



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110141561 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201810271022.X *A61K 47/26*(2006.01)

(22)申请日 2018.03.29 *A61K 47/10*(2006.01)

(71)申请人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院 *A61K 47/18*(2006.01)  
*A61P 31/00*(2006.01)

地址 100071 北京市丰台区东大街20号五  
所九室

(72)发明人 焦周光 杨文慧 周冬生 孙岩松  
邱业峰 高波 法云智 杨慧盈  
冯俊霞 赵月娥 于学东 殷喆  
熊小路 焦俊 靳爱军 胡凌飞

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.  
*A61K 9/72*(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种可气溶胶化蛋白干粉吸入剂的制备技术

(57)摘要

本发明公开一种可气溶胶化蛋白干粉吸入剂的制备技术。本发明提供了一种用于制备干粉吸入制剂的试剂,包括溶质,所述溶质由药物、甘露醇、冻干保护剂和分散剂组成;所述冻干保护剂为肌醇、海藻糖和右旋糖酐-40中至少一种;所述分散剂由亮氨酸和泊洛沙姆组成;再将该试剂采用喷雾冷冻干燥(SFD)技术,制备粒径适宜的干粉吸入制剂。该干粉制剂以固体粉末形式保存和运输,保存和运输时要注意防潮,过于潮湿时会影响干粉气溶胶发生效果。该干粉制剂易溶于水,吸湿性不强,含水量较低,制备过程中蛋白活力损失小,发生出的干粉气溶胶可以较好的沉积于下呼吸道和肺部,用于呼吸免疫或呼吸给药能发挥理想的效果。

1. 一种用于制备干粉吸入制剂的试剂,包括溶质,  
所述溶质由药物、甘露醇、冻干保护剂和分散剂组成;  
所述冻干保护剂为肌醇、海藻糖和右旋糖酐-40中至少一种;  
所述分散剂由亮氨酸和泊洛沙姆组成。
2. 根据权利要求1所述的试剂,其特征在于:  
所述药物、所述甘露醇、所述冻干保护剂、所述亮氨酸和所述泊洛沙姆的配比为0.05-0.15g:1g:1-1.5g:0.5-1g:0.05ml;  
或,所述冻干保护剂为肌醇和海藻糖,所述肌醇和所述海藻糖的质量比为1:1;  
或,所述冻干保护剂为肌醇和右旋糖酐-40,所述肌醇和所述右旋糖酐-40的质量比为1:0.5。
3. 根据权利要求1或2所述的试剂,其特征在于:  
所述试剂还包括溶剂,  
所述试剂由所述溶质和所述溶剂组成;  
所述药物在所述试剂中的质量体积百分含量为0.05-0.15%;  
所述甘露醇在所述试剂中的质量体积百分含量为1%;  
所述冻干剂在所述试剂中的质量体积百分含量为1-1.5%;  
所述肌醇在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;  
所述海藻糖在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;  
所述右旋糖酐-40在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5%;  
所述亮氨酸在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;  
所述泊洛沙姆在所述试剂中的体积百分含量为0.05%。
4. 根据权利要求1-3中任一所述的试剂,其特征在于:  
所述药物为蛋白或其他化学分子;  
所述蛋白为抗原或蛋白酶;  
和/或,所述蛋白酶具体为胰蛋白酶。
5. 一种干粉吸入制剂,为将权利要求1-4中任一所述的试剂制备为干粉,得到干粉吸入制剂。
6. 根据权利要求5所述的干粉吸入制剂,其特征在于:所述干粉吸入制剂的空气动力学质量中值直径为1-5 $\mu\text{m}$ ;  
或所述制备方法为喷雾冷冻干燥法;  
或所述喷雾冷冻干燥法采用的喷雾头为二流体喷雾头,供气压力为0.1-0.2MPa,供液速率为4-8mL/min。
7. 根据权利要求5或6所述的干粉吸入制剂,其特征在于:所述干粉吸入制剂的的粒径范围为1 $\mu\text{m}$ -25 $\mu\text{m}$ 。
8. 一种制备权利要求5-7中任一所述干粉吸入制剂的方法,包括如下步骤:
  - 1) 制备权利要求1-4中任一所述的试剂;
  - 2) 将所述试剂采用喷雾冷冻干燥法制备干粉吸入制剂。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:  
所述喷雾冷冻干燥方法采用的喷雾头为二流体喷雾头,供气压力为0.1-0.2MPa,供液

速率为4-8mL/min。

10. 权利要求5-7中任一所述干粉吸入制剂在制备人或动物疫苗或治疗人或动物疾病产品中的应用。

## 一种可气溶胶化蛋白干粉吸入剂的制备技术

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种可气溶胶化蛋白干粉吸入剂的制备技术。

### 背景技术

[0002] 大多数烈性病原体可经气溶胶吸入感染,主要感染部位是呼吸道和肺,相比其它感染途径传播速度更快。疫苗通过传统的经皮或经肌肉注射接种,呼吸道和肺部黏膜免疫应答相对缺乏,故而对气溶胶吸入感染的免疫保护效果较差。气溶胶化的疫苗干粉经肺吸入免疫接种后不仅诱导适应性免疫应答,还可诱导传统免疫接种途径欠缺的呼吸道和肺部黏膜免疫应答,故而可明显提高吸入感染防护效果。此外,临床上某些感染性疾病和哮喘等的给药也常通过呼吸道给药的方式来进行治疗,这种给药方式可以使药物直达病灶,从而更好的发挥作用。

