

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/14

B05B 7/14

B05B 7/16



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00811293.2

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1198593C

[22] 申请日 2000.6.9 [21] 申请号 00811293.2

[30] 优先权

[32] 1999. 6. 9 [33] US [31] 60/138,394

[86] 国际申请 PCT/US2000/015957 2000.6.9

[87] 国际公布 WO2000/075281 英 2000.12.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.4

[71] 专利权人 罗伯特·E·希弗斯

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 罗伯特·E·希弗斯

S·P·塞勒斯 J·F·卡彭特

审查员 王灵茹

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 6 页 说明书 26 页 附图 14 页

[54] 发明名称 超临界流体辅助的喷雾和鼓泡干燥

[57] 摘要

提供了一种制备物质细小干颗粒的方法，包括形成含有感兴趣物质和超临界或近临界流体的组合物；迅速降低所述组合物上的压力，形成液滴；让所述液滴通过加热的气流。该过程不需用有机溶剂。

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

- 1.一种形成细小干颗粒的方法，其中所述颗粒含有可在超临界或近临界的流体中溶解的物质或可在水溶液中溶解或悬浮的物质；其特征在于，该方法包括：
- 5 (a)形成一种组合物，该组合物含有一种或多种物质和超临界或近临界的流体；
- (b)迅速降低所述组合物上的压力，形成液滴；
- (c)让所述液滴通过干燥气流，其中所述干燥气流不是与超临界或近临界流体相同的物质，所述干燥气体在环境温度以上和 100℃ 以下加热。
- 10 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述干燥气体的温度在所述液滴开始通过所述气体的位置低于 100℃。
- 3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的一种或多种物质可溶于所述超临界或近临界的流体。
- 4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的组合物还含有水
- 15 相溶剂。
- 5.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的一种或多种物质可溶于所述水相溶剂。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的组合物还含有一种或多种选自赋形剂、稳定剂、填充剂和表面活性剂的添加剂。
- 20 7.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述一种或多种添加剂占干颗粒的重量百分数小于 99.9%。
- 8.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的组合物还含有 pH 缓冲物质。
- 9.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述超临界或近临界流体是二氧化碳。
- 25 10.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述干燥气体是氮气。
- 11.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的干燥气流在干燥室内。
- 12.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的一种或多种物质

- 是生理学活性组合物，该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。
- 5 13. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括：
(d) 收集所述细小的干颗粒。
14. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中步骤(a)包括：
10 混合含有一种或多种感兴趣的物质的水溶液和一种超临界或近临界的流体，形成组合物。
15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的干燥气体温度在所述液滴开始通过所述气体的位置低于 100℃。
16. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的组合物还含有一种或多种选自赋形剂、稳定剂、填充剂和表面活性剂的添加剂。
15
17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述添加剂占干颗粒的重量百分数小于 99.9%。
18. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，表面活性剂浓度为 0.001-0.5%重量；稳定剂浓度为 0.05%-25%重量。
- 20 19. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，在死体积小的三通中进行混合。
20. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的一种或多种物质是生理学活性组合物，该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。
25
21. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的干燥气流在干燥室内。

22. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(a)包括：
使感兴趣的物质的水溶液和超临界或近临界的流体达到平衡，形成一种组合物。
23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的干燥气体温度在
5 所述液滴开始通过所述气体的位置低于 100℃。
24. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的组合物还含有
一种或多种选自赋形剂、稳定剂、填充剂和表面活性剂的添加剂。
25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述添加剂占干颗粒的重量百
分数小于 99.9%。
- 10 26. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，表面活性剂浓度为 0.001-0.5%
重量；稳定剂浓度为 0.05%-25%重量。
27. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述步骤(a)的物质是生理学
活性组合物，该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、
抗微生物剂、病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、
15 RNA、肽、蛋白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减
充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、
消炎药、抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活
性的物质。
28. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的干燥气流在干
20 燥室内。
29. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述颗粒是药物活性的物质的
颗粒，它具有至少 90%的该物质的原来药物活性，具有 0.1-10 微米的粒径，0.1%-10%
的水含量，0.1-1.5 克/立方厘米的表观密度。
30. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述颗粒还含有一种或多种选
25 自赋形剂、稳定剂、填充剂和表面活性剂的成分，它们按干粉末重量计的浓度为
0.001%-75%。
31. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述物质是生理学活性组合物，
该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、
病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋

白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。

32. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述颗粒是 0.1-10 微米粒径，
5 表面厚度为粒径 1/10-1/10,000 的空心颗粒。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述物质是生理学活性组合物，
该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、
病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋
10 白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利
尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、
抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。

34. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述干颗粒是在重新水合后活
性比未干燥的 LDH 水溶液有改善的 LDH 细小的干颗粒该方法包括：

(a) 形成一种组合物，它含有 1 毫克/毫升以下的 LDH、5%重量以上的糖、0.5%
15 重量以下的表面活性剂、水、缓冲剂和超临界或近临界的流体，所示糖和表面活
性剂的百分数是在干燥前水溶液中存在的百分数。

(b) 降低所述组合物上的压力，形成液滴；

(c) 使所述液滴通过加热到 70℃的气流，所述气流不是与超临界或近临界流
体相同的物质。

35. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述干颗粒是在重新水合后生
物学活性比未干燥的 LDH 水溶液有改善的 LDH 细小干燥颗粒，其特征在于，该方
20 法包括：

(a) 形成一种组合物，它含有 1 毫克/毫升以下的 LDH、0.05-25%重量的糖水、
缓冲剂和超临界或近临界的流体；

25 (b) 降低所述组合物上的压力，形成液滴；

(c) 将所述液滴通过干燥气流，所述干燥气流不是与超临界或近临界流体相
同的物质，所述干燥气体在环境温度以上，100℃以下加热。

36. 一种用于权利要求 1 所述的形成细小干粉颗粒的方法的装置，其中所述
颗粒含有可在超临界或近临界的流体中溶解的物质或可在水溶液中溶解或悬浮的

- 物质；其特征在于，该装置主要包括：
- (a) 一个装有物质在第一种非气相超临界或近临界的流体的增压室；
 - (b) 一个装有第二种非气相流体中的溶液或悬浮液的室；
 - (c) 用于混合部件(b)的溶液或悬浮液与第一种流体的混合室，该室与所述第
- 5 一室和第二室通过管道连接；
- (d) 第一个流量控制装置，与第一室和混合室之间的管道连接，用于使所述第一种流体流入所述混合室；
 - (e) 第二个流量控制装置，与第二室和混合室之间的管道连接，用于使所述
- 10 (f) 与所述混合室连接的节流器，用于将组合物引出混合室，进入压力低于超临界或近临界流体压力的迅速膨胀区域，在该区域中形成了所述物质细小颗粒的分散体；
- (g) 与节流器连接的干燥室；
 - (h) 与干燥室在一个或多个入口连接的气体源，所述气体不是与超临界或近
- 15 临界流体相同的物质；
- (i) 在颗粒通过干燥室后的收集颗粒的装置。
37. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述部件(c)的混合室是死体积小的室。
38. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述第一种流体是超临界二氧
- 20 化碳。
39. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述部件(a)的第一种流体是近临界的流体。
40. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述部件(b)的第二种液体是水。
- 25 41. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述物质是生理学活性组合物，该组合物选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、

抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。

42. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述(f)的节流器是多通道流式/减压节流器，包括：

- (a)引入组合物的入口端；
- 5 (b)具有多个开口的出口端；和
- (c)独立的基本平行的许多非同心通道。

43. 如权利要求 42 所述的装置，其特征在于，所述出口呈锥形。

44. 如权利要求 42 所述的装置，其特征在于，所述通道由内径 40-50 微米的蜂窝状陶瓷通道构成。

10 45. 如权利要求 42 所述的装置，其特征在于，所述节流器与混合三通用环氧树脂粘合。

46. 如权利要求 42 所述的装置，其特征在于，所述出口端是机械或化学成形的。

15 47. 如权利要求 46 所述的装置，其特征在于，所述机械成形是用一种磨具对出口端施加冲击压力。

48. 如权利要求 46 所述的装置，其特征在于，所述化学成形是用酸蚀刻出口端。

49. 如权利要求 36 所述的装置，其特征在于，所述(c)的混合室是所述组合物通过其中的死体积小三通；

20 所述(f)的节流器具有一条以上基本平行的非同心通道，所述节流器连接于所述三通。

超临界流体辅助的喷雾和鼓泡干燥

5 发明背景

随着基因治疗和重组 DNA 技术的进步，蛋白质药物已成为一类重要的治疗药物。例如，近年来用于治疗呼吸道疾病以及作为全身性传递大分子注射的具有吸引力的替代方法，受到了很大的关注。然而，蛋白质药物的商业性生产严重的受到了蛋白质化学和物理降解的限制，这种降解会导致生物性失活 (Manning, M. C. 等
10 (1989), “蛋白质药物的稳定性”, *Pharm. Res.* 6:903-918; Lai, M. C. 和 Topp, E. M. (1999), “蛋白质和肽的固态化学稳定性”, *J. Pharm. Sci.* 88:489-500)。许多这些降解过程是用水水解和/或通过其他降解过程的。因此，许多蛋白质药物制备成固态，如干粉，来延长产品的使用寿命和储藏稳定性。干燥的固体中蛋白质的解折可导致直接重新水合后不可逆的变性，并显著降低长期储藏的稳定性。

15 超临界流体是温度和压力在临界温度和压力以上的物质，该物质的密度、压缩性和粘度是气体和液体的中间值。近临界的流体与超临界流体相似，定义为其温度和压力与临界温度和临界压力之差在 10% 内的流体。例如，由于 CO₂ 的临界温度是 31.6°C (304.6K)，临界压力是 1073psi，高于 2°C (275K) 和 966psi 的 CO₂ 是接近临界的。已研究了超临界流体在药物细粉生产中的用途，然而，这些技术包
20 括(超临界流体的成核 (Larson, K. A. 和 King, M. L. (1986), “药物工业中超临界萃取的评价”, *Biotechnol. Prog.* 2:73-82), 超临界溶液的快速膨胀 (Tom, J. W. 和 Debenedetti, P. G. (1991) “通过超临界溶液快速膨胀沉淀生物可冲蚀的微球和微粒”, *Biotechnol. Prog.* 7:403-411) 和气相反溶剂技术 (Randolph, T. W. 等 (1993), “气相反溶剂喷射沉淀法合成的聚(L-乳酸)亚微米粒径的生物可降解颗粒”,
25 *Biotechnol. Prog.* 9:429; Meyer, J. D. 等 (1998), “适用于治疗骨髓炎的庆大霉素浸润的生物可降解珠的制备和体内特征” *J. Pharm. Sci.* 87:1149; Winters, M. A. 等 (1996), “超临界二氧化碳中的蛋白质沉淀”, *J. Pharm. Sci.* 85:586; Palakodaty, S. 等 (1998), “超临界流体处理来自水溶液的物质: SEDS 对作为模型物质的乳糖的应用”, *Pharm Res.* 15:1835) 都需要药物是在超

临界流体中可直接溶解的，或可被超临界流体从非水溶剂(如二甲亚砜)中沉淀出来的。美国专利号 5,639,441(Sieves, R. E. 和 Karst, U., 1997 年 6 月 17 日提交)和分案申请 08/847,310 中公开的喷雾器系统能使用超临界流体和不互溶的液体(如水)来处理不溶于超临界流体的物质，形成蒸气气溶胶。因此，使用美国专利

5 号 5,639,441 中公开的方法和装置，可形成水溶性蛋白质、赋形剂、稳定剂、填充剂和/或表面活性剂的颗粒，而不是仅形成在超临界流体和/或有机溶剂中可溶的化合物的颗粒。美国专利号 5,639,441 参考结合于本申请公开的内容。不像其他沉淀方法，如上述的 SEDS 法和 GAS 法，在该新方法中不需要有机溶剂，只要药物、水和超临界或近临界的流体(例如二氧化碳)。

10 即使能制备水溶性蛋白质的颗粒和其他水相制剂，迄今为止还不存在形成这些蛋白质和/或制剂的合适干粉的方法。现存的产生干蛋白质粉末的方法(如喷射干燥、冷冻干燥或超声喷雾)存在着许多问题。总的说，当用现有技术的方法制备时，由于这些方法中涉及的处理步骤，用这些方法干燥蛋白质所需的温度和这些方法的脱水过程，会破坏蛋白质的精致结构，所以干蛋白质粉末常常不可避免

15 被灭活。另外，为了用于直接吸入药物，药物粉末必需足够细小，能有效肺部传递。通过肺部途径的药物传递比其他传递途径(如注射)好，因为疼痛减轻，药物传递到所需位置更快。如果干燥过程产生的颗粒比所需的大，它们必须经过喷射研磨或机械研磨。这对分子会产生额外的物理应力，可能使得蛋白质活性进一步损失。产生于正确粒径范围的干粉能直接用于肺部传递用的干粉吸入器中。

