(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103393601 A
(43)申请公布日 2013.11.20

(21)申请号 201310241749.0
(22)申请日 2005.05.12
(30)优先权数据
60/570,274 2004.05.12 US
10/894,410 2004.07.19 US
(62)分案原申请数据
200580015053.X 2005.05.12
(71)申请人 巴克斯特国际公司
地址 美国伊利诺伊州
申请人 巴克斯特医疗保健股份有限公司
(72)发明人 拉里·R·布朗
韦雷德·比斯科尔-莱布
德布拉·拉弗雷尼尔
约翰·麦克吉亨
朱莉娅·拉什巴-施特普
特伦斯·斯科特
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
代理人 杨青 穆德骏
(51)Int.Cl.
A61K 9/16(2006.01)
A61K 9/10(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

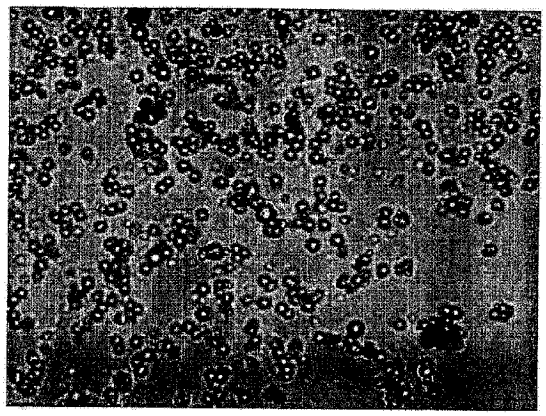
权利要求书3页 说明书28页 附图36页

(54)发明名称

含有蛋白并在高浓度蛋白下显示可注射性的微球体

(57)摘要

本发明公开了含有蛋白并在高浓度蛋白下显示可注射性的微球体。本发明涉及微粒组合物，其包含由基本上无定形的蛋白微粒的悬浮液，该组合物提供的浓度为每毫升所述组合物中至少50毫克所述蛋白，并且所述蛋白的分子量为至少约25,000道尔顿。根据制备方法，将活性剂溶解在含有溶解的相分离增强试剂(PSEA)的水相或可与水混溶的溶剂中以形成单一液相的溶液。将该溶液进行液固相分离以使得所述活性剂形成基本上无定形的或非晶体的和可以以高浓度通过细标准针注射的小球。本发明对于较高分子量的蛋白具有特殊的应用。



CN 103393601 A

1. 制备微粒的方法，所述方法包括：(a) 将抗体与相分离增强试剂在水性溶液中合并以形成单一连续相并提供基本上无定形的抗体组合物，所述相分离增强试剂是水溶性的或可在与水混溶的溶剂中溶解，以及 (b) 将组合物冷却到低于该组合物的相转变温度的温度，使得在该组合物处于或低于该组合物的相转变温度的温度后形成微粒，以及所述相分离增强试剂保留在液相中，其中所述抗体是所述微粒的至少约 20 重量 %，并且当冷却所述组合物时形成微粒，并且所述微粒在生理环境下注射时容易溶解。

2. 权利要求 1 中的方法，还包括从所述组合物除去所述相分离增强试剂。

3. 权利要求 1 中的方法，其中所述抗体选自：单克隆抗体、多克隆抗体、单克隆抗体片段、圈套分子、单链抗体、其重组形式以及它们的组合。

4. 制备微粒的方法，所述方法包括：(a) 将蛋白与相分离增强试剂在水性溶液中合并以形成单一连续相并提供基本上无定形的蛋白组合物，所述相分离增强试剂是水溶性的或可在与水混溶的溶剂中溶解，以及 (b) 将组合物冷却到低于该组合物的相转变温度的温度，使得在该组合物处于或低于该组合物的相转变温度的温度后形成微粒，以及所述相分离增强试剂保留在液相中，其中所述蛋白是所述微粒的至少约 20 重量 %，并且当冷却所述组合物时形成微粒，并且所述微粒在生理环境下注射时容易溶解。

5. 权利要求 4 中的方法，还包括从所述组合物除去所述相分离增强试剂。

6. 组合物，其包含通过权利要求 1、2、3、4 或 5 的方法制备的微粒。

7. 药学微粒组合物，其在每毫升所述组合物在所述微粒中至少约 50mg 蛋白的浓度下可注射通过至少 20 号或更细的针头，所述微粒组合物包含通过权利要求 1 或 2 的方法制备的基本上无定形的抗体微粒，所述微粒任选地结合有在制备所述微粒中使用的相分离增强试剂，其中所述微粒在生理环境下注射时容易溶解。

8. 权利要求 7 中的组合物，其中所述微粒是非晶体。

9. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体是单克隆抗体。

10. 权利要求 7 中的组合物，其中所述微粒是颗粒大小不超过约 50 微米的微球体。

11. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体微粒包含选自单克隆抗体、多克隆抗体、单克隆抗体片段、圈套分子、单链抗体、其重组形式以及它们的组合的抗体。

12. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体的分子量为至少约 25,000 道尔顿。

13. 权利要求 7 中的组合物，其中所述微粒被包封在聚合物基质中。

14. 权利要求 7 中的组合物，其中所述微粒还包含赋形剂。

15. 权利要求 7 中的组合物，其中所述组合物提供浓度从每毫升大约 50 毫克到每毫升大约 400 毫克的所述抗体微粒。

16. 权利要求 15 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 50%。

17. 权利要求 15 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 80%。

18. 权利要求 15 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 90%。

19. 权利要求 7 中的组合物，其中所述组合物提供浓度为每毫升至少约 50 毫克的所述抗体微粒。

20. 权利要求 19 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 50%。

21. 权利要求 19 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 80%。

22. 权利要求 19 中的组合物，其中所述抗体，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 90%。

23. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体是所述微粒的至少约 50 重量 %。

24. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体是所述微粒的至少约 80 重量 %。

25. 权利要求 7 中的组合物，其中所述抗体是所述微粒的至少约 90 重量 %。

26. 可注射的微粒药物组合物，其含有通过权利要求 4 或 5 的方法制备的基本上无定形的蛋白微粒的悬浮液，所述组合物提供了每毫升所述组合物在所述微粒中至少约 50mg 蛋白的浓度，并且所述蛋白的分子量为至少约 25,000 道尔顿，其中所述微粒在生理环境下注射时容易溶解，以及其中所述微粒任选地结合有在制备所述微粒中使用的相分离增强试剂。

27. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白微粒包含抗体。

28. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白微粒包括单克隆抗体。

29. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白微粒是微球体。

30. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白微粒是非晶体。

31. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白微粒包含选自单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段、圈套分子、单链抗体、其重组形式以及它们的组合的抗体。

32. 权利要求 31 中的组合物，其中一定剂量的所述组合物蛋白被分散在不超过大约 10ml 的所述组合物中。

33. 权利要求 31 中的组合物，其中所述微粒具有的平均颗粒大小不超过约 50 微米，并且该可注射的组合物通过 20 号或更细的注射针头。

34. 权利要求 26 中的组合物，其中临床有效剂量的所述组合物蛋白被分散在不超过约 10ml 的所述组合物中。

35. 权利要求 26 中的组合物，其中所述微粒在注射后表现出的溶出速率，比平均颗粒大小不超过约 50 微米的晶体性微粒的溶出速率更快，并且该可注射的组合物通过 20 号或更细的注射针头。

36. 权利要求 26 中的组合物，其中存在于所述微粒中的蛋白至少有大约 90% 是化学上完整的。

37. 权利要求 26 中的组合物，其中所述微粒被包封。

38. 权利要求 37 中的组合物，其中所述微粒被包封在基质中。

39. 权利要求 37 中的组合物，其中所述微粒还包含赋形剂。

40. 权利要求 26 中的组合物，其中所述组合物提供浓度从每毫升约 50 毫克到每毫升约 400 毫克的所述蛋白微粒。

41. 权利要求 40 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 50%。

42. 权利要求 40 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至

少约 80%。

43. 权利要求 40 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 90%。

44. 权利要求 26 中的组合物，其中所述组合物提供了每毫升至少约 50mg 所述蛋白微粒的浓度。

45. 权利要求 44 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 50%。

46. 权利要求 44 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 80%。

47. 权利要求 44 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 90%。

48. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 50%。

49. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 80%。

50. 权利要求 26 中的组合物，其中所述蛋白，基于所述微粒的总重量，是所述微粒的至少约 90%。

51. 权利要求 26 中的组合物，其中所述微粒的悬浮液在临床可接受的时间和力的条件下是可注射的。

52. 权利要求 26 中的组合物，其中在临床可接受的力的条件下，1ml 所述微粒的悬浮液在不到约 45 秒内可注射。

53. 权利要求 26 中的组合物，其中在临床可接受的力的条件下，1ml 所述微粒的悬浮液在不到约 30 秒内可注射。

含有蛋白并在高浓度蛋白下显示可注射性的微球体

[0001] 本申请为国际申请 PCT/US2005/016651 于 2006 年 11 月 10 日进入中国国家阶段、申请号为 200580015053.X、发明名称为“含有蛋白并在高浓度蛋白下显示可注射性的微球体”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请是 2004 年 7 月 19 日提交的申请 10/849,410 的部分延续，并且要求 2004 年 5 月 12 日提交的美国临时申请 No.60/570,274 的优先权，这两个申请通过引用其全部内容而并入本发明，并作为本申请的一部分。

技术领域

[0004] 本发明涉及活性剂的小颗粒的，优选基本上是球形小颗粒的组合物。所述活性剂优选为高分子量的蛋白，并且更优选为基本上无定形的高分子量蛋白，和最优选为基本上无定形的单克隆抗体。本发明能够提供高分子量蛋白，包括单克隆抗体，在高浓度下的可注射或通过注射器注射的组合物，并因此提供了用小体积组合物递送临床有效剂量的这种活性剂的能力，所述小体积组合物优选为 10mL 或更少的组合物，并且更优选为典型注射器应用的体积，包括典型用于皮下快速注射的可注射小体积的注射器。本发明也考虑到了这些活性剂小球颗粒的组合物的生产方法和使用方法。根据生产方法，将所述活性剂溶解在含有溶解的相分离增强试剂 (PSEA) 的水相或可与水混溶的溶剂中以形成单一液相的溶液。然后将溶液进行液固相分离，活性剂包含于固相中、PSEA 和溶剂包含于液相中。所述液固相分离可以通过多种方式诱导，例如改变溶液的温度或施加能量。该方法最适合于形成治疗剂的小球颗粒，该颗粒可以向需要所述治疗剂的对象递送。该方法同样最适合于形成大分子，特别是热不稳定的大分子，例如蛋白、包括单克隆抗体材料的固体小球颗粒。本发明能够提供可注射的大分子。

背景技术

[0005] 过去，已经使用了几种技术用于生产生物聚合物的纳米颗粒和微米颗粒。常规技术包括用于形成颗粒的喷雾干燥和碾磨，这些技术可用于生产大小为 5 微米或更小的颗粒。

[0006] 美国专利 5,654,010 和美国专利 5,667,808 描述了固体形式的重组人生长激素 hGH 的生产，通过与锌复合以生成无定形复合物，然后通过超声喷嘴微粒化，并在液氮中向下喷雾以冻结液滴。然后在 -80℃的温度下将液氮蒸发，并且获得的物质被冻干了。

[0007] 微粒和微球体是固态或半固态的颗粒，其直径小于 1 毫米，更优选小于 100 微米，最优选小于 10 微米，它们可以由各种不同的材料制成，包括蛋白、合成聚合物、多糖和其组合。微球体已经使用在许多不同的应用中，主要是分离、诊断和药物递送。

[0008] 在分离技术中使用的最广为人知的微球体的例子是由合成的或天然来源的聚合物，例如聚丙烯酰胺、羟基磷灰石或琼脂糖形成的微球体。在可控药物递送领域，为了在随后释放，通常将分子并入或封装在小球颗粒中或并入单片基质中。从合成聚合物、天

然聚合物、蛋白和多糖制造这些微球体颗使用很多不同的技术，包括相分离、溶剂蒸发、coascervation、乳化和喷雾干燥。通常所述聚合物形成这些微球体的支持结构，而目的药物被并入到聚合物结构中。

[0009] 用脂质封装靶药物而制备的颗粒目前是可以获得的。脂质体是由单个或多个磷脂和 / 或胆固醇双层构成的球形颗粒。脂质体大小为 100 纳米或更大，并且可以装载多种水溶性或脂溶性药物。例如，在 Sinil Kim 的美国专利 5,422,120 中描述的，在环绕着多种水相隔室的双层膜中排列以形成颗粒的脂质可以被用来封装水溶性的药物用于随后的递送。

[0010] 球状小珠作为生化学家的工具已经商业化多年了。共轭于小珠上的抗体产生特异于特定配体的相对大的颗粒。抗体通常被用来结合细胞表面上的受体以活化细胞，并被结合于固相以形成抗体包被的颗粒用于免疫亲和纯化，并且可以用于递送随时间缓慢释放的治疗剂，例用共轭于所述颗粒的组织或肿瘤特异性抗体以使所述治疗剂定位于所需的位点。

[0011] 对于发展新的制造颗粒的方法一直有着持续的需要，特别是被改造用于药物递送、分离和诊断领域的那些方法。从应用的观点来说最需要的颗粒是具有下列特征的小球颗粒 ：窄的大小分布、基本上球形、基本上只含有活性剂、能够保持活性剂的生物化学完整性和生物活性。所述颗粒可以将提供一个适当的固相，允许通过包被或微囊包封对颗粒进行进一步稳定化。此外，小球颗粒的制造方法应该具有下列所需的特点 ：制造简单、主要为水相的工艺、高产率、以及不需要后续的筛分。

[0012] 蛋白是连续排列的氨基酸，其链长足够产生较高水平的三级和 / 或四级结构。这区别于不具有这样结构的“肽”或其它小分子量药物。

[0013] 抗体（免疫球蛋白）是免疫系统的细胞 (B 淋巴细胞）对外源分子（抗原）或入侵的生物应答而产生的蛋白。抗体通常与外源分子或细胞极其紧密地结合，从而使其失活或对其进行标记以通过吞噬作用或补体诱导的裂解进行破坏。

[0014] 免疫球蛋白 (Ig) 是一个抗体分子。高等脊椎动物具有 5 类免疫球蛋白——IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，每种在免疫应答中都有不同的作用。

[0015] 单克隆抗体 (mAb) 是从仅仅一个免疫系统细胞 (B 淋巴细胞）的克隆衍生的高特异性的、纯化的抗体（免疫球蛋白分子），并仅仅识别一种外源分子（抗原）的特异性位点。单克隆抗体可以通过实验室操作大量生产（鼠的、嵌合的、人源化的）。术语“单克隆抗体”可以广义使用，具体来说涵盖了具有免疫球蛋白 Fc 区域的单克隆抗体，具有多抗原决定簇 (polyepitopic) 特异性的抗体组合物，双特异性抗体，diabodies 和单链分子，以及抗体片段（例如 Fab、$F(ab')_2$ 和 Fv）。

[0016] 多克隆抗体是对单一外源分子（抗原）的许多位点具有特异性的一系列抗体（免疫球蛋白分子）。天然的免疫应答是多克隆的。

[0017] 被称为圈套分子 (trap molecule) 的抗体由两个不同的受体元件和抗体分子被称为“Fc 区域”的部分融合而构成的，导致产生的生长因子和细胞因子阻断剂具有比单一的元件试剂所能提供的亲和性明显升高的亲和性。圈套分子已经由例如 Regeneron Pharmaceuticals 公司开发。

[0018] 单克隆抗体 (mAbs) 可以是衍生自一个细胞克隆的抗体的实验室衍生种群，并高度特异于与一个特定的抗原位点的结合。它们是分子量约 150kDa 的大型蛋白，含有 4 条肽

链：两条轻链，每条大约 25kDa，两条重链，每条大约 50kDa。由于其大小，目前单克隆抗体通常通过静脉内注射递送。

[0019] 为了达到治疗效果，抗体通常需要以相对大的量进行递送。例如，许多抗体的递送剂量在大约 100 到 800mg 之间。这些大量的物质的可注射性对制剂和递送提出了实质性的挑战。小体积的这种大剂量物质典型地具有高粘度；因此，需要约 10-250mL 的大体积以进行静脉内递送。静脉内递送对于病人来说非常不舒服，需要临床装置，并且它既昂贵又耗时。

[0020] 本发明的微粒技术可以为该市场提供巨大的优势，因为它允许形成高度浓缩的悬浮液，在注射时可以容易地溶解。类似地，其它含有高分子量蛋白的活性剂也可以从本发明获益。本发明描述了可以以高浓度和相对小体积递送的组合物，因此组合物具有可通过注射器注射性和可注射性。在本发明之前，分子量在大约 25kDa 之上的单克隆抗体、其它抗体或其它高分子量蛋白，不能使用细规格针进行注射，例如与标准注射器连接使用的 20 号和更细的针。在本发明之前，这样的蛋白也不能以含有临床有效剂量的蛋白的小体积（10mL 或以下）进行递送。与这些分子相关的微粒技术的使用解决了以前需要的这些分子的大体积注射的问题。本发明也可以用于帮助以高浓度在小注射体积内以及短的递送时间内递送较低分子量蛋白物质。

[0021] 单克隆抗体的制造过程是烦琐的过程，这解释了它的高价格。因此，将 mAbs 以非常有效和安全的方式精确地递送到靶位点是重要的。在微粒的制备和递送中，不论是否是 mAbs，同样是重要的高产率地形成容易溶解的微粒或微球体、它们相应的化学完整性的保留，和在例如 mAbs 物质的情况下，具有非常好的可注射性以允许它们通过静脉内、眼部或其它给药途径递送。

[0022] 本发明的一个方面或目的是提供了基本上无定形的或非晶体的抗体微粒。

[0023] 本发明的另一个方面或目的是提供包含了基本上无定形的或非晶体的抗体微粒的可注射组合物。

[0024] 本发明的又一个方面或目的是提供可注射的组合物，该组合物甚至当蛋白具有大约 25,000 道尔顿和以上的分子量时，它也能够在大约 10ml 或更少的组合物中提供有效剂量的蛋白。

[0025] 本发明的又一个方面或目的是提供了每毫升临床有效药剂中含有至少大约 50 毫克活性剂的微粒，当所述活性剂具有至少大约 25,000 道尔顿的分子量时，该微粒可特别有利地应用。

[0026] 本发明的另一个方面或目的是提供以临床有效的方式通过活性剂递送使用微粒的方法，所述活性剂递送通过以高浓度进行注射、例如但不限于皮下注射来进行。

[0027] 本发明的又一个方面或目的是制备具有相对高分子量的蛋白物质的微粒的方法。

[0028] 本发明的另一个目的或方面是提供微粒、优选微球体，它们易于溶解，即在生理 pH 下在 PBS 缓冲液中在大约 10 分钟之内表现出溶解性，同时表现出化学完整性、即在微粒中至少大约 90% 的化合物是化学完整的，并且表现出可注射性，更具体来说是可用注射器注射的形式，即形成至少 50mg/ml 的悬浮液，以及可以通过细规格的针不使用过分的力量递送悬浮液的能力。

[0029] 本发明的其它方面、目的和优点将从下面关于本发明的优选实施方案的描述得到

理解，特别是包括了本文描述的各种特点的陈述的和未陈述的组合、与在附图中显示的信息相关的信息。

发明内容

[0030] 本发明涉及在高剂量下具有可注射性的蛋白微粒。所述蛋白是活性剂，并且所述微粒基本上是无定形的或非晶体的。使用这些组合物，非常高浓度的活性剂可以以非常小的体积递送。

[0031] 本发明的活性剂优选为活性剂，其可以是治疗剂或诊断剂。在本发明的优选实施方案中，所述活性剂是大分子蛋白，包括单克隆抗体。在另一个优选实施方案中，含有活性剂的颗粒适合于通过任何适当的途径对需要该试剂的对象进行体内递送，包括皮下和 / 或眼部注射方法，否则的话这些方法用于这些类型的大分子是不可行的。

[0032] 本发明还涉及了活性剂的微粒、小球颗粒或微球体的生产方法和使用方法。根据生产方法，将活性剂溶解于含有溶解的相分离增强试剂的溶剂中以形成单一液相的溶液。所述溶剂优选为水相或可与水混溶的溶剂。然后将该溶液进行液固相分离，活性剂包含于固相中、PSEA 和溶剂包含于液相中。液固相分离可以通过多种方式诱导，例如改变溶液的温度到溶液的相转变温度之下。

[0033] 在本发明的优选实施方案中，将溶液进行液固相分离的方法是通过将溶液冷却到溶液中的活性剂的相转变温度之下。该温度可以高于或低于溶液的凝固点。对于其凝固点高于所述相转变温度的溶液，在溶液中可以包含凝固点降低试剂，例如聚乙二醇或丙二醇，以降低溶液的凝固点，使得溶液中的相分离得以在溶液不凝固的情况下进行。

[0034] 当溶液被进行相转变步骤时，本发明的相分离增强试剂增强或诱导了溶液中活性剂的液固相分离，在该相转变步骤中，活性剂固化形成小球颗粒的悬浮液作为不连续的相，而相分离增强试剂保持溶解在连续的相中。也就是说，相分离增强试剂不经历相变，但是活性剂经历相变。

[0035] 在本发明中生产颗粒的方法还可包括一个控制颗粒的液固相分离的附加步骤，以控制形成的颗粒的大小和形状。控制相分离的方法包括控制离子强度、pH 值、相分离增强试剂的浓度、溶液中活性剂的浓度、或控制溶液温度改变的速度，这些因素的控制可以在相分离之前，或者为了诱导相分离可以改变这些因素中的任何一个或几个。

[0036] 在本发明的优选实施方案中，在颗粒形成之后将小球颗粒与连续相中的 PSEA 分离开来。在另一个优选实施方案中，分离方法是通过用液体介质洗涤含有颗粒的溶液来进行的，其中活性剂不溶解在该液体介质中，而相分离增强试剂可溶解在该液体介质中。所述液体清洗介质可以含有降低活性剂在液体介质中的溶解度的试剂。所述液体清洗介质也可以含有一种或多种赋形剂。该赋形剂可以作为小球颗粒或活性剂或载体试剂的稳定剂。该赋形剂也可以使活性剂或颗粒具有附加的特征，例如活性剂从颗粒的可控释放、或活性剂通过生物组织的修饰的透过性。在另一个优选实施方案中，当小颗粒不包含 PSEA 时，它们可以在从 PSEA 相分离之前在存在 PSEA 相的情况下被收获以用于随后的加工步骤。在另一个优选实施方案中，溶液是包含水相或可与水混溶的溶剂的水溶液。

附图说明

[0037] 图 1 给出了按照实施例 3 中的描述制备的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的光学显微镜图。

[0038] 图 2 提供了按照实施例 3 中的描述制备的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的偏振光学显微镜图。

[0039] 图 3 提供了按照实施例 3 中的描述观察到的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的扫描电子显微图。

[0040] 图 4 给出了实施例 4 中的描述的抗因子 VIII 单克隆抗体（起始材料和溶解的微球体）的凝胶电泳图。

[0041] 图 5 给出了按照实施例 5 中的描述观察到的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的扫描电子显微图。

[0042] 图 6 报告了实施例 5 中的描述的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的通过数量、表面积和体积分布表示的颗粒大小分布情况。

[0043] 图 7 提供了按照实施例 6 中的描述制备的抗 CD34 单克隆抗体微球体的光学显微镜图。

[0044] 图 8 是按照实施例 8 中的描述制备的抗 CD34 单克隆抗体微球体的光学显微镜图。

[0045] 图 9 是按照实施例 6 中的描述制备的抗 CD34 单克隆抗体微球体的扫描电子显微图。

[0046] 图 10 报告了通过按照实施例 6 中的描述制备的抗 CD34 单克隆抗体微球体的数量分布表示的颗粒大小分布情况。

[0047] 图 11 给出了实施例 10 中描述的抗 CD34 单克隆抗体微球体（具有两个狭缝构型）和三十六烷：硅混合物的 X- 射线粉末衍射。

[0048] 图 12 报告了实施例 7 中描述的抗 CD34 单克隆抗体微球体在用泊洛沙姆冷却过程中构象稳定性的荧光监测情况。

[0049] 图 13 是活性剂浓度对温度作图的二维相转变图。

[0050] 图 14 是冷却温度特征图。

[0051] 图 15 是 HPLC 分析，显示了胰岛素在制备到小球颗粒中时化学稳定性的总体维持情况。

[0052] 图 16a 和 16b 是说明了不同批次的可重复性的图表。

[0053] 图 17a 是 α -1- 抗胰蛋白酶 (AAT) 的圆二色性 (CD) 图。

[0054] 图 17b 是实施例 21 中活性对室温下储存时间的图。

[0055] 图 17c 是实施例 21 中活性对 4℃下储存时间的图。

[0056] 图 18-28b 是 DSC 图。

[0057] 图 29 是显示了 HFA-134a 中胰岛素稳定性数据的图。

[0058] 图 30 是比较使用三种吸入装置，胰岛素的空气动力学性能的图。

[0059] 图 31 是 25℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0060] 图 32 是 37℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0061] 图 33 是 25℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0062] 图 34 是 37℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0063] 图 35 是 25℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0064] 图 36 是 37℃储存的胰岛素小球颗粒与胰岛素起始材料的稳定性数据比较图。

[0065] 图 37 是使用 Cyclohaler DPI 进行的胰岛素空气动力学稳定性直方图。

[0066] 图 38 是 Danes 小球颗粒的光学显微镜图。

[0067] 图 39 是 DNase 的酶活性的图。

[0068] 图 40 是 SOD 小球颗粒的光学显微镜图。

[0069] 图 41 是 SOD 小球颗粒的酶学数据图。

[0070] 图 42A-B 是连续乳化反应器的示意图，其中图 42A 是表面活性化合物在乳化之前被加入到连续相或分散相的情况下连续乳化反应器的示意图，图 42B 是表面活性化合物在乳化之后加入的情况下连续乳化反应器的示意图。

[0071] 优选实施方案描述

[0072] 本发明允许许多不同形式的实施方案。随着本发明的优选实施方案的公开，应该理解的是，这些公开的内容将被当作本发明的原理的示例，并不意于将本发明的广泛方面限制于所描述的实施方案。

[0073] 由于需要，在本文中公开了本发明的详细的实施方案，但是，应该理解的是公开的实施方案仅仅是本发明的示例，其可以以多种形式而具体化。因此，本文中公开的具体的详细情况不将被解释为限制性的，而仅仅是作为权利要求的基础和作为教导本技术领域的专业人员以事实上任何适当的方式广泛应用本发明的代表性基础。

[0074] 本发明涉及含有基本上无定形的或非晶体的活性剂小颗粒的组合物，所述活性剂是蛋白。当活性剂具有至少大约 25,000 道尔顿的分子量时有特别的应用。根据生产方法，将活性剂溶解在含有溶解的相分离增强试剂的溶剂中以形成单一液体连续相的溶液。所述溶剂优选为水相或可与水混溶的溶剂。然后将溶液进行相分转变，例如通过降低溶液的温度到活性剂的相转变温度之下，通过这个步骤，活性剂经过液固相分离形成了基本上无定形的或非晶体的小颗粒的悬浮液构成了不连续的相，同时相分离增强试剂保留在连续相中。

[0075] 本发明涉及活性剂的，优选为基本上是球状的小颗粒的组合物。所述活性剂优选为高分子量蛋白，更优选为基本上无定形的高分子量蛋白，最优选为基本上无定形的单克隆抗体。本发明能够提供在高浓度下可注射的或可通过注射器注射的高分子量蛋白、包括单克隆抗体的组合物，因此提供了使用较小体积组合物递送临床有效剂量的该活性剂的能力，所述较小体积组合物优选为 10mL 或以下的组合物，更优选为标准注射器中所典型使用的体积。

[0076] 本发明也考虑到了这些活性剂小球颗粒组合物的生产方法和使用方法。根据生产方法，将活性剂溶解在含有溶解的相分离增强试剂 (PSEA) 的水相或可与水混溶的溶剂中以形成单一液相的溶液。然后将溶液进行液固相分离，活性剂包含于固相中、PSEA 和溶剂包含于液相中。液固相分离可以通过多种方式诱导，例如改变溶液的温度或施加能量。本方法最适合于形成治疗剂的小球颗粒，所述治疗剂可以递送给需要该治疗剂的对象。本方法也最适合于形成大分子、特别是热不稳定的大分子例如蛋白、包括单克隆抗体材料的固体小球颗粒。本发明能够提供可注射的大分子。

[0077] 活性剂

[0078] 本发明的活性剂是可以作为治疗剂或诊断剂的蛋白。优选的活性剂是高分子量蛋

白。优选的试剂是无定形的蛋白，包括无定形的抗体。

[0079] 在本文中使用的术语抗体包括了单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段、特别是通常公知为“Fab”片段或区域的抗原结合部分、单链抗体、以及重组体形式的单克隆或多克隆抗体或其它抗体、以及目前在本领域内被称为“圈套分子”的抗体。抗体也可以指任何通过本文描述的方法例如包被或封装来处理的前述形式的抗体。

[0080] 圈套分子由两个不同的受体元件和抗体分子被称为“Fc 区域”的部分融合而构成的，其导致产生的生长因子和细胞因子阻断剂具有比单一的元件试剂所能提供的亲和性明显升高的亲和性。

