

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410085604.7

A61K 38/57

A61K 9/12

A61K 9/14

A61P 11/00

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1636595A

[22] 申请日 2001.10.26

[21] 申请号 200410085604.7

分案原申请号 01818118.X

[30] 优先权

[32] 2000.10.31 [33] EP [31] 00403035.9

[32] 2001.6.28 [33] EP [31] 01401731.3

[71] 申请人 德比奥药物股份有限公司

地址 瑞士洛桑

[72] 发明人 A·蓬森 F·沙迪布雷

A·博克曼

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称 EPI - HNE 蛋白质干粉

[57] 摘要

本发明涉及一种 EPI - hNE 蛋白质晶体颗粒悬浮液，制备所述悬浮液的方法，所述悬浮液派生的干粉气溶胶，含有所述悬浮液或所述气溶胶的可吸入药物制剂，以及所述可吸入药物制剂在治疗各种病理症状中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 含有 EPI-hNE-4 球形颗粒的干粉，其特征在于，据直接显微镜测定，至少 75%颗粒的大小或直径在 1-3 微米之间。
- 5 2. 含有 EPI-hNE-4 球形颗粒的干粉，其特征在于，据激光粒度计测定，至少 60%颗粒的大小或直径在 1-3 微米之间。
3. 含有 EPI-hNE-4 球形颗粒的干粉，据激光粒度计测定，至少 90%颗粒的直径或颗粒大小在 0.5-4.0 微米之间，MMAD 值约 2.1 微米。
4. 一种干粉气雾剂，包含如权利要求 1-3 中任一所述的干粉与适宜的助推赋
10 形剂。
5. 一种可吸入药物悬浮剂，包含权利要求 4 所述干粉气雾剂。
6. 制备权利要求 1 或 2 所述干粉的方法，其特征在于，此方法包括的步骤有：
配制 EPI-hNE-4 蛋白质的悬浮液，其中，EPI-hNE-4 蛋白质以结晶颗粒形式存在，据激光颗粒度测定，至少 65%的 EPI-hNE-4 蛋白质结晶粒子的颗粒大小或
15 直径介于 3-6 微米之间，EPI-hNE-4 悬浮液的蛋白质浓度介于 2.5-50 mg/ml，其水相载体 pH 介于 4.0-5.0 之间；
在上述悬浮液中，将晶体从液相中分离出来；
去除残留的水份并匀化得到的易碎结块。
7. 制备权利要求 3 所述干粉的方法，其特征在于，此方法包括喷雾干燥
20 EPI-hNE-4 蛋白质溶液的步骤。
8. 如权利要求 5 所述的可吸入药物制剂在制备一种治疗因 hNE 活性过高而引起的疾病的药物中的应用。
9. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，疾病是呼吸性疾病，或者选自膀胱纤维变性、肺气肿、ARDS（急性呼吸窘迫综合症）和 COPD（慢性阻塞性肺部疾病）。

EPI-hNE 蛋白质干粉

5 本申请是中国专利申请 CN01818118.X, “EPI-hNE 蛋白质悬浮液, 其制备方法, 其派生的干粉气溶胶含有所述悬浮液或气溶胶的药物组合物及其应用”的分案申请。

本发明涉及一种 EPI-hNE 蛋白质晶体颗粒悬浮液, 制备所述悬浮液的方法, 所述悬浮液派生的干粉气溶胶, 含有所述悬浮液或干粉气溶胶的可吸入药物制剂, 以及所述可吸入药物制剂在治疗各种病理症状中的应用。

LEY 等人的国际专利申请 WO 96/20278 描述了数个通过基因工程方法获得的可抑制人中性粒细胞弹性蛋白酶 (hNE) 的蛋白质。正如上述专利申请中所指出, 人中性粒细胞弹性蛋白酶 (亦称为人白细胞弹性蛋白酶) 是多形核白细胞嗜苯胺蓝颗粒中的主要中性蛋白酶之一。这个酶与消除病原体以及结缔组织的重建有关。

15 hNE 主要的系统性抑制剂为 α -1-蛋白酶抑制剂, 从前称作 α 1 抗胰蛋白酶。在某些病理状态下 (遗传性疾病, 慢性支气管炎, 肺气肿, 膀胱纤维变性), 这种抑制剂或是在血流中存在的量不足, 或是失去了活性, 从而导致了 hNE 促弹性纤维水解的活性失控, 由此引起肺组织的大范围损害。

WO 96/20278 于是提出了一些作为稳定, 无毒性, 高效能的 hNE 抑制剂的新蛋白质。这些抑制剂构成了衍生于 Kunitz 型抑制结构域的一组抑制剂的一部分, 而 Kunitz 型抑制结构域见于基础胰蛋白酶抑制剂 (BPTI) 或一种称为人 Inter- α -胰蛋白酶抑制剂 (ITT) 轻链的人源蛋白质。它们特别是 EPI-hNE-1, EPI-hNE-2, EPI-hNE-3 及 EPI-hNE-4。WO 96/20278 中的抑制剂系通过生物技术方法制成, 并在 Kunitz 生物功能域上含有经修饰的 DNA 序列, 从而使它们具有高度活性。这些抑制剂之一, EPI-hNE-4, 是特别的令人感兴趣的。

