[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00817722.8

[51] Int. Cl.
C09K 15/16 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1253528C

[51] Int. Cl. (续)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

[22] 申请日 2000.12.22 [21] 申请号 00817722.8

[30] 优先权

[32] 1999.12.24 [33] JP [31] 368053/99

[86] 国际申请 PCT/JP2000/009163 2000.12.22

[87] 国际公布 WO2001/048117 日 2001.7.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.24

[71] 专利权人 大塚制药株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 山下亲正 小富正昭

审查员 孙 红

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 2 页 说明书 19 页

[54] 发明名称

含疏水氨基酸的干燥组合物

[57] 摘要

本发明提供了可用于减少或防止糖类和氨基酸合用所致着色的氨基酸，以及可作为稳定剂用于含药理活性蛋白性物质的干燥组合物的氨基酸。 本发明还提供了着色抑制剂，其含有疏水氨基酸作为必需成分，适用于防止含糖类干燥组合物着色，提供了其特征在于使用疏水氨基酸防止含糖类干燥组合物着色的方法，还提供了进一步包含糖类及疏水氨基酸稳定剂的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物。

1. 一种防止含糖类干燥组合物着色的方法，包括将亲水性指数不小于 2 的疏水氨基酸加入到所述含糖类和至少一种选自干扰素-α，β，γ或促红细胞生成素的药理活性蛋白性物质的干燥组合物中；

这样使用所述的疏水氨基酸以使其总浓度相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份的糖类，为 0.1 重量份~200 重量份；且

这样使用所述疏水氨基酸以使其总浓度相对于每 100wt.%的干燥组合物总重量，为 0.5wt.%~50wt.%，且

这样使用所述的糖类，以使其总浓度相对于每 100wt%的组合物总重量，为 10wt~90wt%，

其中

亲水性指数不小于 2 的疏水氨基酸是选自缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的至少一种，及

糖类是选自麦芽糖、蔗糖和海藻糖的至少一种。

2. 根据权利要求 1 的防止含糖类干燥组合物着色的方法，其中所述疏水氨基酸是选自亮氨酸和异亮氨酸的至少一种氨基酸。

3. 根据权利要求 1 的防止含糖类干燥组合物着色的方法，其中所述糖类是选自蔗糖和海藻糖的至少一种。

4. 疏水氨基酸在防止含糖类和至少一种选自干扰素-α，β，γ或促红细胞生成素的药理活性蛋白性物质的干燥组合物着色中的应用，所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 2；

这样使用所述的疏水氨基酸以使其总浓度相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份的糖类，为 0.1 重量份~200 重量份；且

这样使用所述疏水氨基酸以使其总浓度相对于每 100wt.%的干燥组合物总重量，为 0.5wt.%~50wt.%，及

这样使用所述的糖类，以使其总浓度相对于每 100wt%的组合物

总重量，为 10wt~90wt%，

其中

亲水性指数不小于 2 的疏水氨基酸是选自缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的至少一种，及

糖类是选自麦芽糖、蔗糖和海藻糖的至少一种。

含疏水氨基酸的干燥组合物

技术领域

本发明涉及减少和/或防止糖类和氨基酸合用所导致的着色的方法。具体而言，本发明提供了（在氨基酸与糖类一同使用的情况下）与糖类结合时具有抗着色效果的氨基酸。本发明还提供了防止因使用氨基酸而导致的着色的方法。

本发明还涉及稳定含药理活性蛋白性物质的干燥组合物的方法。具体而言，本发明涉及其中加入了糖类和氨基酸的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物。

技术领域

在药物组合物中，特别是在含药理活性蛋白性物质作为活性成分的干燥组合物中，蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖等糖类（日本未审查专利公开 1983-92619、1985-48933 和 1990-138222 等）、甘氨酸、丙氨酸等氨基酸（日本未审查专利公开 1983-146504）一般被用作有效作用于所述活性成分的稳定剂。

但众所周知，当这些用作药理活性蛋白性物质的稳定剂的糖类与氨基酸一起使用时，因 Maillard 反应等而导致着色。因此，含糖类和氨基酸的药物组合物的缺陷在于随时间推移而着色。