[0003] 相比病原体的其他感染途径,气溶胶吸入感染传播速度更快,病程发展更迅速,病情更严重,因此大多数经气溶胶吸入感染机体的烈性病原体常被视为生物战剂与生物恐怖剂。疫苗接种是防御生物战剂与生物恐怖剂的重要手段,但传统的经皮或经肌肉注射接种,与直接肺部免疫接种相比,缺乏呼吸道和肺部黏膜免疫应答,对气溶胶吸入感染的免疫保护效果较差,因此肺部免疫接种被认为是针对气溶胶感染的重要免疫途径。有研究表明粉剂较液剂能引发更强的黏膜免疫反应,原因可能是液态疫苗被递送入肺后很快被黏膜系统的清除运动排出体外,而干粉疫苗被递送入肺后在局部的黏附力较好,从而延缓了黏膜对其清除速度。气溶胶化的疫苗干粉经肺吸入免疫接种后不仅诱导全身免疫应答,通常还可诱导传统免疫接种途径欠缺的呼吸道和肺部黏膜免疫应答,因而相比于传统免疫接种方法,气溶胶化的疫苗干粉对吸入感染防护效果可起到更好或相等的作用。可气溶胶化的吸入型干粉疫苗制剂是可以直接用于呼吸道免疫的一种疫苗制剂,理想的疫苗干粉通常具有含水量低、吸湿性差、分散性好、性质稳定、易于运输等优点。

[0004] 制备疫苗干粉制剂涉及到液态样品的干燥。目前常用的干燥技术有冷冻干燥和喷雾干燥等。冷冻干燥得到的饼状产品通常通过机械研磨来获得粉状产品,产品粒径分布范围广,且研磨时产生的热量会造成产品质量降低。喷雾干燥将直接雾化的样品在与热气体介质接触的过程中蒸发溶剂,从而得到干燥粉末,但医药产品中的活性成分常因不耐热而遭到破坏。喷雾冷冻干燥法结合了上述两种干燥方法的优点,同时又克服它们的不足。喷雾冷冻干燥过程一般包含下列3个步骤:①利用特殊设计的雾化器把需要干燥的液体样品雾化成为细小的雾滴;②通过低温气体或者液体把上述的雾滴快速冷却和冻结,形成冻结的粉末;③通过升华原理,对上述冻结粉末进行真空冷冻干燥,最终获得粉末状的干燥成品。

[0005] 研究表明空气动力学直径 $7\mu\text{m}$ 以下的颗粒物可进入咽喉, $5\mu\text{m}$ 以下的颗粒物可进入呼吸道的深部, $2.5\mu\text{m}$ 以下的粒子可深达肺泡并沉积。

### 发明内容

- [0006] 本发明的一个目的是提供一种用于制备干粉吸入制剂的试剂。
- [0007] 本发明提供的试剂,包括溶质,
- [0008] 所述溶质由药物、甘露醇、冻干保护剂和分散剂组成;
- [0009] 所述冻干保护剂为肌醇、海藻糖和右旋糖酐-40中至少一种;
- [0010] 所述分散剂由亮氨酸和泊洛沙姆组成。
- [0011] 上述试剂中,
- [0012] 所述药物、所述甘露醇、所述冻干保护剂、所述亮氨酸和所述泊洛沙姆的配比为0.05-0.15g:1g:1-1.5g:0.5-1g:0.05ml;
- [0013] 或,所述冻干保护剂为肌醇和海藻糖,所述肌醇和所述海藻糖的质量比为1:1;
- [0014] 或,所述冻干保护剂为肌醇和右旋糖酐-40,所述肌醇和所述右旋糖酐-40的质量比为1:0.5。
- [0015] 上述试剂中,
- [0016] 所述试剂还包括溶剂,溶液的溶剂可以是去离子水、超纯水、蒸馏水等。
- [0017] 所述试剂由所述溶质和所述溶剂组成;
- [0018] 所述药物在所述试剂中的质量体积百分含量为0.05-0.15%;
- [0019] 所述甘露醇在所述试剂中的质量体积百分含量为1%;
- [0020] 所述冻干剂在所述试剂中的质量体积百分含量为1-1.5%;
- [0021] 所述肌醇在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;
- [0022] 所述海藻糖在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;
- [0023] 所述右旋糖酐-40在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5%;
- [0024] 所述亮氨酸在所述试剂中的质量体积百分含量为0.5-1%;
- [0025] 所述泊洛沙姆在所述试剂中的体积百分含量为0.05%。
- [0026] 上述试剂中,
- [0027] 所述药物为蛋白或其他化学分子;
- [0028] 所述蛋白为抗原或蛋白酶;抗原蛋白包括各种有治疗作用或刺激免疫反应的蛋白。
- [0029] 和/或,所述蛋白酶具体为胰蛋白酶。
- [0030] 本发明另一个目的是提供一种干粉吸入制剂。
- [0031] 本发明提供的干粉吸入制剂,为将上述的试剂制备为干粉,得到干粉吸入制剂。
- [0032] 上述干粉吸入制剂的空气动力学质量中值直径为1-5 $\mu\text{m}$ 。
- [0033] 或所述制备方法为喷雾冷冻干燥法;
- [0034] 或所述喷雾冷冻干燥法采用的喷雾头为二流体喷雾头,供气压力为0.1-0.2MPa,供液速率为4-8mL/min。
- [0035] 上述干粉吸入制剂的粒径范围为1 $\mu\text{m}$ -25 $\mu\text{m}$ 。
- [0036] 本发明第3个目的是提供一种制备上述干粉吸入制剂的方法。
- [0037] 本发明提供的方法,包括如下步骤:
- [0038] 1) 制备上述的试剂;
- [0039] 2) 将所述试剂采用喷雾冷冻干燥法制备干粉吸入制剂。
- [0040] 上述方法中,

