

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 9/00

A61K 9/14 A61K 9/16

A61K 47/26

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98803450.6

[43]公开日 2000 年 6 月 14 日

[11]公开号 CN 1256626A

[22]申请日 1998.3.18 [21]申请号 98803450.6

[30]优先权

[32]1997.3.18 [33]GB [31]9705588.3

[86]国际申请 PCT/GB98/00817 1998.3.18

[87]国际公布 WO98/41188 英 1998.9.24

[85]进入国家阶段日期 1999.9.17

[71]申请人 扇形支撑剑桥有限公司

地址 英国诺丁汉

[72]发明人 J·卡姆宾格

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

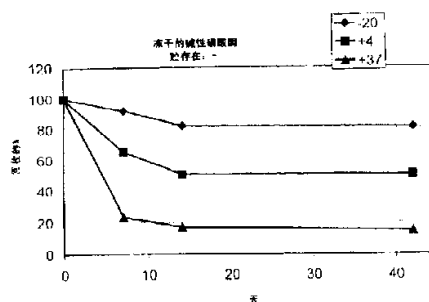
代理人 郭建新

权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 稳定粒子的液体制剂

[57]摘要

一种稳定粒子的液体制剂,该制剂包括悬浮于连续相中的微粒的不连续相,该连续相是不溶解所述微粒的非水液体,优选是生物相容性的。所述微粒包括选自下组物质的细分散的糖玻璃体:海藻糖、palatinit、吡喃葡萄糖基山梨糖醇、吡喃葡萄糖基甘露糖醇、乳糖醇、以及单糖醇例如甘露糖醇和肌醇,所述糖玻璃体含有至少一种生物分子制品,该玻璃体中的生物分子制品或者呈稳定的固体溶液或者它自身悬浮于该糖玻璃体中。所述非水连续液相中微粒的单分散单粒子悬浮体可通过在该连续相中包括至少一种具有低 HLB 或很低 HLB 的表面活性剂而制备。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种稳定粒子的液体制剂，该制剂包括悬浮于连续相中的微粒的不连续相，该连续相是不溶解所述微粒的非水液体，其中该微粒包括含有至少一种生物分子制品的细粉状糖玻璃体，该糖玻璃体中的生物分子制品或者呈稳定的固体溶液或者它自身悬浮于该糖玻璃体中。

2. 权利要求 1 的制剂，其中所述连续相包括低 HLB 或很低 HLB 的脂溶性表面活性剂。

3. 权利要求 1 或 2 的制剂，其中所述糖玻璃体由一种或多种选自下组的糖构成：海藻糖、palatinit、吡喃葡萄糖基山梨糖醇、吡喃葡萄糖基甘露糖醇、乳糖醇，以及单糖醇例如甘露糖醇和肌醇。

4. 权利要求 1 的制剂，其中所述非水连续液相是生物相容的。

5. 权利要求 1 的制剂，其中所述非水连续相是一种疏含水溶剂。

6. 权利要求 1 的制剂，其中所述非水液体连续相是水混溶性的。

7. 权利要求 1~7 任一项的制剂，其中所述糖玻璃体微粒直径是约 0.1~约 10 μ ，优选小于 10 μ ，例如 1 或 2 或 5 μ 的直径，最优选小于 1 μ 的直径。

8. 权利要求 7 的制剂，其中所述微粒不表现粒径方面的巨大变化。

9. 权利要求 1~8 任一项的制剂，其中所述微粒大致是干的，具有小于约 1% 的很低水含量。

10. 权利要求 1~9 任一项的制剂，其中所述生物分子制品是药物或者其它生物活性成分，例如蛋白质、抗体、酶（例如限制性内切核酸酶）等，它包括生物物质，例如食料、染料、饮料等。

11. 权利要求 1~10 任一项的制剂，其中所述微粒在连续相中构成一种单分散悬浮体。

12. 权利要求 1~11 任一项的制剂，它在不连续相中含有约 1wt% 到多于 50wt%、例如约 10wt% 的微粒。

13. 权利要求 2 的制剂，其中连续相中表面活性剂的量是约 0.01vol% ~ 约 10vol%，例如 1 vol%。

14. 权利要求 2 或 13 的制剂，它含有一种或多种选自下组的表面活性剂：脱水山梨糖醇倍半油酸酯、二缩甘露醇单油酸酯、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯和甘油单硬脂酸酯，卵磷脂（磷脂酰胆碱）、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱，以及脱水山梨糖醇月桂酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯和油酸酯。

15. 权利要求 1 或 2 的制剂，其中所述连续的非水液相包括一种或多种选自下组的疏含水无毒溶剂或者由其构成：芝麻油、花生油、大豆油、油酸乙酯和矿物油。

16. 权利要求 1 或 2 的制剂，其中所述非水连续液相包括选自下组的一种水混溶性非水溶剂或者由其构成：聚乙二醇、甘油、乙二醇、丙二醇、氧化丙烯、聚丙二醇。

17. 一种生产稳定粒子的液体制剂的方法，该方法包括如下步骤：制备包括一种或多种含于糖玻璃体中的生物分子制品的微粒，再将该微粒加到不溶解该粒子的非水连续液相中而形成悬浮体，该糖玻璃体中的生物分子制品或者呈稳定的固体溶液或者它自身悬浮于该糖玻璃体中。

18. 权利要求 17 的方法，其中通过在所述非水连续液相中包括至少一种具有低 HLB 或很低 HLB 的表面活性剂而在该连续相中制备一种微粒的单分散单粒子悬浮体。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述表面活性剂是在添加粒子之前被加入所述连续的非水液相的。

20. 权利要求 1 或 2 的制剂，它是二元药物制剂，其中所述生物分子制品是药物前体，并且其中所述最终活性药物成分是通过化学反应合成或释放的，该化学反应只是在给患者施用该制剂后所述前体被体液润湿时才开始的。

21. 权利要求 1 或 2 的制剂，它包含含有一种以上生物分子制品的微粒。

22. 权利要求 1 或 2 或 21 的制剂，它含有微粒的混合物，该微粒在与含水环境接触时释放一种以上生物分子制品。

23. 权利要求 21 或 22 的制剂，其中当在含水环境中释放后，两种或多种生物分子制品相互作用。

24. 切割 DNA 的方法，它应用权利要求 1 或 2 的制剂，其中所述生物分子制品是限制性内切核酸酶，并且其中将该制剂与 DNA 的水溶液接触，于是保持在所述糖玻璃体中的悬浮酶在含 DNA 的水相中溶解并能切割该 DNA。

稳定粒子的液体制剂

所有的活生物体都需要水。确实，在很大程度上，大多数生物是水。生物学中很少的一致性主题是，水占生物体重量的约 75%。然而，惊人的是，有一些生物在失去它们几乎全部的水之后还能在干的状态下生存。被称为间生态（“无水的生命”）的该能力是在所有的生物王国（包括细菌、真菌、动物和植物）中发现的，并且可能是在至少二十亿年前进化的。这类间生态生物体能完全干透并且表面上看来像死了，但它们没死；它们还活着，无活动力且无生气地无限期处于滞生状态，直到存在水时才活过来。所有这些生物解决了在没有冷藏或冷冻下如何保存生物分子的问题。

一个对间生态生物体来说是普通的、并且对它们的脱水耐性可能是关键的确切特征是它们产生大量单糖的能力。最有效的是海藻糖（ α -D-吡喃葡萄糖基 α -D-吡喃葡萄糖苷），但间生态植物例如 *Craterostigma plantagineum*）积累蔗糖而不是海藻糖。显然，细胞内的和细胞外的糖对于细胞或干生物体的生存力来说是必要的。研究证实了，对间生态来说，单独的海藻糖就足够了，在该研究中将该二糖人工导入活细胞中，使它们变干后又成功地再水化了。