本发明的一个目的是提供具有抗着色效果的氨基酸，用于减少和/或防止糖类和氨基酸合用所导致的着色。具体而言，本发明提供了抗着色剂，其含有氨基酸作为必需成分，适用于防止含糖类干燥组合物随时间变化而着色。本发明也提供了防止着色的方法，其中使用了所述的氨基酸。

本发明的另一目的是提供一种氨基酸，其可作为稳定剂用于含糖类干燥组合物，特别是含糖类蛋白性干燥组合物。更具体而言，本发明提供了含糖类和氨基酸的干燥组合物。

发明公开

为达到上述目的，本发明人进行了广泛的研究。结果，本发明人发现，在含糖类干燥组合物，特别是含糖类和药理活性蛋白性物质的干燥组合物中，使用特定氨基酸可显著减少和/或防止糖类所造成的着色。他还发现，通过加入特定氨基酸，含有作为稳定剂的糖类的干燥组合物，甚至是含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其稳定性可进一步改善。基于上述发现，本发明得以完成。

换言之，本发明首先涉及使用疏水氨基酸防止糖类和氨基酸合用所导致的着色，具体包括如下实施方式。

1. 抗着色剂

第 1 项. 一种抗着色剂，其含有适用于防止含糖类干燥组合物着色的疏水氨基酸作为必需成分。

第 2 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 2。

第 3 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 3.8。

第 4 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数为 3.8-4.5。

第 5 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述疏水氨基酸是选自缬

氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的至少一种氨基酸。

第 6 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，所述疏水氨基酸含量为 0.1 重量份-200 重量份。

第 7 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述糖类是选自还原糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇和右旋糖 40 的至少一种。

第 8 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中相对于每 100 wt.%干燥组合物总重，所述疏水氨基酸的浓度为 0.1 wt.%-70 wt.%。

第 9 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述干燥组合物是冻干的组合物，其包含药理活性蛋白性物质作为活性成分。

第 10 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述药理活性蛋白性物质是选自抗病毒多肽、免疫调节性多肽和补血性多肽的至少一种物质。

第 11 项. 根据第 1 项的抗着色剂，其中所述药理活性蛋白性物质是干扰素。

2. 防止着色的方法

第 12 项. 一种防止含糖类干燥组合物着色的方法，包括将疏水氨基酸加入所述含糖类干燥组合物中。

第 13 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 2。

第 14 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 3.8。

第 15 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数为 3.8-4.5。

第 16 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述疏水氨基酸是选自缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的至少一种氨基酸。

第 17 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，所述疏水氨基酸含量为 0.1 重量份-200 重量份。

第 18 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述糖类是选自还原糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇和右旋糖 40 的至少一种。

第 19 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中相对于每 100 wt.%干燥组合物总重，所述疏水氨基酸的浓度为 0.1 wt.%-70 wt.%。

第 20 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述干燥组合物是冻干的组合物，其包含药理活性蛋白性物质作为活性成分。

第 21 项. 根据第 20 项的防止着色的方法，其中所述药理活性蛋白性物质是选自抗病毒多肽、免疫调节性多肽和补血性多肽的至少一种物质。

第 22 项. 根据第 12 项的防止着色的方法，其中所述药理活性蛋白性物质是干扰素。

3. 疏水氨基酸的应用

第 23 项. 疏水氨基酸在防止含糖类干燥组合物着色中的应用。

第 24 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 2。

第 25 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 3.8。

第 26 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数为 3.8-4.5。

第 27 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述疏水氨基酸是选自缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的至少一种氨基酸。

第 28 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，所述疏水氨基酸含量为 0.1 重量份-200 重量份。

第 29 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述糖类是选自还原糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇和右旋糖 40 的至少一种。

第 30 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中相对于每 100 wt.%干燥组合物总重，所述疏水氨基酸的浓度为 0.1 wt.%-70 wt.%。

第 31 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述干燥组合物是冻干的组合物，其包含药理活性蛋白性物质作为活性成分。

第 32 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述药理活性蛋白性物质是选自抗病毒多肽、免疫调节性多肽和补血性多肽的至少一种物质。