20 WO 96/20278 描述了如何构建巴斯德毕赤酵母生产系统以进行 hNE 抑制剂 EPI-hNE-1, EPI-hNE-2, EPI-hNE-3 及 EPI-hNE-4, 蛋白质的生产和纯化 (见具体实施例 10-15)

30 含有非功能性组氨酸脱氢酶基因 (his4) 的巴斯德毕赤酵母突变株 GS115 被表达质粒所转化。该质粒含有一段编码啤酒酵母交配因子 α -前肽序列; 而 α -前肽

序列在上游可诱导的巴斯德毕赤酵母 *aox1* 基因启动子和下游 *aox1* 转录终止及聚腺苷化序列控制下,直接融合于所需的 hNE 抑制剂的氨基末端。该表达质粒以 *SacI* 消化后成为线状,而该线状 DNA 经同源重组掺入巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株基因组中,发生原生质球转化,选择能在缺乏加入组氨酸条件下生长的菌落并筛选具有甲

5 醇利用表型,分泌水平和基因剂量(用 Southern 杂交法估算)较高的母菌。选出估计含有约四个拷贝以串联排列整合于 *aox1* 基因位点的表达质粒的菌株。

选到的菌株首先以甘油为碳源成批培养,甘油耗尽后以限量添加甘油方式进一步扩增细胞量并抑制 *aox1* 启动子,最后以限量添加甲醇方式培养。后期让 *aox1* 启动子充分显示活性,蛋白质即分泌到培养液中。

10 然后纯化 EPI-hNE 蛋白质。具体纯化工序视各蛋白质特性的不同而不同。简而言之,离心培养液,上清液作微孔过滤然后超滤或渗滤,再以硫酸铵沉淀和离子交换层析回收蛋白质。

欧洲专利申请 00203049.2 号及国际专利申请 PCT/FR 01/02699 已由申请者公司备案,其在优先权请求中描述了一种从宿主菌株培养液中纯化符合药用质量的

15 EPI-hNE 蛋白质的改进工序,包括以下步骤:

- (a) 使培养液的一部分通过扩张的阳离子交换床,回收洗脱液;
- (b) 根据蛋白质疏水性质的差别对洗脱液作蛋白质分离;
- (c) 使洗脱液通过阳离子交换柱;
- (d) 或者在无菌条件下过滤所得培养液,以及
- 20 (e) 或者冷冻干燥所得滤液以回收 EPI-hNE 蛋白质。

经步骤(d)后获得的溶液或其后获得的冻干粉可用以制备本发明的悬浮液,所述悬浮液能加入本发明的可吸入药物配方中。

申请该专利的公司完善了 EPI-hNE 蛋白,特别是 EPI-hNE-4,的纯化方法,后来又投入了大量的探索和努力来开发含有纯化 EPI-hNE 蛋白的药物组合物。

25 事实上该专利申请公司致力于开发含有 EPI-hNE-4 溶液的口腔吸入药物组合物。然而,在产品开发过程中他们发现 EPI-hNE-4 溶液一旦装入雾化器即变得不稳定而且趋向于沉淀,从而使溶液变成浑浊。

起初认为蛋白质沉淀形式不具有治疗活性。然而令人惊讶并出乎意料的是,发现该沉淀形式是 EPI-hNE-4 蛋白质的结晶形式,结晶对该蛋白的活性没有不良影响。本文的术语“结晶形式的 EPI-hNE-4”意为该蛋白质的不可溶形式,具有棒状

30 结构,粒子大小一般小于 10 微米。

于是, 该专利申请公司将努力方向转向开发一种结晶形式的 EPI-hNE 蛋白质悬浮液, 所述悬浮液能够加入到药物组合物中, 具体是用于吸入的药配方中。

令人惊奇的是发现有可能制成一种在特定浓度和 pH 条件下室温稳定的悬浮液, 从而得以制备含有在室温下稳定的所述悬浮液的药物制剂。这种室温稳定性在移动治疗中尤为重要。

使用 EPI-hNE 蛋白质悬浮液取代其溶液最主要的好处体现在可制备吸入型药物制剂, 在此基础上可以开发出活性成份更浓的制剂, 从而能缩短给药时间。

这在吸入剂给药中是一个重要的因素, 因为吸入过程的时间往往要求较长, 被认为是一种严重的强制措施, 可能导致病人顺从性差。

本发明涉及一种 EPI-hNE 蛋白质悬浮液, 所述悬浮液的特征为 EPI-hNE 蛋白质以结晶粒子形式存在, 经激光粒度计测量其颗粒大小主要介于 1-6 微米特别是 3-6 微米之间, 该悬浮液的 EPI-hNE 蛋白质浓度介于 1-80mg/ml, 以 2-50 mg/ml 更佳, 主要取决于治疗状况所需要的 EPI-hNE 蛋白质的量; 其水相运载体 pH 介于 3-8 之间, 以 4-6 更佳, pH4.0-5.0 之间最好。