[0041] 所述喷雾冷冻干燥方法采用的喷雾头为二流体喷雾头,供气压力为0.1-0.2MPa,供液速率为4-8mL/min。

[0042] 上述干粉吸入制剂在制备人或动物疫苗或治疗人或动物疾病产品中的应用也是本发明保护的范畴。

[0043] 通常用于吸入的药物空气动力学粒径保持在1-5 $\mu\text{m}$ 才能有较好的到达肺部率并发挥药效,直径5 $\mu\text{m}$ 以下的颗粒物可进入呼吸道的深部,直径2.5 $\mu\text{m}$ 左右的颗粒物可以深达肺泡并沉积,并且相对来说,颗粒物粒径越大,其携带的有效药物量也越大,因此直径2.5 $\mu\text{m}$ 左右的颗粒物是较佳的选择。质量中值直径通常可以较好的代表颗粒物的分布特征。本发明的新型干粉吸入制剂制备技术,制备出来的固体干粉粒子其空气动力学质量中值直径在1-5 $\mu\text{m}$ 之间,可以较好的沉积于肺部。

[0044] 为补充现有微生物感染相关疫苗制剂或呼吸给药药物,发明人发明了一种新型的干粉吸入制剂制备技术,该干粉吸入制剂制备技术采用将药物或抗原蛋白和免疫佐剂、几种赋形剂的溶液混合均匀后,对混合溶液采用SFD技术,制备粒径适宜的固体干粉粒子,密封保存;使用前,将固体干粉装入干粉气溶胶发生器,对受体发生可吸入的干粉气溶胶,人或动物通过呼吸将药物吸入呼吸道和肺。

[0045] 本发明所述的新型干粉吸入制剂,使用前,根据接受者不同,将适量固体粉末装入适宜的干粉气溶胶发生器发生干粉气溶胶。接受者通过呼吸作用将干粉吸入,从而达到免疫刺激或者疾病治疗的目的或效果。

[0046] 本发明所述的新型干粉吸入制剂,以固体粉末形式保存和运输,保存时注意防潮。配方不同,则固体干粉的含水量和吸水能力不同。制备出来的干粉粒子分散性较好,疏松多孔,易溶于水,易气溶胶化,空气动力学粒径较小,适宜用作呼吸用疫苗或呼吸用药物。

[0047] 本研究旨在制备可气溶胶化蛋白干粉吸入剂。其中,目的蛋白包裹在赋形剂基质中,干粉吸入剂的空气动力学质量中值直径在1~5 $\mu\text{m}$ 之间,粒子疏松多孔,粒径分布较均匀。本研究通过喷雾冷冻干燥技术最终制备的干粉吸入剂空气动力学质量中值直径在2.5 $\mu\text{m}$ 左右,可以较好的沉积于靶器官从而刺激机体的免疫应答。

[0048] 本发明制备的干粉吸入制剂其空气动力学质量中值直径在2.5 $\mu\text{m}$ 左右,可以较好的沉积于靶器官从而刺激机体的免疫应答或发挥药物效果。而且,制备成功后为固体干粉状颗粒物,含水量低,吸湿能力弱,分散性(圆球状颗粒,粒径较小),相对于液体制剂干粉制剂更易于运输,利于保存,水溶解性好,具有较好的呼吸免疫或呼吸给药前景。

## 附图说明

[0049] 图1是实施例1-例5的干粉吸入制剂的粉末形态。

[0050] 图2是实施例1-例5的干粉吸入制剂中间50%颗粒物质量的粒径分布。

[0051] 图3是实施例1-例5的干粉吸入制剂吸水百分比-时间曲线,测定条件为25 $^{\circ}\text{C}$ ,60%RH。

## 具体实施方式

[0052] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0053] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0054] 下述实施例中质量体积百分浓度如无特殊说明,均为质量:体积为g:ml。