第 33 项. 根据第 23 项的疏水氨基酸的应用，其中所述药理活性

蛋白性物质是干扰素。

本发明可有效减少或防止含糖类干燥组合物，特别是含糖类和药理活性蛋白性物质的组合物随时间变化而着色。由此，本发明可提供具有优异稳定性的干燥组合物。

其次，本发明涉及以稳定方式含有药理活性蛋白性物质的干燥组合物，所述稳定方式包括防止着色。

4. 干燥组合物

第 34 项. 含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中加入了糖类和疏水氨基酸作为稳定剂。

第 35 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 2。

第 36 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数不小于 3.8。

第 37 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述疏水氨基酸的亲水性指数为 3.8-4.5。

第 38 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述疏水氨基酸是选自缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的至少一种氨基酸。

第 39 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，所述疏水氨基酸含量为 0.1 重量份-200 重量份。

第 40 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述糖类是选自还原糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇和右旋糖 40 的至少一种。

第 41 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中相对于每 100 wt.%干燥组合物总重，所述疏水氨基酸的浓度为 0.1 wt.%-70 wt.%。

第 42 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其是冻干的组合物。

第 43 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述药理活性蛋白性物质是选自抗病毒多肽、免疫调节性多肽和补血性多肽的至少一种物质。

第 44 项. 根据第 34 项的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中所述药理活性蛋白性物质是干扰素。

通过使糖类和疏水氨基酸组合，本发明可提供干燥组合物，该干燥组合物含药理活性蛋白性物质作为活性成分，其即便在干燥（冻干等）完成后和在保存过程中仍处于稳定状态。

发明的最佳实施方式

本发明的抗着色剂包括疏水氨基酸作为必需成分。本发明的抗着色剂可有效防止随时间推移而着色，尤其是在使用含糖类干燥组合物的情况下。

用于本发明的疏水氨基酸是那些亲水性指数(Hydropathy index)是大约 2 或更大的氨基酸（Jack Kyte 和 Russel F. Doolittel, “显示蛋白亲水性的简单方法”（A Simple Method for Displaying the Hydropathic

Character of a Protein.） J. Mol. Biol. 157 (1982): 105-132）。任何具有上述特性的氨基酸均可用于本发明，无论其是否是构成蛋白的氨基酸。所述疏水氨基酸可优选其亲水性指数是大约 2.8 或更大的氨基酸如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸；更优选亲水性指数是大约 3.8 或更大的氨基酸；最优选亲水性指数是大约 3.8-大约 4.5 的氨基酸如缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

用于本发明的疏水氨基酸类可以是二肽、三肽、盐或酰胺形式。疏水氨基酸二肽的例子是亮氨酰-缬氨酸、异亮氨酰-缬氨酸、异亮氨酰-亮氨酸、亮氨酰-甘氨酸等。疏水氨基酸三肽的例子是异亮氨酰-亮氨酰-缬氨酸、亮氨酰-甘氨酰-甘氨酸等。疏水氨基酸盐的例子包括疏水氨基酸与钠、钾等碱金属构成的盐或与钙、镁等碱土金属构成的盐；疏水氨基酸与磷酸、盐酸、氢溴酸等无机酸或与磺酸等有机酸构成的加成盐。更具体的疏水氨基酸盐的例子是 L-亮氨酰胺盐酸盐、L-异亮氨酰-β-萘基酰胺氢溴酸盐、L-缬氨酸-β-萘基酰胺等。

这些疏水氨基酸（包括那些盐或酰胺形式）可单独使用或以任意组合使用。

本发明的抗着色剂靶向糖类，普遍已知所述糖类在与氨基酸组合时因 Maillard 反应而随时间推移导致着色。具体而言，被靶向的糖类包括普遍已知用作干燥药物组合物，特别是含药理活性蛋白性物质的药物组合物的稳定剂的那些糖类。更具体而言，包括葡萄糖、果糖、麦芽糖等还原糖；蔗糖、海藻糖、甘露醇和右旋糖 40 等。这些糖类可单独或以任意组合加入干燥组合物中。在这些糖类中，优选蔗糖和麦芽糖。