[0081] 下面的参考文献提供了圈套分子的进一步信息：“细胞因子圈套：细胞因子作用的多元件高亲和性阻断剂”；Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, Pyles EA, Xu X, Daly TJ, Young MR, Fandl JP, Lee F, Carver S, McNay J, Bailey K, Ramakanth S, Hutabarat R, Huang TT, Radziejewski C, Yancopoulos GD, Stahl N; 杂志：Nat Med(2003);9(1):47-52。“在一个卵巢癌模型中血管内皮生长因子 - 圈套减小了肿瘤负载、抑制了腹水、并引起了戏剧性的血管重塑”；Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB; 杂志：Clin Cancer Res(2003);15;9(15):5721-8。“通过用血管内皮生长因子圈套 R1R2 进行处理在灵长类中阻止了鞘血管发生、窦房滤泡生长和排卵”；Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM; 杂志：Endocrinology(2002);143(7):2797-807。

[0082] 在本发明的优选实施方案中，活性剂是单克隆抗体，可以是天然的也可以是合成的。单克隆抗体的例子包括但不限于：adalimutab（可以从 Abbot 以商标名 Humira 获得）、abciximab（可以从 Centocor 以商标名 ReoPro 获得）、daclizumab（可以从 Roche 以商标名 Zenapaz 获得）、rituximab（可以从 IDEC/Genentech 以商标名 Rituxin 或 Rituxan 获得）、basiliximab（可以从 Novartis 以商标名 Simulect 获得）、palivzumab（可以从 Medimmune 以商标名 Synagis 获得）、infliximab（可以从 Centocor 以商标名 Remicade 获得）、trastuxumab（可以从 Genentech 以商标名 Herceptin 获得）、gemtuzumab（可以从 IDEC 以商标名 Mylotarg 获得）、alemzutumab（可以从 Millennium/ILEX 以商标名 Campath 获得），以及 ibritumomab（可以从 IDEC 以商标名 Zevulin 获得）。Gammagard 液体（可以从 Baxter Healthcare Corporation, Westlake Village, CA 获得）是易于使用的高度纯化和浓缩的免疫球蛋白 G(IgG) 抗体的无菌液体制剂。

[0083] 抗体“Fab”部分或区域的例子包括但不限于下面的描述：TGX-6B4，目前由 Dublin, Ireland 的 ThromboGenics Ltd 开发，是针对抑制血小板吸附的 GP1b 的抗体，已经被表明是防止动脉血栓形成早期阶段的新方法；地高辛特异性 Fab 片段已经被报道有益于蟾蜍毒素中毒的治疗 (Heart. 2003;89:12-472, Toxalert, 15: 第一期，1998)；人源化 Fab 片段已经被显示能够在 COS 和 CHO 细胞中识别人类 Fc(ε)RIα 的 IgE 结合结构域 (Journal of Biochemistry, 2001:Vol129(1), 5-12)。其它与使用多价 Fab' 片段进行抗肿瘤放射免疫疗法相关的信息可以在 British Journal of Cancer(1999)81, 972-980 中发现。

[0084] 其它高分子量蛋白的例子包括但不限于 AAT、Dnase、超氧化歧化酶、枯草杆菌蛋白酶和其它蛋白。典型地说，高分子量是指蛋白具有大约 25,000 数量级的分子量，这依赖于蛋白的具体需要或性质或其使用目的。较低分子量蛋白如果需要以高浓度通过例如注射给

药，也可以在相同程度上从本发明获益。这样的蛋白在本技术领域内是公知的，参见例如2004年7月19日提交的美国专利申请10/894,410和2004年7月21日提交的美国专利申请10/896,326。

[0085] 微粒、小球颗粒或微球体

[0086] 本发明的微粒或微球体优选具有小于200微米的平均几何颗粒大小，典型地从大约0.01微米到大约200微米，一般不超过大约50微米，更优选从0.1微米到10微米，更优选从大约0.5微米到大约5微米，最优选从大约0.5微米到大约3微米，这些大小通过动态光散射方法（例如光关联的分光光度法、激光衍射法、小角度激光光散射法(LALLS)、中等角度激光光散射法(MALLS))、光遮蔽方法（例如Coulter分析方法）或其它方法例如流变学或显微术（光学或电子）来测量。

[0087] 小球颗粒或微球体基本上是球形的。“基本上球形的”意味着颗粒横切面的最长和最短的垂直轴的长度比率少于或等于大约1.5。基本上球形的并不必需对称。此外，颗粒可以具有表面结构，例如与颗粒的总大小相比小尺寸的纹路、缺口或突起，而颗粒仍基本上是球形的。更优选情况下，颗粒的最长和最短轴之间的长度比率少于或等于大约1.33。更优选情况下，颗粒的最长和最短轴之间的长度比率少于或等于大约1.25。在基本上球形的微球体中，表面接触被最小化，这也最小化了颗粒在储存中的不需要的聚结。许多晶体或薄片具有平的表面，允许大的表面接触面积，可以通过离子或非离子相互作用发生聚结。球形允许在更小的面积上接触。

[0088] 微粒也优选具有基本上相同的颗粒大小。大小分布较广的微粒，既具有相对大的又具有相对小的颗粒，允许较小的颗粒填充到较大颗粒之间的缝隙中，从而产生新的接触表面。大小分布较广通过为结合聚结产生许多接触机会可以产生较大的球。本发明的球形微粒优选在狭窄的大小分布范围内，从而最小化了接触聚结的机会。“狭窄的大小分布”意味着优选的颗粒大小分布，其中90%的小球颗粒的体积直径与10%的体积直径之间的比率小于或等于5。更优选情况下，90%的小球颗粒的体积直径与10%的体积直径之间的比率小于或等于3。更优选情况下，90%的小球颗粒的体积直径与10%的体积直径之间的比率小于或等于2。

[0089] 几何标准偏差(GSD)也可以用于表明狭窄的大小分布。GSD的计算包括了以累积少于15.9%和84.1%百分率确定有效截止直径(ECD)。GSD等于少于84.17%的ECD与少于15.9%的ECD之间的比率的平方根。当GSD<2.5、更优选小于1.8时，GSD具有狭窄的大小分布。

[0090] 在本发明的优选形式中，微粒或微球体中的活性剂是半晶体的或非晶体的或基本上无定形的。

[0091] 微球体优选含有基本上无定形的或非晶体的活性剂，也就是说它们是处于无定形的或半晶体形式。在本文中使用时，“无定形”是指活性剂的通常是随机的固体形式，其中微球体中的一种或多种蛋白或一种或多种其它活性剂的晶格不存在，“半晶体”是指一种或多种活性剂的通常是随机的固体形式，其中微球体中的活性剂成分含有少于50%的一种或多种活性剂的晶格形式。

[0092] 典型情况下，微粒或微球体基本上是无孔的，密度大于0.5g/cm^3，更优选大于0.75g/cm^3，最优选大于大约0.85g/cm^3。优选的密度范围从大约0.5到大约2g/cm^3，更优选

从大约 0.75 到大约 1.75g/cm^3，更优选从大约 0.85 到大约 1.5g/cm^3。本发明的基本上无定形的或非晶体微粒更容易溶解，或者表现出比不是如此构造的微粒，例如晶体微粒更快的溶出速率。

[0093] 本发明的微粒或微球体可以表现出高含量的活性剂。其中不需要许多其它制备微粒的方法所需的大量的填充剂或类似的赋形剂，尽管在需要达到特定的一个或多个目的时也可以包含除了活性剂之外的物质。例如在许多应用中，微球体中含有等于或大于 95 重量％的微粒。一般来说，活性剂占颗粒的大约 20 重量％到 100 重量％，优选占大约 50 重量％到大约 100 重量％，更优选占大约 80 重量％到大约 100 重量％，更优选占大约 90 重量％到大约 100 重量％。在本文中当陈述范围时，意味着包含了其中的任何范围或范围的组合。

[0094] 本发明的另一个方面是在含有或不含有赋形剂的情况下微粒或微球体保留了活性剂的生物化学完整性和生物活性。

[0095] 颗粒的体内递送

[0096] 本发明中含有活性剂的微粒、小球颗粒或微球体适合于通过可注射的途径递送给需要试剂的对象。优选的递送途径是可注射的，包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、鞘内、硬膜外、动脉内、关节内注射等。其它的递送途径、例如局部、口、直肠、鼻、肺、阴道、颊、舌下、透皮、透过粘膜、耳或眼内递送也可以使用，但一般来说，本发明的优点对于注射应用来说更明显。出于本发明的目的，更优选的是可用注射器注射的递送途径。最重要的是，尽管蛋白或活性剂具有高分子量，微粒或微球体可以被吸入到注射器中，并通过细的针注射。优选的递送途径是使用细针进行注射，包括皮下、眼内等。通过细的针意味着针至少为 20 号口径，一般在大约 22 号和大约 30 号之间和以上。有利的是细的针可以细到至少 24 号，更有利的是细到至少 26 号，更有利的是细到至少 28 号。

[0097] 微粒或微球体能够以每毫升注射的组合物至少大约 50 毫克蛋白的浓度进行注射。例如，从大约 100 到 800 毫克的蛋白可以以不超过大约 10 毫升、对于许多应用来说通常至少大约 2 毫升的递送体积进行注射。递送也可以在正常的注射时间期间进行。典型的这种时间期间不超过大约 20 秒或更少。

[0098] 本文中提出的颗粒形成方法提供了颗粒的形成，根据希望或需要可以带有也可以不带有赋形剂或其它成分或添加剂。从不含添加剂的蛋白本身制造蛋白微粒或微球体也是本发明的一种方法，有时能提供优越的优势以便使用。

[0099] 制造微粒的方法

[0100] 连续相

[0101] 本发明制备活性剂的微粒或微球体的方法开始是提供一种溶液，其中含有活性剂和相分离增强试剂，它们溶解在第一种溶剂中成为单一的液相。溶液可以是含有有机溶剂或可混溶的有机溶剂混合物的有机体系。溶液也可以是基于水相的溶液，含有水相介质或可与水混溶的有机溶剂或可与水混溶的有机溶剂的混合物或其组合。水相介质可以是水、通常的盐水、缓冲溶液、缓冲盐溶液等。适合的与水混溶的有机溶剂包括但不限于 N- 甲基 -2- 吡咯烷酮 (N- 甲基 -2- 吡咯烷酮)、2- 吡咯烷酮 (2- 吡咯烷酮)、1,3- 二甲基 -2- 咪唑烷酮 (DMI)、二甲亚砜、二甲基乙酰胺、乙酸、乳酸、丙酮、甲基乙基酮、乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇、3- 戊醇、正丙醇、苯甲醇、甘油、四氢呋喃 (THF)、聚乙二醇 (PEG)、PEG-4、PEG-8、PEG-9、PEG-12、PEG-14、PEG-16、PEG-120、PEG-75、PEG-150、聚乙二醇酯类、PEG-4 二月桂酸

酯、PEG-20 二月桂酸酯、PEG-6 异硬脂酸酯、PEG-8 棕榈酸硬脂酸酯、PEG-150 棕榈酸硬脂酸酯、聚乙二醇山梨糖醇酐、PEG-20 山梨糖醇酐异硬脂酸酯、聚乙二醇单烷基醚、PEG-3 二甲基醚、PEG-4 二甲基醚、聚丙二醇 (PPG)、聚丙烯褐藻酸盐、PPG-10 丁二醇、PPG-10 甲基葡糖醚、PPG-20 甲基葡糖醚、PPG-15 硬脂基醚、丙二醇二辛酸酯 / 二癸酸酯、丙二醇月桂酸酯、以及甘油糠醛（四氢化糠基醇基聚乙二醇醚）、烷类包括丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷，或其组合。

[0102] 单一的连续相的制备可以通过首先提供相分离增强试剂的溶液，该相分离增强试剂或者可以溶解在第一种溶剂中、或者可以与其混溶。然后在溶液中加入活性剂。活性剂可以直接加入到溶液中，或者活性剂也可以首先溶解在第二种溶剂中，然后一起加入到溶液中。第二种溶剂可以是与第一种溶剂相同的溶剂、它也可以是从上面的列表中选择的能够与溶液混溶的另一种溶剂。优选，在环境温度或更低的温度下将活性剂加入到溶液中，这对于热不稳定分子例如某些蛋白来说特别重要。“环境温度”意味着大约为室温的温度，为大约 20℃到大约 40℃。但是，只要加热不会引起试剂活性的明显降低，系统也可以被加热以增加活性剂在系统中的溶解度。

[0103] 相分离增强试剂

[0104] 当将溶液进行相分离步骤时，本发明的相分离增强试剂 (PSEA) 增强或诱导了活性剂从溶液中的液固相分离，其中活性剂变成了固相或半固相，形成了小球颗粒的悬浮液作为不连续相，而相分离增强试剂保持溶解在连续相中。当将溶液带入到相分离条件时，相分离增强试剂减少了活性剂的溶解度。合适的相分离增强试剂包括但不限于可以溶解在溶液中或可以与溶液混溶的聚合物或聚合物的混合物。适合的聚合物的例子包括线性的或支化的聚合物、共聚物和嵌段共聚物。这些聚合物可以是水溶的、半水溶的、与水混溶的或不溶的。

[0105] 在本发明的优选形式中，相分离增强试剂是水溶的或可与水混溶的。可以使用的聚合物的类型包括基于碳水化合物的聚合物、聚脂族醇、聚乙烯聚合物、聚丙烯酸、聚有机酸、聚氨基酸、共聚物和嵌段共聚物（例如泊洛沙姆例如普卢诺尼克 F127 或 F68）、叔 - 聚合物、聚醚、天然存在的聚合物、聚酰亚胺、表面活性剂、聚酯、支化的和环状的聚合物和聚醛。

[0106] 优选的聚合物是可接受为药用添加剂的用于活性剂颗粒的预期给药途径的聚合物。优选的聚合物是药学可接受的添加剂，例如不同分子量的聚乙二醇 (PEG)、例如 PEG200、PEG300、PEG3350、PEG8000、PEG10000、PEG20000 等和不同分子量的泊洛沙姆，例如，泊洛沙姆 188 和普卢诺尼克 F127 或普卢诺尼克 F68。另一种优选的聚合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。另一种优选的聚合物是羟基乙基淀粉。其它的两亲聚合物也可以单独使用或组合使用。相分离增强试剂也可以是非聚合物例如丙二醇与乙醇的混合物。

[0107] 液固相分离

[0108] 溶液中活性剂的液固相分离可以通过本技术领域内任何已知的方法来诱导，例如温度的改变（升高或降低）、压力的改变、pH 的改变、溶液离子强度的改变、活性剂浓度的改变、相分离增强试剂的浓度的改变、溶液渗透压的改变、它们的组合等。

[0109] 在本发明的优选实施方案中，相变是温度诱导的相变。在许多实施方案中，温度诱导的相变是通过将温度降低到溶液中活性剂的相转变温度之下来进行的。

[0110] 图 1 是含有溶剂、PSEA 和活性剂的溶液的二维相图 10。该相图以活性剂浓度对溶

液温度作图。PSEA 的浓度保持不变。

[0111] 图 1 的相图包含有饱和曲线 12 ;超饱和曲线 14 ;它们之间的亚稳定区域 16 ;饱和曲线下的第一区域 18,其中体系处于均匀的单一液相中,所有的成分都在液相中 ;以及超饱和曲线上的第二区域 20,其中体系是一个两相体系,具有固相的活性剂和液相的 PSEA 和溶剂。该相图对于确定体系的温度、纯的液相和液固相中成分的相对浓度、以及这两相之间转变的条件是有帮助的。

[0112] 正如本文所公开的那样,活性剂的微粒或微球体的制备原则上包括将未饱和的溶液 (图 1 中的点 A') 冷却到饱和点 A,这时溶液与可能存在的任何固相处于平衡。通过进一步冷却达到这样一种状态,这时溶液含有比给定温度下对应于平衡溶解度的活性剂更多的活性剂 ;因此溶液变为超饱和。固相的自发形成直到达到点 B 时才会发生。点 B 是位于亚稳定区边界的点。亚稳定区的宽度可以用最大可达到的过冷却 $T_{max}=T_2-T_1$ 或超饱和 $C_{max}=C*_2-C*_1$ 来表示。这两种表示是热力学等价的 :

[0113] $$\Delta C_{max} = C_2^* - C_1^* = \int_{T_1}^{T_2} \left(\frac{\partial C^*}{\partial T} \right) dT \cong \Delta T_{max} \left(\frac{dC^*}{dT} \right)$$

[0114] 途径 A'-A-B 代表了制备亚稳定溶液的多温方法。在等温方法中起始点将是 A''。通过在恒定温度下增加浓度,也将在点 A 再次达到饱和。等温增加浓度 (例如通过溶剂蒸发或通过放入晶种 / 加入活性剂) 到点 C 将导致溶液移动到亚稳定区域,直到再次达到亚稳定性限制。当超过亚稳定性限制时,溶液变得不稳定,固相的自发形成马上开始。

[0115] 等温条件下获得的值 $(\Delta C_{max})_T=C^*_3-C^*_2$ 可能与多温条件下获得的相应值 $\Delta T_{max}=T_3-T_2$ 有所不同。当达到亚稳定区域的边界时,固相颗粒形成所需的时间降低了,直到亚稳定限制达到。

[0116] 在多温方法中,冷却的速度以控制的速度进行以控制颗粒的大小和形状。控制的速度意味着大约 0.2℃ / 分钟到大约 50℃ / 分钟,更优选从 0.2℃ / 分钟到 30℃ / 分钟。改变的速度可以是恒定的或线性的速度、非线性的速度、间歇的或程序化的速度 (具有多相循环)。颗粒可以与溶液中的 PSEA 分离开,通过下面将要讨论的方法清洗纯化。

[0117] 本发明考虑到了调整活性剂的浓度、PSEA 的浓度、温度或这些因素的任何组合来引起相变,其中活性剂从液态变为固态,而 PSEA 和溶剂不经历相变并保持为液体。此外还考虑到了改变 pH、离子强度、渗透压等来增强、促进、控制或抑制相变。对于凝固点相对高、或凝固点高于相转变温度的溶液,在溶液中可以包含凝固点降低试剂例如丙二醇、蔗糖、乙二醇、醇 (例如乙醇、甲醇)、或凝固点降低试剂的水性混合物以降低体系的凝固点,使得体系中的相变得以在系统不凝固的情况下进行。该方法也可以被执行以至温度被降低到系统的凝固点之下。本文描述的方法特别适合于热不稳定的分子 (例如蛋白)。

[0118] 可任选的赋形剂

[0119] 本发明的微粒可以包含一种或多种赋形剂。赋形剂可以赋予活性剂或微粒其它的特征,例如增加微粒或活性剂或载体试剂的稳定性、活性剂从微粒中的可控释放、或修饰活性剂通过生物学组织的通过性。适合的赋形剂包括但不限于碳水化合物 (例如海藻糖、蔗糖、甘露糖醇)、阳离子 (例如 Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+})、阴离子 (例如 SO_4^{2-})、氨基酸 (例如甘氨酸)、脂类、磷脂、脂肪酸、表面活性剂、三酰基甘油、胆汁酸或其盐 (例如胆酸或其盐、例如胆酸

钠，脱氧胆酸或其盐）、脂肪酸酯以及存在的水平低于它们作为 PSEA 起作用所需的水平的聚合物。当使用赋形剂时，赋形剂不明显影响溶液的相图。

[0120] 颗粒的分离和清洗

[0121] 在本发明的优选实施方案中，微粒或微球体通过将它们与溶液中的相分离增强试剂分开而收获。在另一个优选实施方案中，分离的方法是通过用液体介质清洗含有微粒或微球体的溶液，其中活性剂不溶解在液体介质中，而相分离增强试剂溶解在液体介质中。某些清洗的方法可以通过透滤或离心来进行。该液体介质可以是水性介质或有机溶剂。对于具有低水溶解性的活性剂来说，液体介质可以是水性介质或含有能够降低活性剂的水溶解性的试剂例如二价阳离子的水性介质。对于具有高水溶解性的活性剂例如许多蛋白来说，可以使用含有蛋白沉淀试剂例如硫酸铵的有机溶剂或水性溶剂。

[0122] 适合用做液体介质的有机溶剂的例子包括了那些上面陈述的适合用于连续相的那些有机溶剂，更优选为二氯甲烷、氯仿、乙腈、乙酸乙酯、甲醇、乙醇、戊烷等。也考虑到了使用任何这些溶剂的混合物。一个优选的混合物是二氯甲烷或 1 :1 的二氯甲烷和丙酮的混合物。优选情况下液体介质具有较低的沸点，以便容易地通过例如冻干、蒸发或干燥来除去。

[0123] 液体介质也可以是超临界的流体，例如液态二氧化碳或接近其超临界点的流体。超临界流体对于相分离增强试剂、特别是某些聚合物来说可能是适当的溶剂，但是对于蛋白颗粒来说不是溶剂。超临界流体可以自身使用或与共溶剂共同使用。可以使用下列的超临界流体 :液态 CO_2、乙烷或氙。潜在的共溶剂可以是乙腈、二氯甲烷、乙醇、甲醇、水或 2- 丙醇。

[0124] 用于将本文描述的微粒或微球体与 PSEA 分开的液体介质可以含有能够降低活性剂在液体介质中的溶解度的试剂。最希望的是颗粒在液体介质中表现出最小的溶解度，以最大化微粒或微球体的产率。对于某些蛋白例如胰岛素来说，溶解度的降低可以通过在蛋白中加入二价阳离子例如 Zn^{2+} 来获得。其它能够用于形成复合物的离子包括但不限于 Ca^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+} 等。复合物的溶解度足够低，以允许透滤水溶液中的复合物。

[0125] 液体介质中也可以含有一种或多种赋形剂，可以赋予活性剂或微粒其它的特征，例如前面讨论的增加微粒和 / 或活性剂或载体试剂的稳定性、活性剂从微粒中的可控释放、或活性剂通过生物学组织的修饰的通过性。在本发明的另一种形式中，微粒或微球体不从含有 PSEA 的溶液中分离出来。

[0126] 基于水相的方法

[0127] 在另一个优选实施方案中，本方面体系的制造方法是包含水相或可与水混溶的溶剂的水相体系的制造方法。适合的可与水混溶的溶剂的例子包括但不限于那些前面指出的用于连续相的溶剂。使用基于水相的方法的一个优点是溶液可以被缓冲，并且可以包含能够提供生物化学稳定作用的赋形剂以保护活性剂。当活性剂是蛋白时这一点可能是特别有利的。

[0128] 预制微粒的微囊包封

[0129] 本发明的微粒或微球体可以进一步包封在形成壁的材料构成的基质中以形成微囊包封的颗粒。微囊包封可以通过本技术领域内任何已知的方法来完成。在优选实施方案中，本发明的微粒或微球体的微囊包封是通过下面描述的乳化作用 / 溶剂提取方法来完成

的。基质可以给予活性剂缓释的性质，使得释放的速度根据所需治疗应用可以持续数分钟到数小时、数天或数周。微囊包封的微粒或微球体也可以产生活性剂的延迟释放配方。在本申请中也提出了其它制造微粒的方法。

[0130] 在乳化作用 / 溶剂提取方法中，乳化作用是通过混合两种不混溶的相——连续相和不连续相（也被称为分散相）以形成乳浊液来获得的。在优选实施方案中，连续相是水性相（或水相），不连续相是有机相（或油相），以形成水包油 (O/W) 的乳浊液。不连续相也可以进一步含有分散的固体颗粒，或者作为细的悬浮液或者作为细的分散液以形成固体在油中 (S/O) 的相。有机相优选是不溶于水的或部分溶于水的有机溶剂。有机相与水相的重量比率从大约 1:99 到大约 99:1，更优选从大约 1:99 到大约 40:60，更优选从大约 2:98 到大约 1:3，或这些范围中的任何范围或范围的组合。在优选实施方案中，有机相与水相的比率是大约 1:3。在这一方面本发明还考虑到了利用反乳浊液或油包水的乳浊液 (W/O)，其中油相形成连续相，水相形成不连续相。也考虑到了利用具有超过两相的乳浊液，例如油 - 水 - 油乳浊液 (O/W/O) 或水 - 油 - 水乳浊液 (W/O/W)。

[0131] 在对发明的这种修改的优选实施方案中，使用乳化作用 / 溶剂提取方法进行微囊包封的过程首先是通过早先描述的方法制备预制的微粒或微球体以及含有成壁物质的有机相。将预制的微粒或微球体分散在含有成壁物质的有机相中形成固体在油中 (S/O) 的相，其中含有预制的微粒或微球体在油相中的分散液。在优选实施方案中，分散是通过对微粒或微球体与有机相的混合物进行均质化来进行的。水性介质将形成连续相。在这种情况下，通过将 S/O 相与水性相乳化形成的乳化体系是固体 - 油 - 水 (S/O/W) 乳化体系。

[0132] 成壁物质是指能够单独或组合形成基质的结构实体的物质。优选的物质是生物可降解的成壁物质，特别是对可注射的应用来说。这样的物质的例子包括但不限于聚乳酸交酯 / 聚乙醇酸交酯聚合物 (PLGA's) 家族、聚乙二醇共轭的 PLGA's(PLGA-PEG's) 和甘油三酯。在使用 PLGA 或 PLGA-PEG 的实施方案中，PLGA 优选的聚乳酸交酯与聚乙醇酸交酯的比率从 100:0 到 0:100，更优选从大约 90:10 到 15:85，更优选为大约 50:50。一般来说，聚合物中聚乳酸交酯与聚乙醇酸交酯的比率越高，微囊包封的颗粒的亲水性越大，导致水化作用越快和降解越快。不同分子量的 PLGA 也可以使用。一般来说，对于聚乳酸交酯与聚乙醇酸交酯的比率相同的聚合物来说，PLGA 的分子量越高，活性剂的释放越慢，微囊包封的颗粒或球体的大小分布越广。

[0133] 在进行微囊包封时，油 - 水 (O/W) 或固体 - 油 - 水 (S/O/W) 乳浊液的有机相（油相）中的有机溶剂可以是不溶于水的或部分不溶于水的。“不溶于水的溶剂”是指当以 1:1 的比率 (O/W) 与水性溶液相混合时形成分界弯液面的那些溶剂。适合的不溶于水的溶剂包括但不限于取代的或未取代的、直链的、支链的或环状的、碳原子数量为 5 或以上的烷类，取代的或未取代的、直链的、支链的或环状的、碳原子数量为 5 或以上的烯类，取代的或未取代的、直链的、支链的或环状的、碳原子数量为 5 或以上的炔类，芳香族烃，完全或部分卤代的烃，醚，酯，酮，甘油一酯、二酯或三酯，天然油，醇、醛、酸、胺、线性或环状硅酮，六甲基二硅氧烷或这些试剂的任何组合。卤代的溶剂包括但不限于四氯化碳、二氯甲烷、氯仿、四氯乙烯、三氯乙烯、三氯乙烷、氟烃、氯代苯（单、双、三取代的）、三氯氟甲烷。特别适合的溶剂是二氯甲烷、氯仿、乙醚、甲苯、二甲苯和乙酸乙酯。“部分溶于水的溶剂”是指那些在某个浓度下不溶于水、但在另一个较低的浓度下可溶于水的溶剂。这些溶剂具有有限的水溶解

性，能够自发形成乳浊液。部分溶于水的溶剂的例子是四氢呋喃(THF)、丙二醇碳酸酯、苯甲醇和乙酸乙酯。

[0134] 在微囊包封方面，可以加入表面活性化合物以例如增加有机相的湿润性质。表面活性化合物可以在乳化步骤之前加入到水相、有机相、以及水相和有机相两者之中，或者在乳化步骤之后加入到乳浊液中。表面活性化合物的使用可以减少未包封的或部分包封的小球颗粒的数量，从而减少了活性剂在释放过程中的初始突释。依赖于化合物的溶解度，表面活性化合物可以加入到有机相中、或水相中、或有机相和水相两者之中。

[0135] 术语“表面活性化合物”是指例如阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、非离子性表面活性剂或生物表面活性分子这样的化合物。不论在何种情况下，表面活性化合物在水相或有机相或乳浊液中存在的重量比率将从少于大约 0.01% 到大约 30%，更优选情况下从大约 0.01% 到大约 10%，或其中的任何范围或范围的组合。

[0136] 适合的阴离子表面活性剂包括但不限于：月桂酸钾、月桂基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、烷基聚环氧乙烯硫酸酯、藻酸钠、丁二酸二辛基磺酸钠、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸及其盐、甘油酯、羧甲基纤维素钠、胆酸和其它胆汁酸（例如胆酸、脱氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺胆酸、甘氨脱氧胆酸）及其盐（例如脱氧胆酸钠）。

[0137] 适合的阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物，例如苯扎氯铵、溴化十六烷基三甲基铵、月桂酸基二甲基苯甲基氯铵、酰基肉毒碱盐酸盐或烷基吡啶卤化物。作为阴离子表面活性剂，可以使用磷脂。适合的磷脂包括例如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、溶血磷脂、卵磷脂或大豆磷脂、或其组合。磷脂可以是盐化的或非盐化的、氢化的或部分氢化的、天然的、半合成的或合成的。