海藻糖从数种性能的组合获得其稳定化能力。与其它许多糖一样，它通过与分子表面氢键键合而替换结构水。海藻糖是惰性的并且不能与其它分子在干燥状态反应。一些其它的类似物也是稳定和惰性的，但大多数糖在凝固点以上与氨基反应（即所谓的美拉德反应）于是破坏该产品。当应用正确的操作将分子从糖溶液中干燥时，形成一种玻璃体，其中分子被包埋了，使分子的扩散和任何相关的降解作用减至最小。

很多糖溶液在干燥时能表现出两种完全不同的方式。最常见的表现是糖形成结晶。当出现该现象时，含该糖的溶液中的分子未受到保护，因为它们被逐出晶体。另一种表现是溶液逐渐变得更浓直到它变得很粘

稠以致在室温下形成一种固态玻璃体。当发生该现象时，生物分子制品已经历了从开始时的液态溶液到最后呈玻璃体的固态溶液的平稳变化。在该状态下，可见到被包埋于并被牢固地固定于该玻璃体基质中的制品分子。这类似于被发现呈保存完好的状态包埋于化石琥珀中的古代昆虫。

由于糖玻璃体是水溶性的，所以该过程容易在水中逆转，于是所述制品在液态溶液中平稳地变回到它的天然状态。这些平稳的转变保证了在干燥过程中没有制品的损坏。就该制品来说，从液态溶液到固态溶液的转变是觉察不到的。由于优质糖的玻璃体是惰性的并且具有高熔点，所以当干燥时，所述制品即使在恶劣条件下贮存也受到保护。

肠胃外施用的药物通常是作为含缓冲盐的水溶液通过空心金属针注射的。可以是皮内、皮下、肌肉或静脉内注射。更罕见的另一种途径（例如鞘内或眼内注射）可能适合。以这种传统方式施用药物已有 100 多年历史了，并且尽管害怕注射、注射引起的疼痛和感染的危险性，但在此期间尚无任何较大的、普遍被接受的改善。

液体喷注注射器（它的工作原理是，在很高的压力下直接穿过皮肤射出很细小的液流）在接种程序中取得了一些成功，但早期的模式不可靠。最近的进展（例如 Mediject 和 Bioject 装置）已在糖尿病方面获得了重大的小生境应用（*niche applications*）并且正扩展到其它领域。但是，注射器和针头以及喷注注射者技术分担了现有技术的主要缺点。很多肠胃外药物在水溶液中不稳定，所以作为更稳定的冻干饼状或作为粉末制备和贮存，它们需要恰在注射前用水或缓冲液重新溶解。该额外的步骤要求技术培训并且增加了不准确分配溶剂从而不准确分配剂量的危险性，或者由于非无菌技术引起感染。作为溶液或悬浮液贮存的药物（例如胰岛素）需要冷藏以防降解并且具有有限的贮存期限。

干药物的重新溶解必须正确和精确地操作以保证准确的剂量，该步骤中的任何差错都会有危险，而且对高效药物来说，甚至可能是致命的。通常需要在同一时间给予一种以上药物。这就可能需要多次引起疼痛的注射，因为某些药物由于在溶液中存在分子之间的化学不相容性而不能在同一个注射器内混合，否则就会导致药效的损失或者甚至产生毒性反

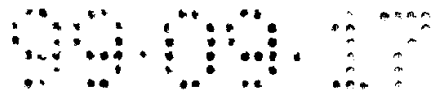
应产物。

解决这些问题的最佳办法（长期以来这也是配药科学家的目标）是一种稳定的液体制剂，该制剂在注射前不需用溶剂重新溶解。虽然在水溶液稳定性方面取得一些较小的改善，但它们未提供可应用海藻糖或类似的稳定性赋形剂以现代干制剂而获得的很高的药物稳定性水平。然而，现代干制剂虽然极为稳定（即使在相当恶劣的环境条件下也很稳定），但仍需要在注射前重新溶解。它们还只在很干时才稳定。甚至少量吸湿也会使这些干制剂在贮存时不稳定。它们通常作为两相体系贮存于密封的玻璃小瓶中，其中药物呈不连续的固相，而连续的液相则是干空气（常在减压下）或干氮气。

现有的喷注注射的疫苗有两个主要问题即贮存不稳定性和需要重新溶解干疫苗，前一个问题是应用单糖海藻糖通过干燥法（现在已由 Quadrant Holdings Cambridge Ltd.取得了专利）解决了。海藻糖-干燥疫苗可在至少 45℃ 的环境温度下贮存而没有可检测到的变质。最惊人的是，甚至氢氧化铝辅剂凝胶也在干燥和贮存期间通过海藻糖稳定化了，并且恢复它们的全部水合体积和功能而没有凝集或沉淀。

虽然论述了通过该干法解决不稳定性问题，但以前描述的海藻糖-干燥疫苗是呈固体玻璃泡沫体形式，并且在通过常规针头和注射器技术的注射前需要重新溶解（例如用已灭菌的水或缓冲液）。干疫苗可被配制成粉末形式并且可应用气体的超声冲击波穿过皮肤送递。由于气体速度和后续的渗透力的限制，所以尚难以确定能否通过这些方法达到深肌肉内注射。更有用的制剂应是现成的稳定液体，它不需要运送单独的缓冲液或者本领域中的重新溶解，然而它仍具有海藻糖-干燥物质的异常的稳定性。这种疫苗可在多剂量容器内配制并且在大规模免疫运动中方便地通过标准喷注注射器送递。我们现在描述了一种应用细粉末和非水载体的新制剂，在该非水载体中该粉末可被均匀地分配成稳定的单分散悬浮体。

基于间生态现象，我们设计并证实了操作条件，该条件保证完全模拟间生态现象的稳定玻璃体的形成。它们可被用于稳定和保藏大多数类型的分子和生物体系（包括很多疫苗）而不需冻干或冷藏。



我们现在描述一种方法，该方法可被用于配制甚至最不稳定的药物的液体制剂，该制剂象最佳海藻糖-干燥制剂那样稳定，但具有现成液体制剂那样的全部安全性和方便性。

药物可在一定的条件下干燥成细粉末，该条件保证药物在呈玻璃态的海藻糖或其它稳定化赋形剂中的最佳稳定化。可自发形成良好的稳定玻璃体的其它糖有 palatinit（一种通过用氢和阮内镍催化剂还原异蔗糖（isomaltulose）而制备的吡喃葡萄糖基山梨糖醇和吡喃葡萄糖基甘露糖醇的混合物，由德国的 Sudzucker AG 生产）。纯异构体吡喃葡萄糖基山梨糖醇和吡喃葡萄糖基甘露糖醇也比较好，例如乳糖醇（乳糖的还原制品）。

(参见: (i) Colaco C.A.L.S., Smith C.J.S., Sen S., Roser D.H., Newman Y., Ring S.和 Roser B.J., 由海藻糖稳定化蛋白质的化学, “蛋白质和肽的配制和送递” (“Formulation and delivery of proteins and peptides”), Cleland 和 Langer 编辑, 美国化学学会(American Chemical Society), Washington, 222 ~ 240 (1994); (ii) PCT 申请 No. WO 91/18091, “生物大分子物质和其它有机化合物的稳定化”, Roser B.J. 和 Colaco C.; (iii)美国专利 No. 5,621,094. “通过添加直链糖醇的非还原苷保持脱水期间琼脂糖凝胶结构的方法”, Roser B.和 Colaco C.; (iv) PCT 申请 No.WO 96/05809. “生物物质在干燥和后续的贮存过程中的改善的稳定化方法及其组合物”, Colaco C., Roser B.J.和 Sen S.)。

