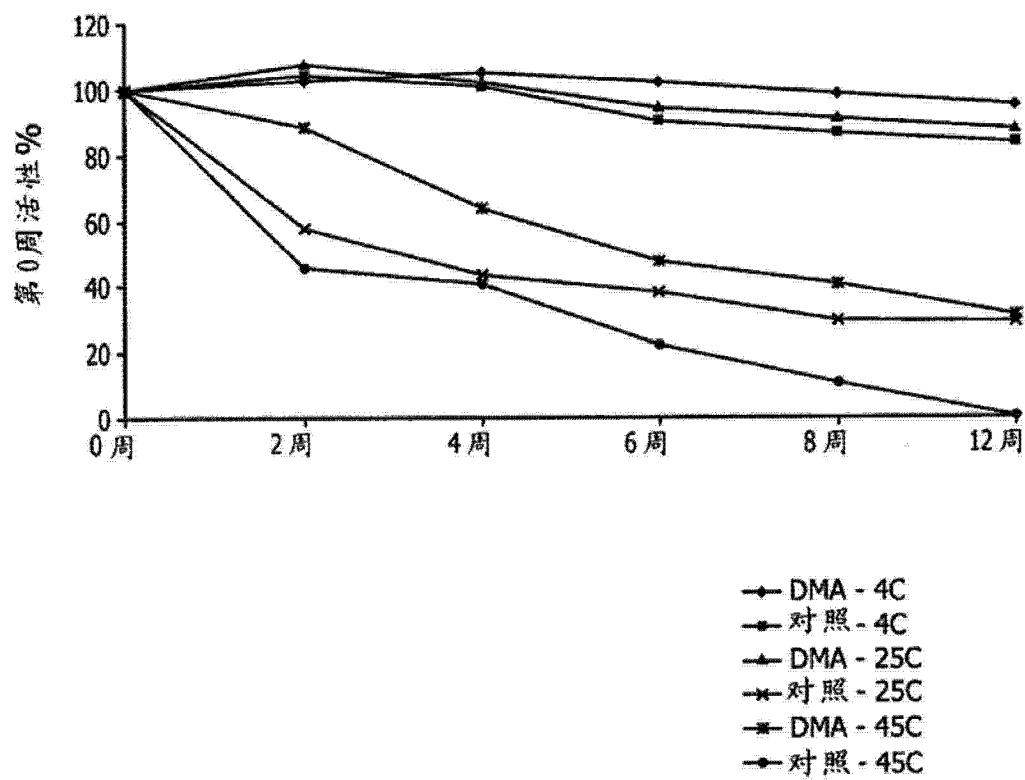


图 14

在不同温度下12周后的连接木瓜蛋白酶样品中的活性

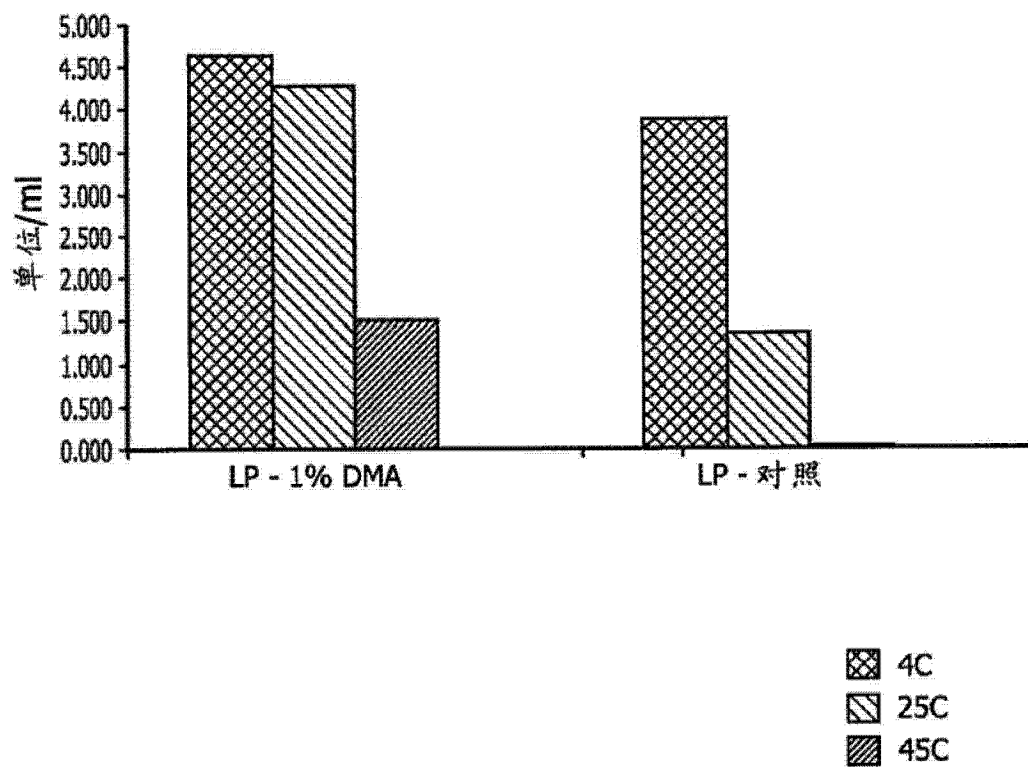