[0055] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0056] 胰蛋白酶原 (PanReac AppliChem,A4532,0001)、甘露醇 (Sigma,M1902)、肌醇 (Sigma,I7508)、海藻糖 (Sigma,T0167)、亮氨酸 (Sigma,L8912)、泊洛沙姆 (Sigma,P5556)。

[0057] 实施例1、以胰蛋白酶原为模式蛋白的新型干粉吸入制剂

[0058] 1、P1吸入制剂混合溶液的制备

[0059] P1吸入制剂混合溶液由如下表1所示的各溶质和溶剂(水)组成,且各溶质的浓度(无特殊说明则为质量体积百分浓度,质量:体积(g:ml)为表1所示的浓度。

[0060] 表1为新型干粉吸入制剂P1的溶质

类别	组分	配方 P1
[0061] 蛋白	胰蛋白酶原	0.05%
填充剂	甘露醇	1%
冻干保护剂	肌醇	0.5%
	海藻糖	0.5%
[0062] 分散剂	亮氨酸	0.5%
	泊洛沙姆	0.05% (体积比, V:V)

[0063] 将P1吸入制剂调节pH值至7.2,然后使用0.2 $\mu$ m滤器过滤除菌,备用。

[0064] P1吸入制剂混合溶液的制备方法:

[0065] 先配置各溶质的母液,具体为:0.5%目的蛋白水溶液、10%肌醇水溶液,可加热助溶、10%海藻糖水溶液,可加热助溶;2%亮氨酸水溶液,可加热助溶;10%甘露醇,可加热助溶;再按表1所示配制好样品后,调节pH值至7.2,然后使用0.2 $\mu$ m滤器过滤除菌。

[0066] 2、新型干粉吸入制剂P1

[0067] P1吸入制剂混合溶液采用SFD技术制备干粉,得到新型干粉吸入制剂P1,方法具体如下:

[0068] 1、将空气压缩机打开并连接至二流体喷雾头(TSE),调节气压为约0.15MPa,供液速率为4-8mL/min。

[0069] 2、将盛有约3/4体积液氮和磁力搅拌器转子的不锈钢锅置于磁力搅拌器上,二流体喷雾头架在不锈钢锅上方。然后将于0 $^{\circ}$ C预冷2h的配方P1吸入制剂混合溶液转移至20mL注射器,将注射器插入二流体喷雾头,开始进行喷雾冷冻。

[0070] 3、喷雾冷冻结束后,将不锈钢锅内的冰晶态固体物质连同少量液氮转移至不锈钢瓶内,待液氮几乎挥发殆尽,将不锈钢瓶转移至冷冻干燥机中进行冷冻干燥。

[0071] 4、冷冻干燥36h后将样品取出,然后称重,加盖,密封,保存,得到新型干粉吸入制剂P1。

[0072] 实施例2、以胰蛋白酶原为模式蛋白的新型干粉吸入制剂

[0073] P2吸入制剂混合溶液由如下表2所示的各溶质和溶剂水组成,且各溶质的浓度为表2所示的浓度。

[0074] 表2为新型干粉吸入制剂P2的溶质

类别	组分	配方 P2
蛋白	胰蛋白酶原	0.05%
填充剂	甘露醇	1%
冻干保护剂	肌醇	1%
分散剂	亮氨酸	0.5%
	泊洛沙姆	0.05% (体积比, V:V)

[0076] 其中,配制混合溶液前,提前配制母液。配制方案参照实施例1。

[0077] 2、新型干粉吸入制剂P2

[0078] 制备过程:同实施例1,所使用混合溶液为P2吸入制剂混合溶液。

[0079] 实施例3、以胰蛋白酶原为模式蛋白的新型干粉吸入制剂

[0080] P3吸入制剂混合溶液由如下表3所示的各溶质和溶剂水组成,且各溶质的浓度为表3所示的浓度。

[0081] 表3为新型干粉吸入制剂P3的溶质

类别	组分	配方 P3
蛋白	胰蛋白酶原	0.05%
填充剂	甘露醇	1%
冻干保护剂	海藻糖	1%
分散剂	亮氨酸	0.5%
	泊洛沙姆	0.05% (体积比)

[0083] 其中,配制混合溶液前,提前配制母液。配制方案参照实施例1。

[0084] 2、新型干粉吸入制剂P3

[0085] 制备过程:同实施例1,所使用混合溶液为P3吸入制剂混合溶液。

[0086] 实施例4、以胰蛋白酶原为模式蛋白的新型干粉吸入制剂

[0087] P4吸入制剂混合溶液由如下表4所示的各溶质和溶剂水组成,且各溶质的浓度为表4所示的浓度。

[0088] 表4为新型干粉吸入制剂P4的溶质

类别	组分	配方 P4
蛋白	胰蛋白酶原	0.06%
填充剂	甘露醇	1%
冻干保护剂	肌醇	1%
分散剂	亮氨酸	1%
	泊洛沙姆	0.05% (体积比)