我们还发现了，如果正确地配制，则现有技术中阐述为不能用作玻璃体形成赋形剂的完整一类的单糖醇确实可形成优良的稳定制剂。这些单糖醇包括甘露糖醇和肌醇。

含稳定活性物的干玻璃体粉末的形成可应用得自这些种类的任何合适的糖或糖衍生物完成。这可直接通过如下方法实现：通过喷雾干燥或者通过某种其它干燥方法（包括标准的方法，例如真空干燥或冷冻干燥），接着是研磨步骤（例如喷射研磨）以减小干制剂尺寸而成为细粉末。在玻璃体中含有药物的稳定固体溶液的该糖玻璃体细粉末（不连续相）然后就被配制成两相体系中的悬浮体，该两相体系含有作为连续相的生物相容性非水液体（它不溶解所述糖）。将水从该体系排除保持了海藻糖或应用的其它稳定赋形剂的稳定化效果。我们以前报道了海藻糖

- 干燥活性物在非水液体(它不溶解海藻糖)中保持稳定达数天。Gribbon E.M., Sen S., Roser B.J.和 Kampinga J., 应用海藻糖(Q-T4)技术的疫苗稳定化。F.Brow (编辑的)“疫苗效能稳定化的新方法”(New Approaches to Stabilisation of Vaccine Potency), Dev Biol Stand Karger Basel, 87, 193~199 (1996)。假定所述非水载体是稳定的,并且假定所述制剂不吸收大量的水,则似乎可能这类制剂应该会与海藻糖干物质本身那样无限地稳定。虽然应用了非水实验溶剂(例如丙酮或二氯甲烷)的实验建立了活性分子在悬浮的糖玻璃体微球中的稳定性原理,但这样的制剂当然是不能注射的,因为所述载体有毒性。然而,还有获得了管理机构认可的各种非水载体可用于肠胃外注射,并且已证实了它们的安全性和方便性。所述液相可以是任何可注射的疏含水溶剂,例如可注射的芝麻油、花生油或大豆油、油酸乙酯或者水混溶性非水溶剂(例如聚乙二醇)。由于大多数合适的非水液体本身在室温或高温下很稳定并且不需冷藏,所以形成的两相制剂是固有稳定的。

然而,糖玻璃体的细粒子在很多非水液体中由于相分离而具有固有的形成块的倾向。因为糖玻璃体是强亲含水的,所以该粒子具有强烈的从连续疏水相被排斥的倾向并被迫聚集成块。这些聚集体从悬浮液中沉出而且不能容易地通过振荡或超声处理被重新溶解成单分散悬浮体。这导致药物剂量在悬浮液中的非均匀性,并且在最坏的情况下,该制剂因出现能阻塞针头的大块状物而不能注射。虽然理想的悬浮液是无水的或接近无水的,但我们意外地发现了,来自油包水(W/O)型乳液的稳定化领域的简单操作可生产稳定的、微球在非水液体中的单分散单粒子悬浮体。

虽然这些体系的水含量很低($<1\%$),但常用于稳定油包水(W/O)型乳液的表面活性剂在约 $0.01\% \sim 10\%$ 、优选约 1% 时具有惊人的效果。它们将玻璃体粒子的聚集体转化为基本上未显示再聚集倾向的稳定的单分散悬浮体。这些表面活性剂〔它们具有低的或很低的亲水亲油平衡(HLB)值〕本身不溶于水但是是脂溶性的。低HLB表面活性剂例如脱水山梨糖醇倍半油酸酯(Arlacel C, $HLB=3.7$)、二缩甘露醇单油酸酯(Arlacel A, $HLB=4.3$)、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯(Span 65,

HLB=2.1) 和甘油单硬脂酸酯 (Arlacel 129, HLB=3.2) 具有很低的毒性 (大鼠经口的 $LD_{50} > 15\text{g/kg}$)，已经被临床应用于 WIO 型乳液 (例如供注射的弗氏佐剂)，并且在该用途方面得到了管理机构的认可。

优选地，所述表面活性剂在粉末粒子的添加之前被添加到连续非水液相中。

Arlacel A 是所谓的“弗氏佐剂”的基本成分，该佐剂被广泛地用于免疫接种动物而产生最大的血清抗体滴度。(参见：“实验免疫学手册” (Handbook of Experimental Immunology)，第 4 版，DM Weir 编辑，合编者：L. Herzenberg 和 L Herzenberg, Vol 1, p8.10 (1986))。弗氏佐剂基本上是一种细滴的油包水型乳液，其中抗原被溶于不连续水相，而轻质石蜡油的连续相则起贮源的作用，抗体从贮源被缓慢地释放。弗氏完全佐剂还含有热灭活的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) (它引起剧烈的炎症)，增强免疫系统的响应。这妨碍它在人体中的应用。

细滴油包水型乳液 (例如弗氏佐剂) 和本文描述的单分散玻璃体于油中的悬浮体之间的主要差别是产生后者需要较低的分散能。在 WIO 乳液中将水相分散成细滴时需要长时间的剧烈混合 (一个高速均化器被用于生产弗氏佐剂，并且在达到稳定的乳液之前它通常在 $> 18,000\text{RPM}$ 的最高速度下运转 15~30 分钟)，而本文描述的稳定悬浮体则只需要添加细粉状药物到油/表面活性剂基体中并剧烈振荡而混合这两相。可采取短暂的 $< 5\text{min}$ 暴露于超声浴中以保证粉碎在添加到所述疏水相中之前或者在添加过程中就可能形成了的任何小块状物。

假定糖玻璃体的细小微球完全不溶于所述疏含水溶剂，那么它们在玻璃体相中应是稳定的而没有重结晶的倾向，并且玻璃体微球内固体溶液中的稳定化分子也是稳定的。

通过常规喷雾干燥技术生产的粉末一个很大的缺点是通常产生的粒径方面的巨大变化。此外，常规喷雾干燥器在生产平均直径显著小于 $5 \sim 10\mu$ 的粒子时很困难。该尺寸的粒子在低粘度液体中迅速地沉降。这就可能导致在小瓶内剂量分配中大的变化，于是需要经常地剧烈振荡以便再悬浮该粒子。直径约为 $0.1 \sim 1\mu$ 的糖玻璃体粒子会更好，因为通过一

按本发明可生产稳定粒子的液体制剂，其中细粒干粉末被均匀分配成稳定的单分散悬浮体。本领域技术人员应容易懂得，这类单分散悬浮体可以通过注射器和针头或者通过液体喷注注射器直接注射。该制剂不需在注射前用溶剂重新溶解即可注射。在难于准备无菌的条件和无菌的重新溶解用溶剂和/或缓冲剂的情况下，这显然是有利的。所述粒子的液体制剂是稳定的，所以不需冷藏即可分配。

在糖玻璃体中以细粒化物形式稳定化的无水药物的固体溶液容易水合。本发明又一个特殊的优点在于，可将生物相容性制剂直接注射入受体；结果正常的生理含水环境将就地水合该药物。可轻易看出，一种稳定的、温度不敏感的、可直接注射的药物制剂在接种程序和普遍的预防性或治疗性施药方面具有巨大的潜力。

如果所述非水液体是水溶性的或水混溶性的，则本发明的制剂还可用于诊断学和试剂。然后就可用一个分液器贮存不稳定的诊断试剂而不用冷藏，将它们分配入水基检测系统，例如免疫测定、基于 DNA 探针的诊断学、PCR 反应等。在诊断系统中与水接触时，非水载体中的细粉状诊断试剂将会立即溶解，于是该试剂将变成完全活性的。例如，该方法可被用于限制酶，该酶用来消化特定序列位点上的 DNA。