干燥组合物中糖类含量根据所含糖类的类型而变化，不能一概而论。但相对于每 100 wt.%干燥组合物，糖类的一般用量是 10 wt.%-90 wt.%，有时为 20 wt.%-80 wt.%，还有时为 40 wt.%-80 wt.%。上述比

率适宜在所用糖类为蔗糖时应用。

干燥组合物中疏水氨基酸含量根据干燥组合物中所含糖类的类型而变化，不能一概而论。但相对于每 100 wt.%干燥组合物，疏水氨基酸的一般含量是约 0.1 wt.%-约 70 wt.%，优选为约 0.25 wt.%-约 60 wt.%，更优选为约 0.5 wt.%-约 50 wt.%，更更优选为约 1 wt.%-约 50 wt.%。

对干燥组合物中所含的疏水氨基酸与糖类之比没有限制。但氨基酸用量，相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，一般为约 0.1 重量份-约 200 重量份，优选为约 0.2 重量份-约 100 重量份，更优选为约 1 重量份-约 100 重量份。

其中可使用本发明抗着色剂的干燥组合物包括含药理活性蛋白性物质作为活性成分的组合物。

对使用的药理活性蛋白性物质没有限制，只要其是药理上有效的蛋白或肽（包括多肽）即可。药理活性蛋白性物质的例子是酶、血红蛋白、免疫球蛋白、激素、血液凝集因子等蛋白；抗病毒多肽（如干扰素-α、干扰素-β、干扰素-γ等）、免疫调节性多肽（如白介素-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 等）、补血性多肽（如促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子）等多肽等等。蛋白和肽可单独或以任意组合包含在干燥组合物中。在这些药理活性蛋白性物质中，优选干扰素。

上述蛋白和肽包括那些天然存在、由重组 DNA 技术产生或化学合成的蛋白和肽。

对药理活性蛋白性物质与干燥组合物的比例没有限制。药理活性蛋白性物质用量根据所用类型而变化；但其浓度的具体例子为，相对

于每 100 wt.%干燥组合物，一般是不大于 20 wt.%，有时为 0.00001 wt.%-10 wt.%，有时为 0.0001 wt.%-10 wt.%，有时为 0.001 wt.%-10 wt.%，有时为 0.001 wt.%-5 wt.%。

其中使用本发明抗着色剂的干燥组合物可进一步包含人血清白蛋白、极性氨基酸或其盐（如亲水性指数不大于 0 的氨基酸或其盐）、无机盐、明胶、表面活性剂、缓冲液等。

本发明抗着色剂的用法不受限制，只要将它们用于上述干燥组合物即可。优选在制备干燥组合物（干燥产品）之前（即，干燥前）将抗着色剂加入含糖类和/或药理活性蛋白性物质的溶液中，或者将抗着色剂与糖类和/或药理活性蛋白性物质一起混入溶液中。

对抗着色剂与干燥组合物的比例没有限制。但相对于每 100 wt.%干燥组合物，疏水氨基酸一般是约 0.1 wt.%-约 70 wt.%，优选为约 0.25 wt.%-约 60 wt.%，更优选为约 0.5 wt.%-约 50 wt.%，更更优选为约 1 wt.%-约 50 wt.%。

相对于干燥组合物中所含的每 100 重量份糖类，疏水氨基酸的含量一般为约 0.1 重量份-约 200 重量份，优选为约 0.2 重量份-约 100 重量份，更优选为约 1 重量份-约 100 重量份。

本发明涉及防止含糖类干燥组合物着色的方法，包括使用疏水氨基酸。疏水氨基酸、糖类、干燥组合物的具体例子以及疏水氨基酸的用法如上所述。

此外，本发明还提供了疏水氨基酸作为稳定剂的用途。疏水氨基酸在与糖类组合时适宜用作稳定剂，并且特别有效地用作含药理活性蛋白性物质的干燥组合物的稳定剂。

本发明还涉及含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，其中使用了由疏水氨基酸和糖类组成的稳定剂。