图 15

Sigma 木瓜蛋白酶标准曲线

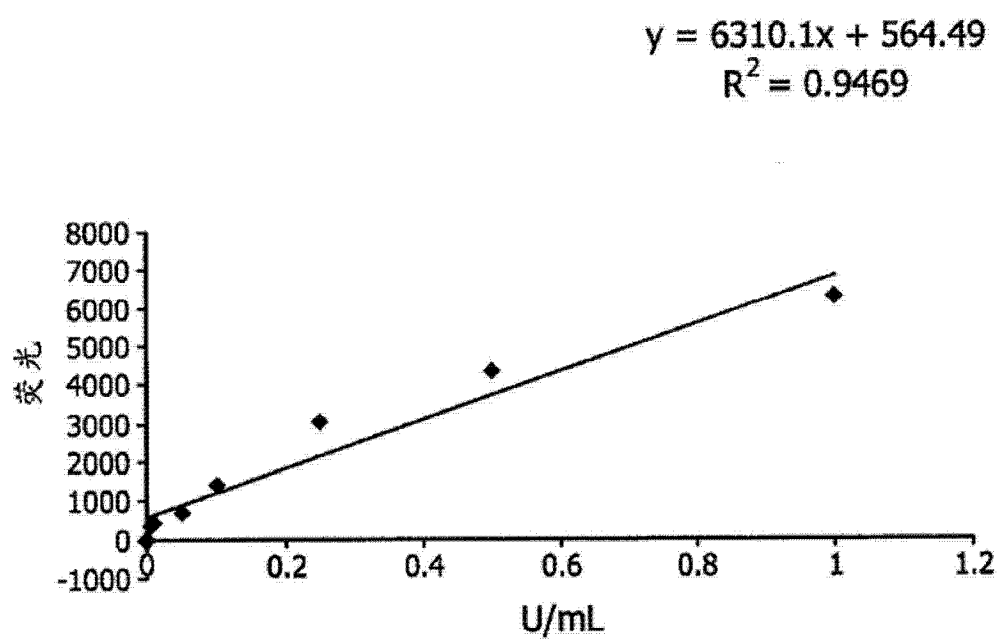


图 16