粒子的特定连续相制剂可以是一种以上，当它们在水中被释放后，它们就迅速地一起相互作用。我们给出的实例是一种粒子中的碱性磷酸酶和另一种粒子中的对硝基苯磷酸（它的底物）。这些可以只轻易地作为两种前体药物成份，它们需要相互作用而从两种前体药物生产活性药物。还可具有数种不同的粒子，例如多价疫苗的各个成分。当它们在体内再水合时这些成分在油中不经历破坏性的相互作用并且它们没有时间相互作用，因为它们从注射部位被吸收并被运送到它们的作用位点。

在限制酶实例中，我们可将处于独立的粒子中的多种试剂用于复杂分子的生物学技术，例如聚合酶链反应（PCR）或测序反应的成分。在前者中，一种粒子应含 DNA 聚合酶，一种应含一种引物，第三种应含另一种引物，第四种则应含核苷酸。在测序反应中，DNA 聚合酶可处于一种粒子中，核苷酸和双脱氧链终端核苷酸则处于另一种粒子中。显然，在所述油中非相互作用的粒子内混合不同试剂的能力为设计强有效的和

方便的试剂盒开辟了很多可能的途径。

图 1 示出冻干的碱性磷酸酶在 37℃、4℃ 和 -20℃ 下与时间相关的活性；

图 2 和 3 示出海藻糖稳定化的碱性磷酸酶的干粉制剂或油悬浮液制剂在 37℃ 和 55℃ 下的活性；

图 4 和 5 示出重组 EPO 的冻干的制剂以及海藻糖稳定化的干粉制剂或油悬浮液制剂在 37℃ 和 55℃ 下的活性；以及

图 6、7 和 8 示出 EcoR1 的冻干的制剂以及海藻糖稳定化的干粉制剂或油悬浮液制剂在 4℃、37℃ 和 55℃ 下的活性。

实施例

实施例 1 碱性磷酸酶。

来自牛肠粘膜的碱性磷酸酶（EC 号为 3.1.3.1, Sigma-Aldrich Co. Ltd. p8647）一般是以冻干粉末获得的。这需要在 <0℃ 下的冷冻机中贮存干燥以便保持该酶的活性。即使在该温度下，冻干的酶也逐渐失去活性。当在更高温度下贮存时，则更迅速地 & 温度相关地失去活性（图 1）。

配制和干燥

将该酶溶于由下列成分构成的缓冲液：

<u>物质</u>	<u>浓度</u>
海藻糖	0.6M
硫酸钠	0.35M
牛血清白蛋白	0.75mM
碱性磷酸酶	40 单位/ml
氯化锌	1mM
氯化镁	1mM

然后在 Labplant SD1 喷雾干燥器中干燥。干燥条件是：入口温度 135℃，出口温度 80℃，最大的空气流量。通过热解重量分析法（TGA）在 Seiko SSC/5200 仪器（Seiko Instruments Inc.）上测得该操作结束时玻璃态粉末的残余水含量是 2%。

贮存

将 100mg 该粉末的等分试样称入 5ml 疫苗小瓶并在真空下密封。将其它等分试样称入小瓶并在 200mg/ml 油的浓度下重悬浮于药物级油酸乙酯 (Croda Chemical Company Ltd.) 中。将这些小瓶也在真空下密封。然后将该干粉末试样和油悬浮液试样在 37℃ 或 55℃ 下贮存不同的时间。

分析

在贮存期末, 添加 5ml 体积的用氢氧化钠溶液调节到 pH10.0 的, 具有下列组成的缓冲液,

<u>物质</u>	<u>浓度</u>
甘氨酸	100mM
氯化锌	1mM
氯化镁	1mM

再在 IEC Centra 413 离心机中在 3,500RPM 下将这些小瓶离心 10 分钟。离心的效果是将含有所述酶的玻璃体粒子转移通过油水界面并将它们溶于缓冲液中从而回收残余的酶。不管在添加了所述含水缓冲液之后是否剧烈地振荡了这些小瓶, 回收的酶量是一样的。酶活性是应用测定“甘氨酸单位”的动力学方法 (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) 测定的, 即在 Shimadzu UV-160A 分光光度计上应用对硝基苯磷酸底物在 37℃ 下测定 405nm 波长处的显色程度。

结果

在 37℃ 下贮存时, 贮存 84 天后所述干粉末或油悬浮液中都无酶活性损失。(图 2)。在 55℃ 下贮存时, 在前 7 天内有少量的损失, 但在长达 84 天后 90% 以上的活性又稳定了(图 3)。如果所述油样品和粉末样品之间有差异的话, 前者更好, 但差异不明显。不管应用矿物油还是油酸乙酯作为连续相都得到基本一致的结果。

在其它实验中进行了喷雾干燥, 应用了不同缓冲组合物, 该组合物含代替硫酸钠的乳酸钙或代替海藻糖的甘露糖醇。这些实验给出基本类似的结果。应用基于甘露糖醇的玻璃体形成缓冲剂的良好结果特别出乎意外, 因为以前公开的文献叙述了不可能应用单糖糖醇作为稳定剂(PCT

申请 No. WO 91/18091, “生物大分子物质和其它有机化合物的稳定化”, Roser B.J.和 Colaco C.; 美国专利 No. 5,621,094, “通过添加直链糖醇的非还原糖保持脱水期间琼脂糖凝胶结构的方法”, Roser B.和 Colaco C.; PCT 申请 No. WO 96/05809, “生物物质在干燥和后续的贮存过程中的改善的稳定化方法及其组合物”, Colaco C., Roser B.J.和 Sen S.)。倘若配制和干燥技术是为了形成良好的玻璃体的话, 情况就不是这样。

受在悬浮液内玻璃体粉末中干燥的活性物惰性和稳定性的启示, 制备了含碱性磷酸酶的粉末和含对硝基苯磷酸的粉末在矿物油中的混合物, 并在 55℃ 下贮存 7 天。在该时间结束时这些悬浮液似乎未变化。在添加 1ml 水并振荡后, 分离的水相中迅速出现浓黄色, 表明水已经再活化了所述酶和底物。该结果表示这些制剂在相同的载体中可容纳会在常规含水混合物中一起反应的组分。该性能将在例如多价疫苗中有重大价值。我们注意到它还是开发所谓的“二元”药物的一个良好的模型系统, 该“二元”药物中, 最终的活性成分是通过只有当前体分子被体液润湿时才开始进行的化学反应合成或释放的。

实施例 2 重组人促红细胞生成素 (EPO)

选择 EPO 作为现代药物的一个实例, 它是通过大肠杆菌 (E. coli) 中重组蛋白质的遗传工程生产的。

将冻干的 EPO 再水合, 用如下组成的缓冲液稀释 100 倍:

<u>物质</u>	<u>浓度</u>
海藻糖	0.6M
硫酸钠	0.7M
牛血清白蛋白	0.75mM

接着如前述那样在喷雾干燥器中干燥。将该粉末称成 125mg 的等分试样, 在真空下 40℃ ~ 80℃ 的温度范围内以每小时 15 度的速度进行第二次干燥, 然后或者密封于血清小瓶中或者重悬浮于 0.5ml 矿物油 BP 中并密封。接着在 37℃ 或 55℃ 下将它们贮存达 15 天。在贮存期结束时, 将残余的 EPO 提取入前述含 0.01% BSA 的磷酸盐缓冲盐水中, 应用