[0138] 适合的非离子性表面活性剂包括：聚氧乙烯脂肪醇醚（聚乙二醇和布里杰）、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯（聚山梨酸酯）、聚氧乙烯脂肪酸酯（密尔吉）、失水山梨糖醇酯（司盘）、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、聚丙二醇、十六烷醇、十八十六醇、十八烷醇、芳基烷基聚醚醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物（泊洛沙姆）、polaxamines、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮和多糖（包括淀粉和淀粉衍生物例如羟基乙基淀粉(HES)、甲基纤维素、羟基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基丙甲基纤维素和非晶态纤维素）。在本发明的优选形式中，非离子性表面活性剂是聚氧乙烯和聚氧丙烯共聚物，优选是丙二醇和乙二醇的嵌段共聚物。这种聚合物在商品名POLOXAMER（泊洛沙姆）下销售，有时也被称为PLURONIC®，由几家供应商包括 Spectrum Chemical 和 Ruger 销售。在聚氧乙烯脂肪酸酯中包含了那些具有短的烷基链的聚酯。这样的表面活性剂的一个例子是SOLUTOL® HS15、聚乙二醇-660-羟基硬脂酸酯，由 BASF Aktiengesellschaft 生产。表面活性生物分子包括例如白蛋白、酪蛋白、肝素、水蛭素、淀粉羟乙基酶或其它适当的生物相容试剂这样的分子。

[0139] 在本发明的微囊包封的优选选择形式中，水相包含了作为表面活性化合物的蛋白。优选的蛋白是白蛋白。蛋白也可以作为赋形剂。在蛋白不是表面活性化合物的实施方案中，其它的赋形剂可以被包含在乳浊液中，可以在乳化过程之前或之后加入。适合的赋形剂包括但不限于糖类、二糖和糖醇。优选的二糖是蔗糖，优选的糖醇是甘露糖醇。

[0140] 此外，使用沟通试剂例如聚乙二醇(PEG)可以增加最终产物的水通透速度，当基质存在时，这可以导致对活性剂从基质中初始释放动力学的修饰，以及通过修饰水化速度对基质的降解速度和降解依赖性的释放动力学的修饰。对于 PEG 用做相分离增强试剂的小

球颗粒的制造过程中清洗过程的消除部分来说，在微囊包封过程中使用 PEG 作为沟通试剂可能是有利的。此外，连续相的盐度和 pH 可以被改变以影响聚合物和产生的微粒或微球体的性质，包括基质包装密度、表面电荷、润湿程度孔隙度、粘度、颗粒大小分布、以及被包封的治疗剂从基质中的初始突释和释放动力学。连续相的盐度也可以被用来降低两相的溶混性。适合的盐包括但不限于水溶性的磷酸盐、硫酸盐、乙酸盐和碳酸盐、Tris、MES、HEPES。在使用盐的实施方案中，盐浓度范围从 0 到 10M，更优选从 1mM 到 1M，更优选从 20 到 200mM。pH 范围从 1 到 11，更优选从 2.5 到 9，更优选从 6 到 8。

[0141] 在将微粒或微球体分散到有机相（油相）中之后，将水性介质（水相）的连续相与有机相的不连续相通过例如匀浆或超声进行剧烈混合，以形成含有初期的微囊包封的颗粒的乳化微滴的乳浊液。在水相和有机相混合之前，连续的水相可以用使用在有机相中的有机溶剂进行饱和，以最小化有机溶剂从乳化微滴中的快速抽提。乳化方法如果使用，可以在混合物可以维持其液体性质的任何温度下进行。乳浊液的稳定性是有机相或水相中的表面活性化合物的浓度的函数，如果是在乳化过程后将表面活性化合物加入到乳浊液中的情况下，是乳浊液中表面活性化合物的浓度的函数。这是决定乳浊液系统的微滴大小（初期的微囊包封的颗粒）以及微囊包封的颗粒的大小和大小分布的因素之一。其它影响微囊包封的颗粒的大小分布的因素是连续相的粘度、不连续相的粘度、乳化过程中的剪切力、表面活性化合物的类型和浓度、以及油 / 水比率。

[0142] 乳化后，将乳浊液转移到淬灭介质中。淬灭介质从初期的微囊包封的颗粒中抽提不连续相中的溶剂，导致固体的微囊包封的颗粒的形成，该微粒具有固体的聚合物基质围绕着乳化的微滴附近的预制的微粒或微球体。在 O/W 或 S/O/W 系统的实施方案中，淬灭介质是水相介质，其中含有表面活性化合物、或增稠剂或其它赋形剂。微囊包封的颗粒优选是球形的，颗粒的大小从大约 0.6 到大约 300 微米，更优选从大约 0.8 到大约 60 微米。此外，微囊包封的颗粒优选具有狭窄的颗粒大小分布。为了减少不连续相的抽提时间，可以对淬灭介质加热或减压。不连续相从初期的微囊包封的颗粒中的抽提速度是最终的固体微囊包封的颗粒的孔隙度的一个重要因素，因为不连续相的快速除去例如通过蒸发（沸腾效应）导致基质的连续性的破坏。

[0143] 在乳化方法的优选实施方案中，如果操作相同，同样可以用连续的方式代替批次方法来进行。图 41 描绘了可以在这方面使用的连续乳化反应器的设计。

[0144] 在另一个实施方案中，当进行包封时，包封了活性剂的微粒或微球体的硬化的成壁聚合物基质，被进一步通过离心和 / 或过滤（包括渗滤）来收获，然后用水清洗。残余的液相可以进一步通过例如冻干或蒸发的方法除去。

[0145] 微粒或微球体可以被包封在至少一层或多层聚合电解质中，这些聚合电解质被选择用来通过控制表面功能性质来将颗粒的性质修改为定向的性质。这样的微粒用溶解在水性介质中的带有相反电荷的聚合物（聚离子）浸泡，以影响颗粒的表面性质。如果通过 ζ 电位测量确定了颗粒具有负电荷，那么第一个聚合物层将带正电。如果颗粒具有起始的正电荷，那么第一个聚合物层将带负电。第一层的沉积可以发生在水中、或缓冲液中、或含有某些可与水混溶的有机溶剂的水性溶液中。

[0146] 在胶体不稳定的蛋白微粒的情况下，可以引入其它的溶解度降低试剂。为此目的可以使用低分子量的溶解度降低试剂 / 粘度增加试剂，例如醇、甘油等，以及聚合物例如水

溶性的聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、羟乙基淀粉、葡聚糖等。与包被材料的温育可以在室温以及较低的温度下进行，以控制颗粒的溶解度。

[0147] 颗粒可以与聚合物一起温育所需的时间（数分钟到数小时）。然后可以通过离心或渗滤将包被的颗粒的悬浮液与过量的未结合的聚合物分离开来。优选从水相溶液或含有上述的溶解度降低试剂的溶液中的残余聚合物上洗下所述颗粒。根据活性物质和包被物质的溶解性对温度进行优化。

[0148] 在完成清洗步骤后，引入下一层具有相反电荷的聚合物。这个步骤可以象前面的循环那样重复。沉积的聚合物层的数目可以依赖于所需的应用。它可以发生变化，从例如用于表面修饰时的一层，到根据所需的溶解动力学用于缓释应用时的 10 到 20 个双层。

[0149] 可以使用的聚合物包括但不限于下面的列举：聚苯乙烯磺酸盐 (PSS)、聚烯丙胺盐酸盐 (PAH)、聚丙烯酸 (PAA)、聚二烯丙基二甲基氯铵 (PDDA)，以及生物相容的聚合物，例如硫酸葡聚糖、壳聚糖、硫酸壳聚糖、聚赖氨酸、明胶、褐藻酸盐、鱼精蛋白、硫酸鱼精蛋白、黄原胶等，以及带电荷的脂类，例如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸等。

[0150] 在另一种层压层的方法中，第一层聚离子也可以在颗粒的控制沉淀结束时不除去体系中存在的聚合物例如 PEG 的情况下加入。此外，脂类结构（例如脂质体）可以用于带有相反电荷聚合物的候补沉淀中，带电荷和不带电荷的脂类之间的比率可以被优化以获得最小的壳透过性。在某些情况下，优选在存在二价阳离子、例如锌的情况下执行一层压一层的装配。

具体实施方式

[0151] 实施例 1

[0152] 本实施例提供了用于制备每批 500μl 可用注射器注射的抗因子 VIII 单克隆抗体微球体的基本步骤。按照下面的描述在 eppendorf 管中制备了 10 批 500μl 的单克隆抗体：

[0153] 40mM，pH=6.5 的乙酸铵 (AA) 的制备：通过将 3.08 克 AA（光谱纯）溶解于 1 升去离子水中制备了 40mM 的 AA 缓冲液。AA 容易溶解，并形成 pH 为约 6.4 的缓冲溶液。使用稀释的氢氧化铵将 pH 调整到 pH=6.5。

[0154] 溶于 40mM AA 缓冲液的 500mL10% 的泊洛沙姆 188 的制备：将 50 克泊洛沙姆 188(BASF) 溶解在 500mL40mM 的 AA 缓冲液中（如步骤 1 中所描述，只是这时不需要调整 pH)。这种量的泊洛沙姆的溶解可以通过几次添加来进行。最终的 pH 大约为 pH6.4。将溶液用 0.22μ 的滤膜过滤，冷冻保存。

[0155] 缓冲液交换：对 5mL 蛋白使用 2 个 PD10 脱盐柱 (Amersham Biosciences)。总的柱体积是 3.5mL，推荐每个柱子用于交换不超过 2.5mL。将每个柱子浸泡在不超过 25mL 的 40mM 乙酸铵缓冲液中，以用缓冲液饱和柱子。然后，将 2.5mL 溶解在磷酸缓冲液中的抗因子 VIII 抗体加入到柱子中，然后加入 1mL 乙酸铵缓冲液以充满柱子。通过注入另外 2.5mL40mM 的乙酸铵缓冲液收集蛋白。

[0156] 优选的透析盒是 1Pierce，具有 3-12mL 的总体积，分子量截留值为 10,000 道尔顿，用于为 5mL 蛋白替换缓冲液。在使用前用去离子水水化透析盒，例如通过使用带有 18G1/2 针头的 5-10mL 注射器。首先，将空气注入透析盒以分离膜壁。然后注入样品。将空气从透

析盒中抽回，使样品与膜更好的接触。最后，在其上加入浮标，将透析盒低速离心。根据经验，每个缓冲液交换应该用至少 10 倍体积。

[0157] 蛋白浓度：蛋白浓度通过测量在 280nm 的吸光度并与校准曲线进行比较来确定。如果需要，蛋白溶液可以使用缓冲液按照所需的工作浓度进行修饰。

[0158] 用乙酸将 10% 的泊洛沙姆溶液的 pH 调整到 pH=6.0 和 pH=6.1。将 5mL 蛋白分成 10 批，每批 500μL。然后，将 1000μL 溶于 pH=6.0 的 40mM AA 溶液的 10% 的泊洛沙姆 188 加入到 5 个 eppendorf 管中，1000μL 溶于 pH=6.1 的 40mM AA 溶液的 10% 的泊洛沙姆 188 加入到另外 5 个 eppendorf 管中。溶液通过小心的振荡和手动混合而完全混合。溶液应该看起来是透明的到轻微模糊。样品在（大约 4℃）下温育 1-2 小时以获得缓慢的冷却。将样品用干冰 / 乙醇混合物冷却并冻干过夜，或放置在 -80℃冰箱中，以除去所有的去离子水。

[0159] 一旦除去了所有的去离子水后，在每个 eppendorf 管的干燥样品中加入 1mL $MeCl_2$/5% 丙酮。进行混合，在 6000-8000RPM 离心 3 分钟。将上清液仔细地从离心管中取出，倾倒，再重复清洗两次。

[0160] 在最后的清洗完成之后，倾倒上清液，使用低速的、非常轻柔的 N_2 气流除去其余的溶剂，以避免粉末的悬浮。将干燥的管放置在冻干器中除去残余的溶剂，收集抗因子 VIII 单克隆抗体的微球体。

[0161] 实施例 2

[0162] 本实施例提供了在 eppendorf 管中制备每批 500μL 的抗 CD34 单克隆抗体微球体的基本步骤：

[0163] 40mM，pH=6.0 的乙酸铵缓冲液的制备：通过将 3.08 克 AA（光谱纯）溶解于 1 升去离子水中制备了 40mM 的乙酸铵 (AA) 缓冲液。AA 容易溶解，并形成 pH 大约 6.4 的缓冲溶液。使用稀释的氢氧化铵将 pH 调整到 pH=6.0。

[0164] 溶于 40mM AA 缓冲液的 500mL15% 的泊洛沙姆 188 的制备：将 75 克泊洛沙姆 188(BASF) 溶解在 500mL40mM 的 AA 缓冲液中（如步骤 1 中所描述，只是这时不需要调整 pH)。这种量的泊洛沙姆的溶解可以通过几次添加来进行。最终的 pH 大约为 pH ～ 6.4。将溶液用 0.22μ 的滤膜过滤，冷冻保存。

[0165] 缓冲液交换：对 5mL 蛋白使用 2 个 PD10 脱盐柱 (Amersham Biosciences)。总的柱体积是 3.5mL。将每个柱子浸泡在不超过 25mL 的 40mM 乙酸铵缓冲液中，以用缓冲液饱和柱子。然后，将 2.5mL 溶解在磷酸缓冲液中的抗 CD34 抗体加入到柱子中，然后加入 1mL 乙酸铵缓冲液以充满柱子。通过注入另外 2.5mL40mM 的乙酸铵缓冲液收集蛋白。1Pierce 透析盒，具有 3-12mL 的总体积，分子量截留值为 10,000MW，被用于为 5mL 蛋白替换缓冲液。注入样品。在其上加入浮标，将透析盒低速离心。

[0166] 蛋白浓度通过测量在 280nm 的吸光度并与校准曲线进行比较来确定。如果需要，蛋白溶液可以使用缓冲液按照所需的工作浓度进行修饰。该步骤的工作浓度被确定为 1.8mg/ml（终浓度为 0.9mg/ml）。

[0167] 用乙酸将 15% 的泊洛沙姆溶液的 pH 调整到 pH=5.8 和 pH=5.9。将 5mL 蛋白分成 10 批，每批 500μL。然后，将 500μL 溶于 pH5.8 的 40mM AA 溶液的 15% 的泊洛沙姆 188 加入到 5 个 eppendorf 管中，500μL 溶于 pH5.9 的 40mM AA 溶液的 15% 的泊洛沙姆 188 加入到另外 5 个 eppendorf 管中。

[0168] 溶液通过小心的振荡和手动混合而完全混合，溶液应该看起来是透明的到轻微模糊，样品在（大约 4℃）下温育 1-2 小时以获得缓慢的冷却。

[0169] 将样品用干冰 / 乙醇混合物快速冷却并冻干过夜，以除去所有的去离子水，或将样品放置在大约 -80℃的冰箱中。一旦除去了所有的去离子水后，在每个 eppendorf 管中加入 1mL $MeCl_2$/5% 丙酮，然后完全混合，在 6000-8000RPM 下离心 3 分钟。将上清液倾倒出来，再重复清洗两次。

[0170] 在最后的清洗完成之后，倾倒上清液，使用低速的、轻柔的 N_2 气流除去其余的溶剂。将几乎吹干的管放置在冻干器中除去残余的溶剂，收集抗 CD34 单克隆抗体的微球体。

[0171] 实施例 3

[0172] 本实施例描述了用泊洛沙姆作为溶剂制备抗因子 VIII 单克隆抗体微球体以及在冷却下微球体的形成。溶于 pH=7.0 的 40mM 磷酸缓冲液、浓度为 5.3-5.5（无氯化钠）的抗因子 VIII 单克隆抗体由 Baxter Healthcare 股份公司 (Bioscience Division, Hayward, CA) 提供。抗因子 VIII 单克隆抗体是一种鼠单克隆抗体，分子量为大约 150kD，用于纯化目的。浓度为 5.3mg/mL 的 5mL 这种单克隆抗体通过 0.22μm 膜过滤，使用透析盒对 pH6.5 的 40mM 乙酸铵缓冲液透析。蛋白的浓度通过测量在 280nm 处的光密度吸收值来确定。制备 pH=6.0 的从 BASF 公司 (Florham Park, N.J.) 购买的泊洛沙姆 188NF(Lutrol F68) 的 10% 溶液，用 0.22 微米过滤器过滤。乙酸铵由 Spectrum Chemicals 公司 (Gardena, CA) 提供。截留分子量 10,000、样品体积为 3-12mL 的透析盒 "Slide-A-Lyzer" 由 Pierce 公司 (Rockford, IL) 提供。0.5mL 单克隆抗体溶液的等份试样被插入到 20 个 1mL 的微量离心管中。在每个含有 0.5mL 抗因子 VIII 抗体（浓度为 5.3mg/mL）的管中加入 1mL10% 的泊洛沙姆溶液，将溶液在室温下小心地混合，在 29℃温育 1 到半个小时。

[0173] 然后，将溶液在 4℃温育 1 小时。在冷却过程中，当含有单克隆抗体的微球体形成时，透明的溶液变得模糊。然后用下面的方法确定蛋白掺入到微球体中的产率：取出微球体悬浮液的一份等份试样，通过离心从溶液中分离出微球体，通过测量在 280nm 处的光密度吸收值确定上清液中的蛋白浓度。温育之后，将管子快速冷冻并冻干。在冻干后，干粉中含有抗因子 VIII 单克隆抗体微球体和泊洛沙姆。

[0174] 通过在每个管中加入 1mL 含有 95% 二氯甲烷和 5% 丙酮的溶液、然后离心和除去上清液来除去泊洛沙姆。清洗步骤被重复 3 次。湿的沉淀物使用氮气干燥，剩余的溶剂使用真空除去。干粉在光学显微镜下检查。光学显微镜图（图 1）和偏振光学显微镜图（图 2）显示出球形颗粒的大小范围在 0.5-5 微米之间。样品被送到 SEM(Hitachi S4800, Electron Microscopy Center, Northeastern University, Boston Mass.)。

[0175] 使用双测传导的碳附着环将抗因子 VIII 抗体微球体样品安装在 SEM 样品支架上。通过使用 Denton DV-502 真空蒸发器进行蒸发在样品上镀上一薄层 (10-15nm) 铂 / 钯 80：20 的导电层。然后在 Hitachi S4800 场致发射 SEM 上使用 2-3kV 的加速电压将样品成像，并数字记录。扫描电子显微图（图 3）显示出球形颗粒的大小范围在 0.5-6 微米之间。

[0176] 当偏振光通过各向同性的样品时，不论样品放置的方向如何，样品都不会对偏振光造成影响，这是因为所有的晶轴都是完全等价的。这种效应被称为完全或各向同性消光，它发生在具有高度对称性的晶体、例如等轴晶系上。非晶体的、无定形的样品也产生同样的行为。偏振光学显微镜图将微球体显示为由亮的光轮围绕的暗圈。这些图不依赖于样品的

方向，表明它的球形形状和无定形结构。

[0177] 实施例 4

[0178] 本实施例显示了按照实施例 3 制备的抗因子 VIII 单克隆抗体的凝胶电泳。3-8% 的 Tris- 乙酸凝胶，1.5mm X10 个孔，Tris- 乙酸 SDS 跑胶缓冲液、NuPage LDS 样品缓冲液、Mark12 分子量标准以及 "SimplyBlue SafeStain" 干燥溶液由 Invitrogen(Carlsbad,CA) 提供。凝胶电泳是广泛使用的分析技术，用于蛋白和肽的分离和定性、以及用于估计蛋白的分子量。

[0179] 按照实施例 3 制备抗因子 VIII 单克隆抗体微球体，并于 37℃溶解在 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。来自 3 个不同批次的 40μL 样品平行上样电泳。40μL 天然的抗因子 VIII 溶液作为对照平行进行电泳。电泳时间 1 小时，电压是 150mV。

[0180] 图 4 展示了两个凝胶图，显示了溶解的单克隆抗体（从微球体中释放）在凝胶中的迁移与天然的单克隆抗体的迁移相同。所有的样品都迁移到 150kD 分子量标准的位置，表明蛋白的大小在配制后没有改变。染色强度也相同，在凝胶孔中没有染色，表明分子的聚集是最小的。

[0181] 实施例 5

[0182] 本实施例描述了使用 PEG/PVP 作为溶剂制备抗因子 VIII 单克隆抗体微球体以及在加热情况下微球体的形成。得自 Baxter Healthcare 公司 (Bioscience Division,Hayward,CA) 的溶于 40mM 磷酸缓冲液（无氯化钠）的抗因子 VIII 单克隆抗体被放入微球体形式中。制备溶于 pH=5.6 的 100mM 乙酸钠缓冲液的 25% 的 PEG/PVP(w/v) 溶液，使用从 Spectrum Chemicals 公司 (Gardena,CA) 获得的聚乙二醇 (PEG)，3350 道尔顿、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)，40000 道尔顿以及乙酸钠。

[0183] 400μ125% 的 PEG/PVP 溶液在室温下加入到 800μl 浓度为 5.3mg/mL 的抗因子 VIII 单克隆抗体溶液中。将溶液混合，在 65℃下温育 1 到半小时。在 65℃下温育后，通过在冷水中温育将溶液快速冷却（猝灭）至大约 20℃。在冷却过程中，当含有单克隆抗体的微球体形成时，澄清的溶液变得混浊。将悬浮液离心，除去上清液。通过用去离子水清洗除去过量的 PEG/PVP。

[0184] 图 5 显示了按照本实施例的步骤制备的微球体的扫描电子显微图。制备的微球体样品，通过 AMRAY AMR-1000 扫描电子显微镜 (Electron Microscopy Center,Northeastern University,Boston,MA)) 进行分析。样品使用基于碳的粘附剂粘附在碳环上，并固定在 SEM 样品台上。样品在真空下镀上铂 / 钯 80:20 的薄镀层。图 9 中显示的扫描电子显微图显示了球形颗粒的大小范围在 1-3 微米之间。

[0185] 对按照本实施例制备的微球体的水性悬浮液使用激光散射 (Beckman Coulter LS230,Miami Fla.) 测定颗粒大小的分布。颗粒大小的分布是狭窄的，超过 90% 的颗粒小于 2μm。此外，通过数量、表面积和体积表示的颗粒大小分布被叠加，表明所有的颗粒都具有大约同样的大小，没有明显的聚集。参见图 6。

[0186] 实施例 6

[0187] 在本实施例中，使用泊洛沙姆溶剂制备了抗 CD34 单克隆抗体微球体，使用冷却进行微球体的形成。抗 CD34 单克隆抗体是一种鼠 IgG1λ 单克隆抗体，分子量为大约 146kD。该单克隆抗体被用于细胞外疗法，例如与 Isolex® 300 和 Isolex® 300i 磁性细胞选择系统

(Baxter Healthcare 公司)一起用于干细胞筛选。干细胞筛选系统和治疗被表明能够处理自体外周血祖细胞 (PBPC) 产物以获得富集了 CD34+ 细胞的种群,用于 CD34 阴性肿瘤病人在骨髓切除治疗后的造血重建。

[0188] 抗 CD34 单克隆抗体由 Baxter Healthcare 公司 (Bioscience Division,Hayward,CA) 提供,溶解在含有 0.15M 氯化钠和 0.001% 吐温 80、pH=5.5 的 0.02M 磷酸钠缓冲液中,浓度为 2.3-2.5mg/mL。将 5mL 浓度为 2.2mg/mL 的单克隆抗体通过 0.22μm 的膜过滤,用 pH=6.0 的 40mM 乙酸铵缓冲液透析。制备从 BASF 公司 (Florham Park,NJ) 获得的泊洛沙姆 188NF(Lutrol F68) 的 15% 的溶液,该溶液 pH 为 6.0,用 0.22μm 的膜过滤。乙酸铵由 Spectrum Chemicals 公司 (Gardena,CA) 提供。截留分子量 10,000、样品体积为 3-12mL 的透析盒"Slide-A-Lyzer"由 Pierce 公司 (Rockford,IL) 提供。0.5mL 单克隆抗体溶液的等份试样被插入到 20 个 1mL 的微量离心管中。在每个含有 0.5mL 抗 CD34 抗体 (浓度为 2.0mg/mL) 的管中加入 0.5mL15% 的泊洛沙姆溶液,将溶液在室温小心地混合,在 29℃温育 1 到半个小时。

[0189] 然后,将溶液在 4℃温育 1 小时。在冷却过程中,当含有单克隆抗体的微球体形成时,透明的溶液变得模糊。然后用下面的方法确定蛋白掺入到微球体中的产率 :取出微球体悬浮液的一份等份试样,通过离心从溶液中分离出微球体,通过测量在 280nm 处的光密度吸收值确定上清液中的蛋白浓度。温育之后,将管子快速冷冻并冻干。在冻干之后,干粉中含有抗 CD34 单克隆抗体微球体和泊洛沙姆。

[0190] 通过在每个管中加入 1mL 含有 95% 二氯甲烷和 5% 丙酮的溶液、然后离心和除去上清液来除去泊洛沙姆。清洗步骤被重复 3 次。湿的沉淀物使用氮气干燥,剩余的溶剂使用真空除去。干粉在光学显微镜下检查,样品被送到 SEM。光学显微镜图 (图 7) 显示出球形颗粒的大小范围在 0.5-5 微米之间。抗 CD34 单克隆抗体微球体的扫描电子显微照片为如上述实施例 4 种所描述观察到的那样 (图 9)。

[0191] 对于按照本实施例制备的 5mg 抗 CD34 单克隆抗体微球体的干粉通过空气动力学飞行时间测定 (TSI Aerosizer) 来确定颗粒大小的分布。颗粒大小对数量的分布是狭窄的,平均的大小空气动力学直径为 1.3μm,95% 的颗粒小于 3.6μm(图 10)。

[0192] 实施例 7

[0193] 实施例 6 的抗 CD34 单克隆抗体微球体的构象稳定性也被监测。在实施例 6 描述的条件下,将 1.5mL 溶于 pH=6.0 的 40mM 乙酸铵缓冲液、浓度为 1.6mg/mL 的抗 CD34 抗体溶液与 1.5mL 溶于 40mM 乙酸铵缓冲液 (25℃下 pH=6.0) 的 15% 的泊洛沙姆溶液混合。加入 3μL10mM 的荧光染料 8- 苯胺基萘 -1- 磺酸 (ANS) 溶液,将溶液小心地混合,转移到荧光比色池中。

[0194] 抗 CD34 抗体的构象稳定性通过使用蛋白的色氨酸和酪氨酸残基的自身荧光和 ANS 染料的外来荧光来监测。在荧光比色池中形成的颗粒使用 250nm 激发的光的弹性散射在 500nm 的第二谐波来测定。本实施例使用配有 Peltier 恒温多池支架附件的 Cary Eclipse Biomelt 荧光分光光度计来进行。样品在 25℃温育 1 分钟,以每分钟 0.06℃的速度加热到 31℃,以每分钟 5℃的速度冷却到 2℃,然后在该温度下温育 1 小时。对照样品包括溶于 40mM 乙酸铵 (pH6.0) 的 10μM ANS、溶于 40mM 乙酸铵和 7.5% 泊洛沙姆 (pH6.0) 的 10μM ANS、以及含有 0.8mg/mL 抗 -CD34 单克隆抗体的溶于 40mM 乙酸铵 (pH6.0) 的 10μM

ANS

[0195] 图 12 显示了抗 CD34 单克隆抗体的构象稳定性的荧光监测结果。荧光数据支持了在微球体形成过程中，蛋白的构象保持完整。

[0196] 实施例 8

[0197] 按照本实施例，使用 Poloxamer 或 PEG/PVP 溶剂，通过加热制备了抗 CD34 单克隆抗体。抗 CD34 单克隆抗体由 Baxter Healthcare 公司 (Bioscience Division, Hayward, CA) 提供，溶解在含有 0.15M 氯化钠和 0.001% 吐温 80、pH=5.5 的 0.02M 磷酸钠缓冲液中，浓度为 2.3-2.5mg/mL。样品处理体积为 2.5mL 的脱盐柱从 Amersham Bioscience 公司 (Piscataway, NJ) 购买，用于将 5mL 抗 CD34 单克隆抗体对 pH6.3 的 40mM 乙酸铵缓冲液 (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) 进行透析。蛋白的浓度通过测量 280nm 下光密度的吸收值来确定。0.5mL 单克隆抗体溶液的等份试样被插入到 10 个 1mL 的微量离心管中，在每个含有 0.5mL 抗 CD34 抗体 (浓度为 2.1mg/mL) 的管中加入 0.3mL15% 的泊洛沙姆 188NF(Lutrol F68，由 BASF 公司提供，Florham Park, NJ) 等份试样，将溶液在室温小心地混合，在 70℃温育 1 到半个小时。

[0198] 70℃温育后，通过在冰水中温育将溶液快速冷却 (淬火) 到 23℃。在冷却过程中，当含有单克隆抗体的微球体形成时，透明的溶液变得浑浊。将悬浮液离心，除去上清液。通过用去离子水清洗除去过量的泊洛沙姆。光学显微镜图 (图 8) 显示了球形颗粒的大小在 0.5-5μm。