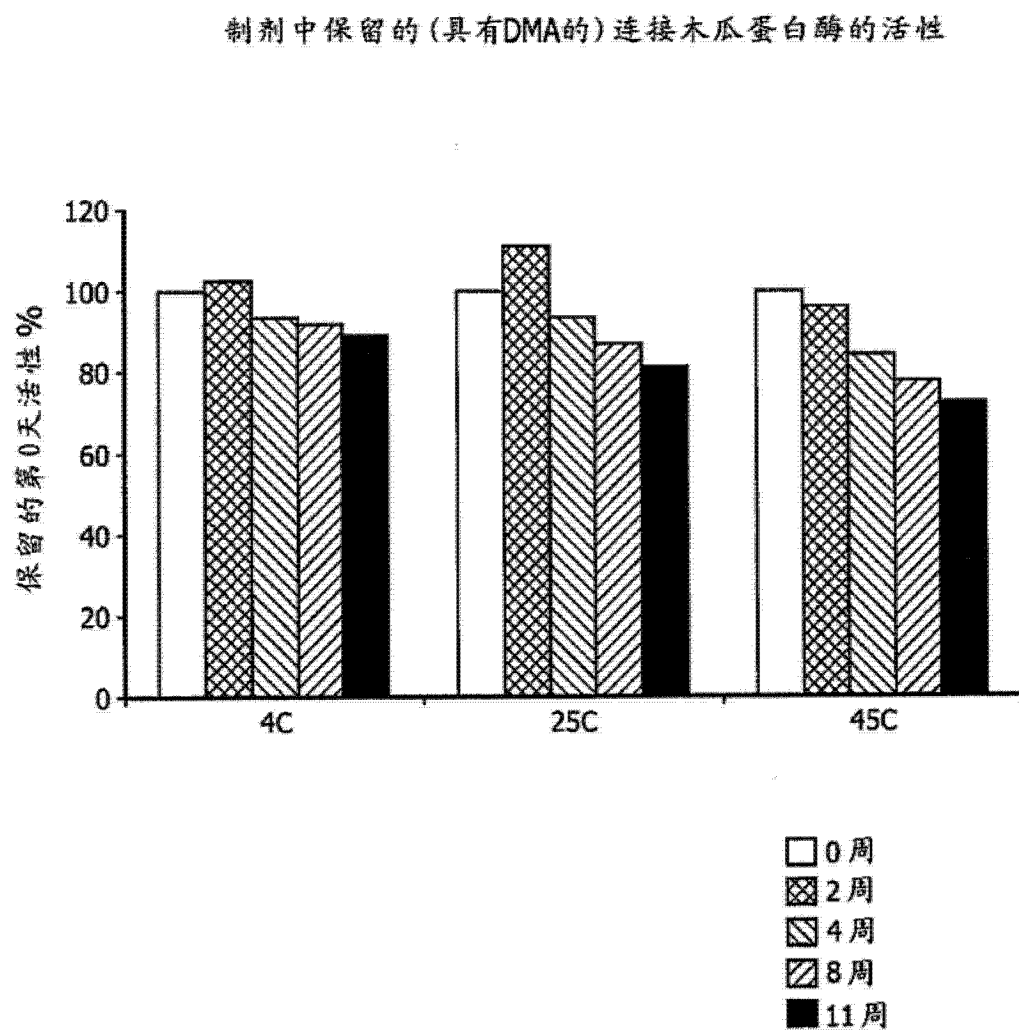


图 17

制剂中保留的(没有DMA的)连接木瓜蛋白酶的活性

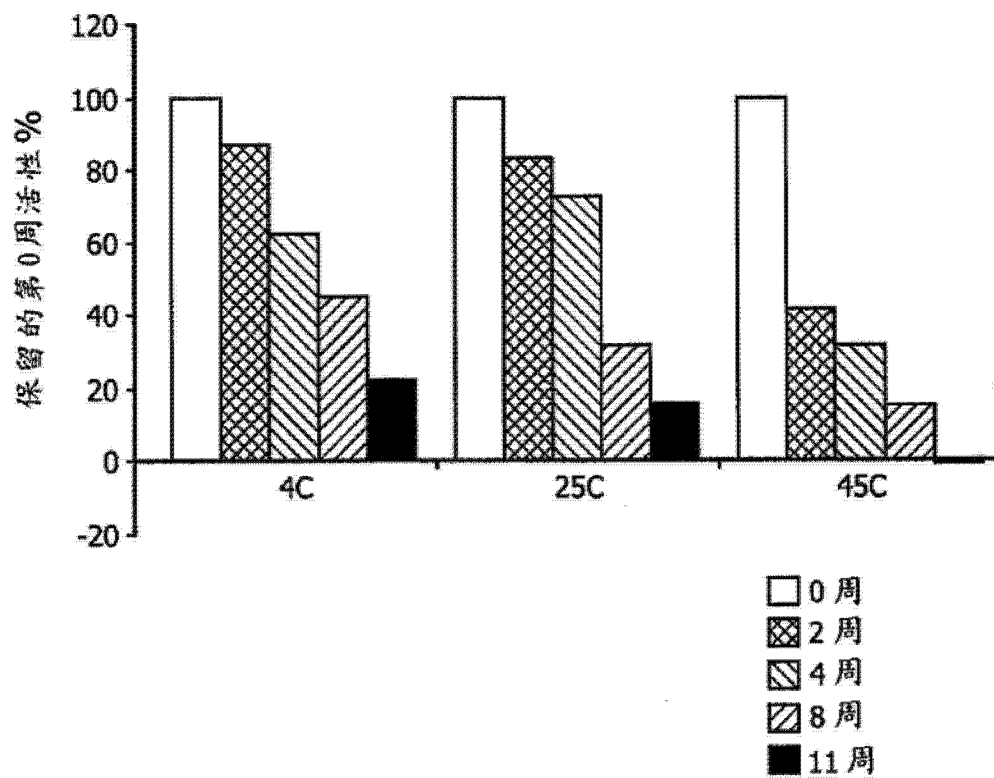


图 18