对本发明中所用糖类没有限制，可包括普遍用作干燥药物组合物、特别是含药理活性蛋白性物质的干燥组合物的稳定剂或起该稳定剂作用的糖类。具体例子是蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖等二糖；甘露醇、木糖醇等糖醇；右旋糖 40、右旋糖 70；硫酸软骨素等多糖。这些糖类可单独或以任意组合加入干燥组合物中。在这些糖类中，优选蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖等二糖，更优选蔗糖。

对被靶向的干燥组合物中的糖类含量没有限制，但是，相对于每 100 wt.%干燥组合物，一般可以是约 10 wt.%-约 90 wt.%，有时为约 20 wt.%-约 80 wt.%，还有时为约 40 wt.%-约 80 wt.%。上述比率适宜在使用蔗糖等二糖时应用。

对干燥组合物中疏水氨基酸含量没有限制，但是，相对于每 100 wt.%干燥组合物，一般是约 0.1 wt.%-约 70 wt.%，优选为约 0.25 wt.%-约 60 wt.%，更优选为约 0.5 wt.%-约 50 wt.%，更更优选为约 1 wt.%-约 50 wt.%。干燥组合物中所含的疏水氨基酸与糖类之比如下，相对于每 100 重量份糖类，疏水氨基酸一般为约 0.1 重量份-约 200 重量份，优选为约 0.2 重量份-约 100 重量份，更优选为约 1 重量份-约 100 重量份。

实施例

下文将参照实施例对本发明进行更详细的描述。但本发明的范围并不局限于这些实施例。

实施例 1-3

在各实施例中，制备了混合物，使其每管（1 ml 容量）含 0.25 ml 干扰素-α母液（下文称为“IFN-α母液”；效价：2×10^7 IU/ml）、1 mg

吐温 80、5 mg 蔗糖和 5 mg 氨基酸（异亮氨酸（实施例 1）、缬氨酸（实施例 2）或亮氨酸（实施例 3））。加入适量注射用蒸馏水以使这些物质溶解。使用棚状冻干机（LYOVAC GT-4：LEYBOLD）将所述混合物冻干。将所得冻干的组合物在 70℃下静置。随时间推移观察冻干组合物的着色程度及效价，然后通过所测 IFN-α活性与冻干后即刻测得的组合物 IFN-α活性（100%）的比率来估计剩余的 IFN-α活性。作为比较，使用 5 mg 甘氨酸（比较例 1）或盐酸精氨酸（比较例 2）作为氨基酸来评价着色。此外，为评价 IFN-α的稳定性，进行实验，除了使用不添加氨基酸的体系外，该实验方法与上述方法相同（比较例 3）。包括实施例和比较例中所得组合物的着色度和 IFN-α稳定性在内的结果如表 1 和表 2 所显示。

表 1

	配方	氨基酸的 HP 指数	着色（70℃）		
			第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	1. IFN-α+蔗糖+异亮氨酸	4.5	-	-	-
	2. IFN-α+蔗糖+缬氨酸	4.2	-	-	-
	3. IFN-α+蔗糖+亮氨酸	3.8	-	-	-
比较例	1. IFN-α+蔗糖+甘氨酸	-0.4	-	+	++
	2. IFN-α+蔗糖+盐酸精氨酸	-4.5	-	+	++

着色评价：

- \- 没有观察到着色
- ± 观察到微量着色
- \+ 观察到少量着色
- ++ 观察到大量着色

+++ 观察到深度着色

表 2

	配方	剩余 IFN-α活性（%）		
		第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	1. IFN-α+蔗糖+异亮氨酸	100.0	71.6	51.8
	2. IFN-α+蔗糖+缬氨酸	100.0	59.2	47.1
	3. IFN-α+蔗糖+亮氨酸	100.0	75.6	72.3
比较例	1. IFN-α+蔗糖	100.0	48.6	38.7

如表 1 所示，蔗糖与甘氨酸合用以及蔗糖与盐酸精氨酸合用造成冻干组合物随时间推移而产生着色。蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。此外，如表 2 所示，与单独使用蔗糖的稳定性相比，在合用蔗糖和亲水性指数（HP 指数）为 3.8 或更大的疏水氨基酸时，IFN-α稳定性得以改善。