[0199] 实施例 9

[0200] 在本实施例中，描述了使用 PEG/PVP 作为溶剂制备抗 CD34 单克隆抗体微球体，以及在冷却过程中微球体的形成。抗 CD34 单克隆抗体由 Baxter Healthcare 公司 (Bioscience Division, Hayward, CA) 提供，溶解在含有 0.15M 氯化钠和 0.001% 吐温 80、pH=5.5 的 0.02M 磷酸钠缓冲液中，浓度为 2.3-2.5mg/mL。聚乙二醇 (PEG)3350Da 和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)40,000Da 以及乙酸钠都由 Spectrum Chemicals 公司 (Gardena, CA) 提供。

[0201] 制备溶于 100mM 乙酸钠缓冲液的 25% 的 PEG/PVP 溶液 (pH=5.6)，通过 0.22μm 的膜过滤。将 5mL 浓度为 2.2mg/mL 的单克隆抗体通过 0.22μm 的膜过滤，使用透析盒 "Slide-A-Lyzer"(截留分子量 10,000、样品体积为 3-12mL，由 Pierce 公司 (Rockford, IL) 提供) 进行透析。单克隆抗体使用 pH=6.0 的 40mM 乙酸铵缓冲液透析。然后，将 200μ125% 的 PEG/PVP 溶液 (w/v) 加入到 500μL 浓度为 2.0mg/mL 的抗 CD34 单克隆抗体中，将溶液在室温小心地混合，在 29℃温育 1 到半个小时。其余的步骤继续按照实施例 6 的描述进行，只是除去 PEG/PVP 时与泊洛沙姆相反，使用 95% 二氯甲烷 /5% 丙酮溶液清洗。

[0202] 实施例 10

[0203] 本实施例显示了按照实施例 6 制备的单克隆抗体微球体的 X- 射线粉末衍射 (XRPD)。使用装备了长的精细焦点 X- 射线管的 Shimadzu XRD-6000X- 射线粉末衍射仪，使用 Cu Kα 放射线 (SSCI, West Lafayette, IN)，获得了高分辨率的 X- 射线粉末衍射 (XRPD) 分析。

[0204] 射线管的电压和电流强度分别被设置为 40kV 和 40mA。发散和散射狭缝被设置为 1°，接收狭缝被设置为 0.15mm。或者，也可以将发散和散射狭缝被设置为 0.5°，接收狭缝设置为 0.15mm。使用 NaI 闪烁检测器检测衍射射线。使用从 1 到 20° 2θ 的每分钟

0.5°（每个0.02°的步骤4.8秒）的速度进行 θ-2θ 连续扫描。分析硅标准品以检查仪器的校准。使用 XRD-6000v.4.1 收集和分析数据。含有 80:20 的三十六烷：硅的低角度标准品被运行以证实在低角度时的仪器分辨率以获得确定好的“d”值。

[0205] 图 11 显示了抗 CD34 单克隆抗体微球体和 80:20 的三十六烷：硅混合物的 XRPD 图案。三十六烷：硅混合物的 XRPD 具有独特的峰显示了晶体状态，而抗体微球体的 XRPD 图案是连续的，没有特征峰，这是典型的无定形、非晶体状态。

[0206]

胰岛素微球体浓度 (mg/mL)	体积(mL)	可用注射器注射	可注射性
100	1	是	是
200	1	是	是
300	1	是	是
400	1	是	部分

[0207] 结果显示高浓度的这些蛋白微球体可以被吸出并成功注射到 10 磅重的肉中。

[0208] 实施例 11

[0209] 一般来说按照实施例 2 的方法将抗 CD34 抗体配制到本发明的微球体中。以表 I 中显示的浓度将微球体悬浮在 5%PEG3350 溶液中。一份体积的悬浮的微球体被吸入注射器，通过 25 号注射针头注入 4 磅重的商店购买的猪前腿中。每次注射进行 20 秒或以下，没有阻塞。表 I 中记录了本实施例中可注射性的结果，表明了将微球体悬浮液通过 25 号针头吸入注射器内并将注射器中的内含物完全注射到猪肉中的能力。

[0210] 表 I

[0211]

抗 CD34 抗体微球体的浓度 (mg/mL)	体积(mL)	可用注射器注射	可注射性
50	0.3	是	是
200	0.15	是	是

[0212] 表 I 中报道的结果显示出高浓度的这些蛋白微球体可以被吸入细的（25 号）针头，并成功地注射它们。这提示皮下环境中通过皮肤进入肌肉的可注射性。

[0213] 实施例 12

[0214] 按照本发明将含有重量百分比在 90% 以上的重组人胰岛素的胰岛素微球体配制到微球体中（参见实施例 13）。以表 1 中显示的浓度将该胰岛素微球体悬浮在 5%PEG3350 溶液中。将 1mL 悬浮的微球体吸入注射器，通过 28 号胰岛素针头注入到 10 磅重的商店购买的烟熏火腿中。每次注射进行 20 秒或以下，没有阻塞。表 1 中记录了可用注射器的能力、在本实施例中是将微球体悬浮液通过 28 号针头吸入注射器内的能力的结果，以及可注射性、在本实施例中是将注射器中的全部内含物完全注射到火腿中的能力的结果。

[0215] 表 1

[0216]

胰岛素微球体的浓度 (mg/mL)	体积(mL)	可用注射器注射	可注射性
200	1	是	是
300	1	是	是
350	1	是	是
400	1	是	部分

[0217] 表 1 中报道的结果显示出高浓度的这些蛋白微球体可以被吸入细的 (28 号) 针头，并成功地注射它们到 10 磅重的火腿片中。后一步为皮下环境中的可注射性提供了粗略的指示。300mg/ml 浓度的注射使用 5.8 牛顿的力量进行。

[0218] 实施例 13

[0219] 按照通用的方法制备胰岛素微粒或微球体。制备含有 16.67%PEG3350 的 pH5.65 的缓冲溶液 (0.033M 乙酸钠缓冲液)。在该溶液中边搅拌边加入锌晶体胰岛素的浓缩的悬浮液。终溶液中胰岛素的浓度为 0.83mg/mL。将溶液加热到大约 85℃到 90℃。胰岛素晶体在这个温度范围内在 5 分钟内能够完全溶解。当溶液的温度以被控制的速度降低到大约 60℃时，胰岛素小球颗粒开始形成。产率随着 PEG 浓度的增加而增加。这种方法产生的微粒或微球体具有不同的大小分布，平均为 1.4μm。

[0220] 在不使微球体溶解的条件下通过渗析清洗微球体，以将形成的胰岛素微粒或微球体与 PEG 分离。使用含有 Zn^{2+} 的水性溶液从悬浮液中洗出胰岛素微球体。Zn^{2+} 降低胰岛素的溶解度并防止降低产率和引起微球体聚集的溶解。

[0221] 实施例 14

[0222] 本发明也可用于制备 α-1- 抗胰蛋白酶 (AAT) 的小球颗粒，它特别适合于本发明的优选的可用注射器的递送途径。AAT 的分子量大约为 44kDa。本实施例报道了在加套柱上批量制备 AAT 小球颗粒 (10-300mg 规模)。

[0223] 在加套的烧杯中使用磁力搅拌棒将含有 16%PEG3350 和 0.02% 普卢诺尼克 F-68 的用 10mM 乙酸铵将 pH 缓冲到 6.0 的溶液进行混合，加热到 30℃。使用循环水浴控制烧杯的温度。边搅拌边在该溶液中加入重组 AAT(rAAT) 的浓溶液，将 pH 调整到 6.0。最终溶液中 rAAT 的浓度是 2mg/ml。rAAT 在该温度下和该溶液成分中可以完全溶解。容器中的全部内含物被转移到加套的柱中，加热到 25-30℃。柱子的循环水浴被设置为均匀下降到 -5℃。柱子和内含物以大约每分钟 1℃的速度冷却到大约 4℃。在冷却步骤中形成了 rAAT 小球颗粒。将微球体悬浮液冷冻在玻璃结晶皿中并冻干，以除去水和缓冲液。

[0224] 为了在冻干之后从蛋白小球颗粒中提取 PEG，用二氯甲烷清洗 PEG/ 蛋白饼状物。另一种使用的清洗介质是二氯甲烷：丙酮 (1:1) 或二氯甲烷：戊烷 (1:1)。清洗程序总共重复 3 次，每次使用 1 倍原始体积。最终的沉淀物被重新悬浮在小体积的丙酮或戊烷中，通过直接暴露到氮气中或通过旋转蒸发进行干燥。

[0225] 实施例 15

[0226] 在本实施例中，使用加套容器批量制备了 AAT 小球颗粒 (200-2000mg 规模)。这种类型的制备使用与加套柱制备同样的配方成分，只是能够容纳较大的体积并更适合于规模

化。在这样的规模下，配方成分在通常为 500-1000ml 的加套容器中使用 A 形的叶片式搅拌器以 75rpm 的速度混合，并加热到 30℃。使用循环水浴控制容器的温度。将溶液保留在同一容器中，将水浴源从 30℃水浴切换到 2℃水浴。容器和内含物以大约每分钟 1℃的速度冷却到 4℃。在冷却步骤中形成了 rAAT 小球颗粒。使用热电偶监测温度，当悬浮液达到 4℃时，将其保持在大约这个温度，并保持 30 分钟。在保持步骤之后，通过在大约 4℃渗滤除去大约 75% 的聚合物和体积以将小球颗粒悬浮液浓缩。在预冷的冻干盘中将留下的小球颗粒悬浮液冻成薄层，并冻干以除去水和剩余的缓冲液。

[0227] 通过用有机溶剂并离心（如实施例 14 中的描述）或通过超临界流体 (SCF) 抽提将蛋白小球颗粒与剩余的干燥聚合物分离开来。使用 SCF 抽提时，将干燥的物质转移到高压提取室中，该提取室用 CO_2 加压到 2500psi（室温）。一旦达到操作压力，以 70:30 的 CO_2:乙醇混合物的形式将乙醇引入入口液体流中。该超临界的液体将聚合物溶解，留下小球颗粒。在本过程结束时，将系统注满乙醇并缓慢减压。

[0228] 实施例 16

[0229] 按照实施例 14 和 15 中的描述制造小球颗粒，并测定该过程的产率。在冷却步骤完成后，取出悬浮液的小等份试样，通过 0.2μm 的注射器过滤器进行过滤以除去固体的小球颗粒。使用紫外分光光度计在 280nm 测定过滤液的吸收值，即残留在溶液中的 rAAT 的吸收值。然后从标准曲线计算 rAAT 的浓度。百分转化率如下计算：

[0230]

$$\frac{\text{起始}rAAT\text{浓度}-\text{滤液}rAAT\text{浓度}}{\text{起始}rAAT\text{浓度}}\times 100\% = \%\text{转化率}$$

[0231]

规模	小球颗粒的转化率 %
100-200mg(n=9,柱)	91.7±4.4
300mg(n=4,柱)	93.4±1.6
2g(n=5,容器)	90.4±1.8

[0232] 如上表所示，不论生产规模如何，高百分率的 AAT 蛋白被转化为小球颗粒。

[0233] 实施例 17

[0234] 本实施例显示了 AAT 颗粒在不同生产规模下颗粒大小分布的 Aerosizer 数据。在 TSI Aerosizer3225 中分析了最终 AAT 干粉小球颗粒的样品，该仪器通过测定飞行时间测量了颗粒大小。从这些测量数据计算出了不同的体积直径比率以说明 AAT 小球颗粒的颗粒大小分布，并被用来与使用本发明之外的其它方法制造的颗粒进行比较。

[0235]

规模	d90/d10（体积）	d80/d20（体积）	(d90-d10)/d50（体积）
5-10mg(n=12,柱)	1.88±0.20	1.49±0.10	0.67±0.14
100-200mg(n=5,柱)	1.83±0.05	1.41±0.05	0.66±0.05

300mg(n=3,柱)	2.05±0.17	1.61±0.11	0.77±0.06
1-2g(n=4,容器)	2.21±0.30	1.60±0.11	0.86±0.19

[0236] 称取 5-10mg 样品到胶囊中，使用 Cyclohaler 干粉吸入器以每分钟 60 升 (LPM) 的流速吸入 Andersen 阶式碰撞采样器中。从所有的碰撞或阶段收集小球颗粒，溶解在 pH8.0 的 0.2M Tris-HCl 缓冲液中，使用反相 HPLC 进行定量。按照美国药典 (USP) 中中的描述分析数据并计算几何标准偏差 (GSD)。数据证实了狭窄的大小分布。

[0237]

规模	GSD
100-200mg(n=5,柱)	1.74±0.22
300mg(n=3,柱)	1.77±0.40
2g(n=5,容器)	1.70±0.09

[0238] 上面显示的所有分布参数证实了本发明的制造方法产生了极好的颗粒大小分布。

[0239] 实施例 18

[0240] 本实施例说明了 AAT 生物活性的保留。为了确定比活力，将 rAAT 小球颗粒在室温下溶解在 pH8.0 的 0.2M Tris-HCl 中。获得的溶液使用一种测试方法进行分析，该方法测量 rAAT 对猪胰弹性蛋白酶 (PPE) 水解在 C- 端含有对硝基苯胺的合成肽的能力的抑制能力。然后使用二金鸡宁酸 (BCA) 分析方法测定同样的 rAAT 小球颗粒溶液的蛋白浓度。在两种分析中也同时分析对照的 rAAT 起始物质溶液。因为活性分析方法的设计是在每个样品 1mg/ml 蛋白的浓度的基础上测定活性，因此根据 BCA 测定的实际蛋白浓度对活性值进行校正，得出比活力值：

[0241]

$$\frac{\text{样品的活力值}}{\text{实际的蛋白浓度}} = \text{样品的比活力}$$

[0242] 猪胰弹性蛋白酶被 rAAT 的抑制

[0243]

规模	IU/mg 小球颗粒	IU/mg 对照
100-300mg(n=12,柱)	64.19±5.01	64.34±4.95
200-300mg(n=8,容器)	62.53±5.29	65.87±0.98

[0244] 因此，比活力证实了在将 AAT 制造成小球颗粒后生物活性的保留。

[0245] 实施例 19

[0246] 本实施例描述了使用 PEG 或泊洛沙姆作为溶剂制备人源化单克隆抗体微球体以及在冷却条件下微球体的形成。将 1mL 溶解在 pH5.9 的 40mM 乙酸铵缓冲液中的浓度为 4mg/mL 的人源化单克隆抗体（抗 CD25 单克隆抗体）与 1mL 从 Spectrum Chemicals 公司

(Gardena,CA) 获得的 PEG3350Da 的 30%(w/v) 的水溶液混合。或者,溶液也可以与 1mL 从 BASF 公司 (Florham Park,N.J.) 获得的泊洛沙姆 188NF(Lutrol F68) 的 30%(w/v) 的水溶液混合。混合物在水浴中于 35℃温育 10 分钟,然后以大约每分钟 0.7℃的速度冷却到 2℃。

[0247] 然后将样品在光学显微镜下以 10 倍和 100 倍的放大倍数进行观察,结果表明使用两种聚合物都有球形颗粒的形成。大多数微球体表现出直径为大约 2 微米,但是有些更小些。几乎没有微球体的直径大于 5 微米。

[0248] 实施例 20

[0249] 本实施例说明了 AAT 结构完整性的保留。可控相分离 (CPS) 技术的一个主要区别点是在颗粒形成过程中使用水性系统的温和条件下颗粒的形成,以及避免其它诱导应力的条件例如增加的温度、剪切力等。在颗粒工程领域,主要关心的是蛋白在制造中的稳定性和储存稳定性。据信,主要的降解途径例如氧化、脱氨、以及特别是蛋白的聚集是蛋白组合物副作用包括免疫原性的主要原因。因此出于调控的考虑,在最终的颗粒组合物中要求极低水平的降解产物。HPLC、物理化学性质例如 CD 和 DSC 被用于确定在形成过程中是否发生了蛋白修饰。

[0250] 圆二色性 (CD) 是最常用的方法,用于评估受到扰动的蛋白中的结构变化,或者将工程蛋白与父本蛋白的结构进行比较。CD 方法可以评估蛋白折叠以及蛋白的二级和三级结构。

[0251] 二级结构可以通过在“远紫外”光谱区 (190-250nm) 的 CD 光谱学来测定。在这些波长下,发色团是位于规则的折叠的环境中的肽键。α-螺旋、β-片层和随机卷曲每种都产生特征形状和强度的 CD 光谱。在任何蛋白中存在的每种二级结构类型的大约比例因此可以通过分析其远紫外 CD 光谱来确定,该远紫外 CD 光谱作为每种结构类型的这种对照光谱的分数倍数的总和被分析。

[0252] 蛋白在“近紫外”光谱区 (250-350nm) 的 CD 光谱可能对三级结构的某些特点敏感。在这些波长下发色团是芳香族氨基酸和二硫键,它们产生的 CD 信号对蛋白的总三级结构敏感。在 250-270nm 区域的信号可归因于苯丙氨酸残基,从 270-290nm 的信号可归因于酪氨酸,而从 280-300nm 的信号可归因于色氨酸。二硫键在整个近紫外光谱区产生广泛的微弱信号。

[0253] rAAT 储存溶液和从磷酸缓冲液中的小球颗粒 (pH7.4,温度为 25℃,蛋白浓度 0.05mg/mL) 释放出的 AAT 的远紫外 CD 光谱被显示在图 13 中。每个光谱代表平均 10 次扫描。

[0254] 远紫外 CD 光谱是不能区分的,证明了将 AAT 制造到小球颗粒中并随后释放后,产生的 AAT 分子的结构与起始的 AAT 材料的结构一致。

[0255] 将小球颗粒溶解在 pH8.0 的 0.2M Tris-HCl 中,通过反相 HPLC 进行分析。与起始 rAAT 蛋白的对照溶液相比,在色谱图的外观中没有明显的区别。

[0256] HPLC 系统 :

[0257] HPLC 柱——Pheomenex Jupiter,5 微米,C4,300A,250×4.6mm

[0258] Waters Alliance2965 泵 / 自动进样器

[0259] 波长——280nm

[0260] 进样体积——75μl

[0261] 浓度梯度：

[0262] 流动相 1：0.1% 的 TFA 水溶液

[0263] 流动相 2：0.085% 的 TFA 溶解在 90%(c/v) 的乙腈水溶液中

[0264] 运行时间——60 分钟

[0265] 流速——1.0ml/min

[0266] DSC 图被生成。参见图 15-25b。

[0267] 实施例 21

[0268] 本实施例报告了 AAT 小球颗粒相对于 AAT 起始材料的储存稳定性。在室温和 4℃下储存 1 周、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月和 12 个月后，（使用实施例 18 中描述的分析方法）分析了小球颗粒的生物活性的保留（图 17b 和 17c）。大块物料是已经透析然后冻干的 rAAT 起始溶液。对于每个时间点和储存条件，取双份样品，每个被分析两次。

[0269] 实施例 22

[0270] 制备了 DNA 酶小球颗粒。DNA 酶的分子量为大约 38kDa。配方例子：溶液中包含 0.18mg/ml DNA 酶（来自 1mg/ml 的储液）、18.2%PEG3350（来自 25% 的储液）、9mM pH5.15 的乙酸铵（来自 1M 的储液）。将该悬浮液在 -80℃冰箱中冷却，冷冻后，在多功能冻干机中冻干，然后用二氯甲烷 / 丙酮通过离心进行清洗。

[0271] 最初尝试的浓度是 0.1mg/ml DNA 酶和 20%PEG3350。但是在尝试从 37℃冷却到 0℃，没有获得沉淀后，另外加入 DNA 酶直到达到上述的浓度。将该悬浮液在 -80℃冰箱中冷却，冷冻后，在多功能冻干机中冻干，然后用二氯甲烷 / 丙酮通过离心进行清洗。最初尝试的浓度是 0.1mg/ml DNA 酶和 20%PEG3350。但是在尝试从 37℃冷却到 0℃，没有获得沉淀后，另外加入 DNA 酶直到达到上述的浓度。将该悬浮液在 -80℃冰箱中冷却，冷冻后，在多功能冻干机中冻干。然后用二氯甲烷 / 丙酮通过离心进行清洗。（图 38、39）。

[0272] 活性（使用从 Sigma 购买的 DNA- 甲基绿测试 DNase-I）起始材料的理论活性被列为 775Ku/mg 蛋白。储存液被测定为 0.145mg/ml 蛋白。该浓度被稀释到 5ml，终浓度为 0.0199mg/ml。活性应该是 775Ku/mg×0.0199mg/ml=15.46Ku/ml。

[0273]

$$Kunitz\text{单位}/ml\text{溶液}=\frac{\text{未知的每分钟}\Delta A_{640}\times 40\times\text{稀释倍数}}{\text{已知的每分钟}\Delta A_{640}}$$

[0274] Ku/ml = -0.0004×40×1/-0.0011 = 14.55Ku/ml

[0275] 与理论值相比：小球颗粒 / 理论 ×100%= 活性 %：

[0276] 14.55Ku/ml/15.46Ku/ml×100% = 94.1%

[0277] 实施例 23

[0278] 制备了超氧化物歧化酶（分子量大约为 32kDa）小球颗粒。溶液含 0.68mg/ml SOD（来自 5mg/ml 的储液）、24.15%PEG3350（来自 31.25% 的储液）、9.1mM 乙酸铵（来自 1M 的储液），最终 pH=4.99，用氢氧化铵和乙酸调整。将溶液在 50 分钟时间中从 40℃冷却到 0℃（大约 0.8℃ / 分钟），沉淀在大约 25℃开始形成。悬浮液在液氮中快速冷冻，在多功能冻干机中冻干，然后用二氯甲烷 / 丙酮通过离心进行清洗（图 40、41）。

[0279] 在 50 分钟时间中从 40℃冷却到 0℃（大约 0.8℃ / 分钟），沉淀在大约 25℃开始形成。在液氮中快速冷冻，在多功能冻干机中冻干。用二氯甲烷 / 丙酮通过离心进行清洗。

形成了小球颗粒，大部分的丙酮被保留。

[0280] 实施例 24

[0281] 使用非聚合物相分离增强试剂制备了枯草菌溶素（分子量大约为 35,230 道尔顿）小球颗粒。起始体系的连续相可以含有非聚合物的相分离增强试剂，以在冷却过程中诱导蛋白的相分离。枯草菌溶素小球颗粒可以按照本发明使用丙二醇和乙醇的混合物而不使用任何聚合物来形成。在该体系中，丙二醇用做凝固点降低试剂，乙醇用做相分离增强试剂。丙二醇也帮助小球颗粒球形形状的形成。

[0282] 制备了溶解在 35% 丙二醇—10% 甲酸—0.02%$CaCl_2$ 中的枯草菌溶素溶液。然后将 35% 丙二醇—枯草菌溶素溶液边混合边加入到 67% 乙醇中。溶液在室温保持透明。但是，当冷却到 -20℃下 1 小时后，颗粒的悬浮液形成了。在离心收集颗粒并用 90% 乙醇清洗后，使用无水乙醇作为悬浮液体进行了 Coulter 颗粒大小分析。颗粒产生的 Coulter 结果与平均直径为 2.2 微米的分离的颗粒产生的结果一致，95% 的颗粒在 0.46 和 3.94 微米之间。光学显微镜评估证实了这些结果显示了基本上球形的颗粒。颗粒的 SEM 分析证实了 Coulter 结果。

[0283] 溶液中的枯草菌溶素转化为枯草菌溶素小球颗粒后枯草菌溶素酶活性的保留通过比色分析方法被证实。通过从冷却前乙醇—枯草菌溶素—丙二醇溶液中测定到的枯草菌溶素的总活力中减去（在分离了枯草菌溶素颗粒后的）上清液中测到的总活力，可以计算出小球颗粒的理论总活力单位。将枯草菌溶素小球颗粒中发现的实际总单位除以理论的单位并以百分数表示，就代表了颗粒形成后枯草菌溶素活性的保留。通过这种计算，在枯草菌溶素小球颗粒形成后保留了 107% 的理论枯草菌溶素活力。

[0284] 应该理解的是，本文公开的实施方案仅仅是本发明的示例，可以以多种形式实施。因此，本文公开的具体的详细描述不应被解释为限制性的，而仅仅是作为权利要求的基础，以及教导本领域的专业技术人员以事实上任何适当的方式广泛地利用本发明的代表性基础。已经描述过的本发明的实施方案示例性地说明了本发明的原理的一些应用，它们可以被修改，包括那些在本文中单独公开或要求权利的特点的组合。

按照实施例1中的描述制备的抗因子VIII单克隆抗体微球体的光学显微镜图
(VBL-0224-MAB-2, VBL-0224-MAB9)

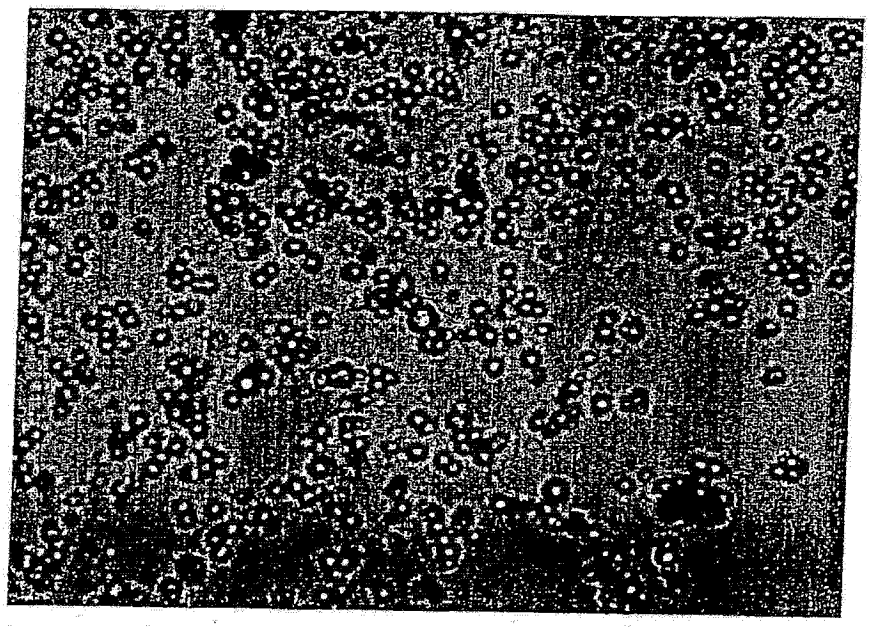


图 1a

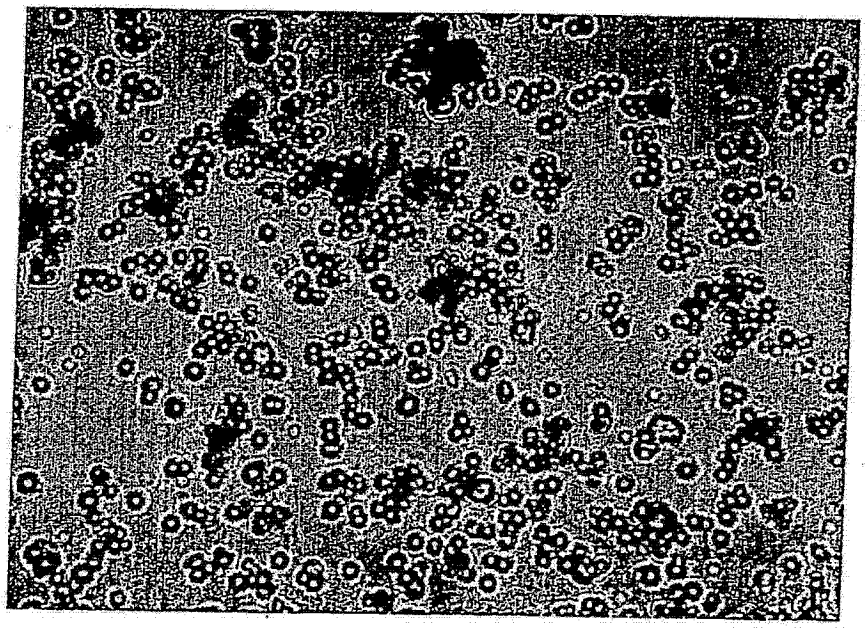


图 1b

按照实施例1中的描述制备的抗因子VIII单克隆抗体微球体的光学显微镜图

(VBL-0224-MAB-2，VBL-0224-MAB9)