[0090] 其中,配制混合溶液前,提前配制母液。配制方案参照实施例1。

[0091] 2、新型干粉吸入制剂P4

[0092] 制备过程:同实施例1,所使用混合溶液为P4吸入制剂混合溶液。

[0093] 实施例5、以胰蛋白酶原为模式蛋白的新型干粉吸入制剂

[0094] P5吸入制剂混合溶液由如下表5所示的各溶质和溶剂水组成,且各溶质的浓度为表5所示的浓度。

[0095] 表5为新型干粉吸入制剂P5的溶质

类别	组分	配方 P5
蛋白	胰蛋白酶原	0.07%
填充剂	甘露醇	1%
冻干保护剂	肌醇	1%
	右旋糖酐-40	0.5%
分散剂	亮氨酸	1%
	泊洛沙姆	0.05% (体积比)

[0097] 其中,配制混合溶液前,提前配制母液。配制方案参照实施例1。

[0098] 2、新型干粉吸入制剂P5

[0099] 制备过程:同实施例1,所使用混合溶液为P5吸入制剂混合溶液。

[0100] 实施例6、新型干粉吸入制剂的检测标准

[0101] 按本发明实施例1-5所述方法各制备三份含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂,测定如下指标:

[0102] 一、测定胰蛋白酶原为模式蛋白的干粉吸入制剂冻干前后酶原酶比活力,计算酶原中酶比活力损失率

[0103] 对五个不同配方的蛋白干粉酶原比活力进行测定,采用的试剂和仪器如下:胰蛋白酶活力测定试剂盒 (Abcam, ab102531), 胰蛋白酶 (Amresco, 0785), 胰蛋白酶原 (PanReac AppliChem, A4532), 恒温恒湿箱 (上海一恒实验仪器设备有限公司), 硼酸 (国药集团),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 1M的NaOH等

[0104] 实验方法:实验前进行如下准备:

[0105] (1) 配制硼酸缓冲液:0.1M硼酸+0.1M  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.0;

[0106] (2) 分别使用硼酸缓冲液配制P1-P5的原溶液(相当于SFD法制备干粉前的喷雾用溶液),并同时使用硼酸缓冲液溶解干粉配制溶液,原溶液和配制的干粉溶液中胰蛋白酶原和胰蛋白酶的终浓度分别为0.5mg/mL和0.01mg/mL,即胰蛋白酶原与胰蛋白酶的质量比为50:1;

[0107] (3) 将配制好的各反应液,置于25℃恒温恒湿箱孵育约8h,然后使用硼酸缓冲液进行400倍稀释后,采用胰蛋白酶活力测定试剂盒,参照其说明书检测各样品中胰蛋白酶原活力。

[0108] (4) 最后向各样品中加入反应混合液后,马上于405nm处检测吸光度值,前期每隔2min左右检测一次吸光度值,后期根据检测情况适当调整检测时间间距。根据酶标仪读数计算酶活。

[0109] 酶活计算方法如下:

[0110] 所有的数据减去零孔,然后绘制p-NA标准曲线。将 $\Delta A_{405nm}$ 应用于标准曲线以得到p-NA的nmol(数据是在T1和T2之间产生)。

$$[0111] \quad \text{胰蛋白酶活力} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{样品稀释系数} = \frac{\text{nmol}}{\text{min}} = \text{mU/mL}$$

[0112] B是从标准曲线中计算出来的p-NA(nmol);T1和T2是第一次和第二次读数(min);V是加入至反应孔的预先处理的样品体积(mL)。

[0113] 单位定义:25℃,每分钟胰蛋白酶裂解底物,产生1.0 $\mu$ mol的p-NA,被定义为胰蛋白酶的一个单位(1U)。

[0114] (5) 根据单位体积溶液中胰蛋白酶活力和胰蛋白酶质量可以计算出各样品中胰蛋白酶原比活力,公式为:

$$[0115] \quad \text{胰蛋白酶比活力} = \frac{\text{单位体积酶活力}}{\text{单位体积质量}} = \frac{\text{U/mL}}{\text{g/mL}} = \text{U/g}$$

[0116] 根据各样品中胰蛋白酶原的比活力进一步计算各个配方的酶比活力损失率:

$$[0117] \quad P_n \text{ 酶比活力损失率} = \frac{P_n \text{ 干粉冻前比活力}}{P_n \text{ 原液冻前比活力}} \times 100\%$$

[0118] 结果见下表6所示:

[0119] 表6冻干前后酶原酶比活力损失率(三份重复制备样品的平均值 $\pm$ 标准差)

[0120]

新型干粉吸入制剂	酶比活力损失率(%)
P1	10.4 $\pm$ 2.6
P2	18.2 $\pm$ 2.6
P3	-0.5 $\pm$ 1.6
P4	16.1 $\pm$ 11.9
P5	24.8 $\pm$ 10.3