Quantikine IVD EPO 特异性免疫测定仪 (R & D Systems Inc) 测定提取物中残余的 EPO 量。

在 37℃ 下一天内, 新鲜的 EPO 失去其活性的 88%, 而干物质, 不管是否悬浮于油中都具有完全的活性 (图 4)。到 15 天的时候失去了少量的活性, 但保持 90% 以上的活性。在 55℃ 下贮存时, 新鲜的 EPO 在一天内失去 >95% 的活性 (图 5)。而干物质在第一天中未失去活性并且在 15 天后仍可回收 >80% 的活性。

实施例 3 限制性内切核酸酶 EcoR1

限制酶通常被贮存在 -20℃ 的冷冻机内含 50% 甘油 (以防结冰) 的缓冲液中。甚至在这些条件下它们中的一些也只具有有限的贮存寿命并且需要每隔一段时间替换。应用本发明的技术干燥了数种酶而得到类似的结果。本文阐述了一种酶即 EcoR1 的数据。用 SC 缓冲液 (Colaco C.A.L.S., Sen S., Thangavelu M., Pinder S. 和 Roser B., “在海藻糖中干燥的酶的异常的稳定性: 简化的分子生物学。” 生物技术 (Biotechnol.), 10, 1007~1011 (1992)) 将该酶溶液稀释 100 倍。在前述喷雾干燥器中形成干燥的酶, 密封于含油或不含油的小瓶内, 并在 4℃、37℃ 和 55℃ 的三个贮存温度下将它的稳定性与用切割缓冲液 (cutting buffer) 稀释的新鲜液体酶比较。为了测定贮存后的残余活性, 如前述那样将酶回收入水相, 用 SC 缓冲液以 2 倍稀释系列稀释, 用于切割 0.5μg 噬菌体 λDNA (Life Technologies Inc)。通过如下方法估测不同稀释度下切割的完全度: 通过琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 其中通过溴化乙锭染色, 在 UV 光下可视化各条带。酶的滴度以显示未出现部分条带的完全切割时的最大稀释度表示。

在 4℃ 下贮存时, 在 28 天中, 所有制剂都未显示逐渐失去活性。甚至新鲜的液体制剂也在该温度下稳定 (图 6)。在 37℃ 下, 新鲜酶到 28 天时基本上失去全部活性, 而添加了油或未添加油的干酶是高度活性的 (图 7)。在 55℃ 下贮存后, 干制剂显示相同的活性回收率, 但在该温度下, 新鲜酶在 7 天内完全无活性 (图 8)。

这些限制酶的制剂提供了切割 DNA 的简便的新方法。把含悬浮的酶粉末的油覆盖在 DNA 溶液上面, 在 Eppendorf 离心机中旋转并离心。

所述酶悬浮液溶于含该 DNA 的水相并在 37℃ 下开始切割。所述油相形成合适的蒸汽屏障，它覆盖消化液而防止蒸发。已经为分子生物学家所熟悉的该方法是聚合酶链反应技术的一个普通部分。处于非吸湿性矿物油载体中的可室温贮存的限制酶构成分子生物学的有价值的、合适的新产品。