20 喷雾干燥是目前可行的产生干蛋白质粉末的方法。在喷雾干燥技术中，用喷射喷雾器形成液滴喷流。在一类喷雾器中，用高压气流将液体样品吸过小直径管道。气体将液体分解成微小液滴。气体还能以直角横向流过小直径管道，以相似方式形成液滴。超声喷雾器使用与样品溶液耦合的超声振动，使溶液分解成细小液滴。喷雾干燥的一个缺点是逸出喷射喷雾器的分子喷流不是非常浓。导致产生

25 所需量的蛋白质过程缓慢。冷冻干燥是另一种目前使用产生干蛋白质粉末的方法，对药物水溶液进行冷冻，并置于真空中，使水分升华。冷冻干燥方法的一个缺点是干燥过程非常缓慢。另外，产生的颗粒较大，需要额外的处理步骤，产生药理学上理想的粒径。

美国专利号 6,063,138(Hanna 等，2000 年 5 月 16 日)和相关的 EP 0767702

描述了通过将超临界流体、物质在第一载体中的溶液或悬浮液、以及基本与第一载体可溶合，并在超临界流体中基本能溶解的第二载体同时引入到形成颗粒的容器中(维持在超临界压力和温度下)，形成物质颗粒的方法。

PCT 出版申请 PCT/US99/19306(WO 010541) (Edwards 等)描述了混合生物活性剂、磷脂和有机溶剂或有机-水相共溶剂，形成混合物，然后喷雾干燥形成颗粒的方法。

美国专利号 5,695,741(Schutt 等, 1997 年 12 月 9 日提交)和相关的美国专利 5,639,443(Schutt 等, 1997 年 6 月 17 日提交)和 5,720,938(Schutt 等, 1998 年 2 月 24 日提交)描述了用于磁共振成像和超声成像的“微泡”。对液体制剂喷雾干燥，产生具有空隙的微球，然后用氟烃气体渗透剂进行渗透，制备“微泡”。

美国专利号 5,928,469(Franks 等, 1999 年 7 月 27 日)描述了将物质与水溶性或水膨胀性载体物质混合，喷雾干燥得到的混合物，形成含有物质和载体物质的颗粒，其中载体物质是非晶体(玻璃状或橡皮状)状态。Franks 描述了 100-300 °C 气温的喷雾干燥。

美国专利号 6,001,336(Gordon 等, 1999 年 12 月 14 日提交)描述了溶于水溶液的疏水成分和亲水成分的悬浮液进行喷射干燥。

美国专利 5,851,453(Hanna 等, 1998 年 12 月 22 日提交)和相关 EP 0 706 421 描述了通过将超临界流体和物质在能溶于超临界流体中的载体中的溶液或悬浮液引入容器(维持在受控的温度和压力下)，形成颗粒状产物的方法和装置。WO 95/01324(York 等, 1995 年 1 月 12 日出版)描述了使用该方法制备的沙美特罗 xinafoate 颗粒。

WO 99/16419(Tarara 等, 1999 年 4 月 8 日出版)描述了对液体雾化，并喷雾干燥所形成的液滴，制备“多孔微结构”。WO 00/00215(Bot 等, 2000 年 1 月 6 日出版)描述了含有“生物活性剂”的“多孔微结构”的传递系统。

WO99/59710(Hanna 等, 1999 年 11 月 25 日出版)描述了将一种物质溶解或悬浮在第一载体(它是或含有第一种超临界或近临界的流体)中，将所得溶液或悬浮液通入一颗粒形成容器(含有第二种超临界流体)中，形成物质颗粒的方法和装置。该装置维持在一定的温度和压力下，使第二种流体是超临界的。

WO 98/36825(Hanna 等, 1998 年 8 月 27 日出版)描述了形成颗粒的方法和装

置，该方法是将两种超临界流体(其中一种含有要形成颗粒的物质)引入加热和增压的处理室中。

现在需要一种干粉形式的稳定或药物活性的蛋白质，并需要一种产生干粉形式稳定或药物学活性的蛋白质的方法。而且还需要产生具有改善药物活性更细小颗粒的方法。

发明简述

本发明提供了形成细小干燥颗粒的方法，包括：

- (a) 形成含有一种或多种物质和超临界或近临界的流体的组合物；
- (b) 快速降低所述组合物上的压力，形成液滴；
- 10 (c) 将所述液滴通过加热至 2°C-300°C 的气流。

起泡干燥优选应在环境温度以上和 100°C 以下的温度下进行，来缩小药物的降解。给予充分的停留时间和稀释，干燥气流可不经外部加热干燥微小液滴。加热提高了水蒸气压力而加速干燥。组合物还可含有水相溶剂。

还提供了形成细小干燥颗粒的方法，包括：

- 15 (a) 混合含有感兴趣物质的和水溶液和超临界或近临界的流体，形成组合物；
- (b) 快速降低所述组合物上的压力，形成液滴；
- (c) 所述液滴通过加热至 2°C-300°C 的气流。

还提供了形成细小干燥颗粒的方法，包括：

- (a) 用超临界或近临界的流体与感兴趣的物质的水溶液平衡，形成组合物；
- 20 (b) 快速降低所述组合物上的压力，形成液滴；
- (c) 将所述液滴通过加热至 2°C-300°C 的气流。

还提供了形成细小干燥颗粒的装置，主要包括：

- (a) 第一个压力室，含有第一种非气相超临界或近临界流体；
- (b) 第二个室，含有第二种非气相液体中物质的溶液或悬浮液；
- 25 (c) 一个混合室，用于混合所述溶液或悬浮液与第一种液体，该室与所述第一和第二室通过管道连接；

(d) 第一个流量控制装置，与第一室和混合室之间的管道连接，用于使所述第一种流体流入所述混合室；

(e) 第二个流量控制装置，与第二室和混合室之间的管道连接，用于使所述

第二种流体流入所述混合室；

(f)与所述混合室连接的节流器，用于将组合物导出混合室，流入具有低于超临界或近临界流体的压力的迅速膨胀区，在其中形成了所述物质细小粒的分散体；

5 (g)与节流器连接的干燥室；

(h)与干燥室以一个或多个入口连接的气体来源；

(i)颗粒通过干燥室后的收集装置。

混合室优选采用死体积小的三通。

细小颗粒是那些直径小于5微米左右的颗粒。用本发明的方法形成的颗粒，
10 粒径可在约0.1-5微米之间。产生的颗粒可小于0.1微米，但现有的测量方法在很小的粒径范围内受到限制，而且细小颗粒在质量上仅占很微小的部分。颗粒的粒径可以是任何分布。对于某些应用，如吸入治疗，为了传递到肺泡深部，大多数颗粒优选在可吸入的粒径范围内。对于吸入用途，颗粒范围优选在1-3微米之间。对于其他用途，颗粒粒径可以具有较大分布，如本领域已知或无需太多实验
15 易于测定的。对于吸入用途，颗粒粒径对于平均粒径的差异优选较小。

本文所用的“干的”或“经干燥的”是指颗粒含有达到水分，优选不超过5%重量。干的颗粒包括含有0.0001%-1%水分、1%-3%水分、1%-5%水分、5%-10%水分及这些范围组合的颗粒。

本发明形成的颗粒包括各种形状的颗粒。例如，颗粒可以是空心的即“泡粒”。
20 泡粒是中空的，类似于网球或乒乓球，虽然它们可能不像网球或乒乓球那样像个球。其粒径通常是表面厚度的10-10,000倍。用本发明方法形成的其他颗粒不是空心的。较高的干燥温度(~100℃)促使形成空心颗粒，而如果在较低的温度以较缓慢的速度干燥，相同的物质可能形成实心球体。

“组合物”不意味着所有物质必定是互相可溶的。可用本发明方法制成颗粒
25 的物质包括在超临界流体或近临界流体或其混合物中可溶的任何物质；或在水溶液中可溶或可悬浮的物质。水溶液可以包括各种共溶剂，但避免有机溶剂的使用，这在环境和毒物学上都有好处。可制成颗粒的一些物质包括：生理学上具有活性的组合物，含有一种或多种物质，它们选自表面活性剂、胰岛素、氨基酸、酶、止痛药、抗癌剂、抗微生物剂、病毒、抗病毒剂、抗真菌药物、抗生素、核苷酸、

DNA、反义 cDNA、RNA、肽、蛋白质、免疫抑制剂、溶血栓剂、抗凝血剂、中枢神经系统刺激剂、减充血剂、利尿性血管扩张剂、精神病治疗剂、神经递质、镇静剂、激素、麻醉剂、消炎药、抗氧化剂、抗组胺药、维生素、矿物质和其他本领域已知的生理学上活性的物质。可产生单克隆抗体颗粒和疫苗。还可产生物质，

5 如氯化钠的颗粒。一些物质可以是药物学上活性的。“药物学活性的蛋白质”标明该蛋白质具有足够活性，是药物学上有用的。其他物质可能不是生理学或药物学活性的。

在本发明的方法和颗粒中可采用各种添加剂。这些添加剂可在过程中加到感兴趣

10 的物质或任何溶剂中。还可直接在形成颗粒后加入添加剂。添加剂包括稳定剂、赋形剂、填充剂和表面活性剂。在蛋白质制剂中使用稳定剂能防止蛋白质活性在干燥后丧失。稳定剂包括(但不限于):糖和亲水聚合物,如聚乙二醇、羟乙基淀粉、葡聚糖等。稳定剂优选是糖或不同的糖的混合物。可用的糖包括甘露糖、蔗糖、乳糖和海藻糖,以及其他单-、二-和寡糖。在脱水之前在蛋白质溶液中加入一种或多种稳定剂,会显著抑制蛋白质中的构型变化,据信这种构型变化与酶

15 活性的丧失有关。可加入一种或多种表面活性剂来减小液/气之间的界面张力,并减少可能在干燥后发生的降解。可加入表面活性剂减少干燥后可能发生的结块或聚团现象。表面活性剂还可认为有助于球形颗粒的形成。可用的表面活性剂的例子包括:聚氧乙烯(20)去水山梨糖醇表面活性剂(Tween),如 Tween 20、Tween 40、Tween 80 和 Tween 85;硬脂酸;在 Beckman 等(2000)Nature 405:165 中报道的

20 类型的 myrj(PEG 硬脂酸酯)、Span 85(去水山梨糖醇三油酸酯)和聚乙醚-碳酸酯嵌段共聚物。可用磷脂,包括磷脂酰甘油酯。表面活性剂和其他试剂(如盐酸胍)与压力处理结合,可促进蛋白质的重新折叠(St. John, R. J. 等(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96:13029)。填充剂和赋形剂可以是惰性或活性的。

如果最终制剂的稳定性需要,优选首先加入缓冲剂。如果需要较强的稳定性,

25 可以加入糖。如果需要更强的稳定性,可加入表面活性剂。pH 缓冲物质适用于抵抗在高压下二氧化碳溶解形成碳酸导致的 pH 迅速下降。

对于低能力药物,粉末中添加剂的组分应最大程度的减少,对于高能力药物,无活性的赋形剂(稀释剂)有时可占重量的 99%以上。在组合物中加入添加剂可为任何有用的含量。通常使用添加剂的浓度是含有感兴趣蛋白质的溶液重量的约

0.001-0.5wt%(优选约0.001-0.1wt%)的表面活性剂,约0.05-25%(优选当用糖时,约0.1-20%,受糖的溶解度限制)的稳定剂。这些百分数表示喷洒和干燥前的水溶液。在干燥粉末中糖的最终百分数可高达~99.9%。

5 组合物可含有溶于超临界或近临界流体的物质,如亲脂性化合物。可用超临界或近临界流体的混合物。组合物还可含有物质的水溶液或悬浮液和超临界或近临界流体(或多种流体)。接着形成不溶于超临界或近临界流体的物质(如亲水性物质)的液滴。在本方法的一个实施例中,将含有溶解或悬浮的化合物的水溶液泵入死体积小的三通中,同时将超临界或近临界流体泵入三通的另一个支管中。对得到的乳液或增压至接近或达到超临界流体的临界压力以上(当使用二氧化碳时,约10 70-100个大气压)的超临界溶液,使其通过节流器膨胀到大气压力,形成含有溶解药物的液滴或液泡。将该气溶胶引到干燥室中,蒸发掉溶剂,形成颗粒。

本方法的第二个变化不用死体积小的三通就可形成气溶胶。在该方法中,首先使前体水溶液与近临界或超临界流体在静力罐或室中平衡,优选同时搅拌或振荡。然后使该组物流经节流器膨胀到大气压,形成细小液滴。这些液滴被引入15 干燥室,蒸发掉溶剂,形成颗粒。

在超临界流体或水相溶剂(或溶剂混合物)中感兴趣的物质的起始浓度受到该物质在溶剂或超临界流体中溶解度即饱和点的限制。通常起始浓度是溶液或流体中总固体重量的约1%-25%。