实施例 4-6

在各实施例中，制备了混合物，使其每管（1 ml 容量）含 0.25 ml IFN-α母液（效价：2×10^7 IU/ml）、1 mg 吐温 80、5 mg 麦芽糖和 5 mg 氨基酸（异亮氨酸（实施例 4）、缬氨酸（实施例 5）或亮氨酸（实施例 6））。加入适量注射用蒸馏水以使这些物质溶解。使用棚状冻干机（LYOVAC GT-4：LEYBOLD）将所述混合物冻干。将所得冻干的组合物在 70℃下静置。随时间推移观察冻干组合物的着色程度。作为比较，使用 5 mg 甘氨酸（比较例 4）或盐酸精氨酸（比较例 5）作为氨基酸来评价着色，并以与上述相同的方式进行实验。实施例和比较例的结果如表 3 所显示。

表 3

	配方	氨基酸的 HP 指数	着色（70℃）		
			第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	4. IFN-α+麦芽糖 +异亮氨酸	4.5	-	-	-
	5. IFN-α+麦芽糖 +缬氨酸	4.2	-	-	-
	6. IFN-α+麦芽糖 +亮氨酸	3.8	-	-	-
比较例	4. IFN-α+麦芽糖 +甘氨酸	-0.4	-	++	+++
	5. IFN-α+麦芽糖 +盐酸精氨酸	-4.5	-	++	+++

着色评价：

- - 没有观察到着色
- ± 观察到微量着色
- \+ 观察到少量着色
- ++ 观察到大量着色
- +++ 观察到深度着色

如表 3 所示，麦芽糖与甘氨酸合用以及麦芽糖与盐酸精氨酸合用造成冻干组合物随时间推移而产生着色。麦芽糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 7-9

在各实施例中，制备了混合物，使其每管（1 ml 容量）含 0.25 ml IFN-α母液（效价：2×10^7 IU/ml）、1 mg 吐温 80、5 mg 海藻糖和 5 mg 氨基酸（异亮氨酸（实施例 7）、缬氨酸（实施例 8）或亮氨酸（实施例 9））。加入适量注射用蒸馏水以使这些物质溶解。使用棚状冻干机（LYOVAC GT-4：LEYBOLD）将所述混合物冻干。将所得冻干

的组合物在 70℃下静置。随时间推移观察冻干组合物的效价，然后通过所测 IFN-α活性与冻干后即刻测得的组合物 IFN-α活性（100%）的比率来估计剩余的 IFN-α活性。为评价 IFN-α稳定性，进行实验作为比较，除了使用不添加氨基酸的体系外，该实验方法与上述方法相同（比较例 6）。实施例和比较例的结果如表 4 所显示。

表 4

	配方	剩余 IFN-α活性（%）		
		第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	7. IFN-α+海藻糖+异亮氨酸	100.0	61.5	58.9
	8. IFN-α+海藻糖+缬氨酸	100.0	61.5	56.9
	9. IFN-α+海藻糖+亮氨酸	100.0	72.7	63.0
比较例	6. IFN-α+海藻糖	100.0	39.2	28.4

如表 4 所示，与单独使用海藻糖时的稳定性相比，在海藻糖和亲水性指数（HP 指数）为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用时，IFN-α稳定性得以改善。

实施例 10-12

在各实施例中，制备了混合物，使其每管（1 ml 容量）含 0.25 ml IFN-α母液（效价：2×10^7 IU/ml）、1 mg 吐温 80、40 mg 蔗糖和 5 mg 氨基酸（异亮氨酸（实施例 10）、缬氨酸（实施例 11）或亮氨酸（实施例 12））。加入适量注射用蒸馏水以使这些物质溶解。使用棚状冻干机（LYOVAC GT-4：LEYBOLD）将所述混合物冻干。将所得冻干的组合物在 70℃下静置。随时间推移观察冻干组合物的着色程度。作为比较，使用 5 mg 甘氨酸（比较例 7）或盐酸精氨酸（比较例 8）作为氨基酸来评价着色，并以与上述相同的方式进行实验。实施例和比较例的结果如表 5 所显示。