说明书附图

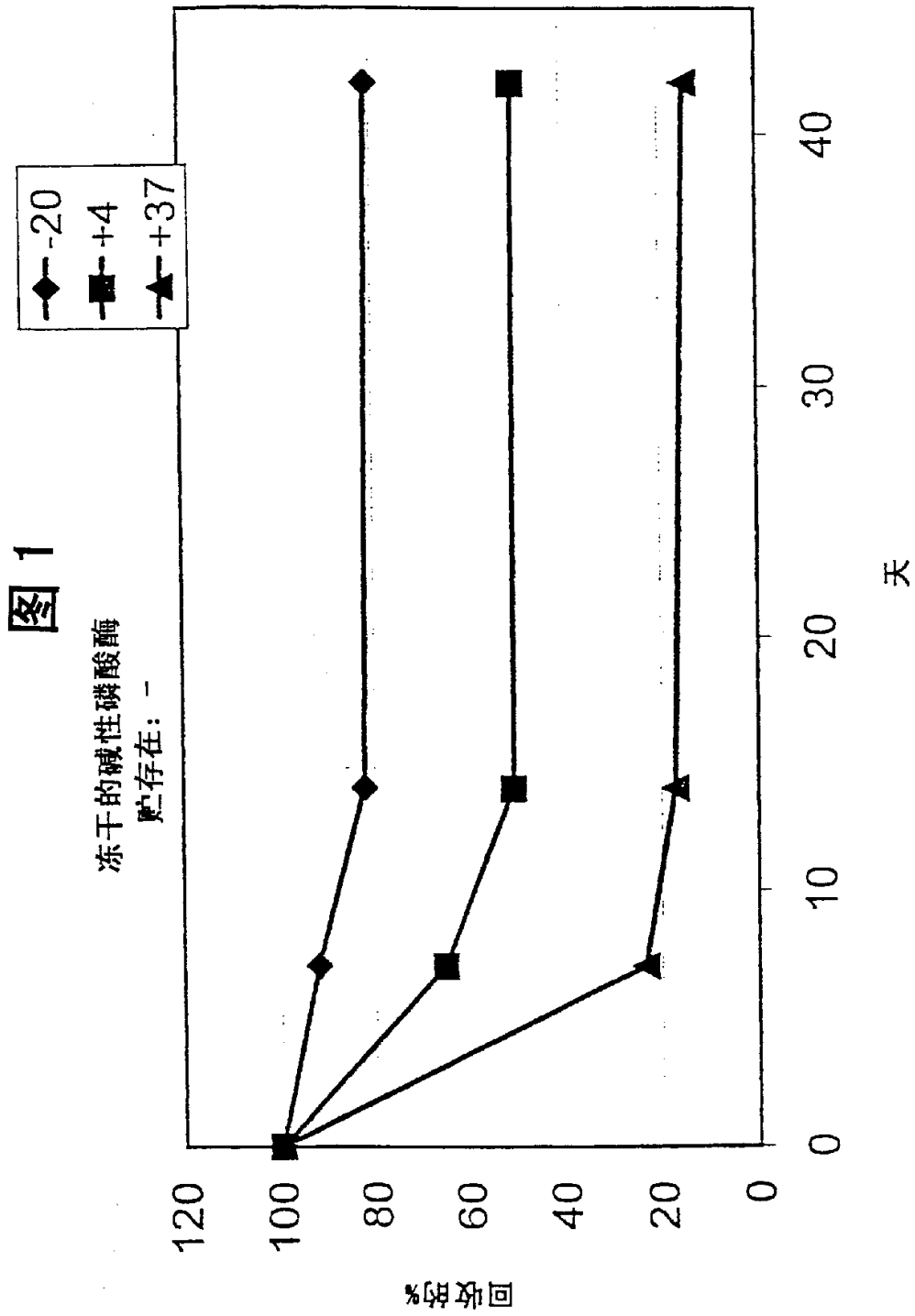


图 2

37°C 下的碱性磷酸酶

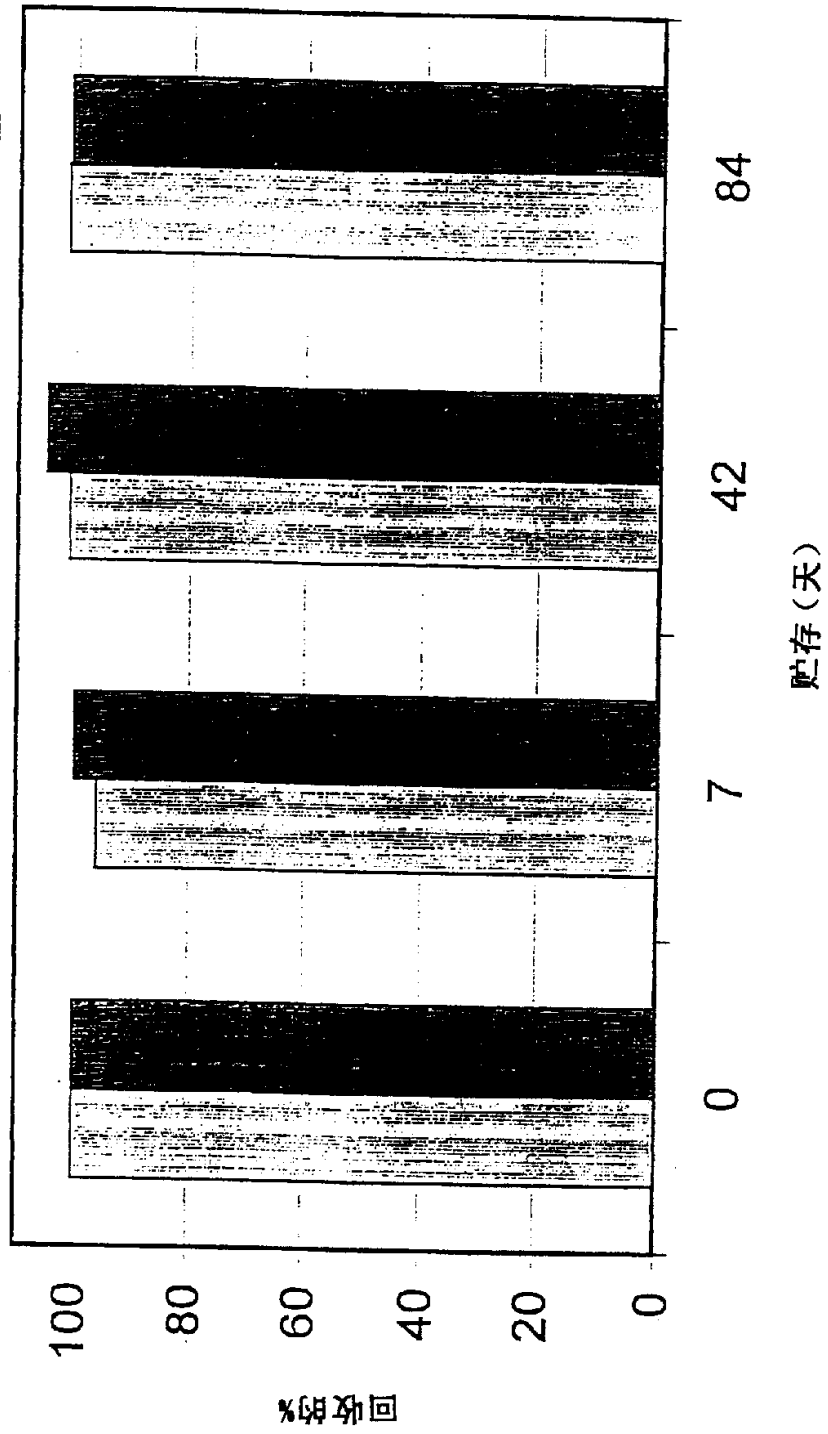
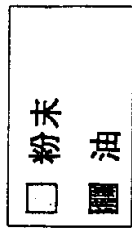