上述悬浮液在室温下生物学活性及颗粒大小分布至少可保持两个月稳定。

水相运载体以等渗生理盐水为较适宜。

生理盐水可含醋酸钠和氯化钠或柠檬酸钠。

EPI-hNE 蛋白质选自 EPI-hNE-1, EPI-hNE-2, EPI-hNE-3 及 EPI-hNE-4 为宜, 以 EPI-hNE-3 或 EPI-hNE-4 较好, 最好是 EPI-hNE-4。

上述悬浮液最好含有至少 65% 的 EPI-hNE-4 晶体颗粒, 激光粒度计测定的颗粒大小应在 3-6 微米之间。

该悬浮液中被吸入物质的量经 Pari LC-star 气雾测定仪测定为约 40-50%, 正是一个吸入型药剂的理想值。

经撞击式粒度计测定含有 EPI-hNE-4 结晶颗粒的雾滴的 MMAD (质量气体动力直径中值) 值约为 2 微米。这个 MMAD 值很适合保证一个高的吸入组分以及有效地穿透进入肺部。

从上述的悬浮液还可制成干粉, 如将悬浮液 pH 调节到 3.5-4.5 后进行离心, 分去上清液, 温和条件下真空干燥沉淀部分, 然后经匀化处理使颗粒从聚集状态分散开来。在这些条件下获得了球形颗粒, 经直接显微镜检查大多数颗粒大小或直径在 1-6 微米之间。经激光粒度计对溶液的测定, 干粉的粒子大小分布与悬浮液中的相当。

干粉也可得自 EPI-hNE 蛋白质溶液，或是 EPI-hNE 蛋白质的冻干粉末。

本发明同样还涉及到一种干粉，经直接显微镜检查，它含有 EPI-hNE-4 球形颗粒，大小或直径大多数在 1-6 微米之间，以至少 75%颗粒的大小或直径在 1-3 微米之间为佳；以激光粒度计测定，颗粒的大小或直径大多数在 1-6 微米之间，以至少 60%颗粒的大小或直径在 1-3 微米之间为佳。这种干粉通过适当的方法获得，该方法包括的步骤有：在上述 EPI-hNE 蛋白质悬浮液中从液相分离出晶体，去除残留的水份，匀化得到的易碎的结块。

本发明还涉及到一种含 EPI-hNE-4 球形颗粒的干粉，激光粒度计测定其至少 90%的颗粒大小或直径在 0.5-4.0 微米之间，MMAD 值约 2.1 微米。当该粉末被分散到适宜的助推剂中时这个 MMAD 值很适合保证一个高的吸入组分和有效地穿透进入肺部。这种干粉可以通过包括喷雾干燥 EPI-hNE 蛋白质溶液步骤的方法很方便地得到。

本发明还涉及到一种含有上述 EPI-hNE-4 蛋白质悬浮液的可吸入的药物制剂，或者一种含有上述干粉和适宜助推剂的干粉气雾剂。

本发明还进一步涉及从 EPI-hNE 蛋白质溶液或从冻干粉制备 EPI-hNE 蛋白质悬浮液的方法。

如果从 EPI-hNE 蛋白质溶液起始制备该悬浮液，适当的方法包括以下步骤：

- (a) 将溶液的 pH 调到 3.5-4.5 之间以利于 EPI-hNE 蛋白质形成结晶，及
- (b) 将 pH 值调到 3.0-8.0 之间。

以上步骤(a)和(b)可在 1-40°C 温度下实施，以 4-30°C 更好。

如果从冻干粉起始制备该悬浮液，适当的方法包括以下步骤：

- (a) 将 EPI-hNE 蛋白质溶解于 pH 值低于 3.0 的缓冲液中
- (b) 将溶液的 pH 值调到 3.5-4.5 之间以利于 EPI-hNE 蛋白质形成结晶，及
- (c) 将 pH 值调到 3.0-8.0 之间。

以上步骤(a)，(b)和(c)可在 1-40°C 温度下实施，以 4-30°C 更好。

本发明还涉及了从上述 EPI-hNE 蛋白质悬浮液、溶液或从冻干粉起始制备上述干粉的方法。

如果从 EPI-hNE 蛋白质悬浮液起始制备干粉，该方法包括的步骤有：例如以离心或亚微孔过滤器过滤，从上述 EPI-hNE 蛋白质悬浮液的液相中分离出晶体，适当采用不会导致固相广泛干固结块的方法去除残留水份，例如在 40°C 以下温度以略低于大气压的条件温和蒸发干燥，再用本领域熟知的适当研磨工艺，如 Fritsch