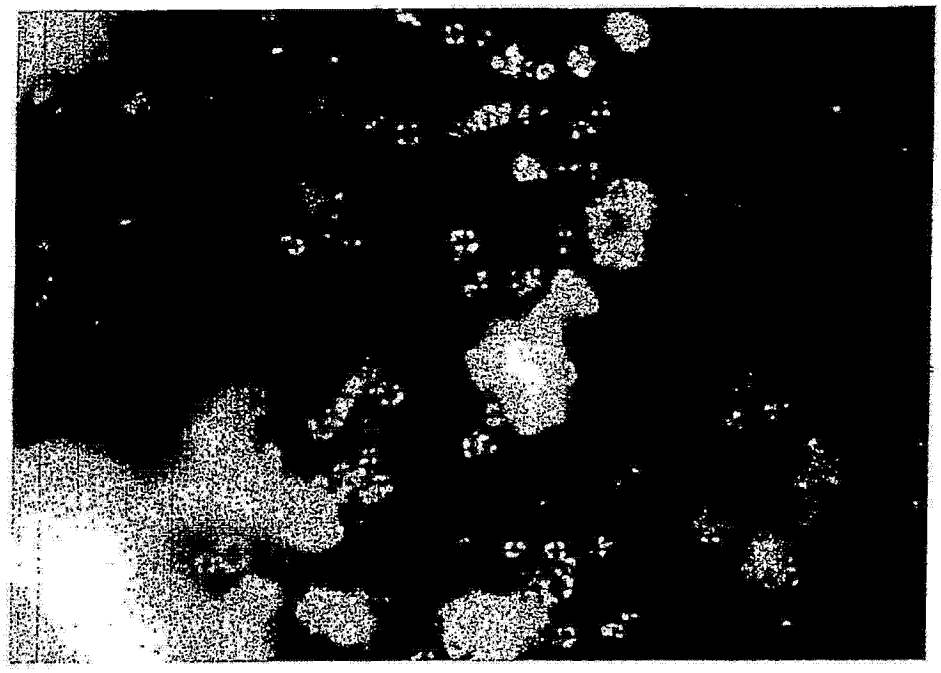


图 2a

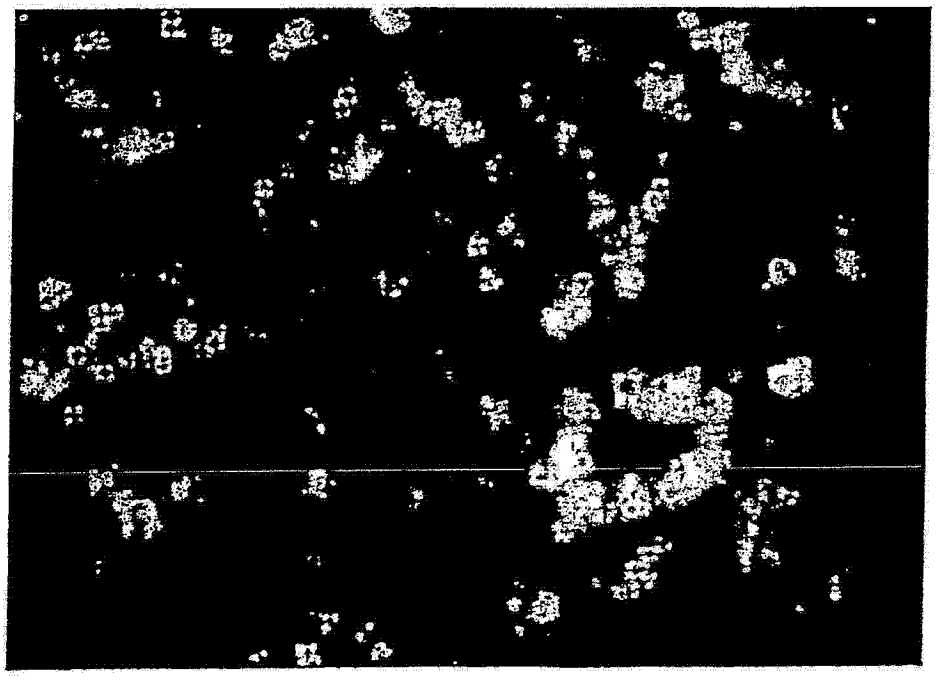


图 2b

按照实施例2中的描述观察到的抗因子VIII单克隆抗体微球体的扫描电子显微图

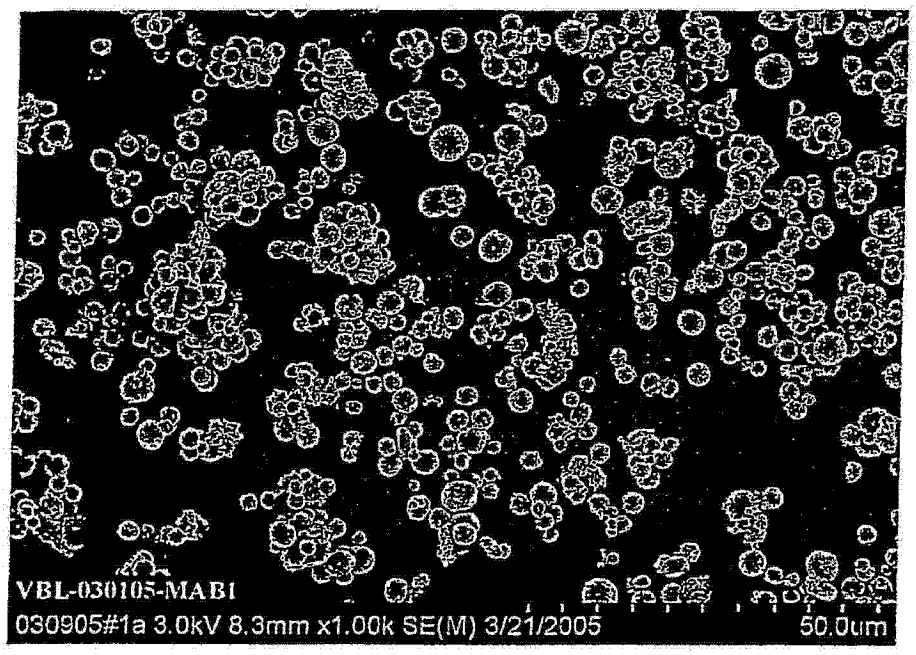


图 3a

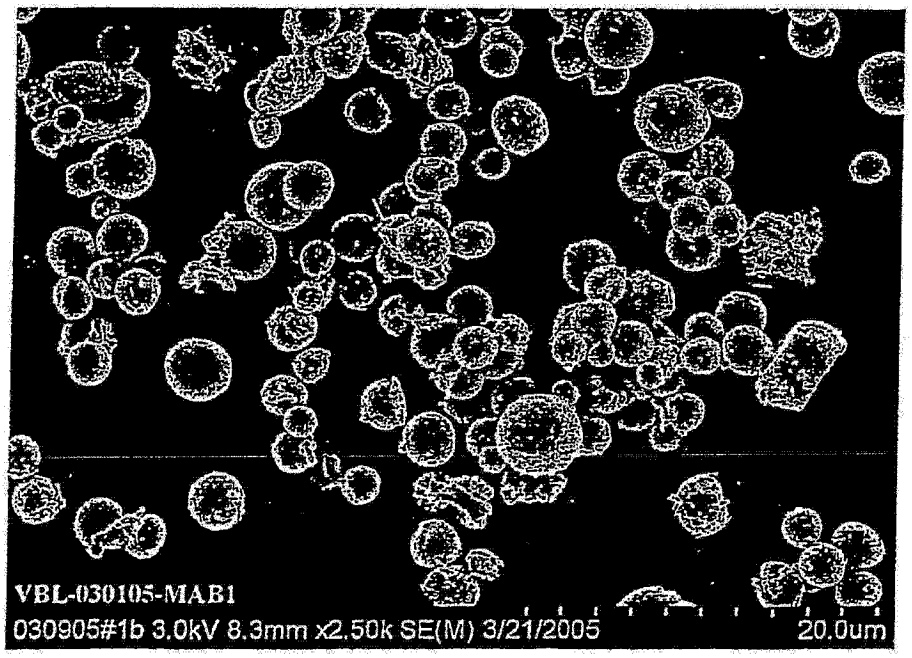


图 3b

实施例3中的描述的抗因子VIII单克隆抗体
（起始材料和溶解的微球体）的凝胶电泳图

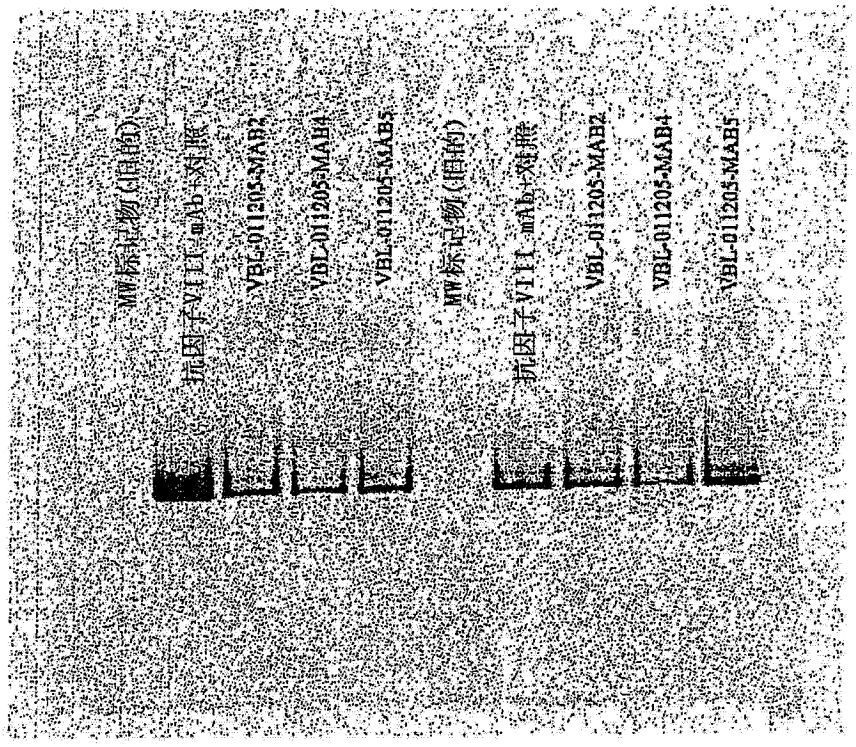


图 4a

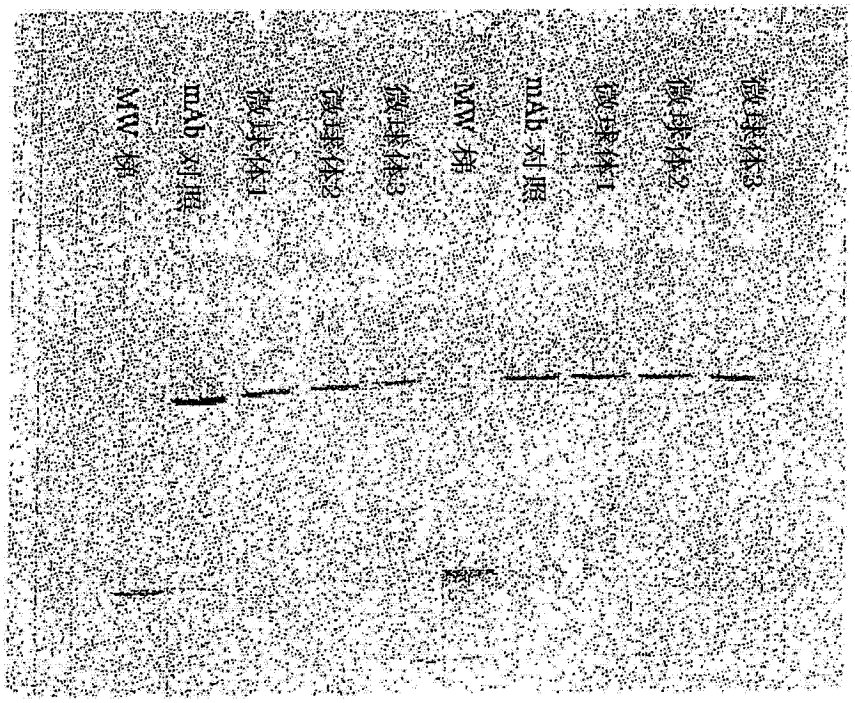


图 4b

按照实施例5中的描述观察到的抗因子VIII单克隆抗体微球体的扫描电子显微图

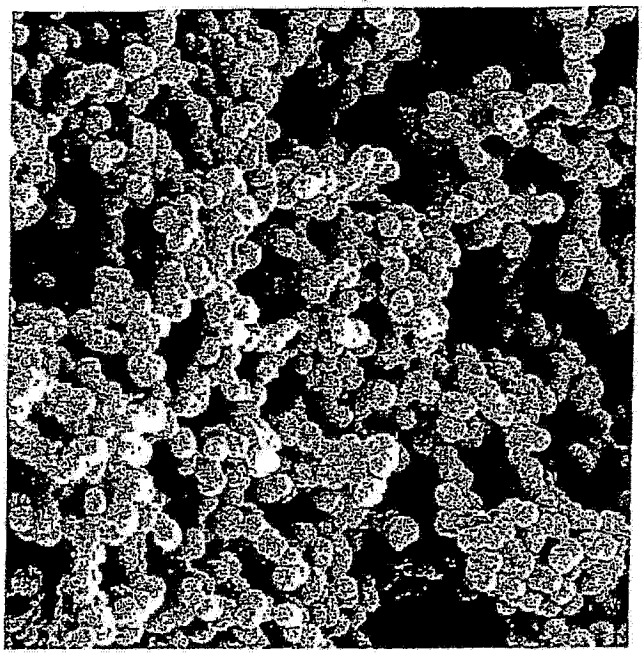


图 5

实施例6中的描述的抗因子VIII单克隆抗体微球体的颗粒大小对数量、表面积和体积分布的分布情况

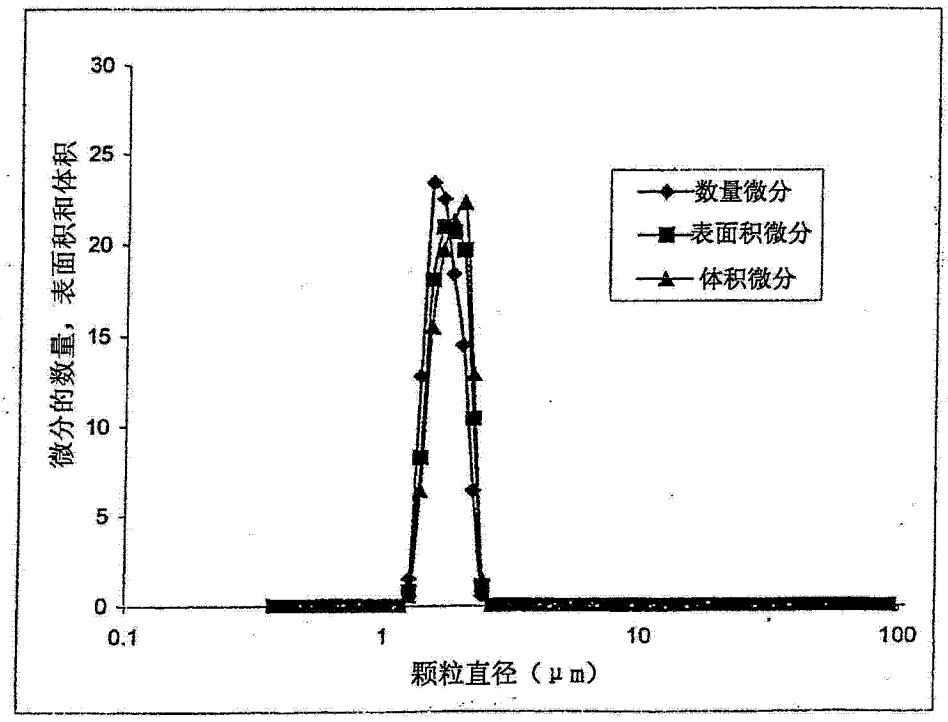


图 6

按照实施例7中的描述制备的抗CD34单克隆抗体微球体的光学显微镜图

（VBL-0307-MAB1，VBL-0307-MAB2）

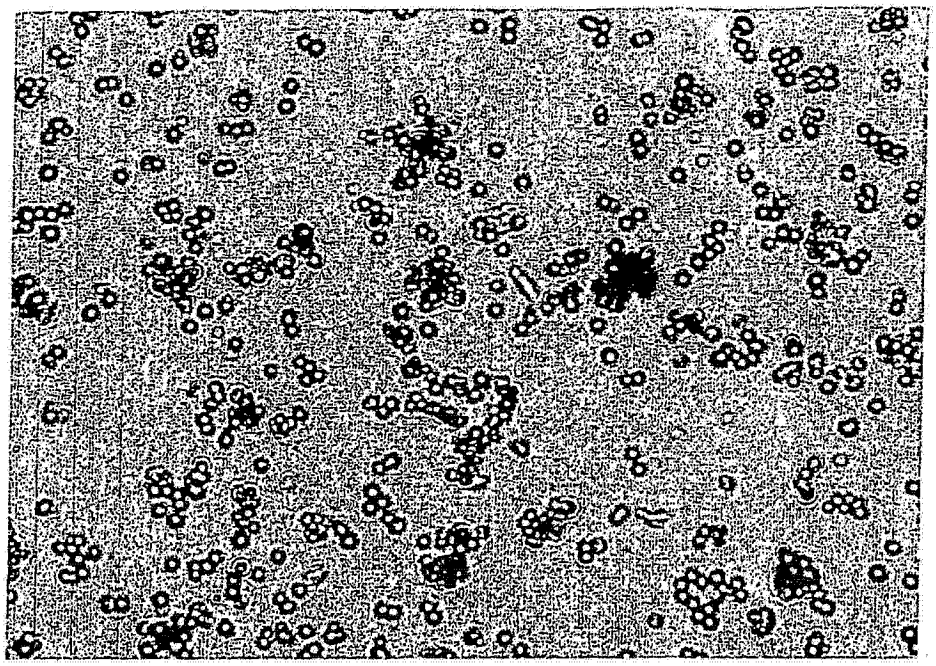


图 7a

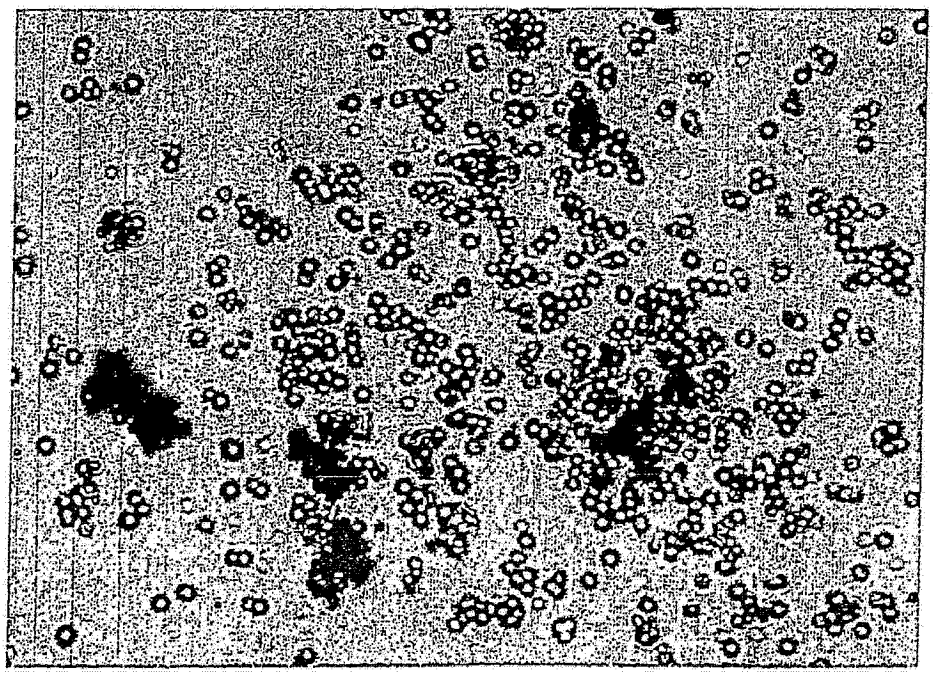


图 7b

按照实施例8中的描述制备的抗CD34单克隆抗体微球体的光学显微镜图

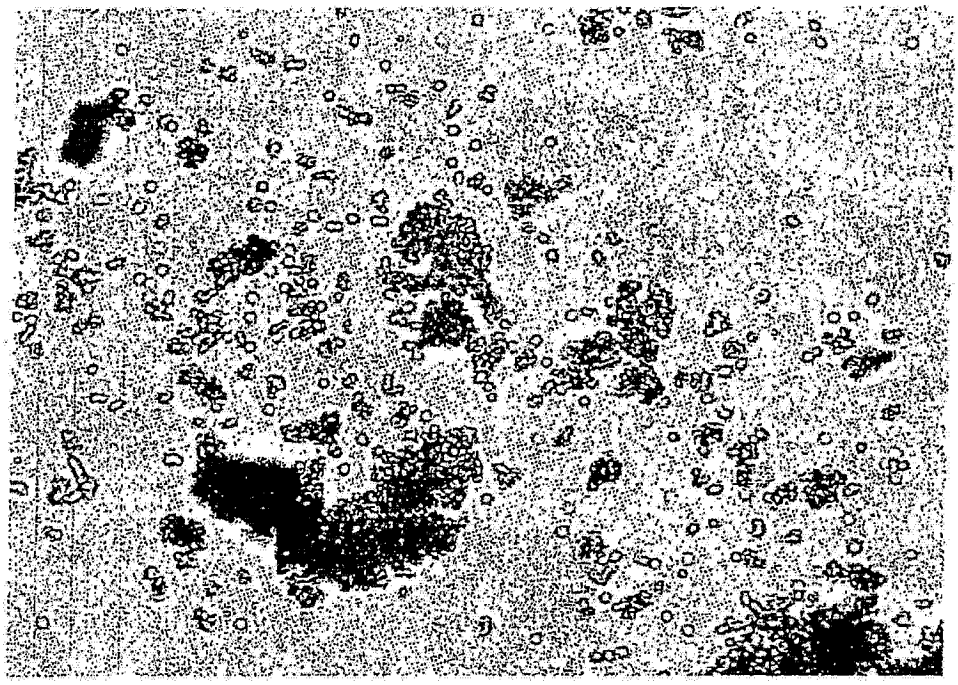


图 8

按照实施例7中的描述制备的抗CD34单克隆抗体微球体的扫描电子显微图

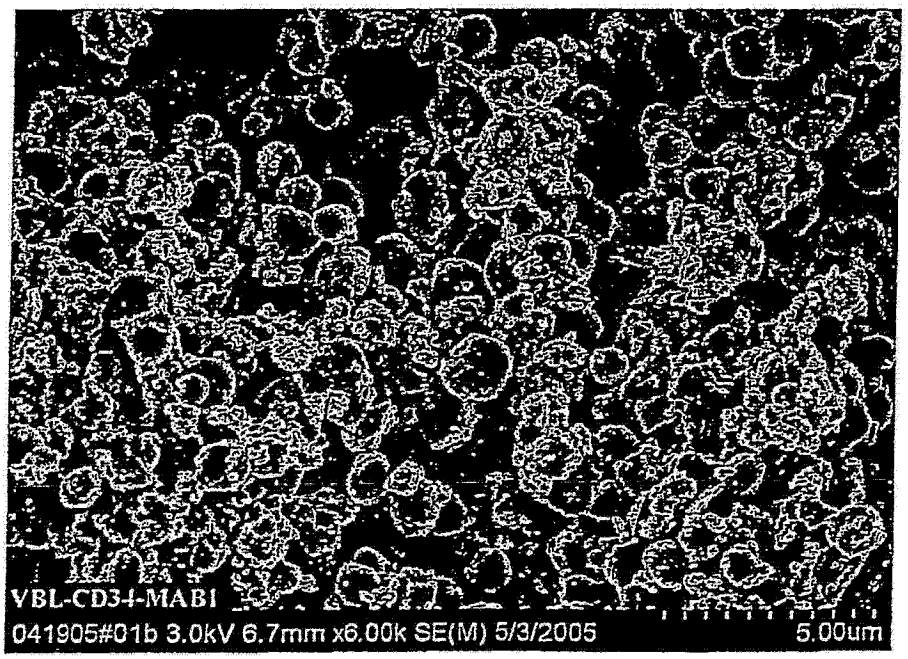


图 9

按照实施例7中的描述制备的抗CD34单克隆抗体微球体的空气动力学颗粒大小对数量分布的分布情况

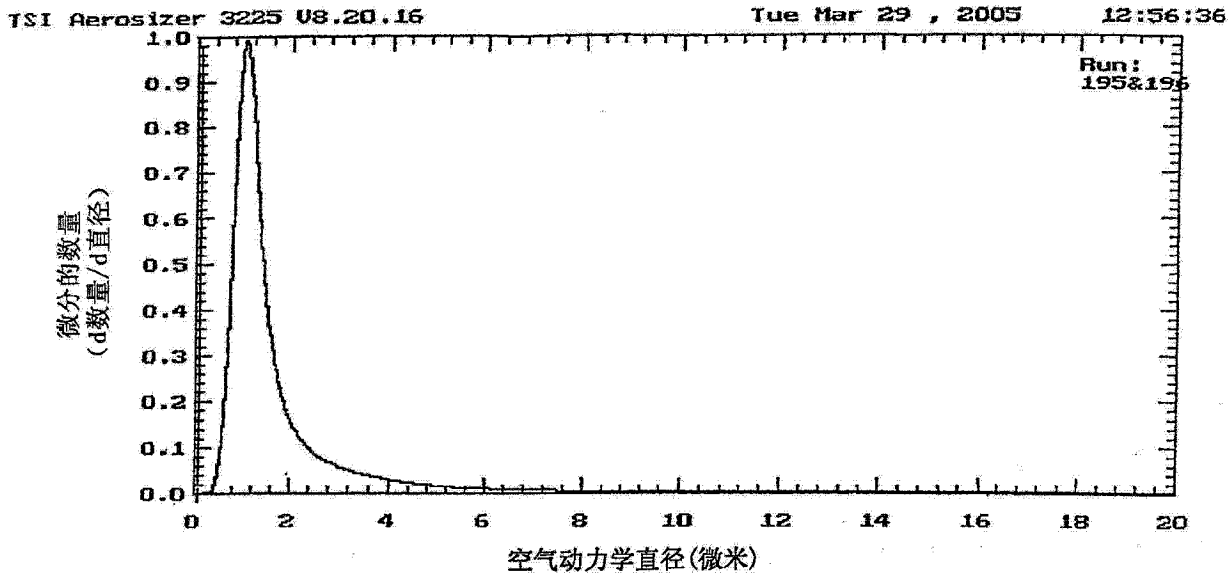


图 10

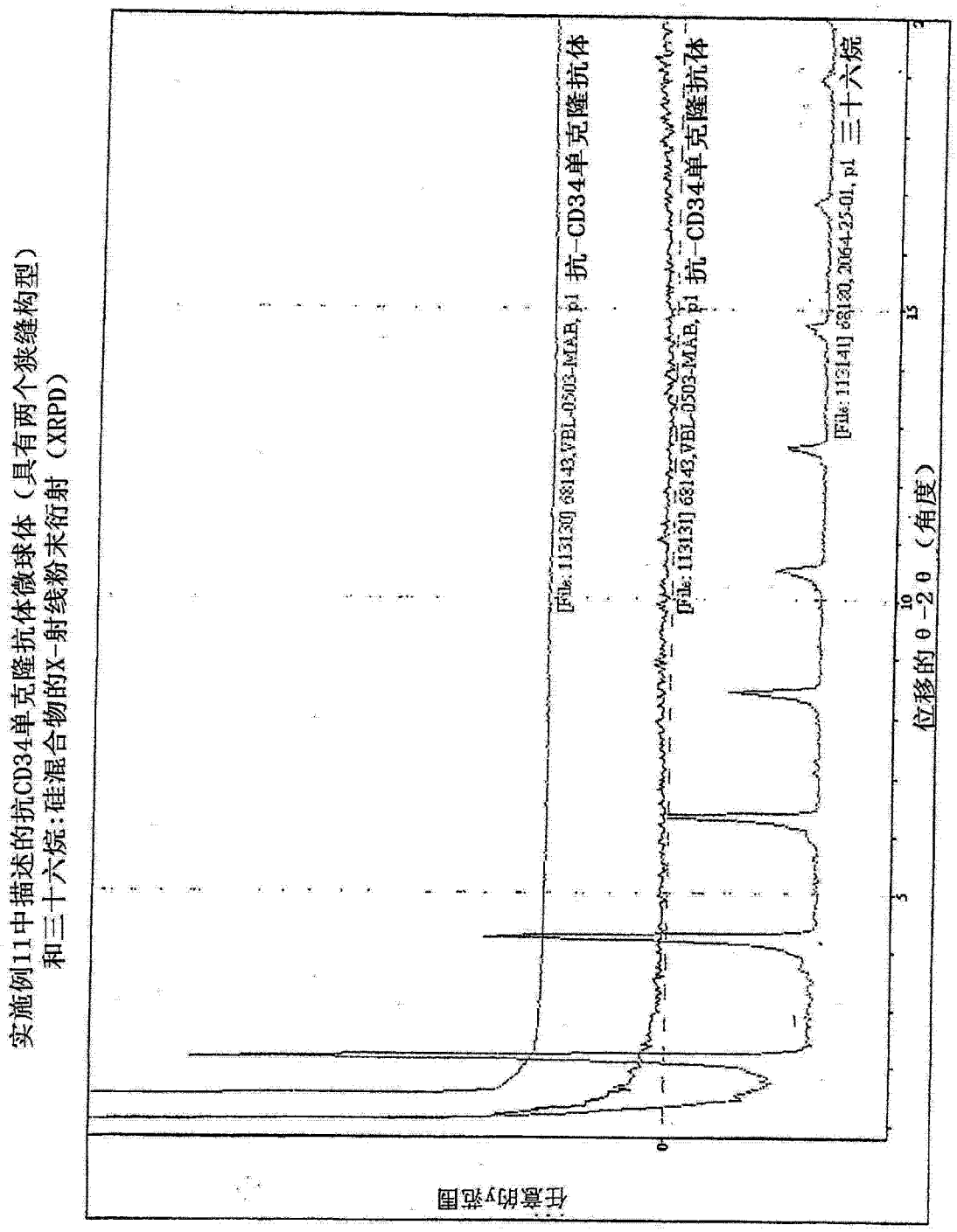

实施例11中描述的抗CD34单克隆抗体微球体（具有两个狭缝构型）
和三十六烷：硅混合物的X-射线粉末衍射（XRPD）
任意的y范围
[File: 113130] 68143,VBL-0503-MAB, p1 抗-CD34单克隆抗体
[File: 113131] 68143,VBL-0503-MAB, p1 抗-CD34单克隆抗体
[File: 113141] 68130, 2064-25-01, p1 三十六烷
0
5
10
15
位移的 θ-2 θ（角度）