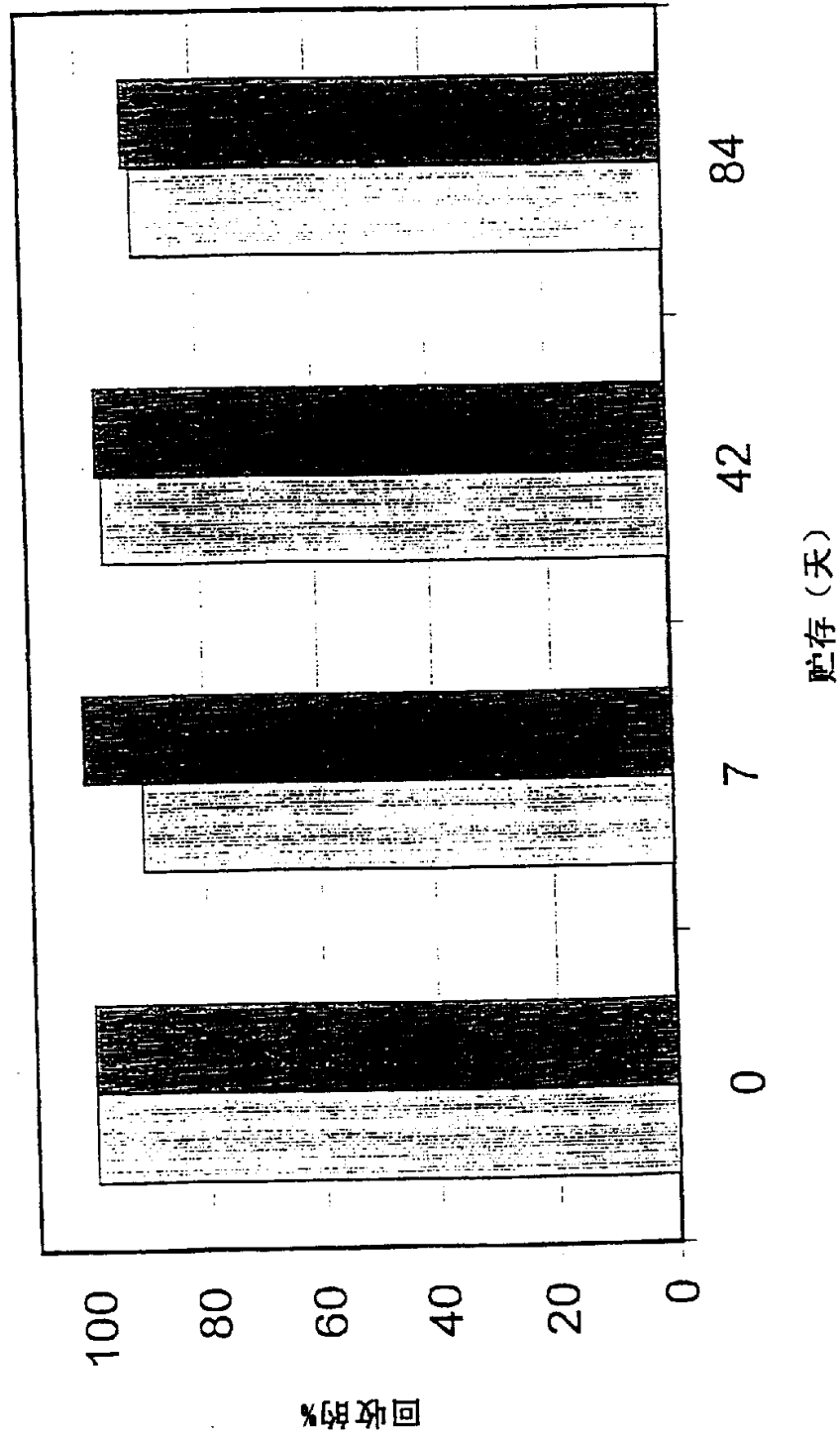
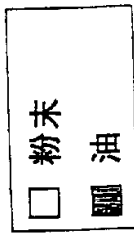
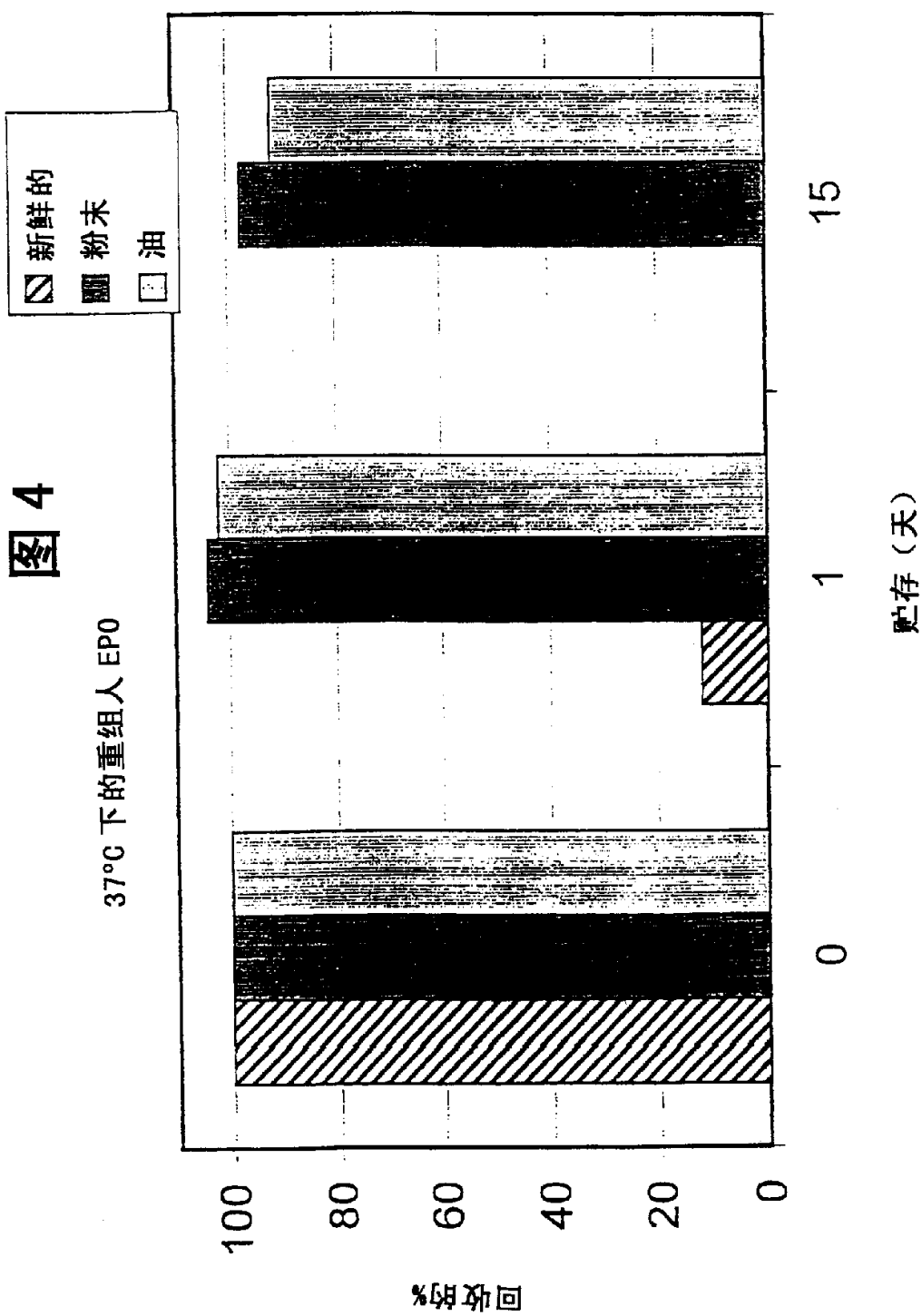