的 5 号磨碎机 (Pulverisette 5) (行星式轧机), 或者巴黎 Moderne 实验室的电动研磨装置 Moulin JK, 匀化得到的固体干块, 使颗粒从聚集状态分散开来。

如果从 EPI-hNE 蛋白质溶液起始制备干粉, 适当的方法包括以下步骤:

- (a) 将溶液的 pH 调到 3.5-4.5 之间以利于 EPI-hNE 蛋白质形成结晶
- 5 (b) 例如以离心或亚微孔过滤器过滤的方式, 从上述悬浮液的液相中分离出晶体,
- (c) 适当采用不会导致固相广泛干固结块的方法去除残留的水份, 例如在 40°C 以下温度以略低于大气压的条件温和蒸发干燥

(d) 再用本领域熟知的适当研磨工艺匀化得到的固相干块, 使颗粒从聚集状
10 态分散开来。

以上步骤(a)和(b)可在 1-40°C 温度下实施, 以 4-30°C 更好。

如果从 EPI-hNE 蛋白质溶液起始制备, 较好的方法包括喷雾干燥该溶液的步骤。可以很方便地调节此步骤中的参数, 使得粉末分散到适宜的助推剂中能保证适合的颗粒大小分布, 继而保证一个高的吸入组分和有效地穿透进入肺部。

15 如果从 EPI-hNE 蛋白质冻干粉起始制备干粉, 适当方法包括以下步骤:

- (a) 将 EPI-hNE 蛋白质溶解于 pH 值低于 3.0 的缓冲液中
- (b) 将溶液的 pH 值调到 3.5-4.5 之间以利于 EPI-hNE 蛋白质形成结晶
- (c) 宜以离心或亚微孔过滤器过滤从上述悬浮液的液相中分离出晶体,
- (d) 适当采用不会导致固相广泛干固结块的方法去除残留的水份, 以在 40°C
20 以下温度并略低于大气压的条件温和蒸发干燥为好

(e) 再用本领域熟知的适当研磨工艺匀化得到的固体干块, 使颗粒从聚集状态分散开来。

以上步骤(a)和(b)可在 1-40°C 温度下实施, 以 4-30°C 更好。

本发明还涉及应用上述 EPI-hNE 蛋白质悬浮液或干粉气雾剂制备药物用以治疗
25 疗因 hNE 活性过高所致疾病。

这些疾病可能特别是任何呼吸性疾病, 或者是选自膀胱纤维变性、肺气肿、ARDS (急性呼吸窘迫综合征) 和 COPD (慢性阻塞性肺部疾病) 的病例。

以下实施例可以更好地描述本发明, 但绝不应被认作是限制性的。

参见图 1 到图 3B 可以更好地理解以下描述。

30 图 1 是 EPI-hNE-4 蛋白质悬浮液离心后获得的沉淀物的显微图像, 显示 EPI-hNE-4 晶体在水中的棒状结构。

图 2 是粒径约 2.5 微米雾滴的显微图像，该雾滴含有棒状 EPI-hNE-4 结晶颗粒。

图 3A 和 3B 是干粉的显微图像，显示在干燥形态下 EPI-hNE-4 颗粒的球形结构。

5 实施例 1

EPI-hNE-4 的纯化

酵母生产体系

hNE 抑制剂的生成系经高细胞浓度的巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株发酵，形成分泌到培养上清液中的蛋白质。

10 表达质粒的构建，是通过将一段编码啤酒酵母交配因子 α -前肽的合成 DNA 序列直接连接到编码所需 hNE 抑制剂的合成 DNA 的 5'末端。将这个融合基因夹在上游可诱导性巴斯德毕赤酵母 *aox1* 基因启动子与下游 *aox1* 转录终止及聚腺苷化序列之间；位于也编码啤酒酵母 *his4* 基因的一质粒上。

15 将线性化的表达质粒 DNA 通过同源重组掺入到巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株的基因组中发生原生质球转化。在缺乏加入组氨酸条件下选择再生的原生质球中能生长的菌落筛选单个分离株中具有甲醇利用表型 (*mut+*)、分泌水平及基因拷贝数较高的菌株。于是选出了一个 EPI-hNE-4 高水平分泌株 PEY-53。这个菌株据基因组 DNA 的 Southern 杂交分析估计含有四个拷贝整合于 *aox1* 基因位点的表达质粒 DNA。