[0121] 结果表明,冻干前后实施例1-5中的酶原比活力有不同程度的下降,其中样品P3中酶原比活力损失最小。

[0122] 二、干粉吸入制剂的空气动力学粒径测试

[0123] 测试方法:

[0124] 所用仪器设备主要有空气动力学粒径谱仪(APS-3321,美国TSI公司),小型生物气溶胶沉降评测舱(北京慧荣和科技有限公司),手持式干粉气溶胶肺递送装置(北京慧荣和科技有限公司),质量浓度检测仪(8530,美国TSI公司)。

[0125] 具体操作流程如下：

[0126] 1、将一小风扇放至单层动物全身暴露系统底部，然后运行单层动物全身暴露系统，开启染毒模式进行系统自净，同时在单层动物全身暴露系统侧面接口处连接质量浓度检测仪，实时监测暴露系统内部的颗粒物浓度，待单层动物全身动态暴露系统内颗粒物浓度降至 $0.006\text{mg}/\text{m}^3$ 及以下时，关闭单层动物全身暴露系统的染毒模式。

[0127] 2、对于干粉颗粒物，使用手持式干粉气溶胶肺递送装置发生实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5干粉气溶胶(每个干粉样品每次使用5mL气体发生5mg样品)后，运行风扇30S，然后在单层动物全身暴露系统侧面的连接口处连接上质量浓度检测仪、空气动力学粒径谱仪和压力检测表，风扇停止运行后，运行空气动力学粒径谱仪，连续采样5min，同时使用质量浓度检测仪监测单层动物全身暴露系统内颗粒物浓度变化。

[0128] 3、待空气动力学粒径谱仪采样结束后，读取仪器记录的数据，记录每组样品的空气动力学质量中值直径。对每个配方的三次重复制备的样品的读数进行总结(三份重复制备样品的读数平均值+标准差)。

[0129] 结果见表7所示：

[0130] 表7为空气动力学质量中值直径的测试(单位 $\mu\text{m}$ )

[0131]

新型干粉吸入制剂	空气动力学质量中值直径
P1	$3.593 \pm 0.245$
P2	$2.670 \pm 0.547$
P3	$2.857 \pm 0.307$
P4	$2.030 \pm 0.287$
P5	$3.057 \pm 0.549$

[0132] 结果表明，实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5的空气动力学粒径不尽相同，但差别不算很大。相对来说，新型干粉吸入制剂P2的空气动力学粒径用于呼吸最更为合适。

[0133] 三、干粉吸入制剂的含水量测定

[0134] 用仪器热重分析仪(DISCOVERY, 美国TA公司)检测实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5的含水量。

[0135] 结果如表8所示，

[0136] 表8含水量测定结果(%)

新型干粉吸入制剂	含水量百分比
P1	$1.629 \pm 0.140$
P2	—
P3	$2.939 \pm 0.912$
P4	—
P5	$2.015 \pm 0.186$

[0139] ——:含水量极低,未测定出数据

[0140] 结果表明,实施例1-5中制备的各个干粉样品其含水量不尽相同,P3样品含水量相对最高,P2和P4样品含水量可以忽略不计。

[0141] 四、胰蛋白酶原为模式蛋白的干粉吸入制剂用扫描电镜观察

[0142] 仪器:扫描电子显微镜(S-3400N,日本日立公司)

[0143] 实验流程:制片后使用扫描电子显微镜对各样品进行观察,并对实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5的三份重复制备的干粉样品分别随机测定其中150个左右单个颗粒物的粒径,对其绝对粒径进行记录,进一步进行统计分析。

[0144] 用扫描电子显微镜直接观察,结果可见图1。

[0145] 对测定的实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5中颗粒物的绝对粒径汇总后计算其质量中值直径和中间50%质量对应的粒径,结果可见图2,图中中间点为颗粒物质量中值直径,上下两端对应的粒径表示在此粒径期间内的颗粒物占总粒子重量的50%。

[0146] 结果表明,实施例1-5中制备的各个干粉样品基本都呈现圆球状,疏松多孔,质地较轻。

[0147] 五、干粉吸入制剂P1-P5的吸水百分比-时间曲线测定

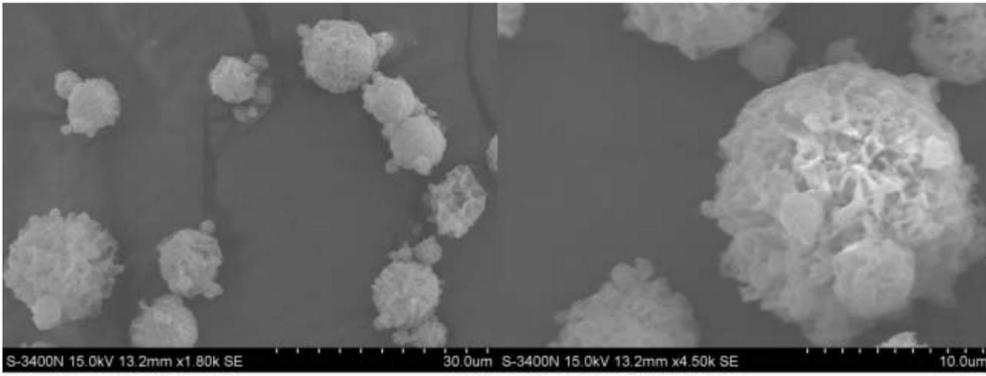
[0148] 仪器:恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器有限公司)