图 11

实施例12中描述的抗CD34单克隆抗体微球体在用泊洛沙姆冷却过程中构象稳定性的荧光监测情况

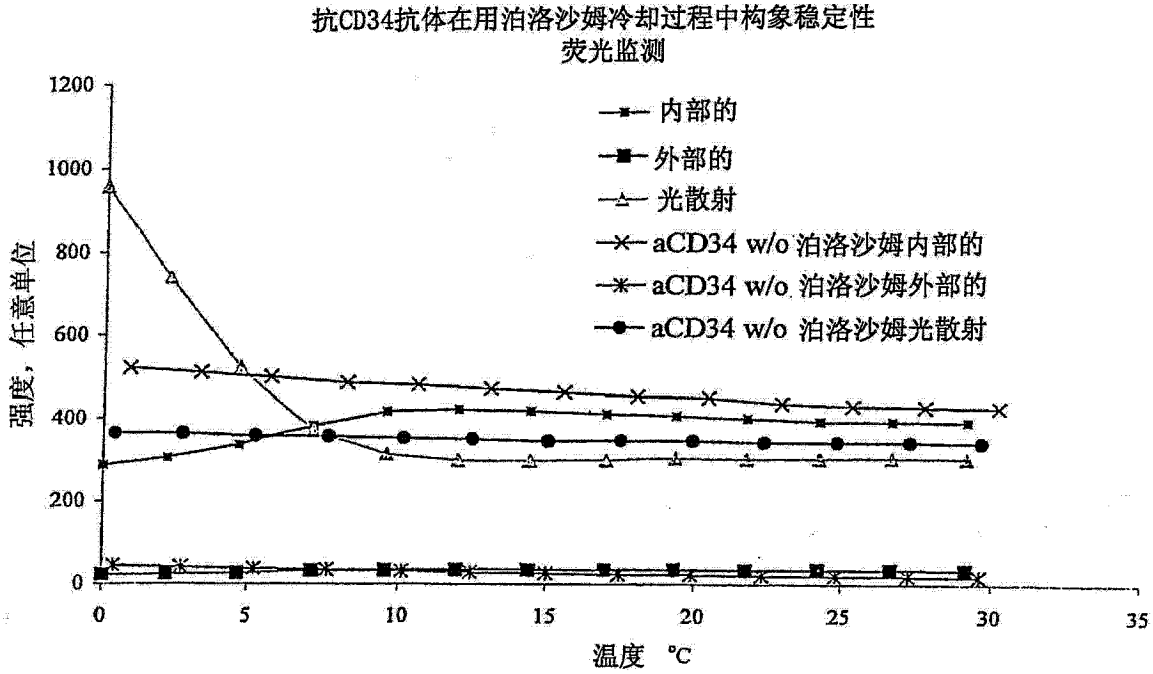


图 12

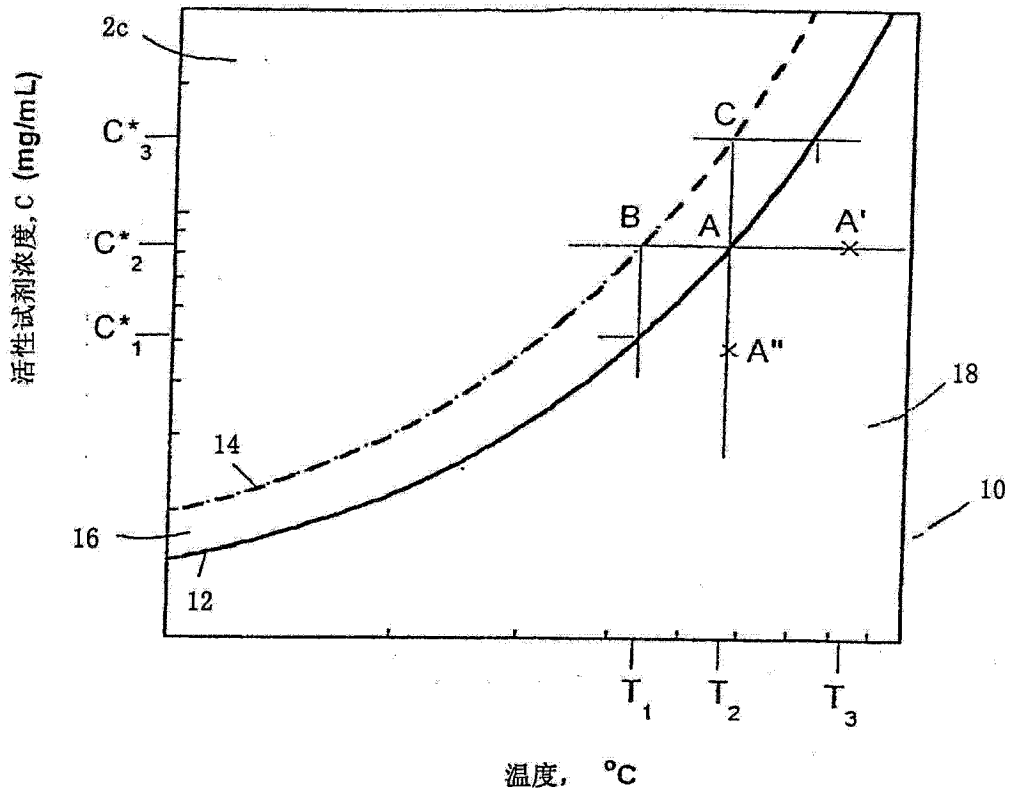
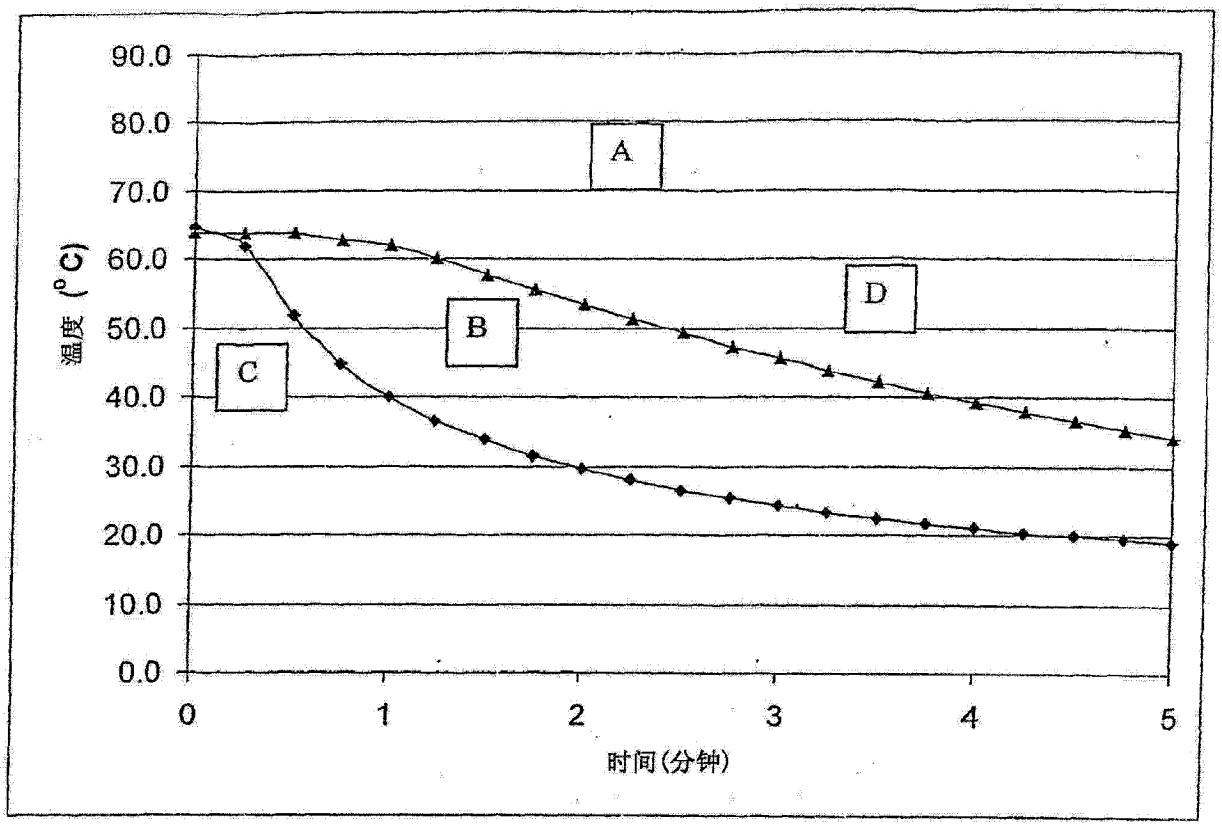


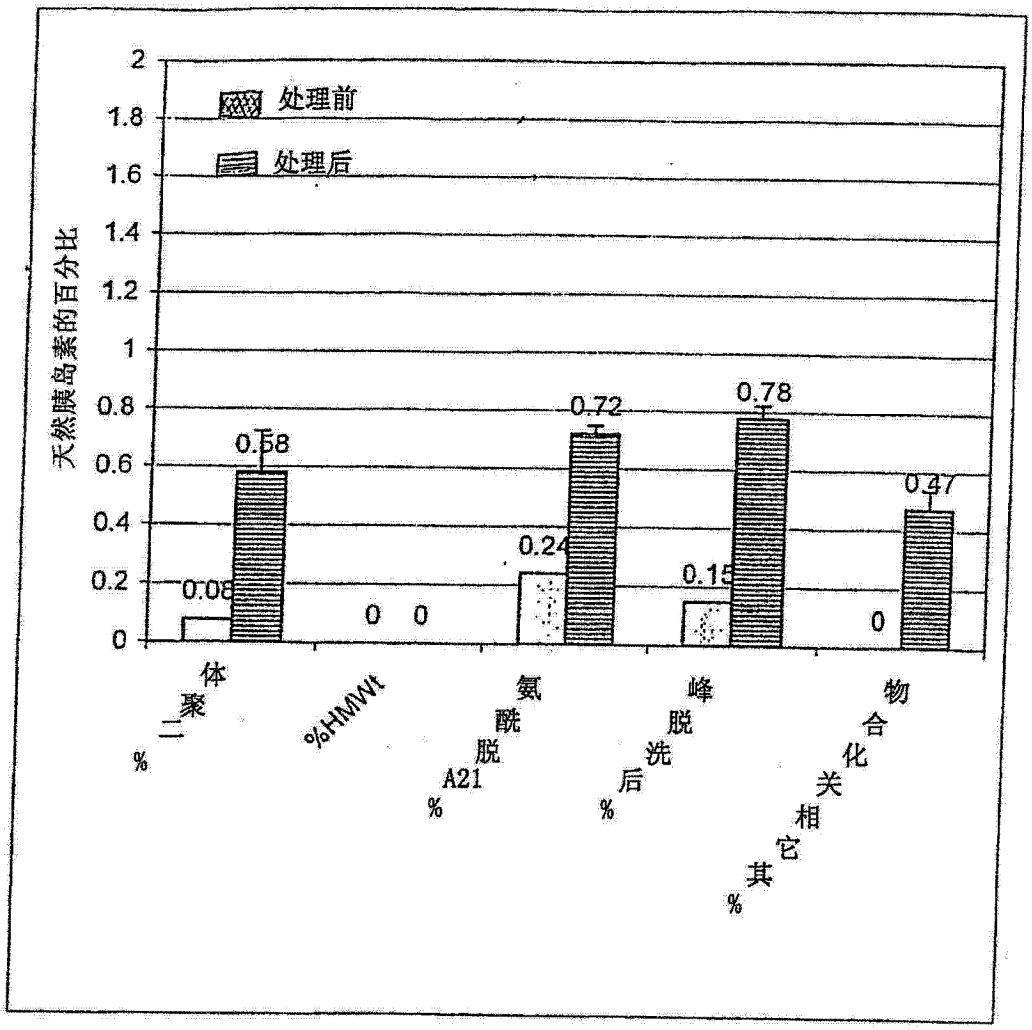
图 13



在缓冲的聚合物溶液中溶液温度和冷却速率对胰岛素相转变的影响。

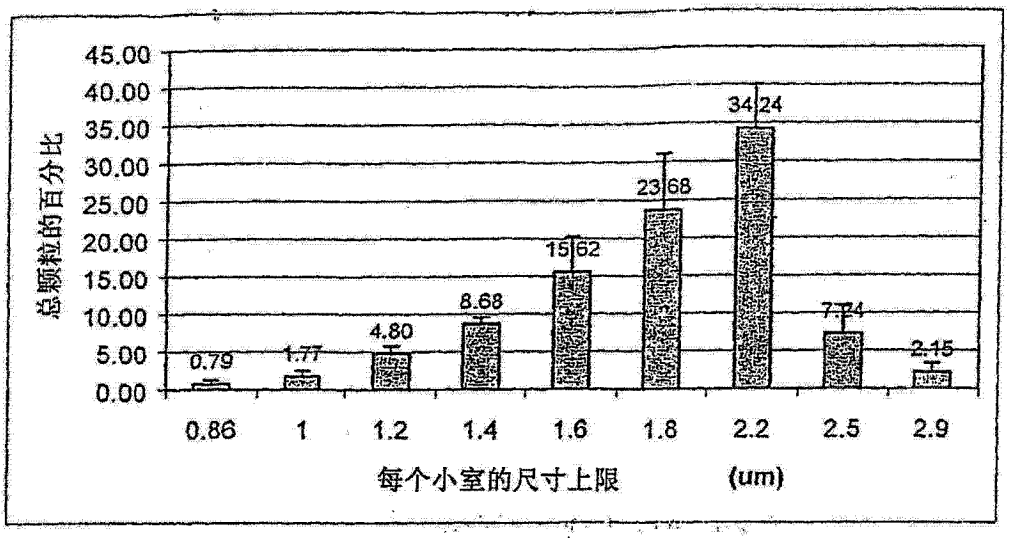
在温度高于60oC时，胰岛素保留在溶液中（A区域）。B区域代表了最适的小球颗粒形成区域，由在热交换器中观察到的最高（◆）和最低（▲）温度变化速率所包围。更快的冷却速率（C区域）导致非常细的非球形颗粒的形成，而更慢的冷却速率（D区域）导致形成不同大小的小球颗粒，以及不规则形状的微粒和絮状的沉淀的混合物

图 14



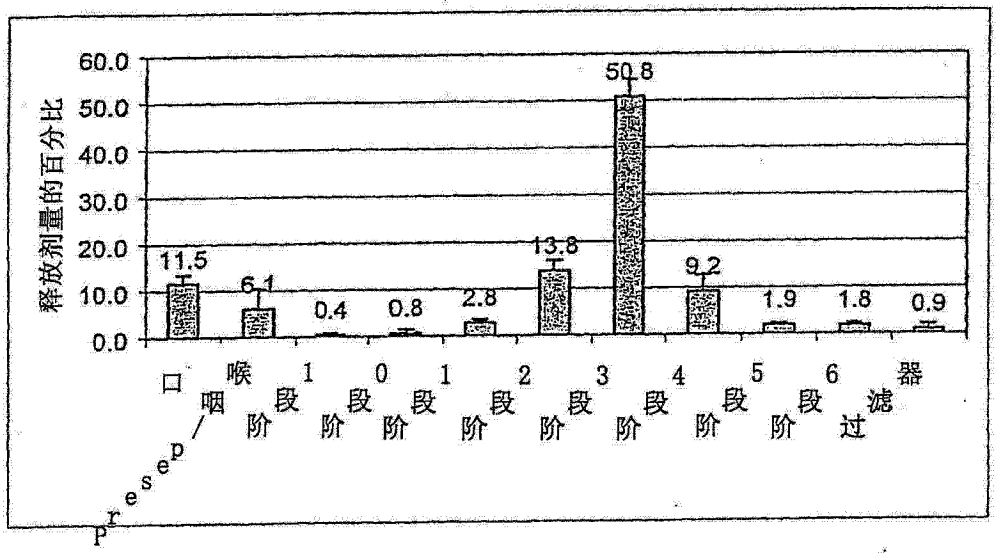
胰岛素微球体制造过程中的化学稳定性。HPLC分析表明与过程相关的高分子量化合物没有增加，并且二聚体、A21脱酰氨胰岛素、后洗脱峰和其它化合物的增加百分率（与起始的胰岛素原材料相比）在USP的限制范围内

图 15



胰岛素小球颗粒的大小分布（Aerosizer时间-飞行数据）。所有生产的6批中，多于96%的颗粒的大小在0.86和2.9微米之间，多于60%的颗粒大小在1.6和2.5微米之间。少于1.1%的小球颗粒位于本图覆盖的大小范围之外

图 16a



使用Anderson阶式碰撞采样器测定的小球颗粒的大小分布。数据是从Cyclohaler装置以60LPM投送的6批胰岛素小球颗粒的结果获得的平均值（平均值+/-SD）。1、2、3和4阶段的ECD分别为4.4、3.3、2.0和1.1微米

图 16b

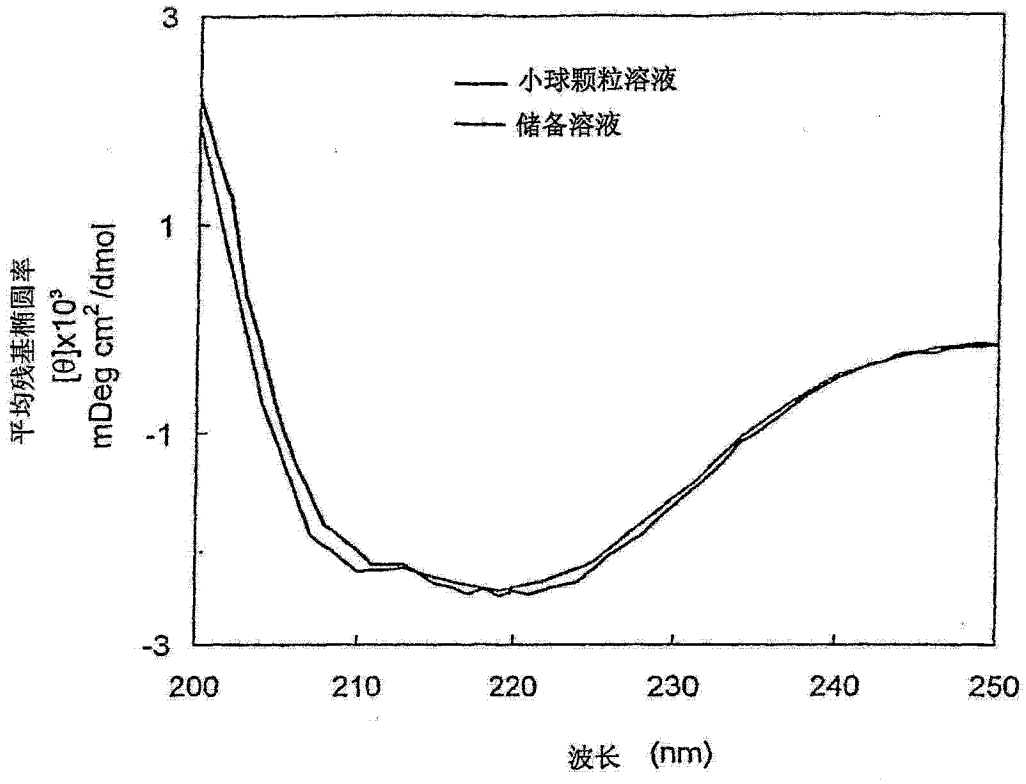

3
1
-1
-3
200
210
220
230
240
250
小球颗粒溶液
储备溶液
平均残基椭圆率
[θ]x10³
mDeg cm²/dmol
波长 (nm)

图 17a

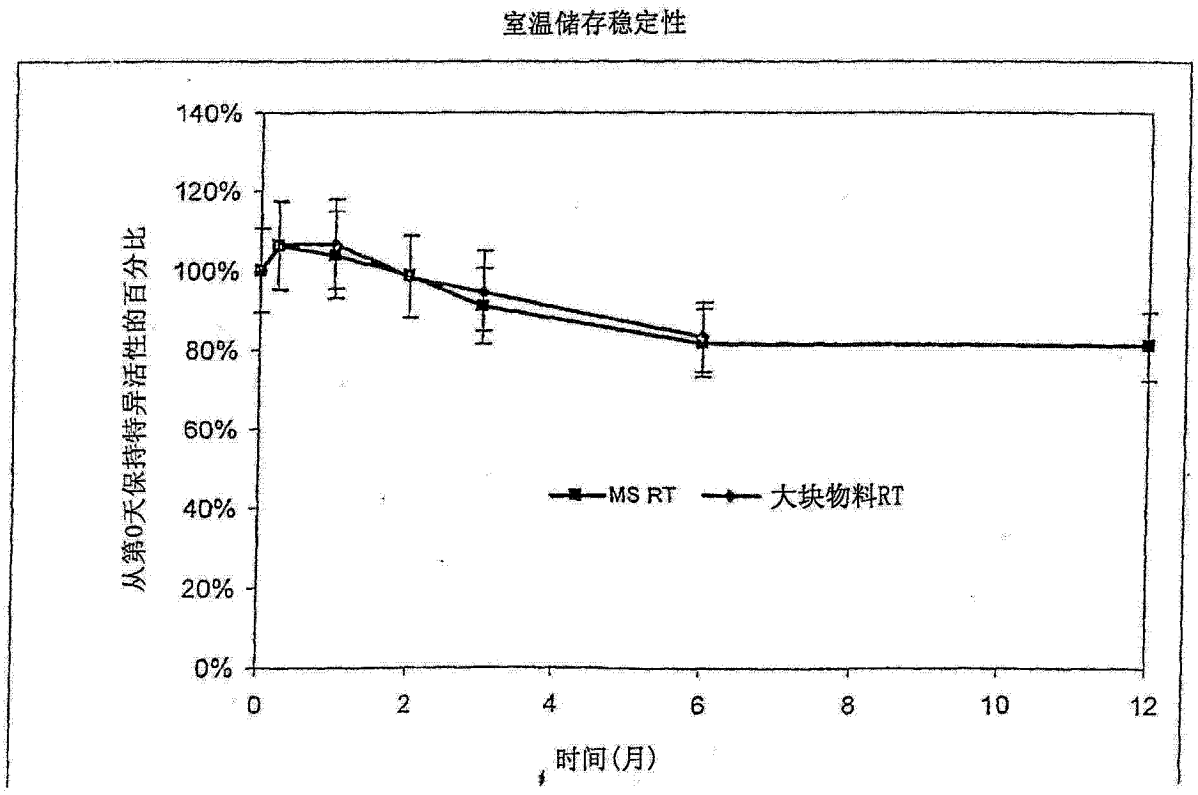

室温储存稳定性
从第0天保持特异活性的百分比
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
2
4
6
8
10
12
时间(月)
MS RT
大块物料RT

图 17b

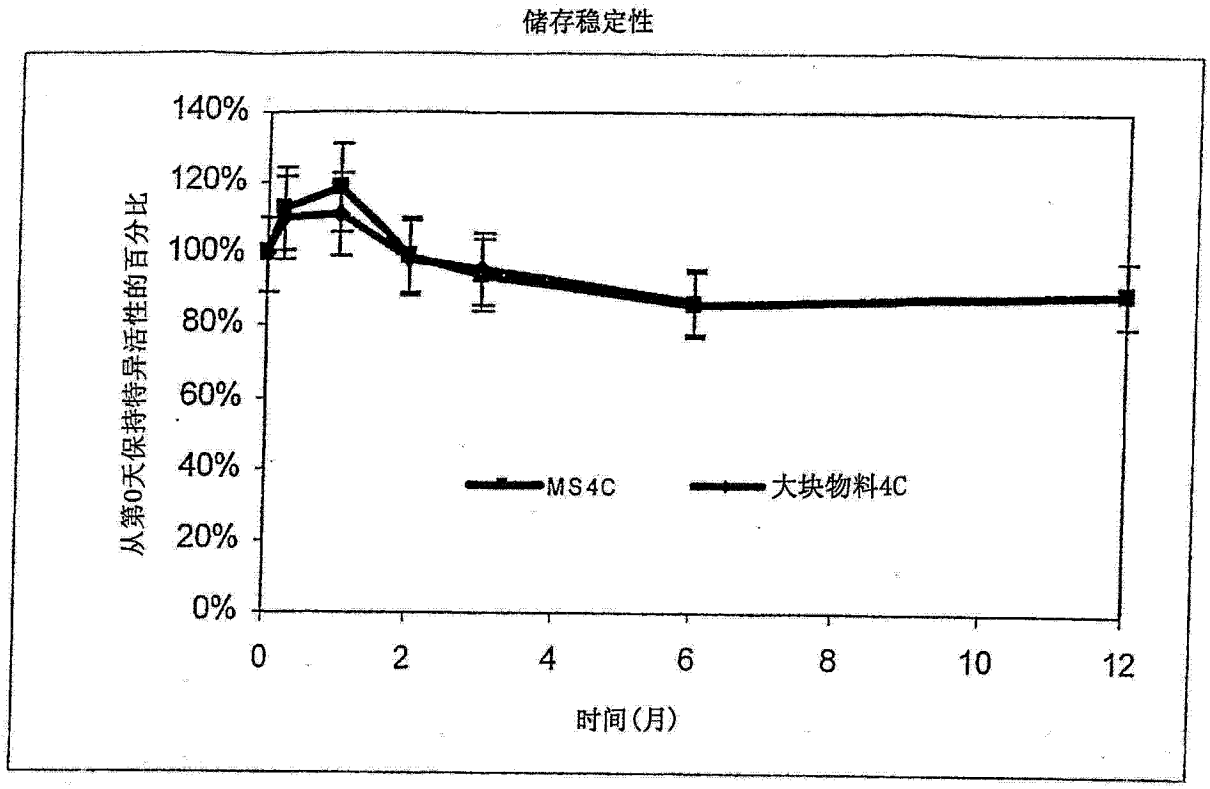
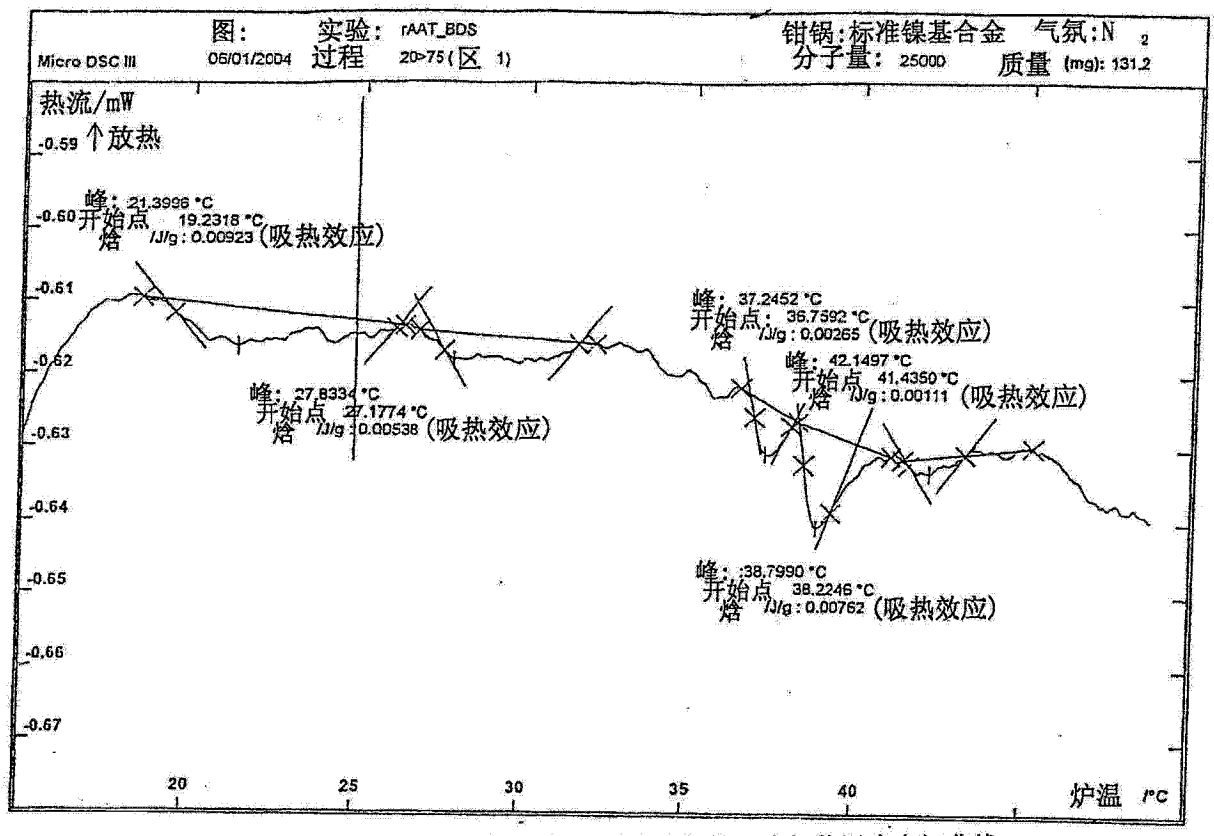
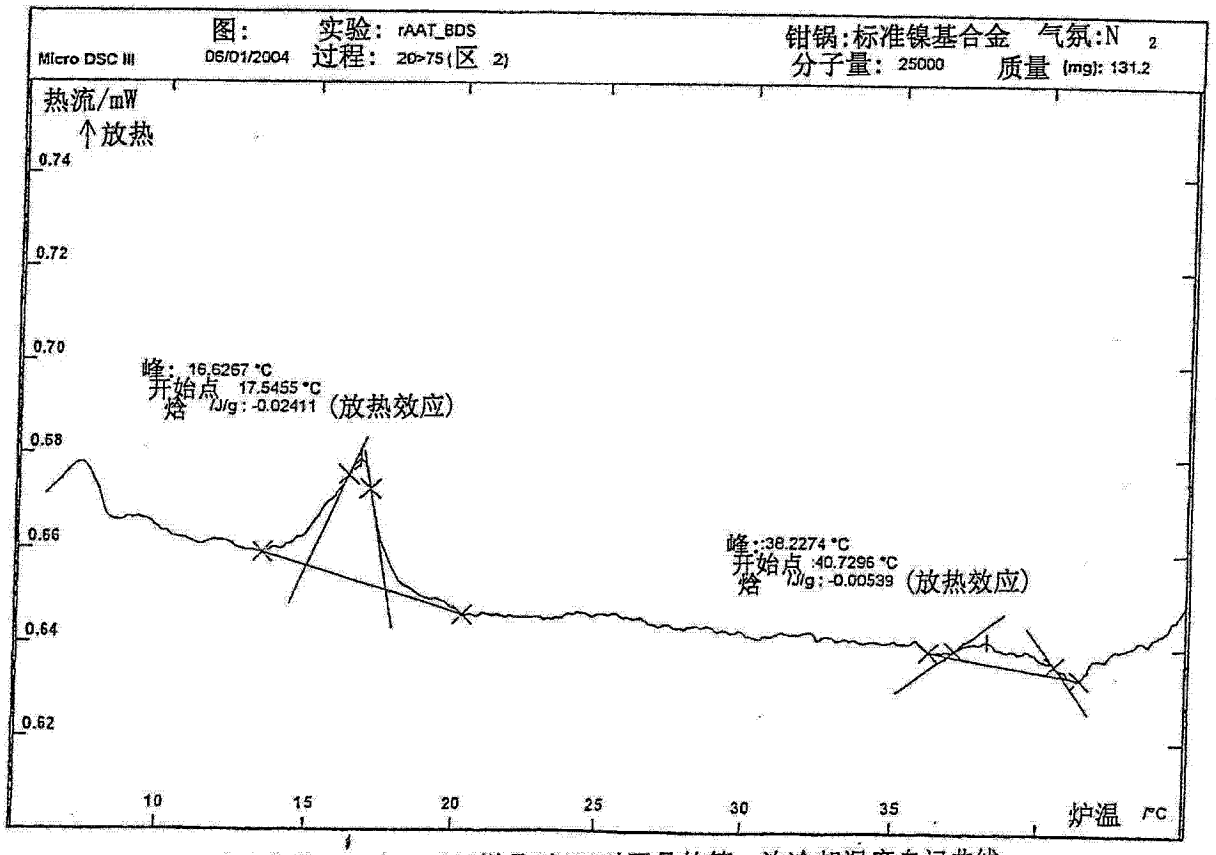