20 超临界流体最好是用二氧化碳,因为二氧化碳是内源的,相对无毒,还具有易于获得的临界压力和温度。也可使用其他超临界或近临界的流体,条件是临界温度和压力可以达到并且适用。二氧化碳目前比任何有机溶剂都便宜,而且其使用避免了VOC的逸出。二氧化碳在水中的溶解度在环境温度和100个大气压下约为2%。

25 与液滴流接触的气体优选是惰性的,例如用氮气,但可选择能与感兴趣的分子在干燥过程中反应的气体。与样品接触的气流优选包覆着样品流,但气流可通过其他方式,如湍流混合方式与样品流接触。优选加热该气体至足够温度,达到颗粒干燥的所需程度,而且基本不会影响颗粒的生物学活性。可将气体加热至约2°C-300°C,优选为低于100°C,虽然根据干燥的物质和组合物的成分,可以调节干燥温度。干燥温度的优选范围是约35°C-100°C之间。

优选将干燥气体装在干燥室(如干燥管)中。干燥管的长度应是以产生在颗粒达到一端时具有所需水分含量的颗粒。干燥管优选比迅速膨胀形成的液滴流直径大。蒸发水分需要的大部分热量优选是在进入干燥室前对干燥气体进行加热提供的。加热干燥管可防止在管表面上的凝结。可用灯(如红外线灯)从外部加热, 或用本领域已知的方法(如嵌在管材料中的加热导线)在内部加热干燥管。可用任何合适的材料(能经受它所处的温度)制成干燥管。可制备干燥管的材料的例子是不锈钢或硼硅酸盐玻璃。可使用任何其他设计的干燥室, 只要能获得所需结果。可用其他装置(例如微波炉)用来代替干燥管起到相同的作用。

快速降低组合物的压力通常是使用限流式/减压节流器。节流器可以是导热材料(如不锈钢)或陶瓷材料, 或其他能经受加诸其上的压力和温度的材料制成的中空针。节流器还可以是熔凝二氧化硅节流器, 或都是一束多通道陶瓷毛细管, 如在本文别处将更详细讨论的。另外, 可用高压烧结不锈钢过滤器产生气溶胶。节流器的长度通常约 2 英寸; 然而, 长度不能长至会引起流速缓慢或固态物质在节流器中充分沉淀, 导致结块。节流器可具有如需要的大直径, 只要形成所需粒径的颗粒, 而且泵具有足够能力维持压力。通过节流器的溶液粘度确定了限流器直径的下限。如果粘度太高, 颗粒不会形成。

本发明还提供一种多通道节流器。这些开口可彼此间隔相同的距离。结构可以是圆柱形、六角形或其他形状, 使其与所用的其他部分连接。开口可以是任何合适形状, 圆形或六角形。这种结构的一个实施例在 2 毫米总直径中具有约 900 个非同心的平行通道。该多通道节流器可具有能形成所需颗粒的总直径。各通道优选具有约 40 微米-125 微米之间的内径。可用其他多通道结构, 开口不需要大小相似, 虽然最好是各开口大小相近。

节流器结构的出口尖端可以是平坦的或基本平坦的, 或可具有其他形成。特别有用的一种形状是通过从平端除去材料, 形成与铅笔相似的拉长笔尖形状。这种形状可得到以大于 180°C 发射的更分散的液滴流, 它可有助于防止颗粒在经历鼓泡干燥时的聚集。得到最佳结果的几何形状具体由所需的结果确定, 可以通过常规实验发现。可用任何其他降低组合物压力的方法来加速干燥。

由于组合物可能通过许多开口, 通过系统的流量会提高, 因此通过系统的产量可增大。总通过流量主要由节流器的总内径控制。还可用单通道节流器的各种

内径，包括 75 微米、100 微米、170 微米、200-1000 微米。多通道节流器比单通道的另一个优点是如果一个通道阻塞，剩余的通道仍起作用。

本发明的方法可用于需要比现在更快的干燥的过程。由于本发明的膨胀/爆裂法对干燥提供了更大的表面积，可发生快速干燥，虽然申请人不希望被该理论限制。

本发明的方法产生了各种无水形式的药物学上活性的蛋白质组合物颗粒，它们包括蛋白质颗粒，或可含有一种或多种添加剂，这些添加剂选自赋形剂、稳定剂、填充剂和表面活性剂，其中添加剂以约 0.001%-99.9% 的浓度(用干蛋白质重量计)存在，而且其中颗粒具有约 0.1 微米-10 微米的粒径。颗粒可具有不同的表观密度，视具体颗粒物质以及颗粒形成和干燥的条件而定。例如，可形成表观密度约 0.1-1.5g/cm³ 的颗粒。表观密度可以小于 1 g/cm³，小于 0.5 g/cm³，小于 0.4 g/cm³，或其他范围。颗粒在重新水合后可具有各种活性。例如，本发明能制得在重新水合后具有至少 90% 原来活性，以及 90-95%、90-100%、100-120% 原来活性的颗粒。

可以采用任何便利方法储藏形成和干燥后的颗粒，包括置于袋中或其他储藏装置中，在储藏时还可用干燥剂如 P₄O₁₀ 进一步干燥。

本发明还提供了一种喷雾系统，它使用比现有系统需要样品体积少的注入孔。当进行实验室规模的实验(例如对昂贵的样品)时这是一个优点。注入孔还能使喷雾和干燥系统只与溶剂平衡，在系统平衡后，引入含有感兴趣的蛋白质的溶液。这就减少了蛋白质的浪费。该喷雾系统可以与鼓泡干燥系统结合，或与常规喷射干燥所用的装置结合，在较低的温度下更快干燥。

提供了一种方法，使用将小体积样品引入流体的装置将一定体积的一种或多种物质注射进入溶液流(该溶液流含有水相或超临界或近临界的溶液)中，对得到的溶液进行迅速降压，形成液滴。引入装置优选是个注入孔，如 HPLC 所用的。引入体积最好是约 0.01 毫升-10 毫升。

提供了一种传递蛋白质或其他物质的方法，它包括：用本发明的方法干燥蛋白质或其他物质，用水或其他合适的物质重建蛋白质，并通过所需装置进行传递。

还提供了稳定和/或药物学上活性的颗粒。“稳定”意味着在储藏、运输、重建和使用过程中能抵抗分解。

还提供了一种迅速膨胀组合物的装置，该装置具有死体积小的三通，所述组合物通过该三通和一种节流器，后者具有一条以上基本平行的非同心通道。死体积小的三通是体积约 0.2-10 微升的混合用三通。可用任何合适方法，如环氧或合适的零件将三通连接在节流器上。

- 5 本发明的干燥技术优于常规干燥技术。本发明的干燥技术是可以放大的，不会显著改变颗粒粒径或形貌。本方法还提供了比其他方法产生的表观密度更小的颗粒。这就是空气动力学粒径小，而绝对粒径大的颗粒，因为在一个实施例中，形成了额外的气相超临界流体，生成呈多孔或空心结构的颗粒。这使得在一种用途中具有较低的动量的较大颗粒，能深入肺内，而其他方法制成的颗粒难以做到
- 10 这一点。

附图简述

图 1 是超临界流体辅助的喷雾和鼓泡干燥系统的示意图。

图 2 是本发明所用干燥管的示意图。

图 3 是多通道限流式节流器的电子显微照片；

- 15 图 4 是成型的多孔节流器的电子显微照片。

图 5 是用超临界 CO₂ 喷雾后，磷酸一氢钾/磷酸二氢钾(◆，pH7)，Tris/Tirs HCl(▲，pH7.2)，柠檬酸/柠檬酸钠(■，pH5.5)和乙酸/乙酸钠(●，pH5)的缓冲能力。

图 6A-6G 是本发明方法产生的干燥蛋白粉的电子显微照片。

- 20 图 7 显示了本发明的方法产生的含和不含赋形剂的溶菌酶粉末的电子显微照片。

图 8 显示对 4 毫克/毫升溶菌酶，100mMpH7.0 的磷酸缓冲液和 10%甘露醇(A)和 10%蔗糖(B)超临界 CO₂ 辅助喷雾的样品的 X 光衍射图，鼓泡干燥的粉末中含有最终近似固体重量百分数为 4%蛋白质、16%缓冲剂和 80%糖。

- 25 图 9 显示了本发明的方法产生的含或不含赋形剂的溶菌酶粉末的 FTIR 图谱。

图 10 是重新水合的粉末的溶菌酶酶活性与原始制剂的活性比较图，该粉末是用超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥制备的。

图 11 是用本发明的方法制备的乳酸脱氢酶(LDH)粉末在重新水合后的活性图。

图 12 是使用各种不同种类以及用量的赋形剂制备的颗粒在重新水合后溶菌酶活性恢复的图。

发明详述

本发明形成干燥蛋白质的技术比常规所用的技术的优点包括：能形成各种不同蛋白质和其他物质的稳定制剂，这些制剂目前用常规技术干燥是不合适的。本发明干燥过程对物质产生的应力和破坏小得多。另外，用该方法能直接制备含有蛋白质的稳定制剂在可吸入粒径范围内的细粉，不再需要额外的机械粉碎，这种粉碎可能会对干燥制剂进一步产生应力，进一步丧失其活性。本发明过程中优选采用的温度低于常规干燥法。这种降低的干燥温度会使热降解减小。本发明方法形成的粉末所含的水分比常规干燥方法的要少，所以不再需要进一步的干燥步骤。本发明方法减少了物质变性程度和常规喷雾法导致的聚集现象。

说明本发明方法中液体、溶液和颗粒流动的图 1 是本发明的一个具体示范的实施例。装有液态二氧化碳的二氧化碳储器 10(可以是气瓶或其他储器)与二氧化碳泵 15(可以是注射泵或其它合适的泵)通过管道 70 连接。二氧化碳泵 15 通过管道 71 与混合三通 20 连接，当到达加热的混合三通 20 时，二氧化碳在变成超临界流体或近临界流体的条件下泵送通过管道 71。水性溶剂储器 40 通过管道 72 与液体泵 35(优选高效液相层析(HPLC)泵，它通过管道 73 与注入孔 30 连接)连接。注入孔 30 用于加入蛋白质或其他药物、缓冲剂、填充剂、赋形剂、稳定剂和/或表面活性剂的水溶液。来自储器 40 的水相溶剂和通过注射孔 30 注入的蛋白质溶液(含或不含添加剂)通过管道 74 通入混合三通 20。混合三通 20 优选具有小的死体积(如小于约 10 微升)，因此可在其中形成超临界二氧化碳和溶液的密切混合物。混合三通 20 装有减压节流器 25，以维持混合三通中的背压力，并还可通过加热线圈保持三通中的超临界温度。

所得的混合物从混合三通 20 通过细小直径的减压节流器 25 后，在减压节流器 25 节流孔出口的压力突然释放，形成非常细小的溶液液滴的气溶胶和/或泡沫(80)。节流器可具有单个出口，或可具有许多出口。然后气溶胶 80 被引入干燥管 45 中央。干燥管 45 优选短于 1 米，直径小于 10 厘米。在干燥管 45 中经过管道 85，通过输入孔 35 加入来自氮气储器 30 的氮气。最好是围绕干燥管 45 的中央安排等距离的多个输入孔 35。可用灯 90 加热干燥管 45。也可如图 2 所示加热氮气。如

果没有爆炸危险，可使用加热的空气或气体混合物。加热促进着干燥过程，并避免水凝结在管内壁上和滤纸上。如果水凝结在滤纸上，它会导致阻塞。干燥管 45 的出口装有滤纸支架 50，它与真空泵 55 通过一合适的接头 91 连接。

5 在操作中，通过超临界二氧化碳泵 15，将液态二氧化碳从二氧化碳储器 10 通过导管 70，经过泵 15，通过导管 71，泵送到低体积 (0.2-10 微升) 混合三通 20 中，它在其中变成超临界流体(如果还没有变成的话)，或近临界流体。泵 35 将通过导管 72 来自溶剂储器 40 的水相溶剂通过导管 73 泵送到注射孔 30，通过该注射孔以水溶液形式加入感兴趣的蛋白质。添加剂可通过注射孔 30 引入或加到储器 40 的溶剂中。可在蛋白质溶液或储器 40 的水相溶剂中使用缓冲液，以减少蛋白
10 质变性的可能性，并减少由于在混合物中引入二氧化碳，未补偿的 pH 改变引起的可能发生的聚集现象。可用加热线圈对混合三通 20 加热，也可和/或加热节流器 25 维持温度在二氧化碳的临界温度以上。用阀门装置(图 1 中未显示)分别调节二氧化碳和水溶液的流量。流量也可通过改变泵的条件进行控制。混合三通 20 中的混合物在下游膨胀，形成含有溶于或悬浮于水溶液的物质的小颗粒气溶胶 80。
15 颗粒被引入干燥管 45 中央，在其中干燥并收集在滤纸支架 50 的滤纸上。另外，如果粒径分布合适的话，例如可用旋风式收集器或级联式冲击取样器收集颗粒。