制剂内部保留的连接木瓜蛋白酶的活性

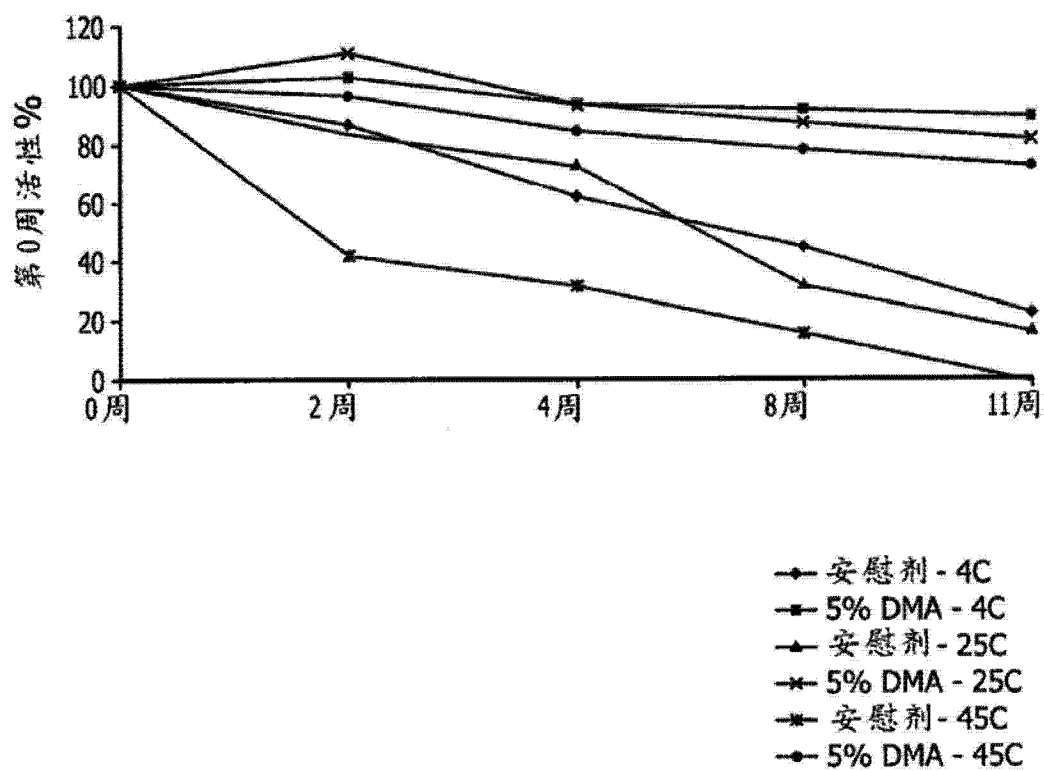


图 19

安慰剂制剂中的 sigma 木瓜蛋白酶的标准曲线