储存稳定性
从第0天保持特异活性的百分比
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
2
4
6
8
10
12
时间(月)
MS4C
大块物料4C

图 17c



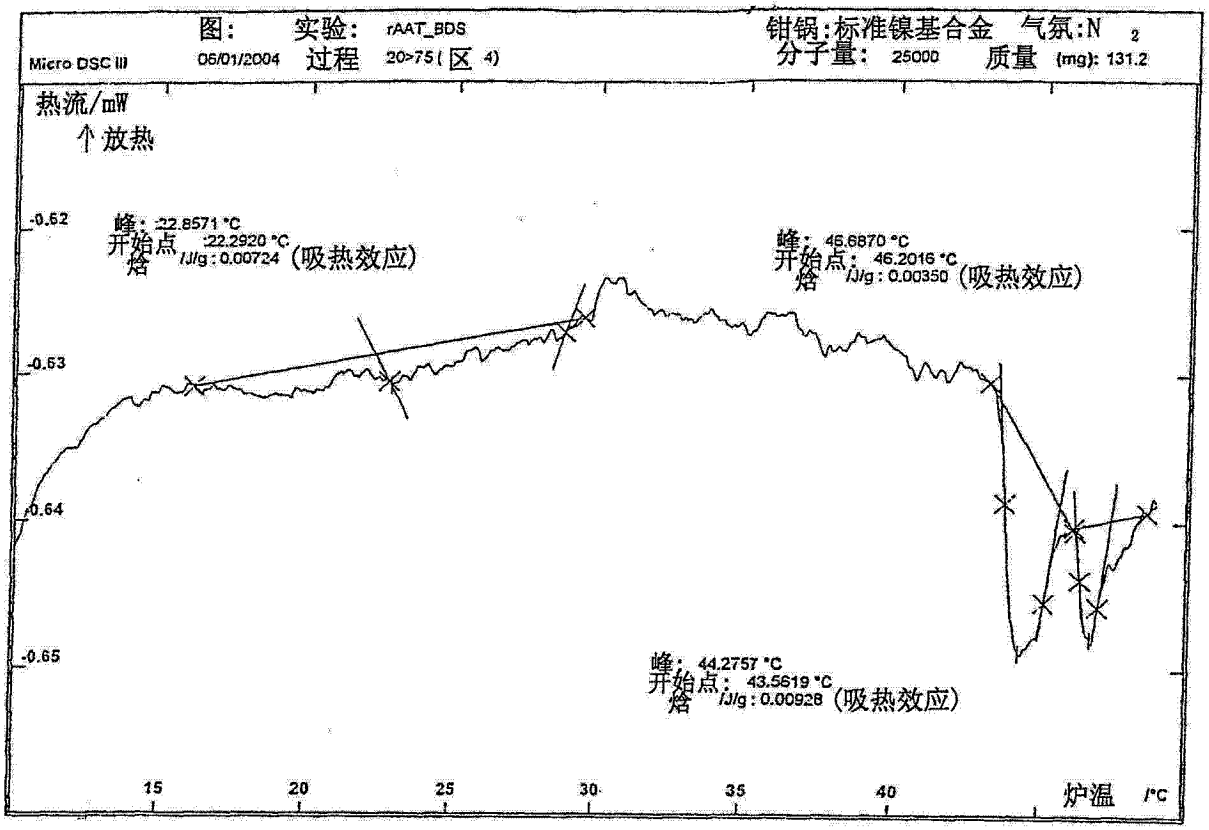
BDS溶液中的50mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第一次加热温度自记曲线

图 18



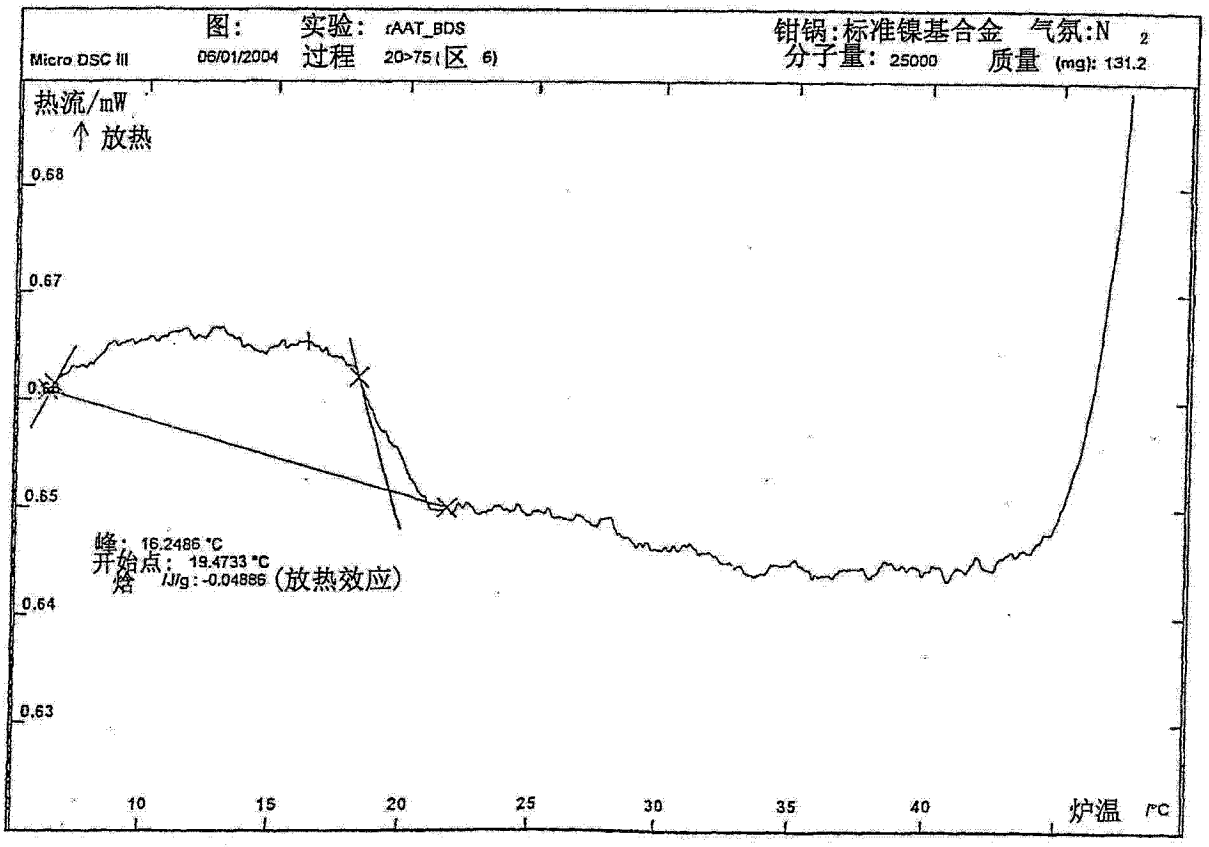
BDS溶液中的50mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第一次冷却温度自记曲线

图 19



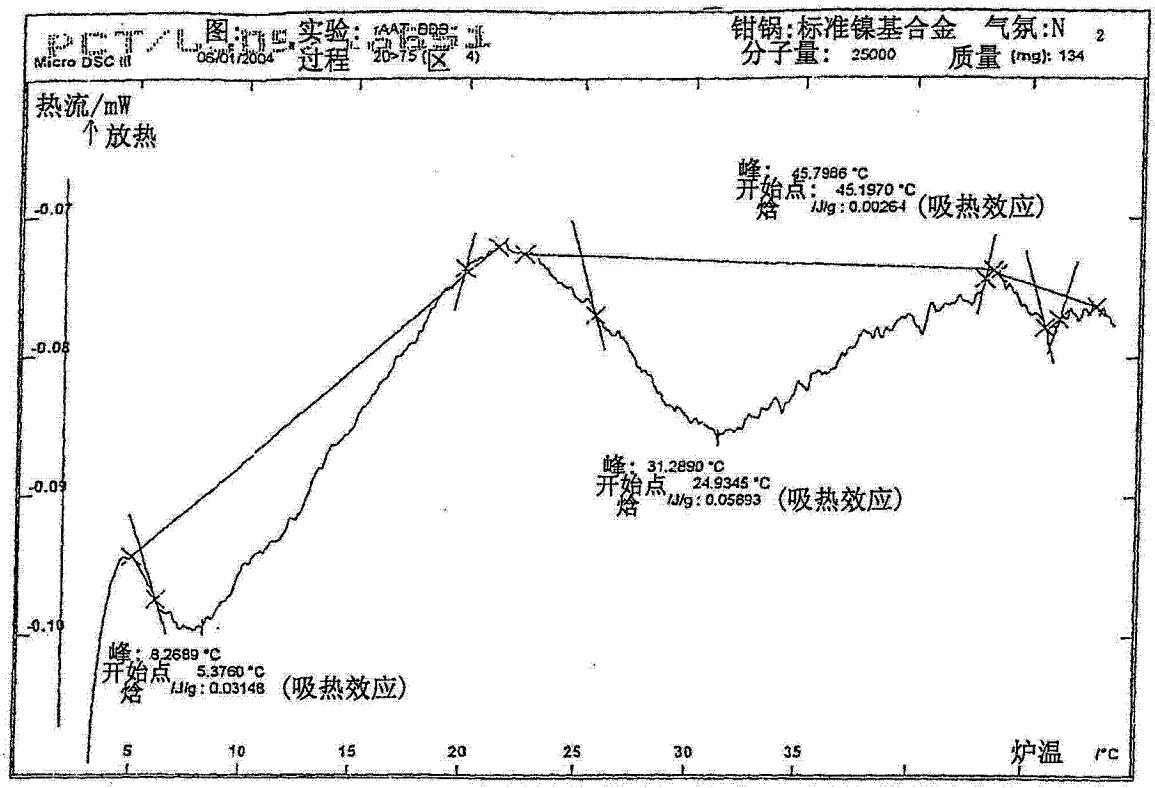
BDS溶液中的50mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第二次加热温度自记曲线

图 20



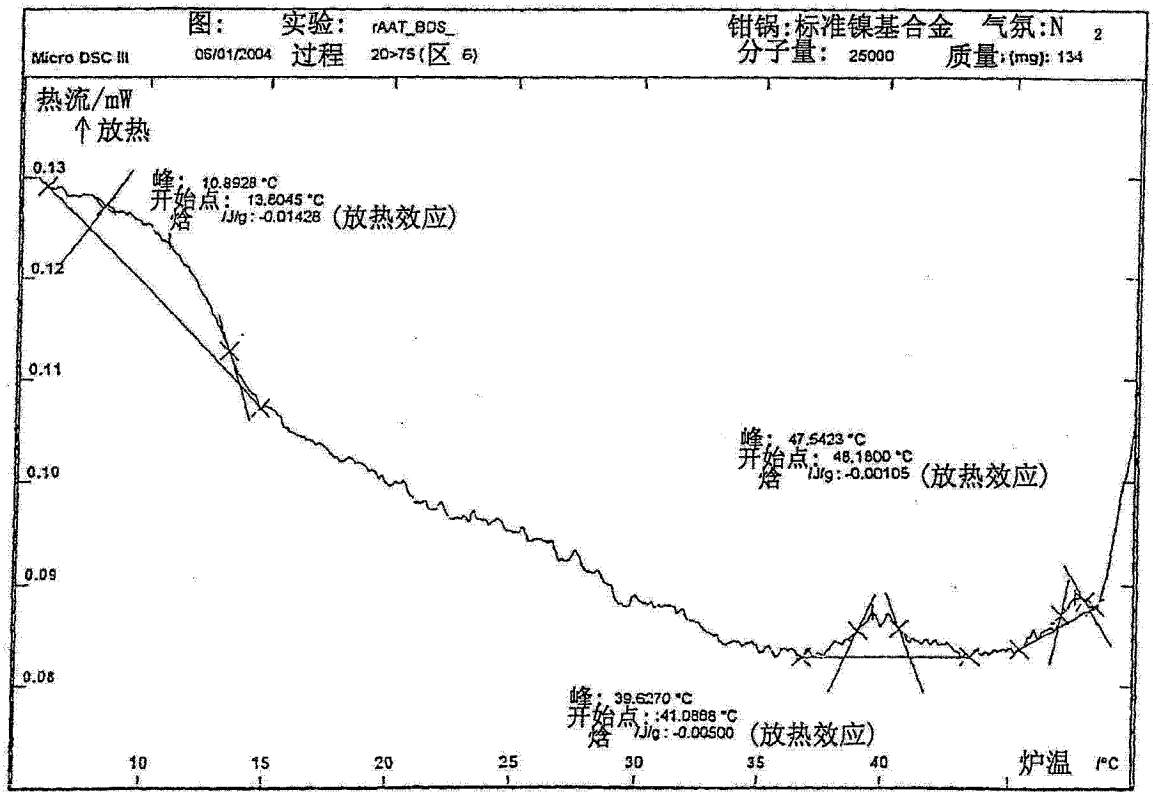
BDS溶液中的50mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第二次冷却温度自记曲线

图 21



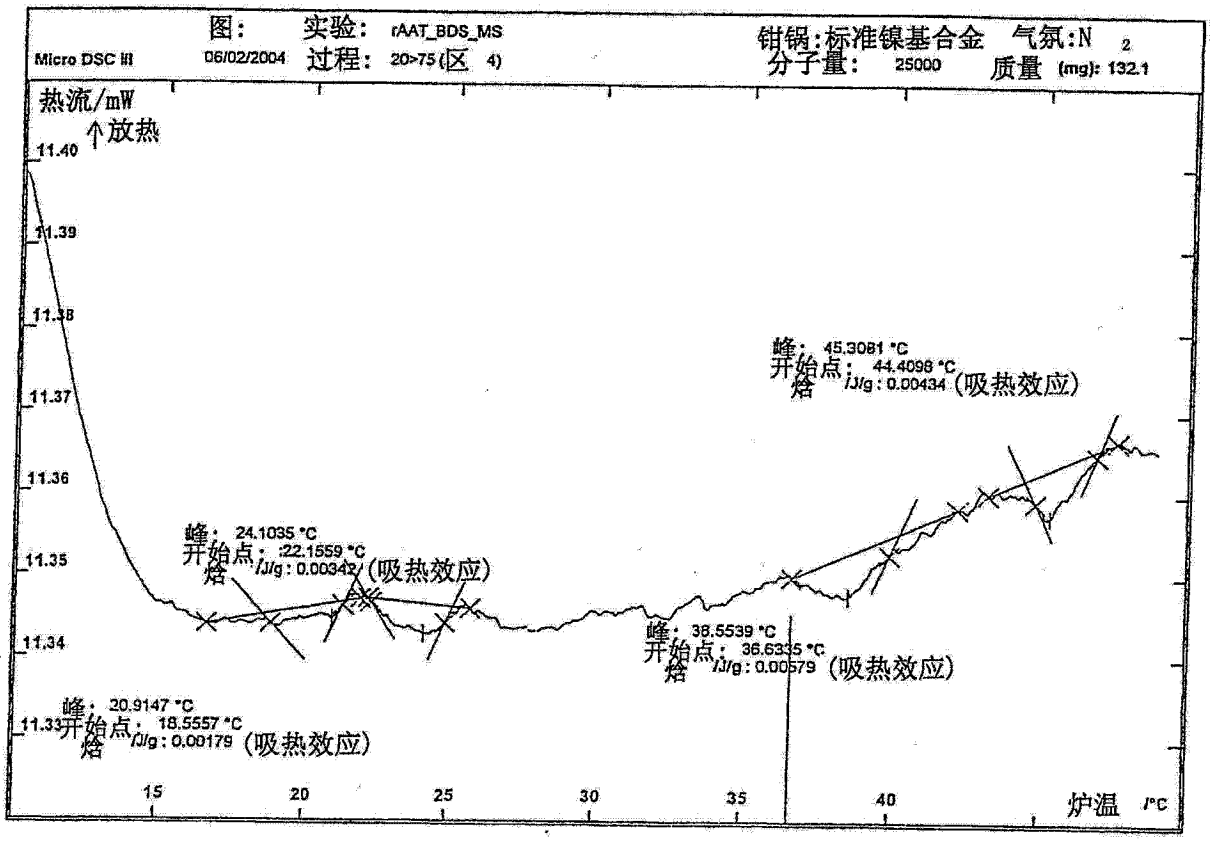
乙酸溶液中的45mg/mL rAAT样品对乙酸缓冲液对照品的第二次加热温度自记曲线

图 22



乙酸溶液中的45mg/mL rAAT样品对乙酸缓冲液对照品的第二次冷却温度自记曲线

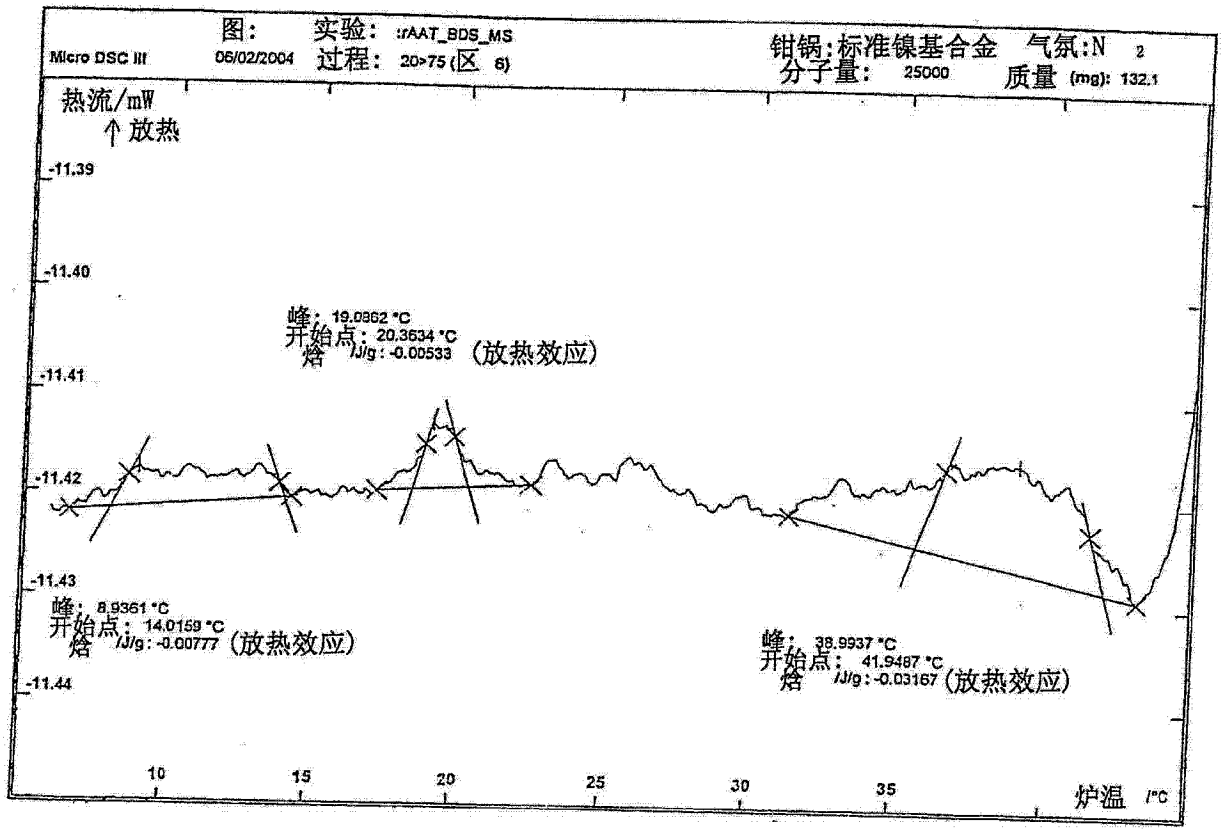
图 23



BDS溶液中的1mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第二次加热温度自记曲线。

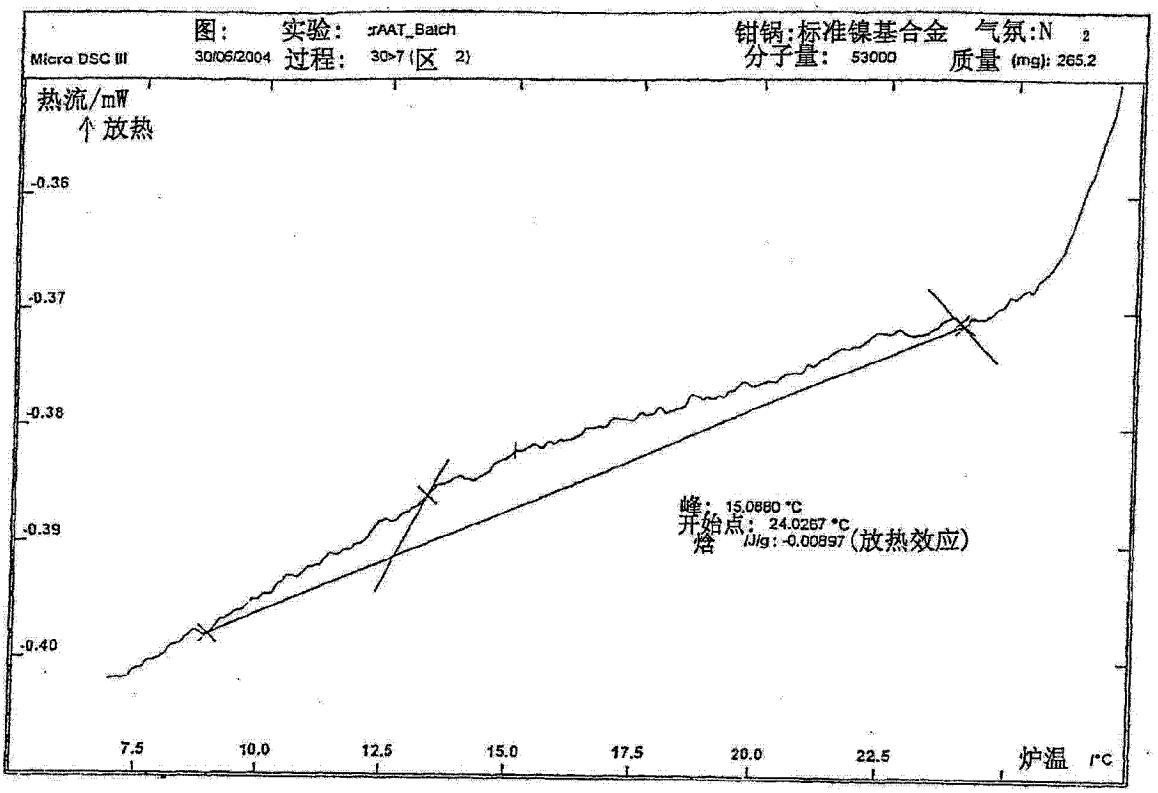
rAAT样品来自于溶解在BDS中的rAAT3小球颗粒

图 24



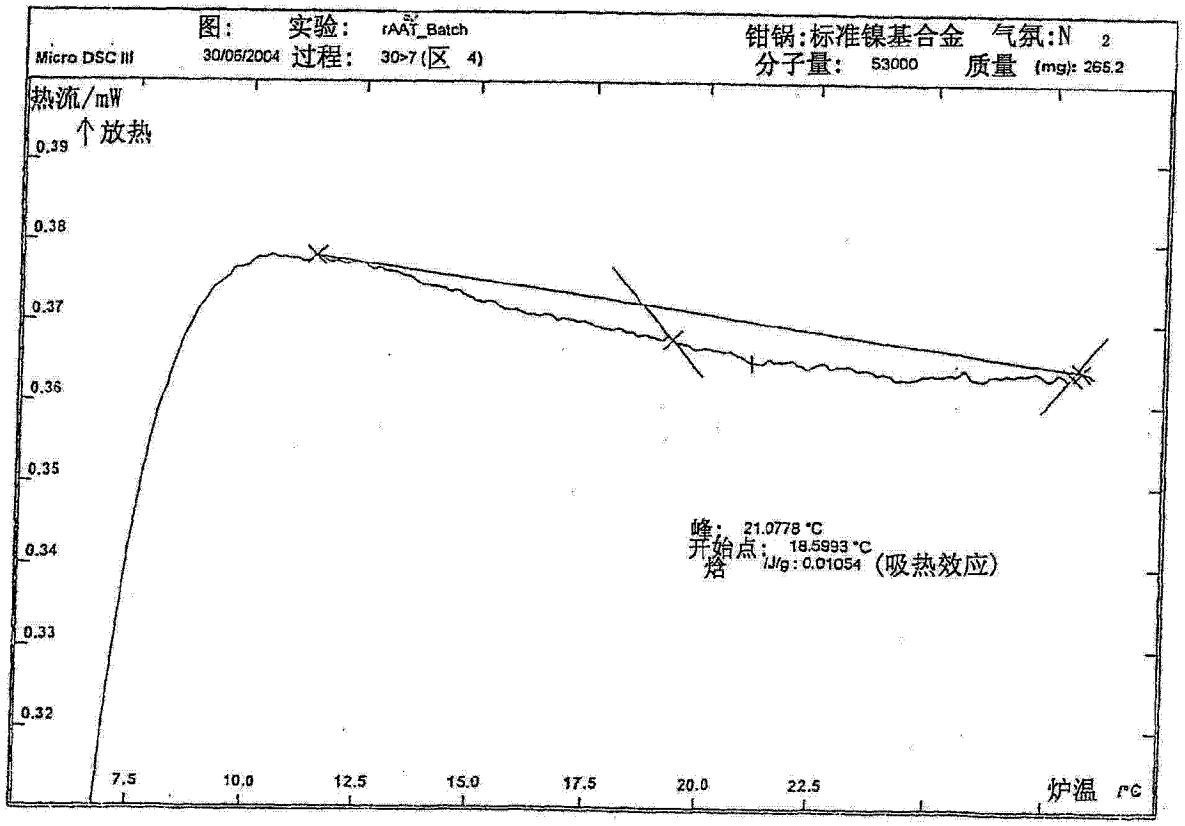
BDS溶液中的1mg/mL rAAT样品对BDS对照品的第二次冷却温度自记曲线。rAAT样品来自于溶解在BDS中的rAAT3小球颗粒。