注射孔 30 的使用能在引入蛋白质和/或添加剂以前使系统平衡。当用热电偶测出干燥管的温度是平衡的，而且水溶液和二氧化碳的流量达到稳态时，系统就达到平衡。平衡后，通过注射孔 30 可在水相进料管中注射已知体积的蛋白质制剂。

20 六孔注射阀可用于喷雾系统，从而在加样阶段有两个独立的溶液回路。在一个回路中将溶剂从 HPLC 泵泵送通过混合三通，而样品包含在样品回路中，如 3 毫升的样品回路，它在加样阶段不与溶剂回路连接。在注射阶段，溶剂从 HPLC 泵泵送通过样品回路，到混合三通。这种修改的优点是蛋白质或其他感兴趣的物质不泵送通过 HPLC 活塞，使得能够注射非常少的样品。每次运行所需的蛋白质数量和
25 总运行时间可很大下降。

当使用样品注射阀时，典型系统参数包括：二氧化碳压力 100 大气压，二氧化碳流量 0.3 毫升/分钟；水相流量 0.3 毫升/分钟，使用内径为 50 微米的 5 厘米长的熔凝二氧化硅节流器。

图 2 显示更详细的干燥管和干燥过程图。来自混合三通 20 的溶液通过节流

器尖 70, 通过入口 100 进入干燥管 45 内, 在其中形成液滴。来自储器 30 的氮气 (或其他气体, 惰性或含有需要与气溶胶颗粒反应的物质) 通过管道 85 到达气体干燥柱 60。然后气体通过管道 95 到加热线圈 65。在优选例中, 将气体加热到约 70 °C, 流量约 15 升/分钟。加热的气体通过管道 100, 经过气体入口 35 到达干燥管 5 45。在优选例中, 干燥管 45 是玻璃管, 具有 5 个输入口, 一个在中间加入气溶胶, 其他 4 个入口围绕中央口排列。还用灯 90 在外部加热干燥管 45。在干燥管 45 的出口, 用支架 50 上的滤纸收集颗粒。

干燥管 45 可使用其它外形。例如, 可用多些或少些的入口 35。还可将气体加到管中央, 颗粒加在气体周围。还可在干燥管中混合气体和颗粒。干燥气体和 10 颗粒在管内的相互作用影响最终产物的特征。

优选用不锈钢制造全部的高压部件。可使用其他惰性材料和涂层。优选用不锈钢制造滤纸支架 50。节流器长度优选约为 2 英寸 (5 厘米)。上述装置中水溶液的流量约 0.5-3 毫升/分钟。如需要, 可以大批量或小批量进行该过程, 只要调节尺寸和流量, 同时维持相似的温度和压力。在一具体的代表性实施例, 当使用 15 50 微米内径的限流式节流器时, 二氧化碳和水相溶剂的流量大约是 0.3 毫升/分钟。

注射孔 30 使得在没有注射孔的系统中引入大体积 (>10 毫升) 制剂需要的相同时间内, 可引入几个小体积蛋白质制剂的等份 (约 0.1-10 毫升)。这就可以使几种具有不同成分和浓度的蛋白质制剂快速干燥, 而且每次运行中蛋白质用量很少。 20 这比商品化的实验室规模喷射干燥器 (它每次实验需要 100 毫升的蛋白质溶液) 优点大得多。然而, 本发明的方法也可用于大体积的蛋白质和大体积的任何物质的干燥。

节流器可以是多通道节流器, 它具有多根平行管子。一种这样的多通道节流器可以用玻璃多通道柱 (Alltech, Inc. Illinois) 制造。该柱可以长达 1 米的长度 25 购得, 具有大约 900 个等于柱长的洞, 各洞具有约 40-50 微米或更大的内径。可用一个这样的柱作为多通道节流器。一种这种产品具有六角形截面 (Alltech 部件号 17059)。其他产品具有圆形截面, 其中六角形置于相同直径的圆中。图 3 显示了这样的节流器末端的电子显微照片。圆形截面的节流器更容易与泵以及具有套环密封装置和 Swagelok 零件的罐连接, 它们也可与不锈钢管道或三通通过涂有环

氧前聚合物混合物的玻璃或陶瓷管连接，并将其滑入大一些的钢管中。六角形截面的孔隙可用聚合物或环氧填充。这些多通道节流器可用于静态过程，也可用于动态过程。在动态过程中，死体积小三通用来对液体蒸汽(接近临界状态)或要喷雾的超临界流体如二氧化碳和水溶液或悬浮液进行混合。在静态过程中，超临界或近临界流体在接近其临界温度的温度对感兴趣的物质的溶液进行增压。这使得一些超临界或近临界流体(如果用二氧化碳，达到大约 1-2 摩尔百分数)溶于水。当溶液通过混合达到平衡时，如果水溶液和超临界或近临界的流体通过节流器射出，随着增压流体的压力回到大气压或更低时，形成气溶胶。还可在气体反溶剂法中和其他需要颗粒的方法中使用多通道节流器。

10 节流器可具基本平坦的或制成一定形状的末端。节流器的末端可以是机械成形的。例如，可用一种磨料除去其部分材料。一些合适的研磨料包括例如钻石包埋的镍合金板(3M 制造的大理石雕刻家使用的类型)。用极细小(微米粒径)的钻石晶体磨去各通道周围的壁。图 4 显示了用钻石板造型后的图 3 所示的节流器类型。另外，可用细碳化硅“干湿”砂纸。灰浆和瓦中的硅酸盐可磨蚀和成形节流器。

15 优选采用钻石。

节流器上的层也可化学蚀刻。例如，可用 HF 蚀刻玻璃节流器的所选层。可以使用的一种方法是将空气缓慢通入节流器的尖端，并将其浸在氢氟酸(水溶液)中越来越深。这就使末端逐渐变成铅笔样的笔尖。也可使用其他合适的化学物质。例如，如果节流器是金属的，可使用盐酸等酸来除去层。也可使用机械和化学蚀刻的组合。

20 锥形尖端的角度可从非常尖到很大的锐角(从节流器体平面约 5 度到从节流器体平面约 89°)。锥体尖端的角度确定了液滴形成的体积。当角度越小，会增加形成液滴的体积。当角度越小时，通道出口显得是长椭圆形，而不是圆形。在半球区域上喷射(而不是单向喷射)使得液滴迅速的分散在干燥气体中，聚集较少。

25 使用多通道节流器的好处包括相对于单通道节流器而言通量的增加，如果某些通道被阻挡或阻塞，仍能连续形成颗粒。用延长的液体出口的好处包括：1) 更分散(轴向)的气溶胶烟雾，它有助于避免颗粒在形成后聚集的问题，2) 混合得到更好的流体。

多通道节流器可用来形成各种物质的颗粒，这些物质包括液体、熔体、溶液、

超临界流体和超临界流体的溶液或悬浮液、水性和/或有机溶剂、乳液、微乳液、胶团、反相胶团和其他物质，形成的是含有细小颗粒固体(非晶态或晶态)的气溶胶。可用本文所述的方法或其他本领域已知的方法干燥这些气溶胶。还可在灭火器中使用这种多通道节流器，其中可用自由基清除剂联合除去热量来灭火。含有

5 自由基清除剂的非常细小分散的水滴气溶胶云比常规喷射喷嘴形成的不含 CO₂ 的大水滴具有更大的表面积和液滴悬浮时间，而不会沉积。

实施例

材料:

从 Sigma Chemical Co. 以批号 53H7145 购得微晶蛋清溶菌酶(结晶，经水中

10 透析和冻干)。作为铵盐悬浮液，从 Sigma Chemical Co. (从家兔肌肉中分离，M₄同工酶，批号 95H9550)和 Boehringer-Mannheim(从猪心脏中分离，M₄同工酶，批号 84895527)购得乳酸脱氢酶。从 Pfanstiehl Laboratories 购得蔗糖和甘露醇，不经进一步纯化使用。从 Aldrich Chemical 购得聚氧乙烯去水山梨糖醇月桂酸酯(Tween20)和缓冲盐，不经进一步纯化使用。从 Scott Specialty Gases 购得二氧

15 化碳(SFE 级，虹吸罐)。

方法:

酶的制备。在所需制剂中加入固态的、预先冻干的固体材料，制备溶菌酶溶液。溶菌酶是一种较强的蛋白质，在冻干或常规喷射干燥后破坏不显著。让冻干粉末缓慢扩散进入 2-8℃之间的溶液。将 LDH 硫酸铵悬浮液对 100mM 磷酸钾(pH7.5)

20 在 2-8℃透析 12-24 小时。然后将得到的溶液稀释到浓度为每毫升水 100 毫克蛋白质。

喷雾和鼓泡干燥系统。本文已简要总结了用于超临界 CO₂ 辅助喷雾的系统(如图 1 所示)。各均以大约 0.3 毫升/分钟的稳定流量将水流和超临界或近临界的二氧化碳流(T>32℃, P=1500psi) 分别传送到死体积小混合三通(Valco)的两个支

25 管中，水流用 HPLC 溶剂传送泵(Water 型 M-6000A)，二氧化碳用注射泵(ISCO 型 260D，设定在 1500psi 的恒压下传送)。将最初室温下的这两股流用装接于混合三通的热电偶控制的加热筒加热到 32℃以上。让在混合三通中得到的乳液膨胀出三通的第三个口，它装有一个 50 微米内径，5 厘米长的熔凝二氧化硅减压节流器(Alltech)。当乳液流出减压节流器，此时水溶液中溶解的二氧化碳爆炸性释放，

超临界流体迅速分解形成非常细小的含有一些剩余溶解二氧化碳的水相液滴。然后该气溶胶进入定制建造的干燥室，它包括一根 30 厘米 x2 厘米的硼硅酸盐玻璃管(在管顶部装有 4 个气体入口)和一个粉末过滤装置(不锈钢 Millipore 滤膜支架，0.2 微米孔径的醋酸纤维素滤纸)，然后是在管底部的一个冷捕集器和真空泵。

5 和气溶胶进入的同时，通过干燥管顶部的 4 个气体入口加入流量约 15 升/分钟的加热干燥的氮气。另外，干燥管用一红外灯从外面加热，促进干燥过程，并防止水凝聚在管的内壁上。在喷雾过程中干燥室内的温度维持在 70℃，这足够引起迅速的鼓泡干燥。

一旦系统通过喷雾和干燥纯净水 10-15 分钟平衡后，将水相蛋白质制剂(含
10 2-20%重量/重量总固体)通过 HPLC-型注射孔注入水相进料管线。这类注射孔能加入体积非常小的等份(约 0.5-5 毫升)水相蛋白质制剂，以便进行喷雾、干燥和收集，这对于使用的蛋白质量有限的情况是很适宜的。该系统的设计能在温热干燥氮气的稳定吹气条件下收集干燥的粉末，该吹气过程持续到实验完成，以从干燥室中除去过量水蒸气。然后从系统中取下过滤装置，转移到充有干燥氮气的套袋
15 中，在套袋中将粉末转移到 1.5 毫升微量离心管中，加盖储藏在置有浓硫酸的干燥器中，供分析之用。在一些实验中，用真空泵通过滤膜以稍低于大气压(在 Boulder, CO 一英里海拔高的地方 630 毫米汞柱)的压力将水蒸气、二氧化碳和氮气抽出。在其他实验中，不用真空泵，在稍高于环境的压力下进行干燥，得到相同结果(数据未显示)。

20 静态和动态系统 pH 测量

为了模拟可观察静态系统中死体积小的三通内的情况，将与 Fisher pH 指示溶液混合的未缓冲或缓冲的溶液，装入配有蓝宝石窗、一个压力转换器、热电偶继电器控制的加热筒和磁性搅拌装置的高压室中。在 35℃ 一边搅拌一边平衡室中的内含物，并用 CO₂ 增压到 1500psi。为了确定由于用二氧化碳增压水相制剂导致
25 酸性增加的程度，对于缓冲和未缓冲溶液都进行了一系列 pH 测定。在第二个更定量的方法中，用超临界 CO₂ 系统喷雾缓冲和未缓冲的溶液，作为液滴气溶胶收集起来，直到收集容器中水溶液的液面允许用 pH 探针进行测量。