表 5

	配方	氨基酸的 HP 指数	着色（70℃）		
			第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	10. IFN-α+蔗糖+异亮氨酸	4.5	-	-	-
	11. IFN-α+蔗糖+缬氨酸	4.2	-	-	-
	12. IFN-α+蔗糖+亮氨酸	3.8	-	-	-
比较例	7. IFN-α+蔗糖+甘氨酸	-0.4	-	+	++
	8. IFN-α+蔗糖+盐酸精氨酸	-4.5	-	+	++

着色评价：

- - 没有观察到着色
- ± 观察到微量着色
- \+ 观察到少量着色
- ++ 观察到大量着色
- +++ 观察到深度着色

如表 5 所示，蔗糖与甘氨酸合用以及蔗糖与盐酸精氨酸合用造成冻干组合物随时间推移而产生着色。蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可显著防止冻干组合物着色。

实施例 13-15

除了用 0.25 ml IFN-β母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 1-3 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 1-3，合用蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸可防止冻干组合物着色。

实施例 16-18

除了用 0.25 ml IFN-β母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 10-12 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 10-12，蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 19-21

除了用 0.25 ml IFN-γ母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 1-3 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 1-3，蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 22-24

除了用 0.25 ml IFN-β母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 10-12 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 10-12，蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 25-27

除了用 0.25 ml 促红细胞生成素母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 1-3 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 1-3，蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 28-30

除了用 0.25 ml 促红细胞生成素母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）代替 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）外，以与实施例 10-12 相同的方式获得冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置，随时间推移观察其着色程度。结果显示，如同实施例 10-12，蔗糖与亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸合用可防止冻干组合物着色。

实施例 31-33

制备 1 管（1 ml 容量）混合物溶液，使其含 0.25 ml IFN-α母液（效价：2 x 10^7 IU/ml）、40 mg 蔗糖和两种氨基酸各 5 mg（甘氨酸+异亮氨酸（实施例 31）、甘氨酸+缬氨酸（实施例 32）或甘氨酸+亮氨酸（实施例 33））。加入适量注射用蒸馏水以使这些物质溶解。然后以与实施例 10-12 相同的方式冷冻干燥，得到冻干组合物。将所得冻干的组合物在 70℃下静置。随时间推移观察冻干组合物的着色程度。作为比较，除只使用 5 mg 甘氨酸（比较例 7）作为氨基酸来外，以与上述相同的方式进行实验。实施例和比较例的结果如表 6 所显示。

表 6

	配方	氨基酸的 HP 指数	着色（70℃）		
			第 0 周	第 1 周	第 2 周
实施例	31. IFN-α+蔗糖+甘氨酸+异亮氨酸	4.5	-	-	-
	32. IFN-α+蔗糖+甘氨酸+缬氨酸	4.2	-	-	-
	33. IFN-α+蔗糖+甘氨酸+亮氨酸	3.8	-	-	-
比较例	7. IFN-α+蔗糖+甘氨酸	-0.4	-	+	++

着色评价：

- 没有观察到着色

± 观察到微量着色

+ 观察到少量着色

++ 观察到大量着色

+++ 观察到深度着色

如表 6 所示，含蔗糖与甘氨酸的冻干组合物随时间推移而产生着色。但除蔗糖和甘氨酸外还使用亲水性指数为 3.8 或更大的疏水氨基酸可显著防止冻干组合物着色。

工业实用性

本发明的抗着色剂可显著减少和/或防止因糖类和氨基酸合用所导致的干燥组合物着色。该抗着色剂对于防止含糖类和药理活性蛋白性物质的干燥组合物着色是特别有用的。基于另一观点，所述抗着色剂还可用作含糖类和药理活性蛋白性物质的干燥组合物的稳定剂。因此，本发明提供了含药理活性蛋白性物质和抗着色剂或稳定剂的干燥组合物，即，其中加入了糖类和氨基酸的含药理活性蛋白性物质的干燥组合物，该组合物具有优异的稳定性，根据随时间推移所观察到的，其显著防止着色并防止活性降低。