20 蛋白质的生产

巴斯德毕赤酵母 PEY-53 菌株以混合养料发酵培养，程序类似于 WO 96/20278 中所描述，不同之处在于用压缩空气取代了纯氧。简单地说，先以甘油为碳源进行成批培养，甘油耗尽后以限量添加甘油方式，培养约四小时以进一步扩增细胞量并抑制 *aox1* 启动子。在生产的最后阶段以限量添加甲醇方式培养。在这个阶段 *aox1* 25 启动子充分显示活性，hNE 抑制剂被分泌到条件培养液 (CM) 中。在 PEY-53 发酵 CM 中，经 SDS-PAGE 分析和反相 HPLC 分析，EPI-hNE-4 的最终浓度为约 1000mg/l。PEY-53 培养物产生的主要分子种类为已适当加工的 EPI-hNE-4 蛋白质。然而，该菌株还分泌约 5-20% 的分子量略高的一种蛋白质，推测其代表经过另一种加工的 EPI-hNE-4 蛋白质。如下所述，基本上纯化正确加工的 EPI-hNE-4 蛋白质去除污染 30 物。

如实施例 1 所述得到 PEY-53 CM 100 升，收集并按如下过程通过扩张床：10

升层析基质 (Streamline SP, Amersham-Pharmacia) 用 pH3.5, 50mM 醋酸铵平衡, 再以同一缓冲液在 300cm/小时流速下流化至 30 升。上样后用 pH3.5, 10mM 醋酸铵洗柱, 直到 280nm 吸收值低于 0.05。将珠状基质装填至 10 升, 用 pH4.5, 1M 醋酸铵缓冲液洗脱回收 EPI-hNE-4 蛋白质。

- 5 于是就获得了含有约 100 克 EPI-hNE-4 的 10 升溶液 (根据 280nm 分光测定、反相 HPLC、Coomassie 蛋白质试验和生物活性试验测定)。

反相 HPLC (Pharmacia 的 Licrosphere 100RP 硅胶柱 / 水+1%TFA 和乙腈 +1%TFA 之间的梯度) 显示另一种加工形式的蛋白不能与正确形式的蛋白分开。也可检测到绿色的污染物。

- 10 将此溶液用 22 微米过滤器 (Millipore 的 Millipack 200) 进行无菌过滤, 然后进一步纯化。

使上述 10 升溶液通过 BioProcess (Pharmacia) 系统, 进行疏水反应层析, 其中采用 Pharmacia 的苯基琼脂糖凝胶快速流动基质和 15 升的 BPTG 层析柱。使用的缓冲液有 A: pH4.5, 50mM 醋酸钠 + 1M 氯化钠; B: pH4.5, 50mM 醋酸钠。以 100% 15 的 B 液进行一步洗脱, 流速 300cm/小时。

洗脱液中含有大约 50 克纯化的 EPI-hNE-4 (根据 280nm 分光、Coomassie 蛋白质试验和生物活性试验测定)。

反相 HPLC 显示另一种加工形式的蛋白未被分离掉。未测见绿色色素污染。

- 20 此后用 Pharmacia 的 BioProcess 层析系统进行阳离子交换层析。使用的层析介质为 BioRad 的 Macroprep High S 型基质 (基于载有磺酸盐表面基团的交联丁烯酸酯的刚性基质), 层析柱为 Pharmacia 的 15 升 BPG200 型柱。使用的缓冲液有 A: pH3.5、10mM 醋酸铵; B: pH6.2、50mM 醋酸钠; 和 C: pH7.8、10mM 碳酸氢铵。先用缓冲液 B 洗脱分离去掉错误加工形式的蛋白。然后用 100% B 液进行一步洗脱, 流速 300cm/小时。

- 25 洗脱液中含有大约 40 克纯化的 EPI-hNE-4 (根据 280nm 分光、Coomassie 蛋白质试验和生物活性试验测定), 相当于纯化工序总产量的 40%。

反相 HPLC 显示非正确加工形式的蛋白低于 1.5%。未测见绿色色素污染。

冷冻干燥洗脱液并保存于-20°C。

30 实施例 2

EPI-hNE-4 配方的制备

从实施例 1 中得到的 EPI-hNE-4 冻干粉起始,按下述方法制备了 12 批 EPI-hNE-4 悬浮液。

配方 10/4: 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 10mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

配方 10/5: 以 pH5.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 10mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

5 配方 5/4: 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 5mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

配方 5/5: 以 pH5.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 5mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

配方 2.5/4: 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 2.5mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

10 配方 2.5/5: 以 pH5.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 2.5mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液。

配方 20/4 (4°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 20mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 4°C 制备。

配方 20/4 (30°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 20mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 30°C 制备。

15 配方 30/4 (4°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 30mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 4°C 制备。

配方 30/4 (30°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 30mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 30°C 制备。

20 配方 50/4 (4°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 50mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 4°C 制备。

配方 50/4 (30°C): 以 pH4.0 醋酸铵和氯化钠溶液配成 50mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液,在 30°C 制备。