实验设计

用超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥从下列水相溶菌酶制剂，制备了粉末表

征用的样品：“仅含缓冲液”含有4毫克/毫升溶菌酶和100mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)。“10%甘露醇”含有4毫克/毫升溶菌酶、100mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)和10% w/w甘露醇。“10%蔗糖”含有4毫克/毫升溶菌酶、100mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)和10%w/w蔗糖，“10%蔗糖 w/Tween”含有4毫克/毫升溶菌酶、100mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)、10%w/w蔗糖和0.01%w/w Tween20(聚氧乙烯(20)去水山梨糖醇月桂酸酯)。在喷雾前，所有制剂均通过0.2微米Nylon注射过滤器，除去其中的颗粒。每次实验将约2毫升各制剂注射入喷雾系统，除了仅含缓冲液的制剂，它每次实验的注射体积是6毫升，(为了每次实验能收集足够的粉末用于分析)，因为该制剂中的溶质总含量低。每种制剂注射三次，分别收集每批粉末，来确定各次实验之间结果的一致性。另外，从含有0.1毫克/毫升LDH和100nM磷酸钾(pH7.5)，并分别含有下列赋形剂的水相制剂中制备了含LDH的粉末：10% w/w甘露醇；10%w/w蔗糖；和含有0.01% w/w Tween20的10% w/w蔗糖。这些浓度是指在鼓泡干燥前水溶液中的百分数；干燥粉末中的浓度由于水被除去而成比例的增大。

尺寸排阻色谱

在装有AD20型UV探头(定为280)、GP40梯度液体泵和Spectra Physics自动采样机的Dionex HPLC上，进行尺寸排阻色谱，测定可溶性聚集物的存在与否。固定相是30毫米x7.8毫米(内径)的TosoHaas TSK-Gel 3000SW_{x1}柱，其中有孔径为250Å的5毫米二氧化硅珠。同等(isocratic)流动相是100mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)。在注射前，将粉末样品用去离子水重新水合到脱水前的原来总固体重量与总溶液重量之比。将该重新水合的样品进行离心，在隔膜加盖的HPLC小管中装到自动采样机上。流量设定为0.5毫升/分子，每种样品向柱中注射约10毫升。用辣根过氧化物酶、肌红蛋白、BSA和卵清蛋白作为分子量标准。每种样品注射三次，确定各峰面积的平均值。

扫描电子显微镜分析

用IS1-SX-30和Jeol JSM-6400扫描电子显微镜(SEM)在加速电压30kV条件下观察粉末。用碳丝胶带将样品粘附在铝棒上，在分析前用金溅射机进行涂覆。

热分析

在Perkin-Elmer DSC-7上进行了差示扫描量热计(DSC)分析。将粉末(5-10毫克)加到经阳极化的铝盘上，在氮气下密封在湿度受控的大气(<2%相对湿度)中。

样品迅速冷却到 -20°C ，在 -20°C 维持10分钟，然后以 $10^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的加热速度加热到 200°C 。 T_g 是玻璃转变温度(玻璃-液体)。 T_m 是固体-液体的熔化温度。

X光粉末衍射

在装有 CuK_α 光源($\lambda=1.54056\text{\AA}$)的Sintag PADV系统(在X光管负载为40kV和25毫安条件下操作)上进行粉末X-光衍射。为了确定超临界 CO_2 辅助的喷雾和鼓泡干燥制备的粉末中是否存在结晶，在 2θ 为 5° – 50° 范围内，以扫描速度为 $0.02^{\circ}/\text{分钟}$ 对样品进行扫描。

水分分析

在Mettler Karl Fisher自动滴定器上进行了Karl Fisher滴定。在氮气充气的 10 手套式操作箱(维持在1%相对湿度以下)中制备分析样品。在25毫克样品粉末中加入约1毫升无水甲醇或甲酰胺。对得到的悬浮液超声处理数分钟。将100毫升该溶液注入库仑计，在减去悬浮粉末的溶剂的背景水分含量后，获得粉末的水分含量。每种粉末样品进行三次平行分析。

红外光谱分析

在Bomem PROTA红外分光光度计上测出了红外光谱。将冻干的粉末(约0.5毫克蛋白质)与300毫克无水KBr混合，用13毫米可抽空模具压成小片。将小片直接置于氮气充气的分光光度计样品室内。天然蛋白质的水溶液(20毫克/毫升)置于具有 CaF_2 窗的样品室内，用6毫米Mylar定位片相隔。以 4cm^{-1} 分辨率在 $4000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ 范围收集了128次扫描的平均值，进行Fourier变换。根据先前建立的标准，从蛋白质溶液的蛋白质光谱减去液态水和水蒸气的光谱(Dong, A.等(1990)“二阶导数酰胺红外光谱得到的水中的蛋白质二级结构”，Biochem 29:3303–3308; Dong, A.和Caughey, W. S. (1994), “研究血红蛋白反应和结构的红外方法” Methods Enzymol. 232: 139–175; Dong, A.等(1995), “冻干的红外光谱研究-诱导的蛋白质聚集”，J. Pharm. Sci 84:415–424)。计算出Fourier变换光谱的二阶导数，对数据进行Savitzky-Golay修正，并用七点卷积窗口减少可能的白噪声。

溶菌酶活性试验

制备了溶壁微球菌的细菌悬浮液(Sigma批号38H8619)，其中有浓度为0.25毫克/毫升的67mM磷酸盐缓冲液(pH6.6)。用磷酸盐缓冲液将溶菌酶溶液稀释到4

毫克/毫升。反应混合物含有 2.5 毫升细胞悬浮液和 0.1 毫升酶稀释液。酶活性与细胞悬浮液浊度的下降速率成正比，浊度用分光光度计在 450 纳米测量 2 分钟，结果是线性下降的。

LDH 酶活性试验

- 5 25°C，在 2 毫升反应混合物中测定了 LDH 活性，该混合物由 25mM 三(羟甲基)氨基甲烷/三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris/Tris HCl, pH7.5)、100mM KCl, 2mM 丙酮酸盐(Sigma, 批号 126H10981)和 0.15mM NADH(Sigma 批号 027H78191)组成。在反应混合物中加入 LDH 制备物(10 毫升)，比色杯倒转 3 次，用分光光度计测量 340 纳米处吸光度减少。在超临界 CO₂ 辅助的喷雾之前和干燥粉末重新水合之后立即测量活性，报道为原始活性的百分数。注意在图 11 中对于某些组合物，LDH 活性大于 100%的原始水溶液的活性。

含或不含缓冲液的静态和动态 pH 测量

- 研究了当 CO₂ 溶于水时，使用缓冲液能否发生酸化的问题。在 1500psi 压力下，CO₂ 在水中的溶解度(在 35°C 约 2 摩尔%)会导致未缓冲溶液中酸度的增加。在不存在缓冲液情况下，酸性环境可能使蛋白质变性。因此，用静态系统模拟混合三通内的条件，观察无缓冲水溶液中酸度的增加程度。在用二氧化碳增压前加入 pH 敏感的指示染料，来定量测量酸度的改变。如预期的，CO₂ 增压后 pH 迅速降到指示剂范围(pH<4)以下。用该静态系统，对下列缓冲盐估测了中和这种 pH 下降效应的能力：磷酸一氢钾/磷酸二氢钾(pH7)，Tris/Tris HCl(pH7.2)，柠檬酸/柠檬酸钠(pH5.5)和乙酸/乙酸钠(pH5)。所有测试的溶液的缓冲能力(测作缓冲系统阻止指示染料颜色改变的能力)在约 100mM 浓度显示为 pH 稳定(数据未示)。为了进一步对这些观察定量，用超临界 CO₂ 系统对静态系统中使用的相同缓冲液进行喷雾，收集所得的液滴气溶胶。各溶液的 pH 必须在收集后立即测定，因为该值由于二氧化碳的冒泡而继续增加。图 5 中表示了该实验的结果，这与静态观测到的 100mM 的缓冲液会充分中和溶解 CO₂ 的效应，并能避免对酸化引起的蛋白质的破坏是一致的。

细粉表征

为了确定本发明的方法产生的分子的表面特征，用上述方法制备了舒喘宁硫酸酯、托布拉霉素硫酸酯、色甘酸钠、rhDNase、乳糖和氯化钠的细粉。液滴形成

的条件是：CO₂压力 1500psi、流量 0.3 毫升/分钟、CO₂和 H₂O 浓度约为 10%(重量/体积)、管子入口约 70℃，管子出口约 50℃，50 毫米和 5 厘米熔融二氧化硅节流器、0.2 毫米醋酸纤维素滤纸。

图 6 显示了用本发明方法制备的代表性干粉的电子显微镜照片。图 6A 是本发明方法用 20%氯化钠水溶液样品制备的干氯化钠颗粒的透射电子显微镜(TEM)照片。图 6B 是相同氯化钠溶液用本发明方法干燥后的扫描电子显微镜(SEM)照片。图 6C 是甘露醇的 TEM 照片。图 6D 和 6E 显示用本发明方法对 10%(总溶质质量/体积)的水溶液制备的托布拉霉素硫酸酯颗粒(6D)和 1%托布拉霉素硫酸酯在乳糖中的颗粒(6E)。图 6F 是本发明方法制备的舒喘宁硫酸酯颗粒。图 6G 是本发明方法制备的色甘酸钠颗粒。

最初对材料和方法两节所述的水相溶菌酶制剂通过 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥制备了干粉。肉眼可见所收集的样品都是非常细小颗粒的白色粉末，粉末的质量在各次实验之间差异非常小。所有的粉末在湿润空气中是吸湿性的，但在低湿度环境中能自由流动而且容易处理。图 7 显示了代表性干粉蛋白质制剂的电子显微照片，有“仅含缓冲液”粉末(A)，10%甘露醇粉末(B)，10%蔗糖粉末(C)，和含有 0.01%Tween 20 的 10%蔗糖粉末(D)。注意当用 Tween 时，(见图 7D)，形成了一种聚集颗粒较少，球形更明显的分散颗粒。这可能是加入表面活性剂 Tween 20 的直接或间接效果。虽然不希望被任何具体理论所限，但可以相信在处理过程中去垢剂帮助脱水。产生的所有粉末中有很一部分颗粒基本在 1-3 毫米直径的可吸入粒径范围内。从仅含缓冲液的制剂和含有 10%甘露醇的制剂中制备的粉末的形状比含有蔗糖的制剂制备的粉末，其颗粒球形度和光滑度差些。在蔗糖溶液中加入 Tween 20 具有进一步光滑干燥颗粒表面的效果。其他颗粒研究者对于常规喷射干燥的颗粒已经观察到了这一点，并可以认为在水相制剂中加入表面活性剂具有在脱水过程中减少表面湍流的作用。

10%甘露醇制剂的粉末颗粒显微镜照片(图 7B)表明是更为完善的结晶材料，表现为多面形状的颗粒。

水分分析

对本发明方法干燥的粉末进行的 Karl Fischer 水分分析也表明了低水分含量：4 毫克/毫升溶菌酶和 10%(原始水溶液中的百分数)甘露醇样品的水分含量是

0.6±0.05%，4毫克/毫升溶菌酶和10%蔗糖的粉末的水分含量是1.18±0.02%，4毫克/毫升溶菌酶和10%蔗糖和0.01% Tween 的粉末的水分含量是1.25±0.07%。

用超临界CO₂辅助的喷雾和鼓泡干燥制备的各LDH粉末得到的Karl Fisher 5 滴定结果表明，用该新方法能获得非常低水分的颗粒：从仅含缓冲液的水相制剂制备的粉末，水分含量是0.83±0.06% w/w，从10%甘露醇制剂得到的是1.3±0.01%，从10%蔗糖制剂得到的是1.4±0.08%，从含有10%蔗糖和0.01%Tween 20的制剂得到3.25±0.03%。收集的蔗糖粉末是非常吸湿性的，其操作必须在充有干燥氮气时手套式真空室内进行。其他糖粉末，如海藻糖粉末吸湿性较小。

XRD 和 DSC

10 由于赋形剂的结晶会剧烈影响固态药物制剂的溶解度和稳定性，研究了超临界CO₂辅助喷雾形成结晶和/或无定形粉末的能力。甘露醇在冻干过程中会结晶和在喷射干燥后形成结晶粉末的强烈倾向是人们熟知的。因此，选择甘露醇作为赋形剂来确定喷雾系统形成结晶粉末的能力，虽然该赋形剂对模型蛋白质不能起显著的稳定作用。虽然结晶性是用作固态药物填充剂的赋形剂的理想性质，但是在过程中有结晶倾向的赋形剂对不稳定的蛋白质药物在脱水和随后干燥状态的储藏过程中保护作用很小。对于超临界CO₂辅助的喷雾制备的样品，在图8中提供的是来自10%甘露醇制剂的溶菌酶样品的粉末衍射数据。其水相制剂含有4毫克/毫升溶菌酶，100mM pH7.0的磷酸缓冲液，与10%甘露醇(A)或10%蔗糖(B)一起进行喷雾。鼓泡干燥粉末中最终的大致重量百分数：4%蛋白质、16%缓冲剂和80%糖。15 10%甘露醇溶液制备的粉末的衍射数据表明样品有良好的结晶性，而且似乎是a和b多形甘露醇的混合物。该衍射图谱与用厂商提供的纯D-甘露醇获得的粉末衍射图谱(未显示)一致。