图 25



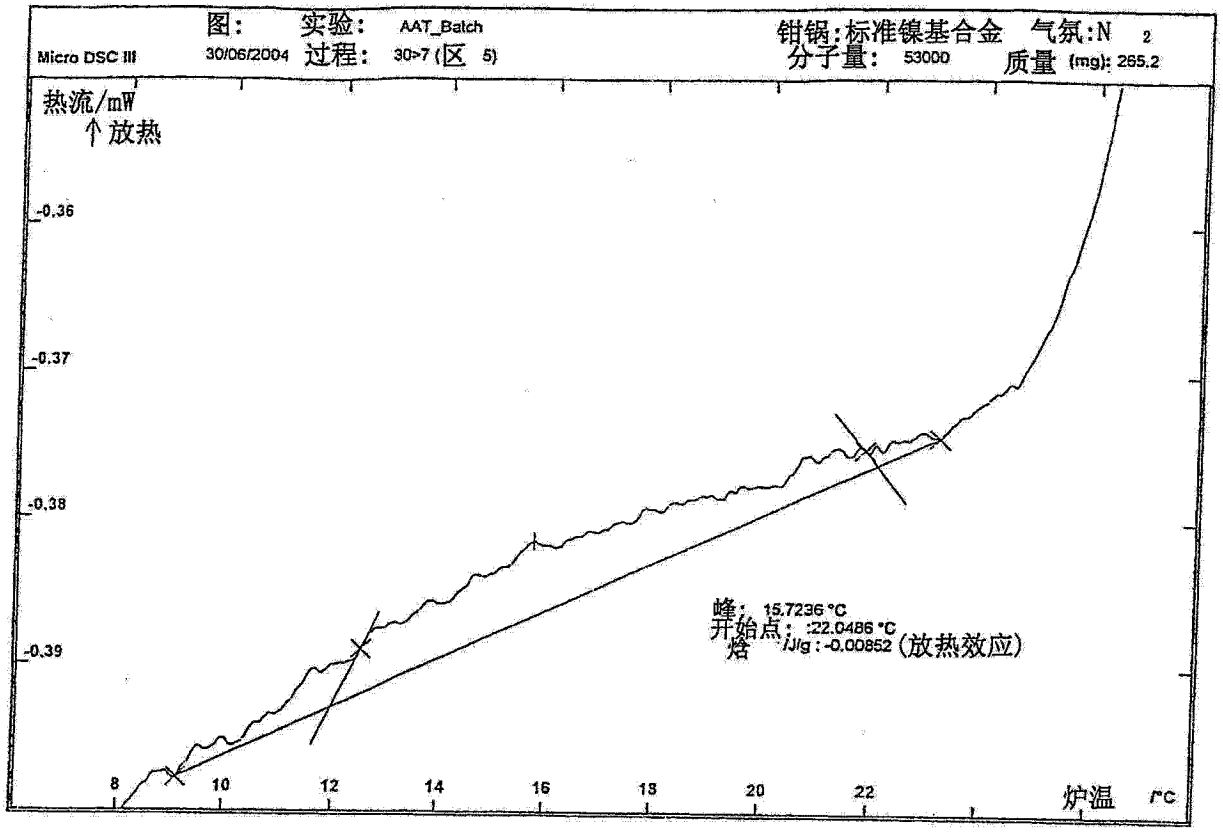
小球颗粒批量制造的第一次冷却温度自记曲线。

图 26



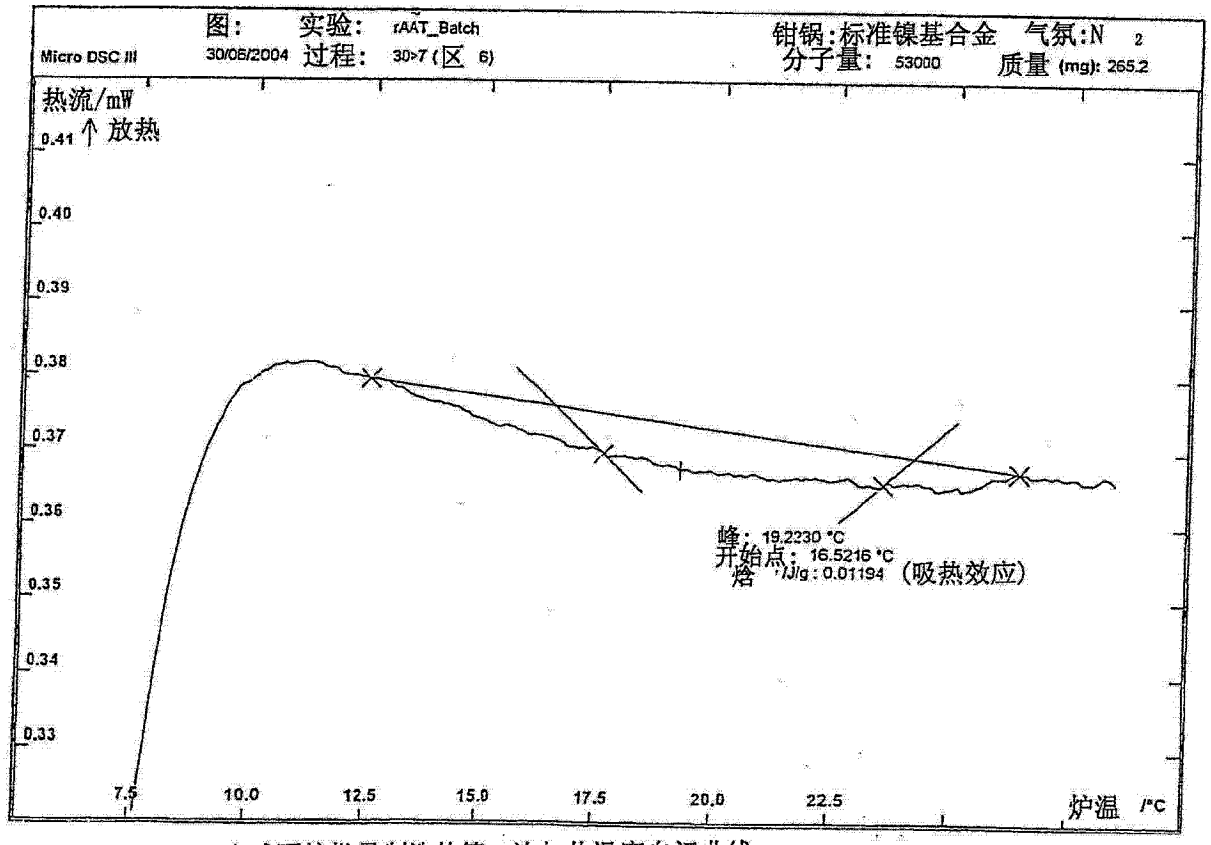
小球颗粒批量制造的第一次加热温度自记曲线。

图 27



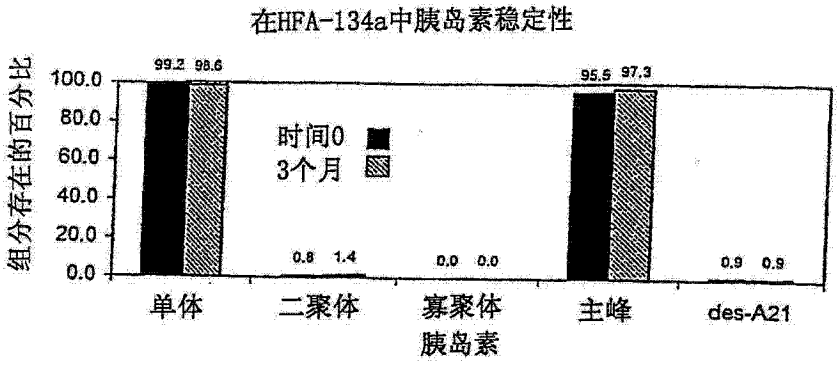
小球颗粒批量制造的第二次冷却温度自记曲线

图 28a



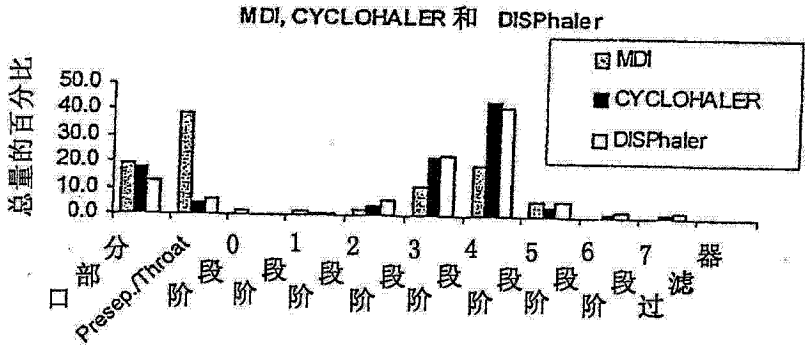
小球颗粒批量制造的第二次加热温度自记曲线

图 28b



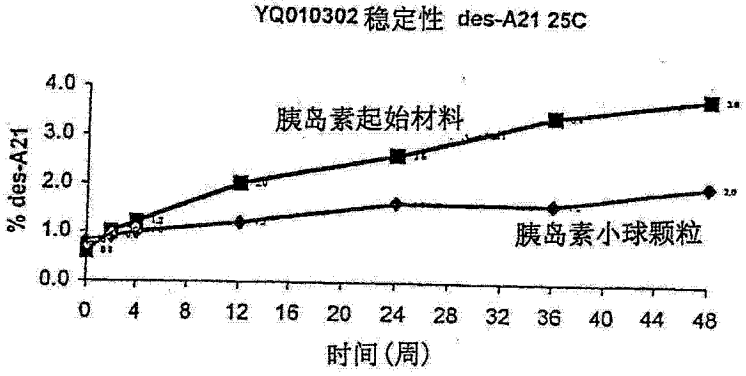
在HFA-134a推进剂中储存之后微球体形式中的胰岛素维持了稳定

图 29



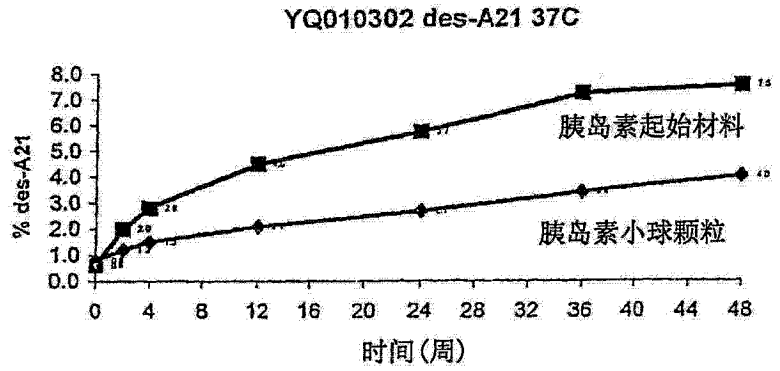
使用三种不同的吸入装置比较胰岛素小球颗粒的空气动力学性能，MDI、Cyclohaler DPI和Disphaler DPI

图 30



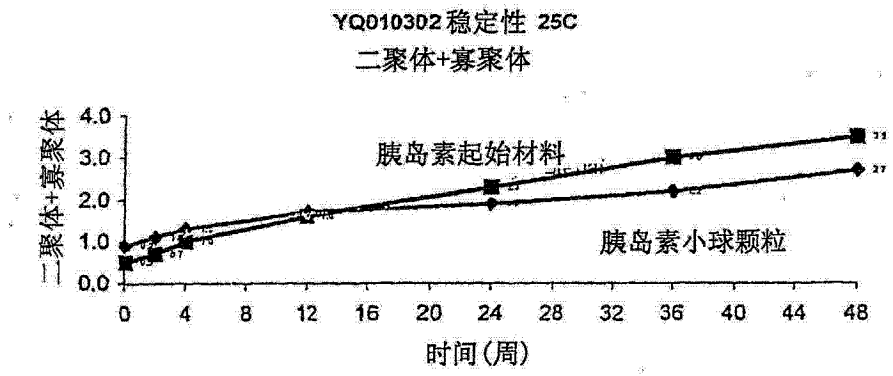
在25oC储存温度下，起始材料中A21脱酰氨胰岛素形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 31



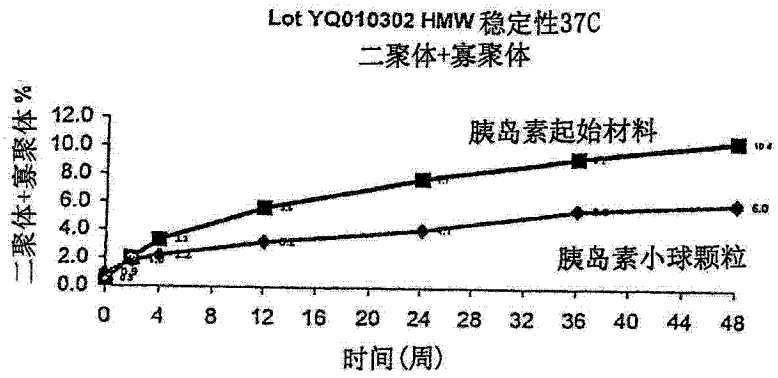
在37℃储存温度下，起始材料中A21脱酰氨胰岛素形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 32



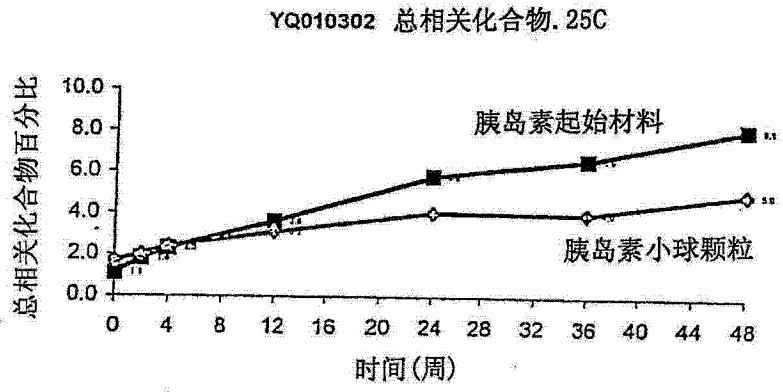
在25℃储存温度下，起始材料中胰岛素二聚体和寡聚体形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 33



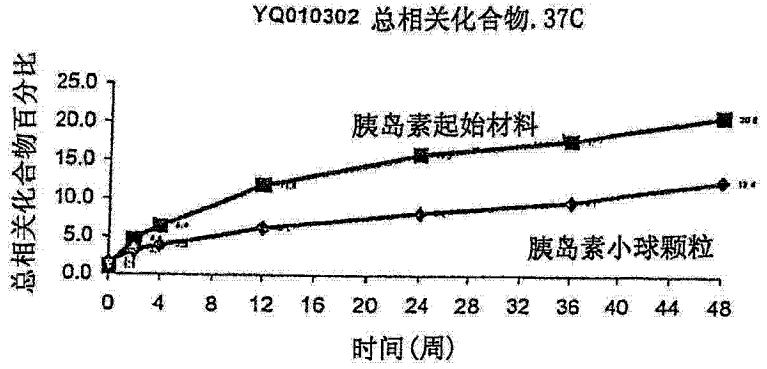
在37℃储存温度下，起始材料中胰岛素二聚体和寡聚体形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 34



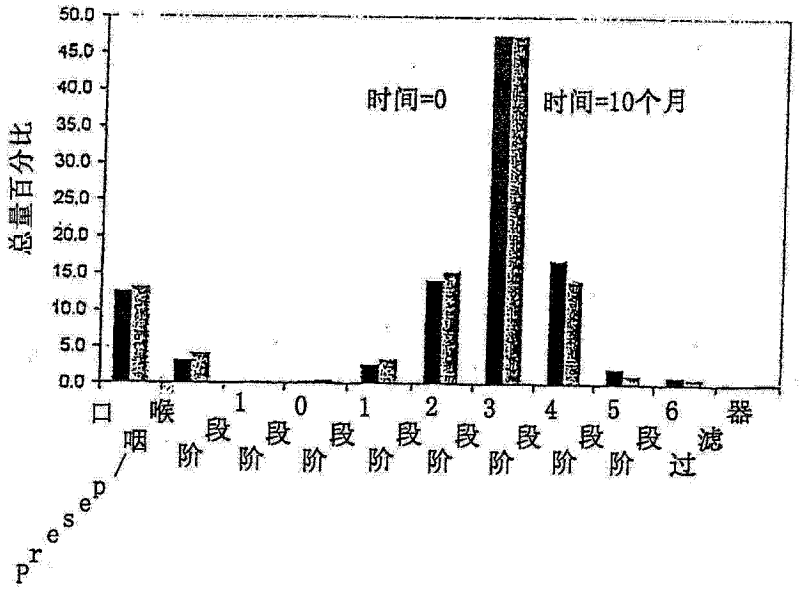
在25℃储存温度下，起始材料中胰岛素总相关化合物形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 35



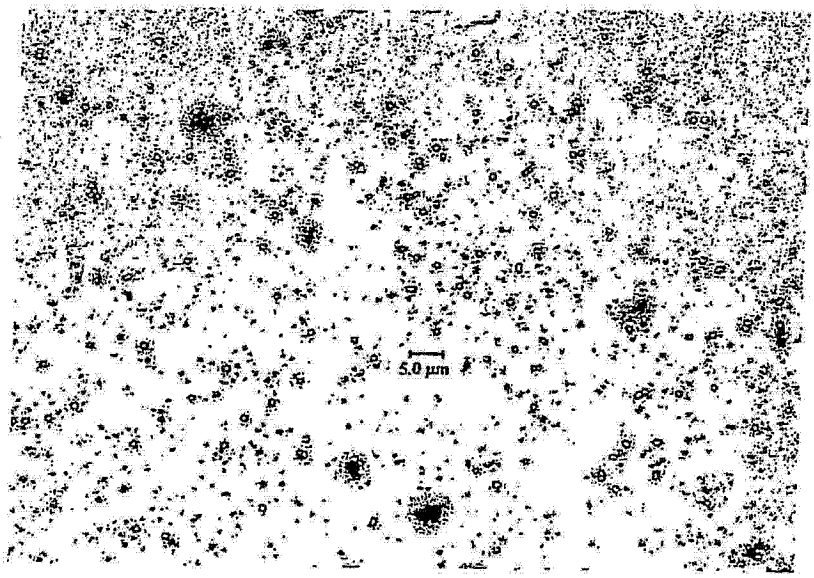
在37℃储存温度下，起始材料中胰岛素总相关化合物形成的百分率与胰岛素小球颗粒相比明显较高。这个结果表明胰岛素小球颗粒与不添加稳定化赋形剂的起始材料相比明显对化学降解更稳定

图 36



使用Cyclohaler DPI在Anderson阶式碰撞采样器中试验的胰岛素小球颗粒的空气动力学稳定性

图 37



Nikon光学显微镜，100x油浸透镜

图 38

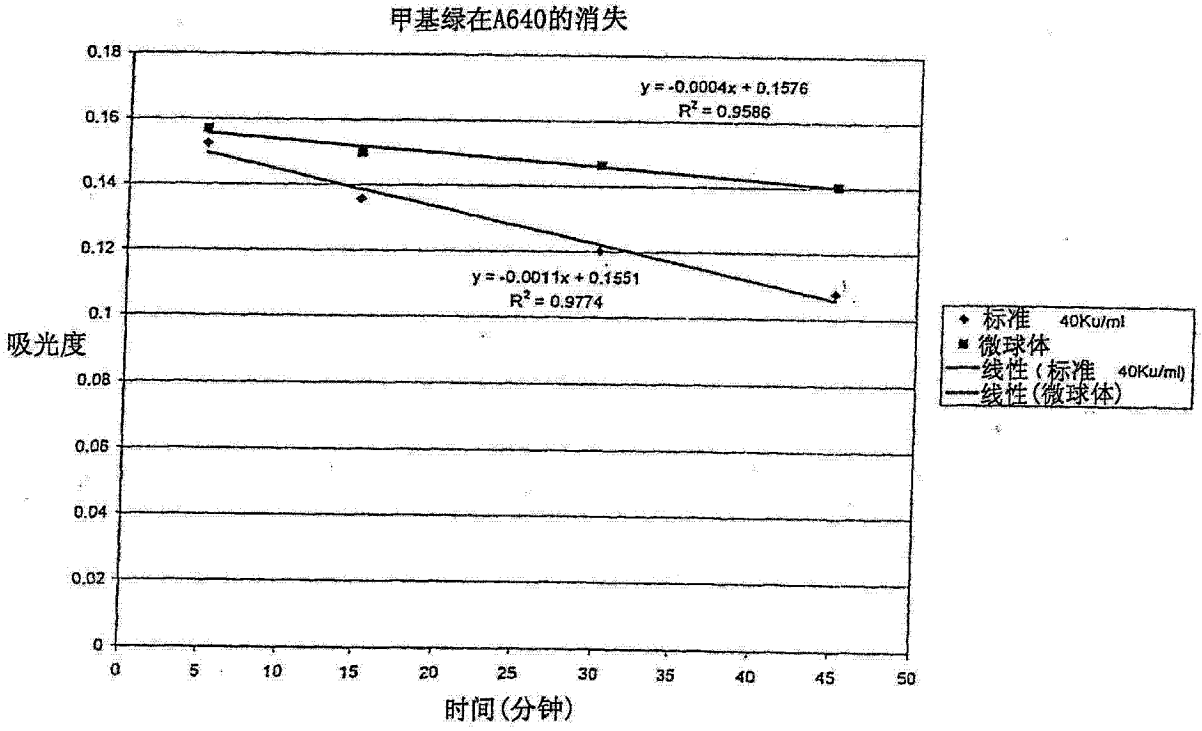
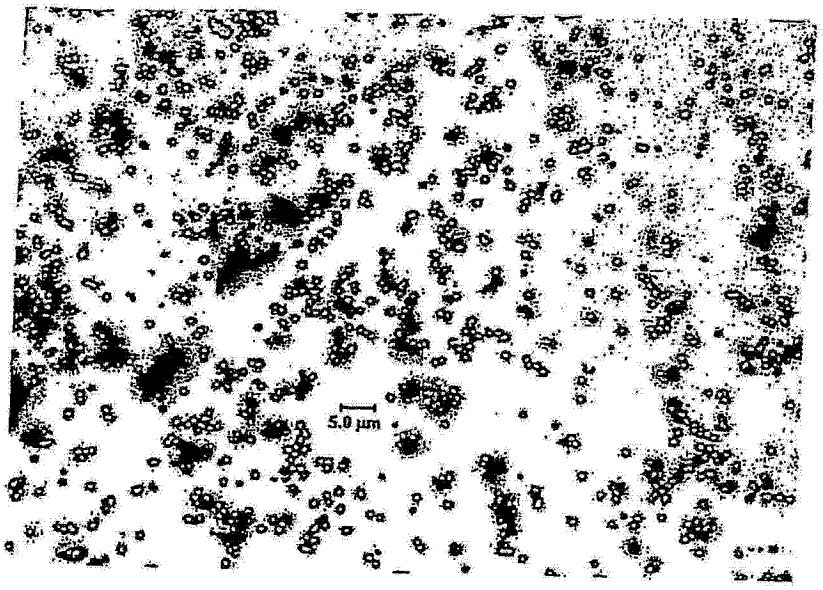
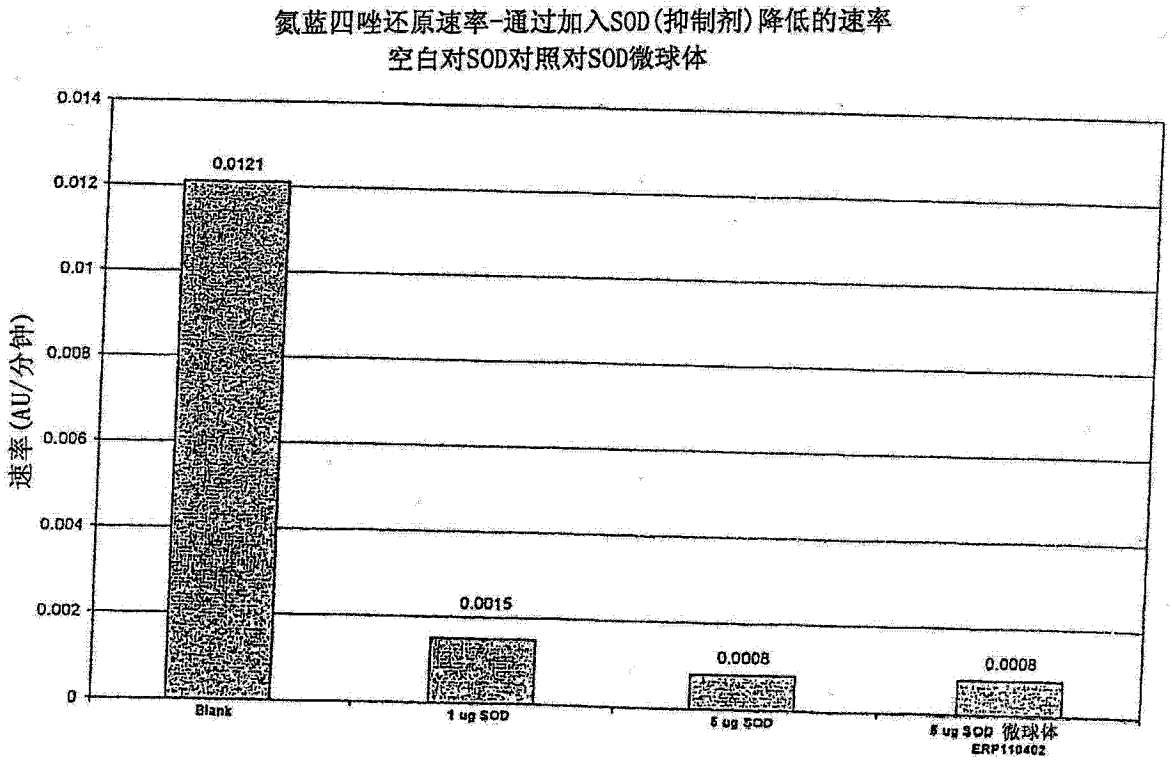


图 39



Nikon光学显微镜，100x油浸透镜，干粉样品

图 40



在Worthington生物化学目录中描述的活性分析

图 41

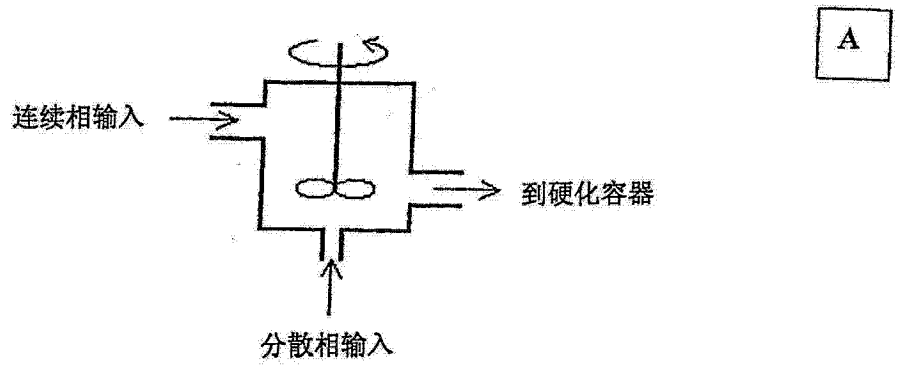


图42a

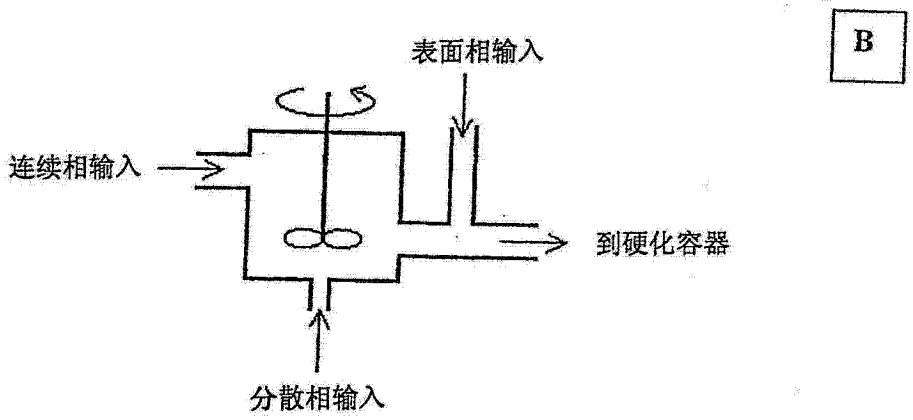


图42b

连续乳化反应器的示意图：

A） 表面活性化合物在乳化之前被加入到连续相或分散相中。

B） 表面活性化合物在乳化之后加入。

图 42