制备 EPI-hNE 蛋白质结晶颗粒悬浮液的通用方法

25 2.5, 5 及 10mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液的制备

pH3.0 浓度 15mg/ml 的 EPI-hNE-4 溶液制备如下: 将 140mg 粉末状的 EPI-hNE-4 溶解于 7ml pH3.0 的 10mM 醋酸钠缓冲液中。用 1M 盐酸 (HCl) 调节 pH 到 2.0。溶解后此溶液用一个 MediaKap 5 型过滤器过滤,用 1M 氢氧化钠 (NaOH) 调节 pH 到 3.0。

30 以紫外分光法检测蛋白质浓度,溶液用 10mM 醋酸钠稀释至浓度为 15mg/ml。加入 PH12 的 10mM 醋酸钠,2.4%氯化钠溶液一半体积得到 10mg/ml、pH4.0 的

EPI-hNE-4 溶液。必要时可用 1M 的盐酸或 1M 的氢氧化钠调节 pH 至 4 ± 0.1 。

将溶液转至一玻璃容器中，置室温过夜使其结晶。

取一份 50 微升的样品离心，取沉淀物作相差显微镜分析。

图 1 显示该沉淀物棒状结构的 EPI-hNE-4 晶体的显微图像。

- 5 将此悬浮液匀化后，取一半体积转入另一玻璃容器中并用 1M 的氢氧化钠将 pH 调至 5.0。将由此所得的 pH4.0 和 pH5.0 的悬浮液分别按需反复稀释直到达到 5mg/ml 和 2.5mg/ml 的浓度。

20, 30 及 50mg/1 的 EPI-hNE-4 悬浮液的制备

- 10 分别从 30, 45 及 75mg/1 的 EPI-hNE-4 溶液起始，配方 20/4 (4°C)、20/4 (30°C)、30/4 (4°C)、30/4 (30°C)、50/4 (4°C) 及 50/4 (30°C) 的制备基本上与上述过程相同，所有步骤在 4°C 或 30°C 下进行，溶液放置 72 小时使之结晶。未发现这两个温度之间在结晶动力学上有显著差异。

15 实施例 3

EPI-hNE-4 悬浮液的激光粒度计分析

用 Coulter Multisizer II 对实施例 2 中制得的 EPI-hNE-4 悬浮液中的粒子作颗粒度分析。下表 1 中列出了部分测试结果。

20

表 1

[EPI-hNE-4] mg/ml	pH	颗粒大小或直径在 3-6 微米之间的颗粒百分比
10	4.0	67.25
10	5.0	65.65
5	4.0	69.27
5	5.0	68.55
2.5	4.0	71.13
20 (4°C)	4.0	87.3
20 (30°C)	4.0	84.2
30 (4°C)	4.0	85.1
30 (30°C)	4.0	89.0
50 (4°C)	4.0	85.6
50 (30°C)	4.0	87.8

上表显示在每一种悬浮液中至少 65% 的颗粒直径在 3-6 微米之间。

实施例 4

EPI-hNE-4 悬浮液的生物活性测定方法

通过比色法测定人中性粒细胞弹性蛋白酶的抑制水平证实了 EPI-hNE-4 悬浮液 5 的生物活性。

人弹性蛋白酶可水解合成底物 N-甲氧基琥珀酰-ala-ala-pro-val-对-硝基苯胺。

水解时产物对-硝基苯胺（黄色）被释放出来。

于是 EPI-hNE-4 的生物活性，即对人弹性蛋白酶的抑制水平，可以通过对-硝基苯胺释放的降低计算出来。 10

制备各种稀释度的 EPI-hNE-4 悬浮液，用紫外分光法定其中特异性蛋白的浓度。使用的稀释液为 Tris 100mM, NaCl 50mM, Triton X100 0.25%, BSA 0.1%, pH8.0。将 100 微升的 100 nM EPI-hNE-4 液加到 5 毫升的试管中。再加入以同样缓冲液配的 100 微升的 100 nM hNE。将稀释样品室温保温 15 分钟（不需搅拌）。 15 加入 100 微升 4.2 mM 的底物（如前所述），37°C 温育反应混合物 15 分钟。加入 50 微升冰醋酸终止反应。以单纯缓冲液和不含 EPI-hNE-4 的 hNE 样品作为对照，测定 410nm 波长吸收值。

实施例 5

EPI-hNE-4 悬浮液的稳定性 20

为了验证其稳定性，对三种 pH5.0、EPI-hNE-4 浓度分别为 2.5, 5 及 10mg/ml 的悬浮液，和三种 pH4.0、EPI-hNE-4 浓度分别为 20, 30 及 50mg/ml 的悬浮液作了为期两个月的颗粒大小分布和抑制活性分析。

悬浮液按照实施例 2 中列出的方法制备。将 pH4.0、EPI-hNE-4 浓度分别为 25 2.5, 5 及 10mg/ml 3 种的悬浮液各取三小瓶室温放置两个月；将 pH4.0、EPI-hNE-4 浓度分别为 20, 30 及 50mg/ml 的三种悬浮液各取三小瓶 4°C 放置两个月。