收到状态的甘露醇、与溶菌酶喷射干燥的甘露醇、与溶菌酶一起喷射干燥的蔗糖以及蔗糖和溶菌酶的DSC在本说明书中并未图示。接受状态的甘露醇样品的25 DSC表明有157.25-177.56℃的峰，从156.10℃开始。T_m是159℃；300.47J/克。与4毫克/毫升溶菌酶一起喷洒干燥的甘露醇样品的PSC显示了从77.63℃开始到146.48℃的峰。T_m=154.7℃；134J/g未校正。含有4毫克/毫升溶菌酶的蔗糖样品的DSC显示21.93-47.12℃的T_g，从40.25℃开始，T_g=43.05℃，1.51J/g未校正。含有Tween和4毫克/毫升溶菌酶的蔗糖的DSC显示28.57-56.99℃的T_g，从

45. 36°C开始; 1.00J/g deg; $T_g=50.95^\circ\text{C}$ 。

蔗糖制剂的 X 光粉末衍射数据(图 8B)表明其更为无定形的本性, 并由 DSC 热像图中观察到的玻璃转变所证实。在玻璃转变温度以下形成无定形玻璃态粉末的能力是所揭示物的重要能力, 因为近来已发现联系蛋白质稳定化与玻璃化(玻璃形成)的重要证据(Crowe, J. H. 等(1998), “脱水生活中玻璃化的作用”, *Annu. Rev. Physiol.* 60:73)。样品的差示扫描量热计分析表明, 在 154.7°C有吸热现象, 它与结晶 D-甘露醇的溶解温度(169°C)一致。低 T_m 可能是由于在粉末中存在水(Karl Fisher 滴定测定约 1%)。

重新水合的溶液的表征

10 将滤纸上收集的粉末转移到小的惰性试管中, 用蒸馏的去离子水重新水合到原始的重量/重量百分数(总溶质质量/总溶液质量)浓度。与原来的溶液相比, 重新水合的蛋白质溶液的活性分析表明, 全部喷洒的溶液保持(或恢复)90%以上的活性。HPLC(尺寸排除 Tosohaas 柱 TSK3000SW_{x1}, 100mM KPO₄ pH=7.0 洗脱缓冲液)表明单体蛋白质与二聚体聚集物之比在干燥和重新水合后保持相同(聚集物形成二聚体、三聚体, 最终形成不溶性的聚集物是常见的蛋白质降解途径)。HPLC 数据在此处并未显示。计算出聚集物: 单体之比对于最初的溶菌酶制剂以及所有重新水合的粉末大约是 0.21%±0.02%。

研究者仍相信, 一种重要的稳定固态蛋白质的方法是对蛋白质提供一种基质, 脱水后至少在某种程度上它能保留天然蛋白质结构(Chang, B. S. 等, “影响冻干白细胞介素-1 受体拮抗剂储藏稳定性的因素: 玻璃转变和蛋白质构型”, *Arch. Biochem. Biophys.* 331:249; Allison, D. S. 等(1998)“干燥法和添加剂对肌动蛋白结构和功能的影响: 脱水引起的破坏及其抑制的机制”, *Arch. Biochem. Biophys.* 358:171)。已经证明, 在处理前在蛋白质溶液中加入某些稳定剂(如蔗糖)抑制了脱水诱导的结构转变(Prestrelski, S. J. 等(1993), “蛋白质中脱水诱导的构型转变及其被稳定剂的抑制”, *Biophys. J* 65:661)。用酰胺 I 区(1600-1700cm⁻¹)中的二阶导数傅里叶变换红外光谱(Carpenter, J. F. 等(1998)“用红外光谱来开发稳定冻干的蛋白质制剂” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45:231)探测干燥的溶菌酶粉末的构型结果。在图 9 中显示了代表性结果。70°C干燥的样品(A): 天然水相状态的溶菌酶; (B): 含有 10%蔗糖和 0.01%Tween 20 的溶菌酶; (C): 含有 10%蔗糖的

溶菌酶；(D)：含有 10%甘露醇的溶菌酶；和(E)：仅含缓冲液的溶菌酶的样品。酰胺 I 区显示了不同类型二级结构的特征性 C=O 伸展频率。有趣的是，虽然酶活性在所有粉末重新水合后几乎完全保留，干燥的溶菌酶粉末在各制剂中都显示了显著不同的蛋白质构型。当与天然溶菌酶液态红外线谱比较时，不含赋形剂的制剂显示了与天然构型最大的偏差，10%甘露醇制剂与仅含缓冲液的制剂相比显示较小的偏差，而 10%蔗糖制剂显示了与天然结构甚至更小的偏差。10%蔗糖加上 Tween 20 制剂显示它是所有粉末中最像天然结构的。这些结果表明，溶菌酶在我们的喷雾和干燥过程受到的破坏并非是不可逆的。然而在干粉中蛋白质结构显示与天然构型显著的偏差。活性的恢复似乎表明溶菌酶在重新水合后恢复其天然构型的能力。可通过加入二糖稳定剂(如蔗糖)抑制干燥过程中观察到的构型转变。

虽然不希望被理论所限，但可认为糖与蛋白质形成氢键，而取代了其与水分子形成的氢键，从而减少了蛋白质结构在水合后的构型变化。可以认为表面活性剂由于与蛋白质竞争可占据的气液界面区，减少了气-液界面上蛋白质经受的应力。据信加到蛋白质制剂中的表面活性剂能预防蛋白质分子的聚集。

15 溶菌酶活性试验

在溶菌酶粉末重新水合至原来的总溶质重量%浓度后，立即测定其酶活性。这些结果(图 10)报道成在超临界 CO₂ 辅助喷雾和鼓泡干燥前立即测量的原始活性的百分数。结果是至少三次测量的平均值，误差横条表示一个标准误差。溶菌酶粉末的分析表明所有制剂都达到原来活性 90%以上的恢复。观察得到的活性恢复说明了该蛋白质在脱水和重新水合后结构改变的可逆性。因此，虽然溶菌酶在超临界 CO₂ 辅助的喷雾过程中，在不存在无定形稳定剂的情况下，脱水后产生了严重的解折叠，但它可在重新水合后容易的重新折叠，从而恢复了大部分其原来的生物学活性。

LDH 活性试验

25 为了进一步考察喷雾过程，用一种很不稳定的酶，即乳酸脱氢酶(LDH, Sigma, 5762)进行了研究。图 10 和 11 显示了数据。已知 LDH 在常规干燥法中会受到破坏(Adler, M. 和 Lee, G. (1999), “乳酸脱氢酶在喷射干燥海藻糖中的稳定性和表面活性” J. Pharm. Sci. 88:199)。在室温下，LDH 对 100mM 磷酸钾透析至少 12 小时到 pH7.5。蛋白质浓度维持在 100 微克/毫升。用鼓泡干燥溶菌酶制剂使用的相

同条件对 LDH 制剂脱水。从 LDH 制备的粉末看来与溶菌酶的粉末相同(数据此处未显示)。

从含有 10%甘露醇、10%蔗糖和 10%蔗糖加 0.01%Tween 20, 连同 LDH(100 微克/毫升)和磷酸钾缓冲液(100mM, pH7.5)的制剂产生了含 LDH 的干粉。将重新水

5 合的粉末的活性与喷雾和干燥前的原始制剂比较。

制备了 4 种不同制剂:

仅含缓冲液

0.1 毫克/毫升 LDH

100mM KPO_4 (pH7.5)

10 10%甘露醇

0.1 毫克/毫升 LDH

100mM KPO_4 (pH7.5)

100 毫克/毫升甘露醇

10%蔗糖

15 0.1 毫克/毫升 LDH

100mM KPO_4 (pH7.5)

100 毫克/毫升蔗糖

10%蔗糖和 Tween

0.1 毫克/毫升 LDH

20 100mM KPO_4 (pH7.5)

100 毫克/毫升蔗糖

0.1 毫克/毫升 Tween 20

图 11 显示了这些制剂的 LDH 催化活性恢复。未加入任何赋形剂喷雾和脱水的 LDH 在重新水合后仅恢复了 15%的原来活性。有趣的是, 作为液滴气溶胶收集的相同溶液保留了其原来酶活性的 87%。该结果表明蛋白质受到的大部分破坏发生在干燥过程中, 水溶液/ CO_2 乳液从节流器尖射出以后。换言之, CO_2 辅助的喷雾干燥不像在 70°C 的氮气中微液滴和微液泡的干燥那样剧烈。加入甘露醇, 或加入蔗糖可更大程度的部分预防脱水过程中经历的不可恢复的破坏。加入蔗糖和 Tween 20 几乎完全防止了活性丧失。由溶菌酶制剂的结构分析这些结果是可以预期的,

因为 LDH 这种更不稳定的四聚酶并不会被预料像溶菌酶一样在重新水合后具有相同的重新折叠的能力。结果，当在蔗糖存在下干燥 LDH 时，活性更好的保留，因为更有可能保存蛋白质结构。

图 12 比较了在不同百分数的甘露醇、蔗糖和(蔗糖+Tween(0.01%))存在条件下重新水合后活性的恢复。注意最初活性的恢复百分数显示，当制剂中使用 Tween 5 时，恢复程度随糖浓度改变而剧烈改变。

这些结果一般表明，超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥过程中 LDH 经历的破坏可通过加入糖稳定剂来抑制，甚至通过组合使用 10%蔗糖和 0.01%表面活性剂 Tween 20 能进一步抑制。配制的蛋白看来在超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥的 10 脱水过程中受到完全保护。

在超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥过程中，在蔗糖存在下 Tween20 能提高保护的机制现在还不清楚。Tween20 可能是饱和了气-液界面的表面位点，从而防止表面变性来保护蛋白质。可以预料气-液界面对于这个过程是重要的，因为超临界 CO₂ 辅助的喷雾产生高表面积的许多微细液滴。另外，表面活性剂可通过饱和 15 蛋白质表面的疏水位点(它是聚集的可能位点)来保护蛋白质。另外，表面活性剂能促进重新水合过程中的蛋白质重新折叠。在喷雾和鼓泡干燥过程中，Tween 20 是否通过这些机制中的一个或多个保护 LDH 现在尚不清楚。在含有 Tween20 的蔗糖制剂中这种蛋白质保护作用，连同上述的改善颗粒分散度和光滑度的作用，清楚的表明了在用超临界 CO₂ 辅助的喷雾和鼓泡干燥的制剂中加入这种表面活性剂 20 的可能益处。还注意到，在某些实验中，用 CO₂ 增压、降压、鼓泡干燥后水相溶菌酶的酶活性明显比 2000psi 增压前的原始水溶液的大，如酶分析表明的(见图 12)。St. John Carpenter 和 Randolph 已证明，蛋白质重新折叠是通过对水溶液进行 20,000psi 的增压实现的(“高压促使蛋白质从高浓度聚集物中重新折 叠”Proc. Natl. Acad. Sci. 96:13029, 1999)。此时，活性改进的原因尚不清楚。 25 虽然申请人并不希望拘泥于理论解释，但用 CO₂ 增压和表面活性剂处理水溶液可产生由于表面活性剂、适当的压力以及二氧化碳或糖的存在或其他机制改善的活性。