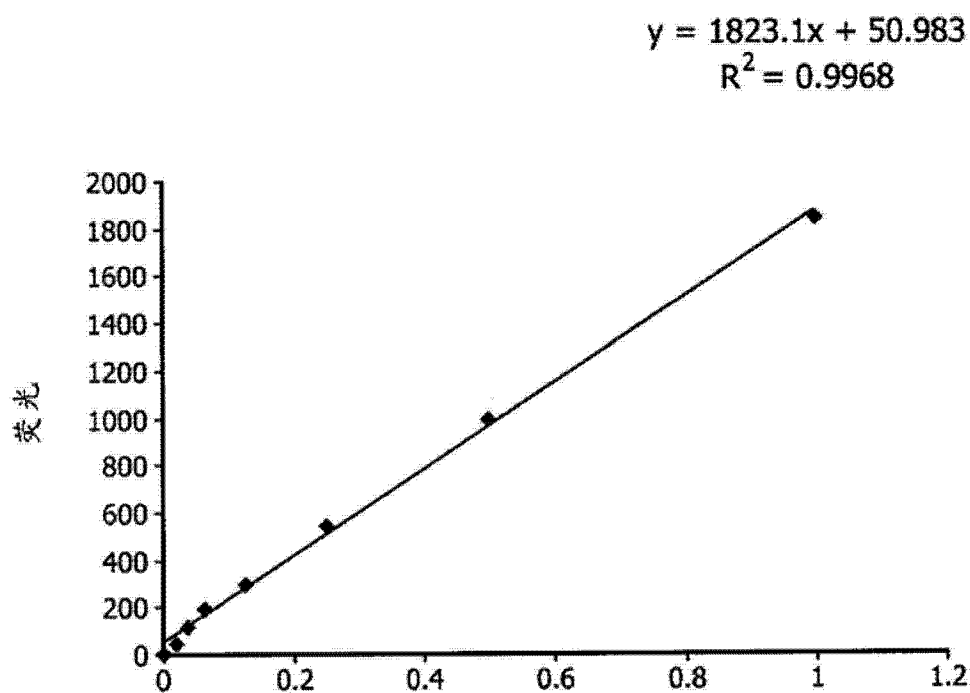


图 20

水包油制剂中保留的连接的木瓜蛋白酶的活性

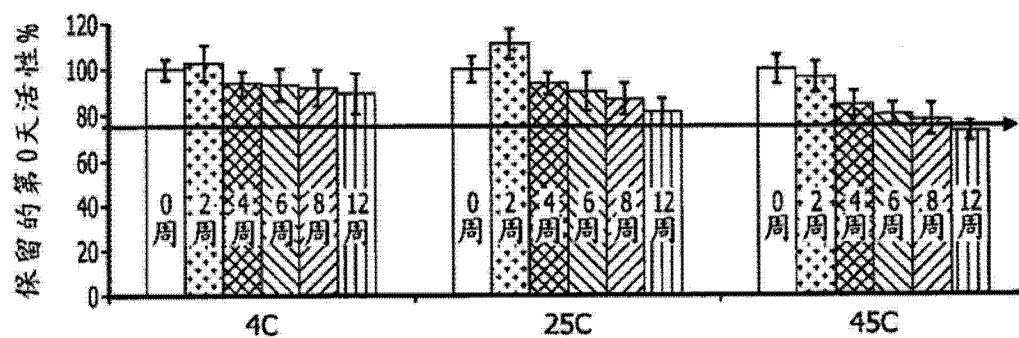


图 21