在两个月开始和结束时分别按实施例 4 所述的比色方法，作人中性粒细胞弹性蛋白酶抑制试验测定悬浮液的生物活性。在两个月期限的开始和结束之间未发现 有显著差别。

在两个月开始和结束时用 Coulter Multisizer II 对粒子的大小分布作激光 30 颗粒度测定。pH5.0、EPI-hNE-4 浓度 10mg/ml 的悬浮液经两个月室温放置后其颗

粒大小分布未发生明显改变。

pH5.0、EPI-hNE-4 浓度 10mg/ml 的悬浮液，经十个月室温放置后，其颗粒大小分布及 EPI-hNE-4 的抑制活性未显示任何显著变化。

5 实施例 6

EPI-hNE-4 悬浮液的雾化。雾滴大小分布的分析及显微观察

将实施例 2 制得的悬浮液用 Pari LC-star 喷射雾化器进行雾化。

可吸入物质的量经本领域熟知的方法测定为约 40-50%，正是一个吸入型药剂的理想值。

10 用 Coulter Multisizer II 对雾化颗粒的大小分布作激光颗粒度分析。其 MMAD 值为 3-4 微米。

按本领域熟知的程序，用撞击式粒度计在 8.0 微米、6.0 微米、4.0 微米、3.0 微米、2.0 微米、1.5 微米、1.0 微米、0.75 微米、0.5 微米和 0.25 微米的系列过滤器上测定雾化颗粒的大小分布。每一种被测的悬浮液 MMAD 值约为 2 微米。

15 图 2 是粒径约 2.5 微米雾滴的显微图像，该雾滴含有棒状 EPI-hNE-4 结晶颗粒。

实施例 7

干粉的制备，所述干粉的显微观察分析和其生物活性测定

20 pH3.0、浓度 15mg/ml 的 EPI-hNE-4 溶液制备如下：将 140mg 粉末状的 EPI-hNE-4 溶解于 7ml pH3.0 的 10mM 醋酸钠缓冲液中。用 1M 盐酸 (HCl) 调节 pH 到 2.0。溶解后此溶液用一个 MediaKap 5 型过滤器过滤，再用 1M 氢氧化钠 (NaOH) 调节 pH 到 3.0。

以紫外分光法检测蛋白质浓度，溶液用 10mM 醋酸钠稀释至浓度为 15mg/ml。

25 加入 P12 的 10mM 醋酸钠 2.4%氯化钠溶液一半体积，得到 10mg/ml、pH4.0 的 EPI-hNE-4 溶液。必要时可用 1M 的盐酸或 1M 的氢氧化钠调节 pH 至 4 ± 0.1 。

将溶液转至一玻璃容器中，置室温 72 小时使其结晶。

30 此悬浮液以 0.22 微米过滤器过滤。回收过滤器，在装有蓝色硅胶的干燥器内（可使水份逐渐挥发的系统）干燥过夜。从过滤器上回收到一个易碎的粉块。用一个研钵作简单的手工机械匀化，从而产生一种表观均匀的极细粉末。

把这种粉末放在 Thomas 平板上作直接显微镜观察。图 3A 是此粉末的显微图

像，显示干燥形式的 EPI-hNE-4 的不规则球形结构，其中大部分单个颗粒的直径或颗粒大小在 1-6 微米之间。显微图像中的暗区可能代表着单个粒子的重叠或手工均化不彻底样品残留的聚集物。

对直接显微镜检查 Thomas 平板显微图像测得的单个颗粒直径（球形粒子最大和最小直径的平均值）作统计学分析显示，大部分（80%以上）颗粒的直径（或颗粒大小）介于 1-6 微米之间，至少 75%的颗粒其直径（或颗粒大小）介于 1-3 微米之间。直径（或颗粒大小）的中值约为 2.1 微米，平均直径（或颗粒大小）为 2.33 ± 0.18 微米。

将粉末分散在 1%氯化钠溶液中并用 Coulter Multisizer II 作激光颗粒度分析。对激光颗粒度数据作完全统计学分析显示，其颗粒大小分布与实施例 3 中获得的的结果非常相似，至少 65%的颗粒其直径（或颗粒大小）介于 1-6 微米之间。

从该粉末起始按照实施例 2 描述的很相似的程序制备了 pH5.0、浓度 10mg/ml 的 EPI-hNE-4 悬浮液。通过比色法分析人中性粒细胞弹性蛋白酶抑制试验确定了此悬浮液的生物活性，如以上实施例 4 所述。测得的生物活性与实施例 5 对 pH5.0、EPI-hNE-4 浓度 10mg/ml 的悬浮液测得的结果无显著差别。