虽然上述描述含有许多细节，但这些细节不应该视为对本发明的限制，而仅是提供了本发明某些目前优选的实施例。例如，可在本发明的方法中使用许多不

同物质的许多细小干粉：除了特别限定的，还可使用其他超临界或近临界的流体；可使用除了特别限定的以外的添加剂。本发明的范围可通过附加权利要求及其法律上等价内容确定。

在本公开中引用的各参考文献在本文中引入以供参考，只要其与本文公开的

5 内容一致。

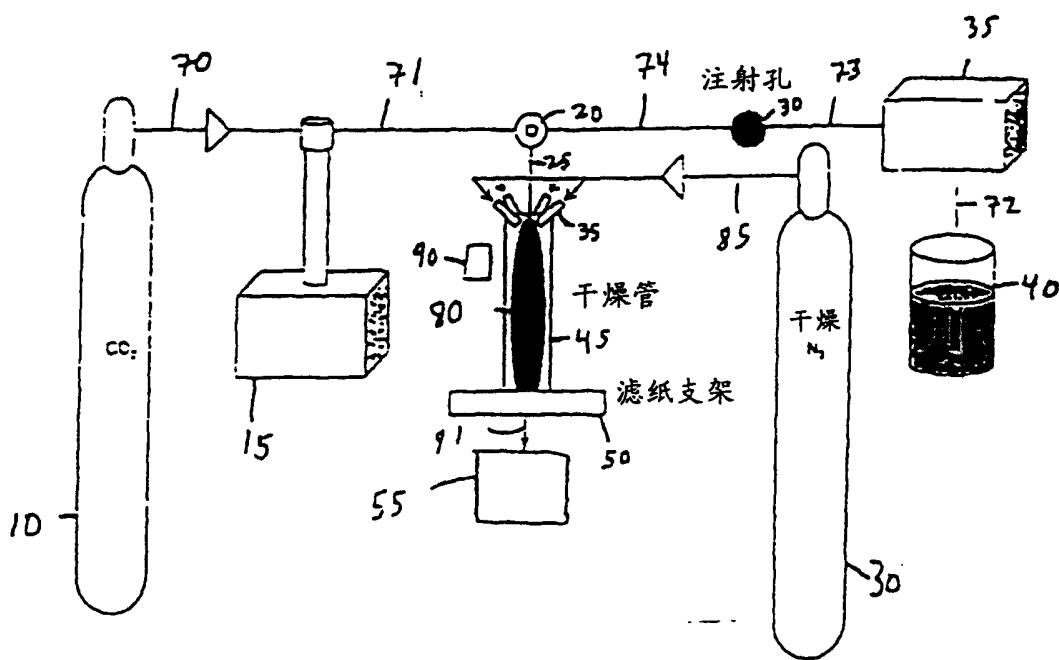


图 1

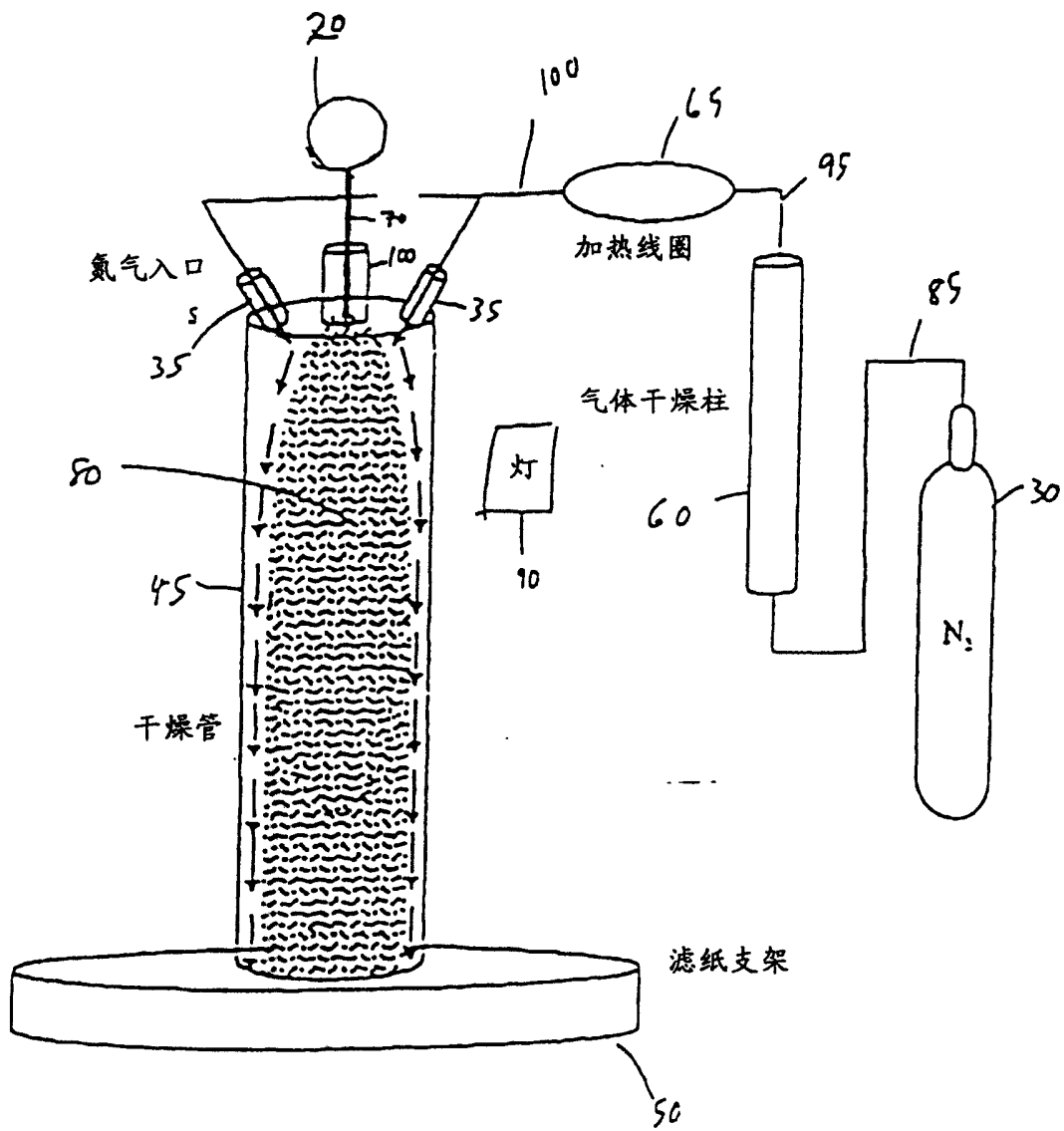


图 2

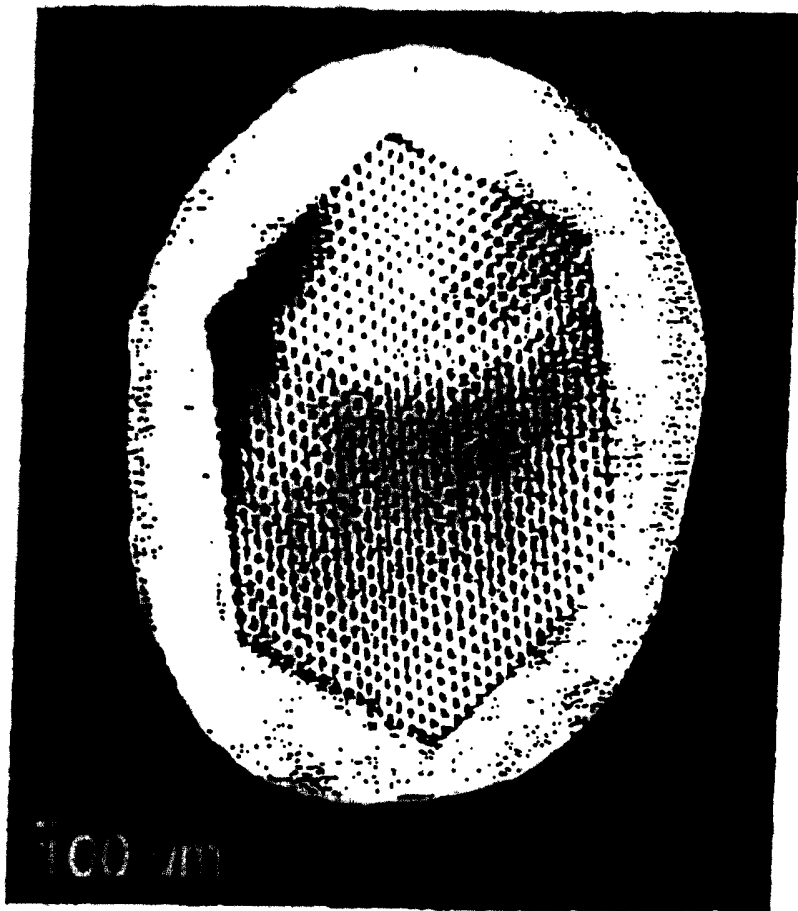


图 3



图 4

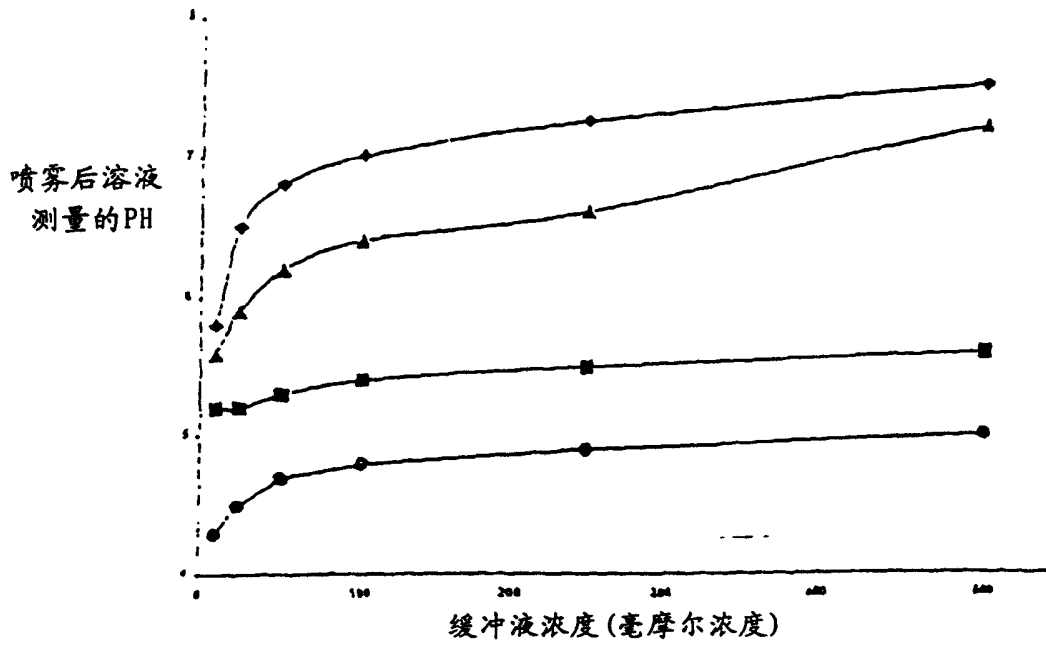


图 5



图 6A



图 6B



图 6C