[0149] 实验流程:将恒温恒湿箱温湿度设定为25℃,60%RH,将电子天平置于恒温恒湿箱舱内,参数稳定后开始进行实验。将一直径9cm的一次性培养皿放至恒温恒湿箱中的天平上,调零后,称取实施例1-5的含有胰蛋白酶原的新型干粉吸入制剂P1-P5 $42 \pm 10$ mg,天平的背风侧和上方玻璃挡板打开或留缝,然后关闭恒温恒湿箱的门,每隔30min记录一次干粉重量,总共记录6h。

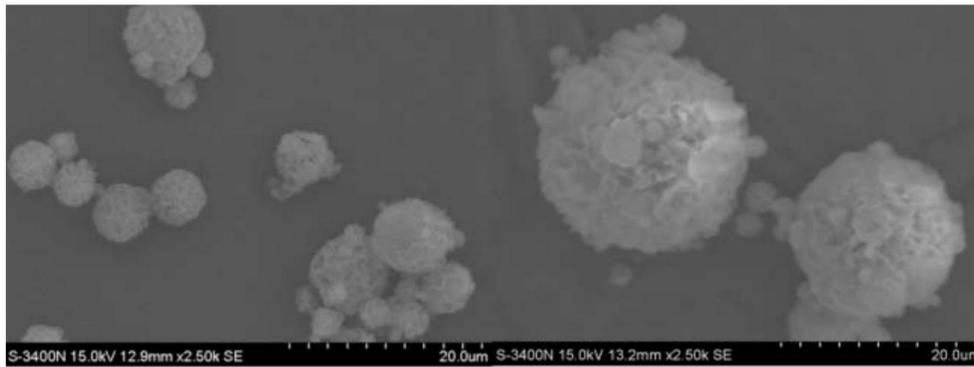
[0150] 计算每个样品在每个时间点相对于0时间点的重量增加百分比(%),绘制吸水百分比-时间曲线。

[0151] 结果见图3,可以看出,实施例1-5中制备的各个干粉样品其吸水能力各不相同,其中P3的吸水能力最强,而P5和P2的吸水能力相对较弱。

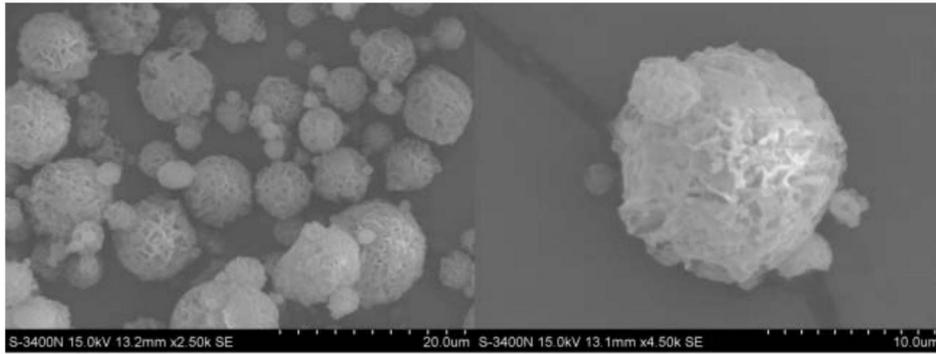
[0152] 将该干粉吸入剂中的胰蛋白酶原更换为抗原蛋白后可用做疫苗,可用于吸入给药。可以通过干粉气溶胶发生器向接受者(可以是人或动物)发生干粉气溶胶,接受者通过呼吸作用主动或被动吸入干粉气溶胶,从而达到激起肺部免疫反应或治愈疾病目的。