实施例 8

干粉制备及其激光颗粒度分析

用生产前几批 EPI-hNE-4 得到的 2 升悬浮液制备了干粉。

10000g 离心此悬浮液 30 分钟。弃上清液，将留下的沉淀物均匀分散于 100 毫升的 10mM 碳酸氢铵缓冲液中。在 0.22 微米过滤器上过滤此悬浮液。回收过滤器，在装有蓝色硅胶的干燥器内（可使水份逐渐挥发的系统）干燥过夜。从过滤器上回收到一个 4 克重的易碎粉块。用巴黎 Moderne 实验室的电动研磨装置 Moulin JK 进行均化处理，从而产生一种表观均匀的极细粉末。

用 Malvern 装置（Malvern Mastersizer 2000 <Malvern, UK>，配备有一个 Scirocco 2000 型的干式采样器）对该粉末作颗粒度分析。

结果显示，大部分（80%以上）颗粒的直径（或颗粒大小）介于 1-6 微米之间，至少 60%的颗粒直径（或颗粒大小）介于 1-3 微米之间。直径（或颗粒大小）的中值约为 2.66 微米。

实施例 9

喷雾干燥法制备干粉及其激光颗粒度分析和生物活性试验

将 1 克粉末状或结晶形式的 EPI-hNE-4（见例 8）溶解于含有 1% 盐酸的 pH2.5 的水中。将该溶液用一台微型喷雾干燥器 Buchi B191 作喷雾干燥（喷成雾状），操作条件如下：

- 5 ■ 喷雾器内径： 0.7 mm
- 喷雾流速： 3.4 g/l
- 空气压力： 600 l/h
- 干空气流速： 35 m³/h
- 干空气进气温度： 120 °C
- 10 ■ 干空气出气温度： 74 – 75 °C

把粉末放在 Thomas 平板上作直接显微镜观察。图 3B 是粉末的显微图像，显示干燥形式 EPI-hNE-4 的不规则球形结构，其中大部分单个颗粒的直径或颗粒大小在 1-3 微米之间。与图 3A 相比没有暗区出现，说明该粉末均一性良好。

用配备有一个 Scirocco 2000 型干式采样器的 Malvern Multisizer 2000 对该粉末作颗粒大小分布的激光颗粒度分析。

结果显示，90%的颗粒直径或颗粒大小为 0.5-4.0 微米，75%的颗粒直径或颗粒大小为 0.5-2.8 微米，60%的颗粒其直径或颗粒大小为 0.5-2.2 微米，MMAD 值为 2.16 微米。

如实施例 4 所述测得的粉末生物比活性显示，此蛋白质具有完全活性。



图 1

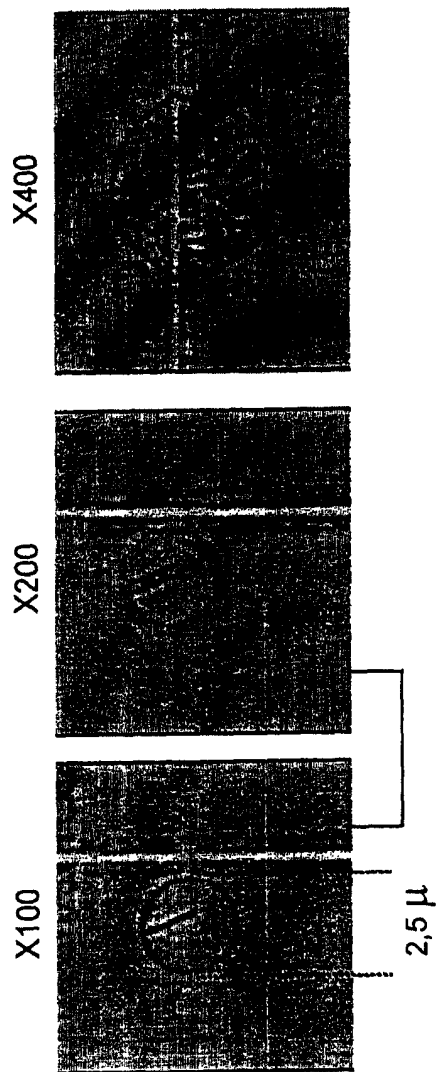


图 2



图 3A

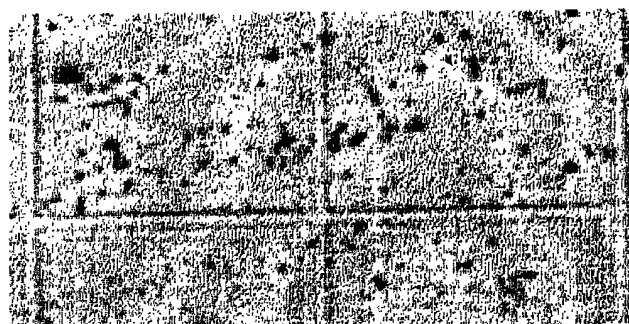


图 3B