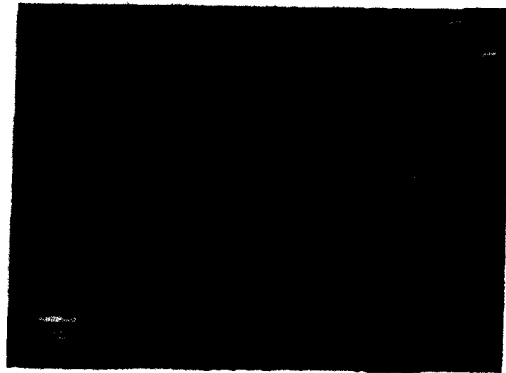


图 6D

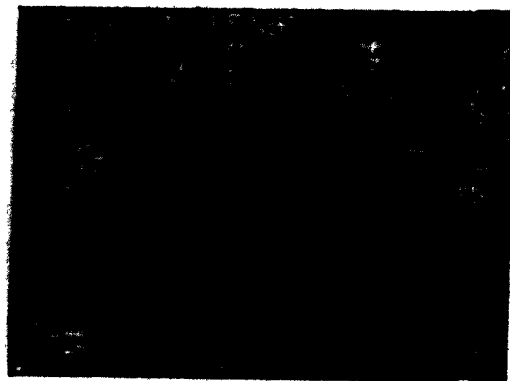


图 6E

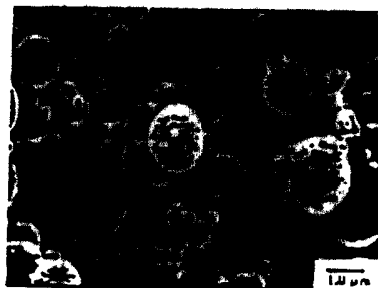


图 6F



图 6G

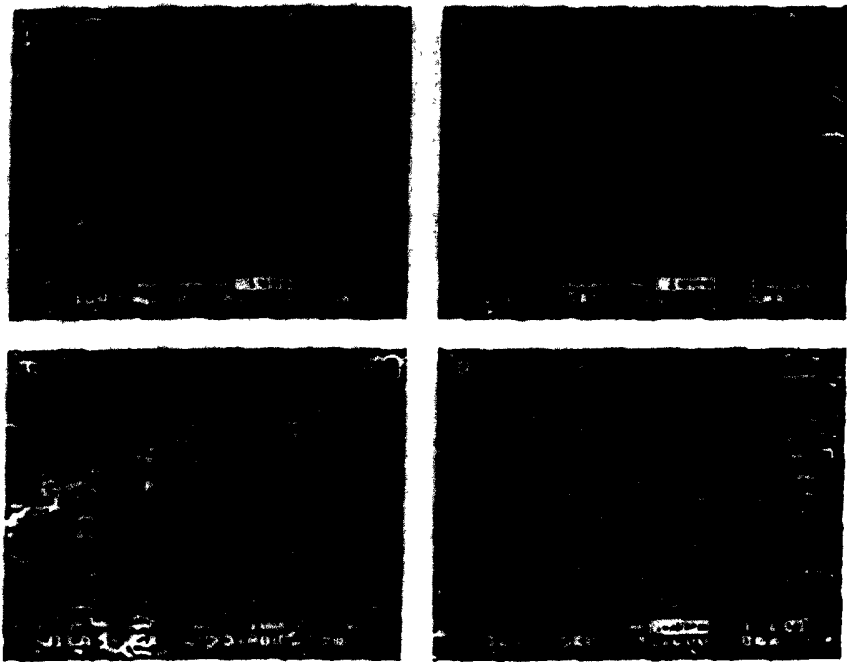


图 7

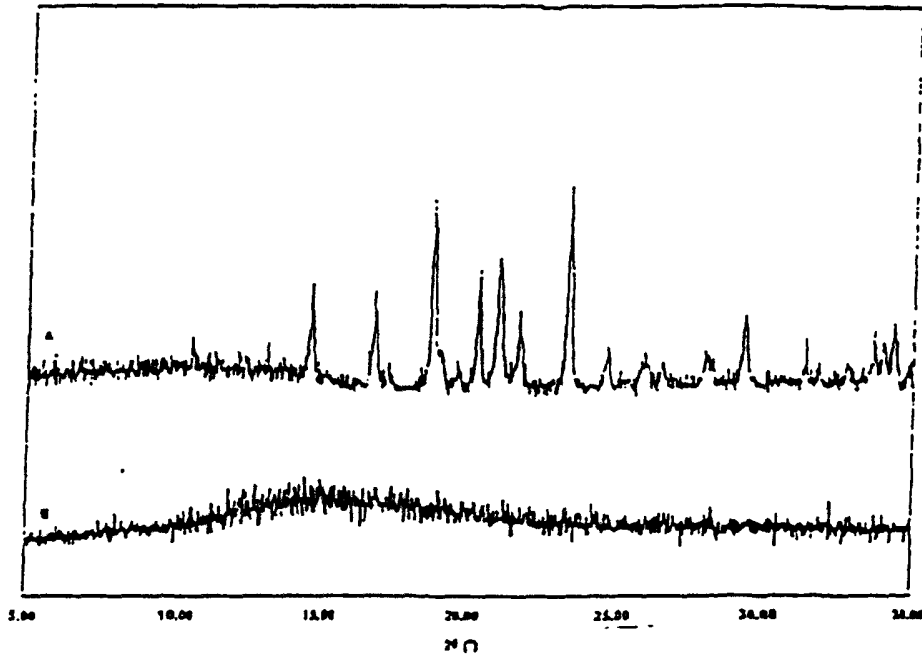


图 8

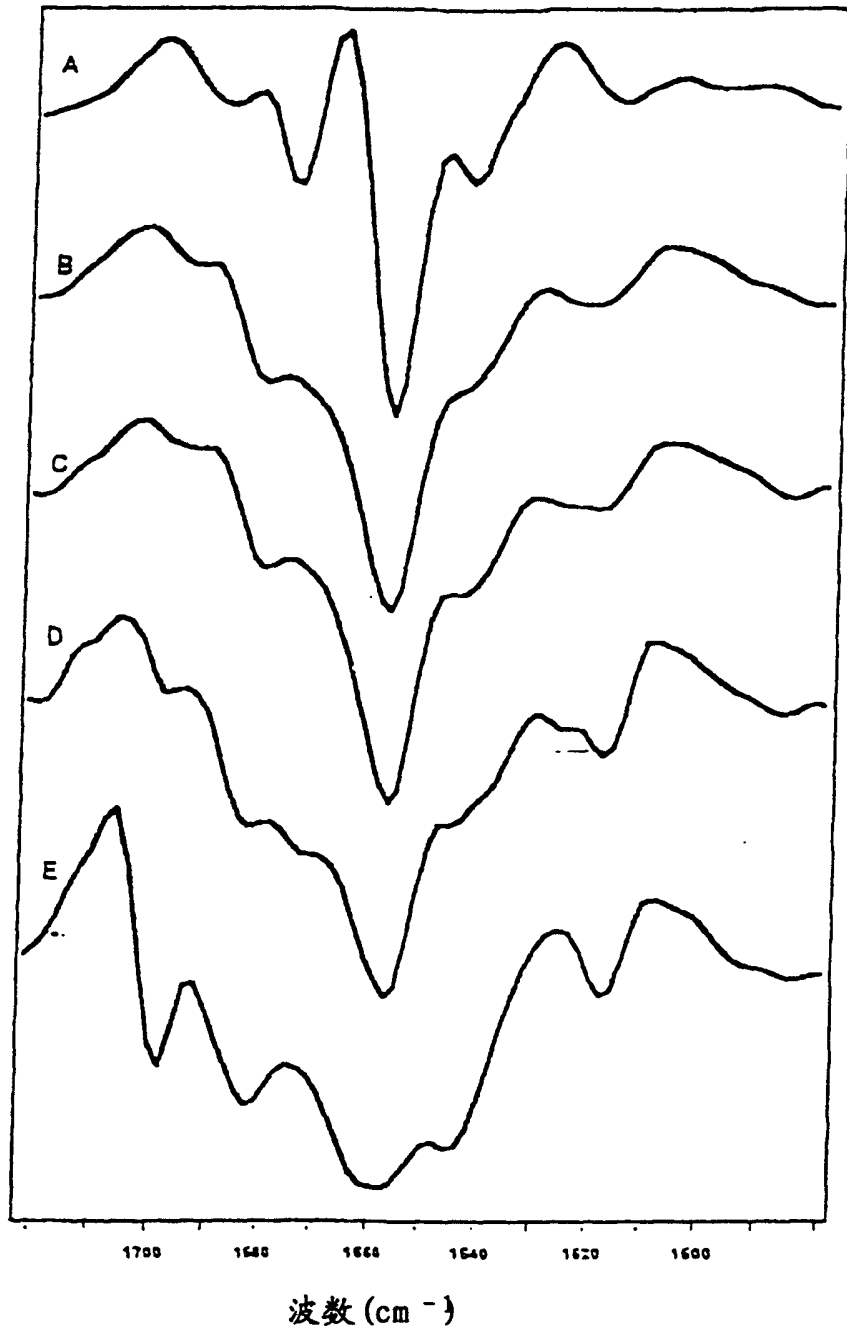


图 9

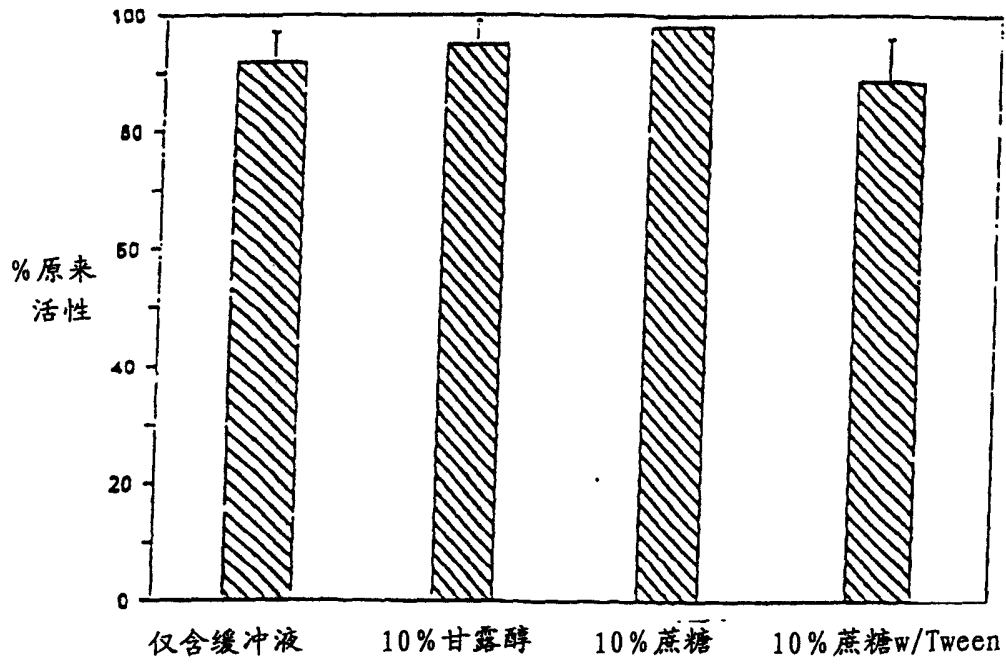


图 10

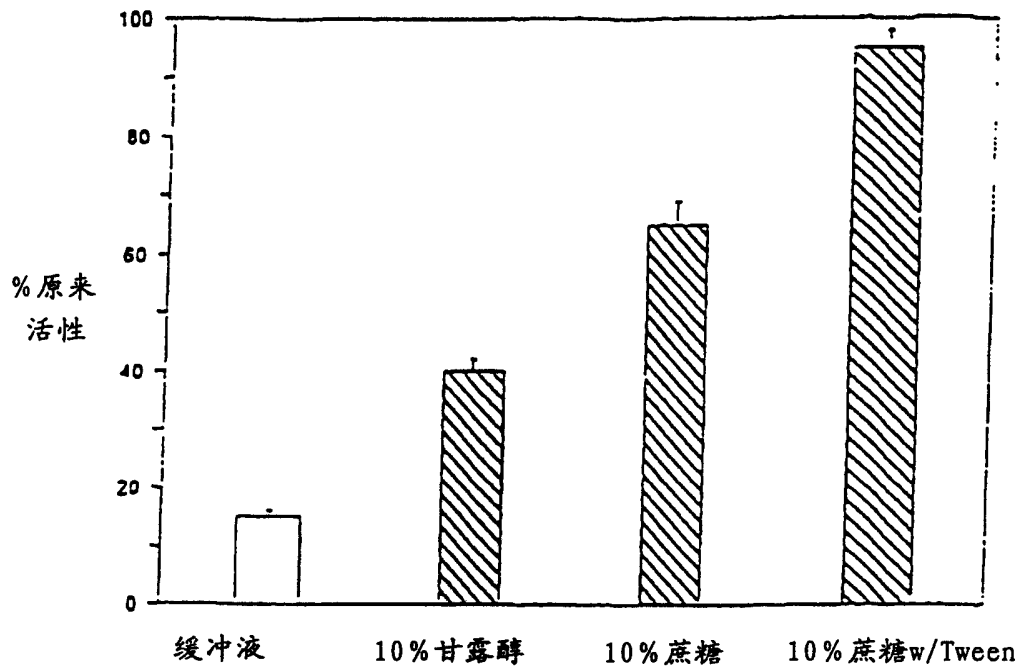


图 11

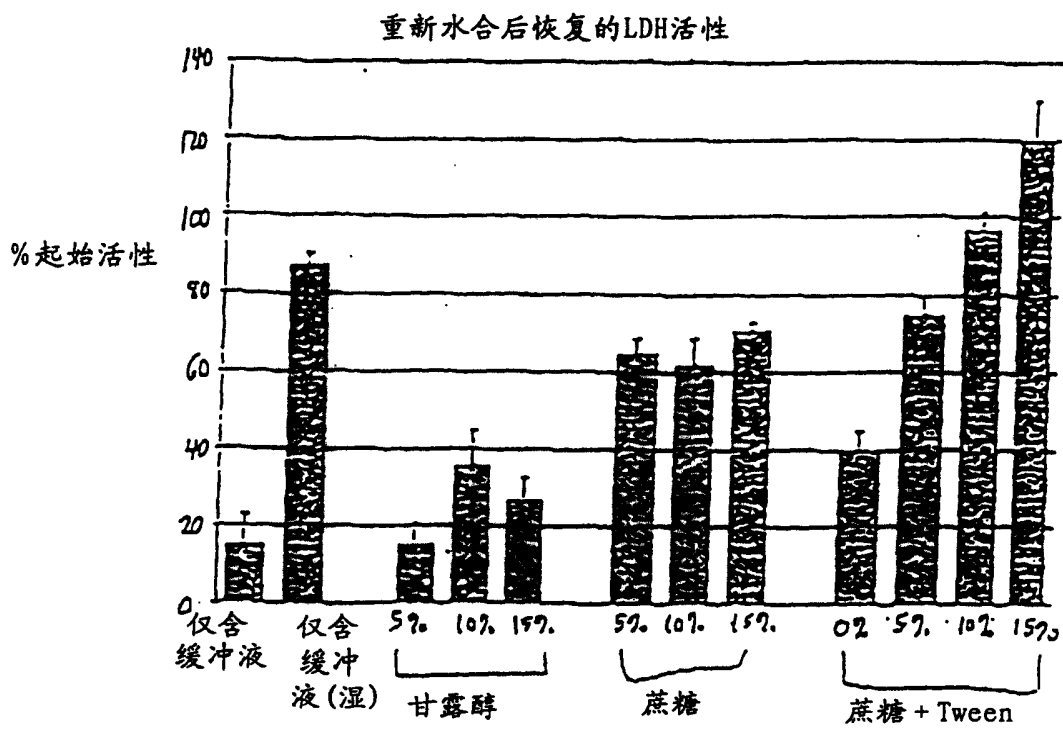


图 12