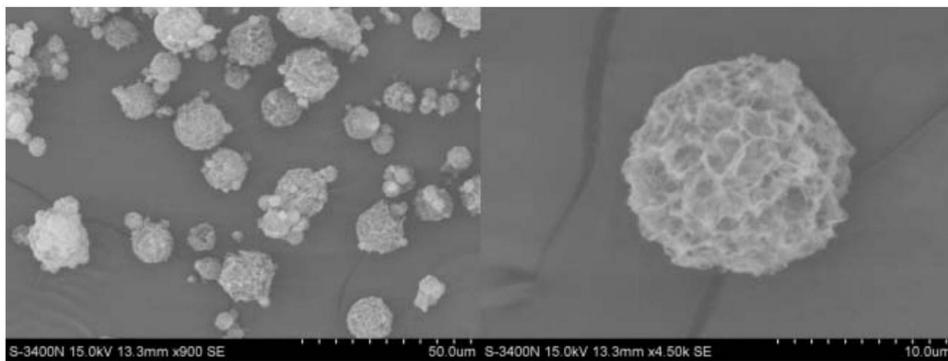
P1



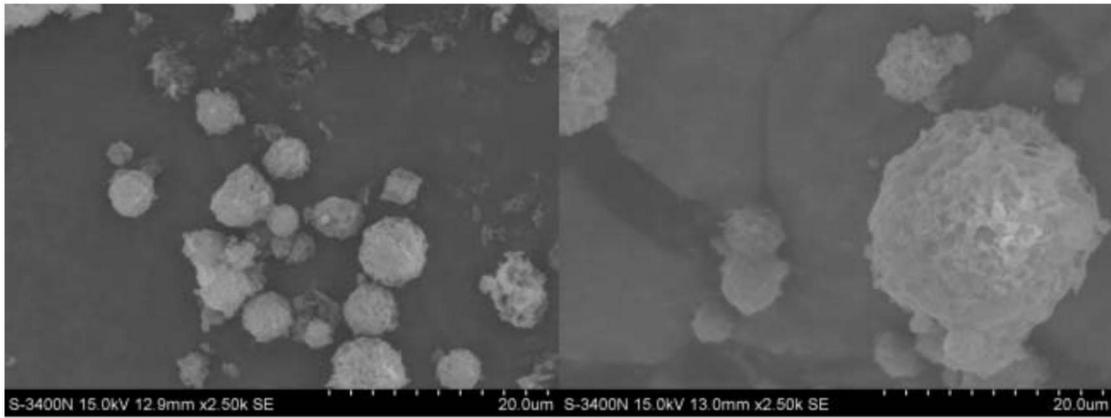
P2



P3



P4



P5

图1

质量50%对应的粒径跨度

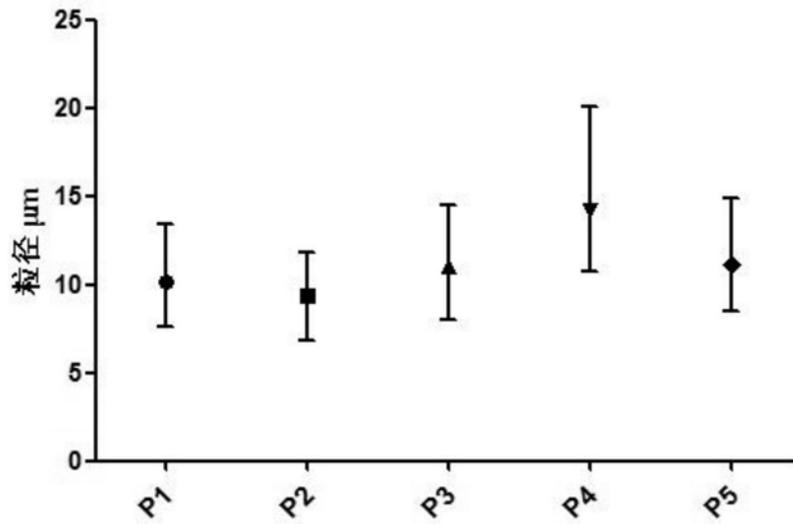


图2

吸水百分比-时间曲线

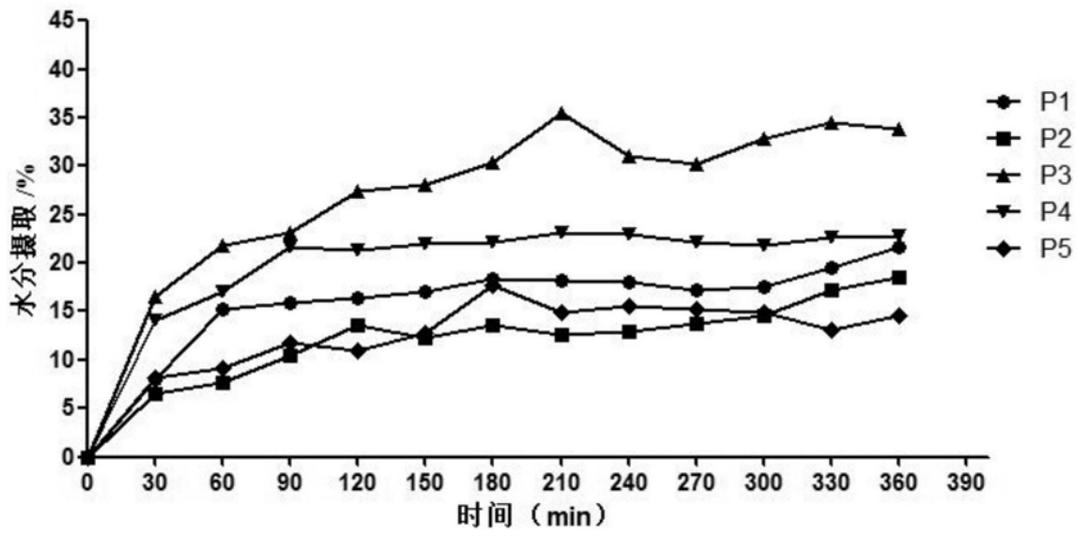


图3