图 3

55°C 下的碱性磷酸酶





99.09.13

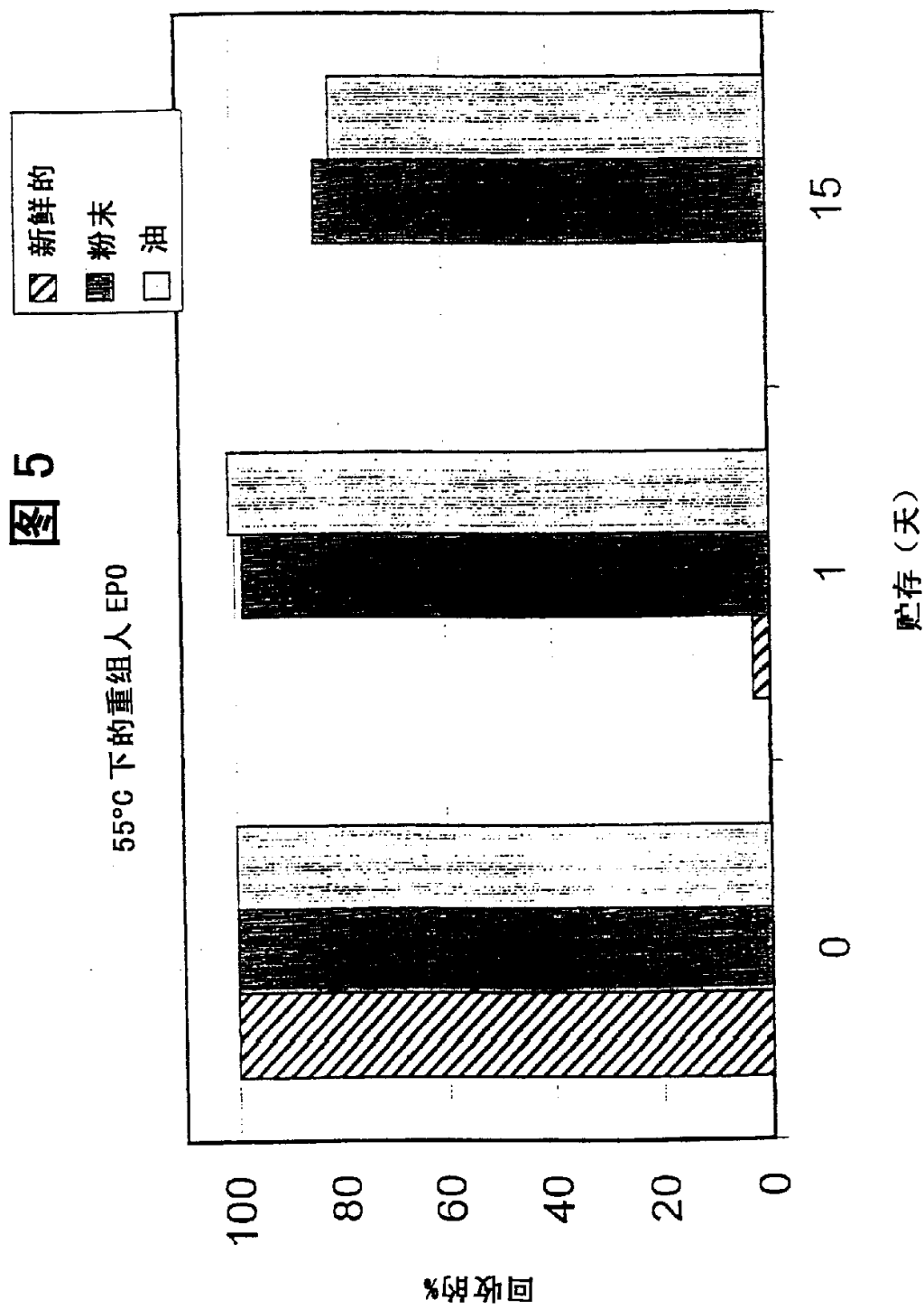


图 6

限制酶 EcoR1 @ 4°C

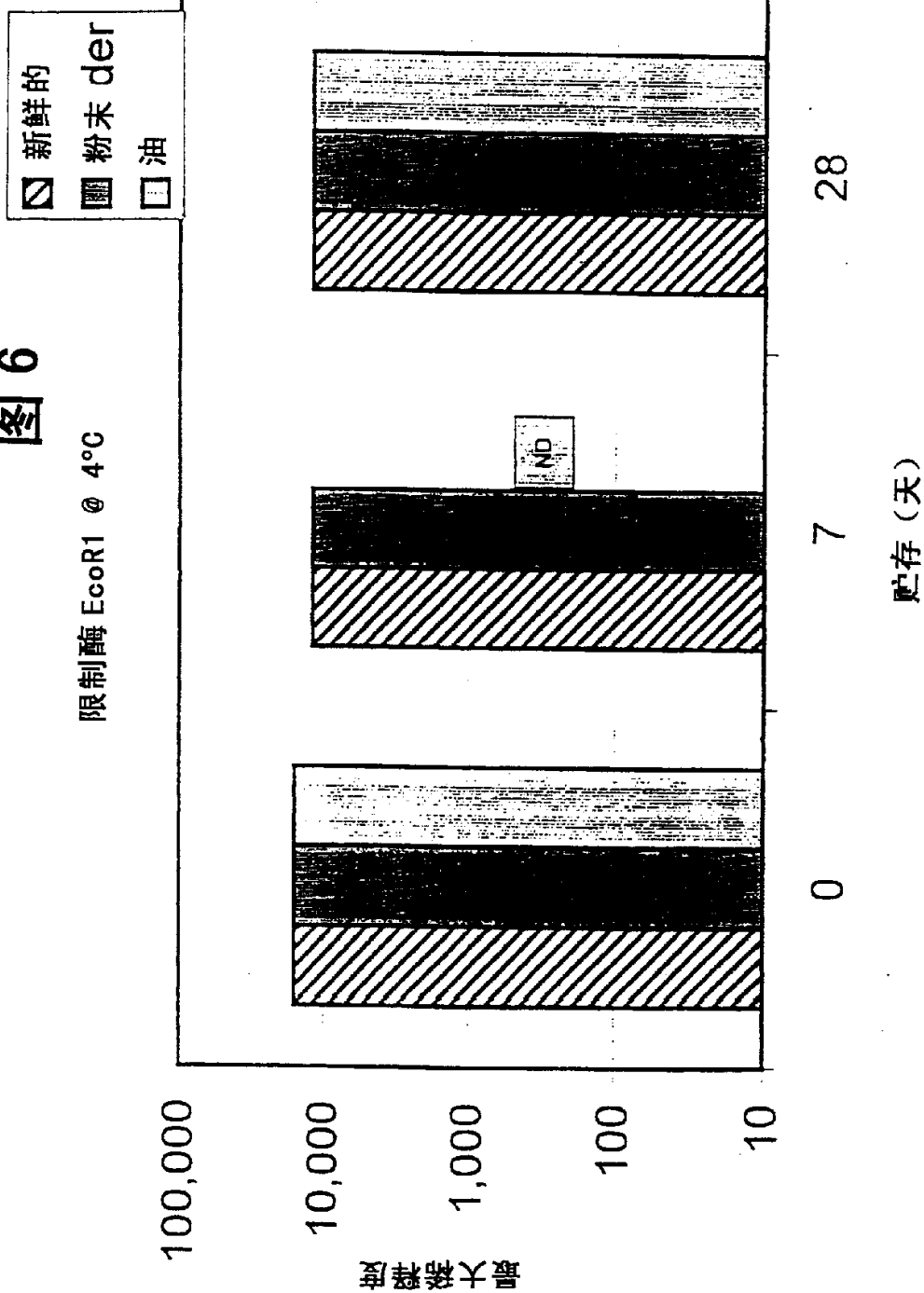


图 7

限制酶 EcoR1 @ 37°C

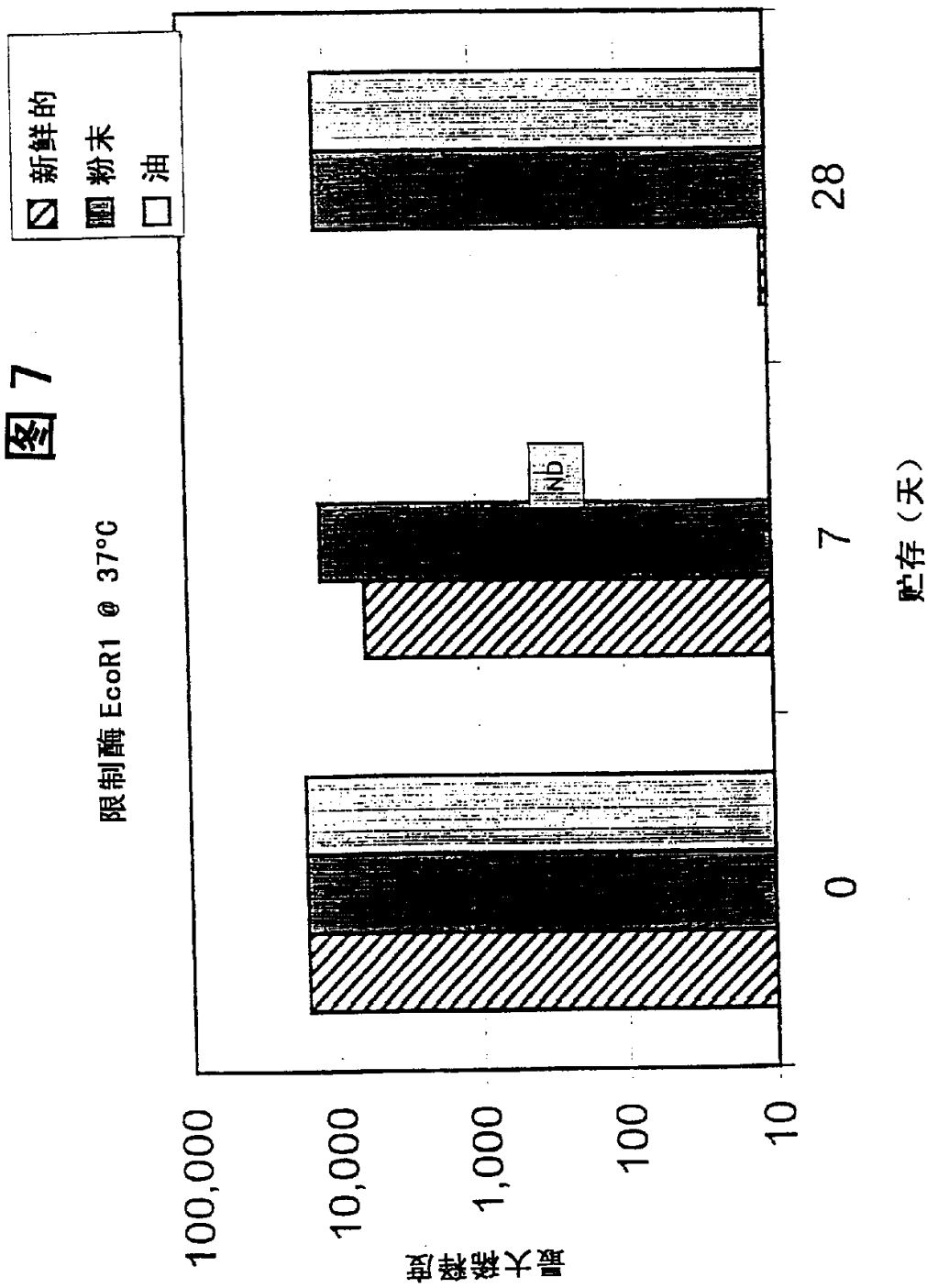


图 8

限制酶 EcoR1 @ 55°C

