

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/42 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610117238.8

[43] 公开日 2008年4月23日

[11] 公开号 CN 101164622A

[22] 申请日 2006.10.18

[21] 申请号 200610117238.8

[71] 申请人 浙江我武生物科技有限公司

地址 313200 浙江省德清莫干山经济开发区
志远路 636 号

[72] 发明人 胡赓熙

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 范 征

权利要求书 1 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

植物种子蛋白提取物及应用

[57] 摘要

本发明提供了可食用植物种子蛋白提取物作为蛋白质类药物的稳定剂的用途。本发明还提供了一种药物组合物，它含有可食用植物种子蛋白提取物、治疗有效量的活性蛋白质药物以及药学上可接受的载体，其中 1 毫升组合物中含有所述植物种子蛋白为 0.01 μ g ~ 50mg。

1. 植物种子蛋白提取物在制备蛋白质药物中作为稳定剂的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述植物种子为可食用植物种子。
3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述蛋白质药物为口服给药蛋白质药物、舌下及颊粘膜给药蛋白质药物、直肠及结肠给药蛋白质药物、透皮给药蛋白质药物、吸入给药蛋白质药物。
4. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述植物种子蛋白提取物用不导致蛋白质严重降解或失活的去离子水或蛋白质提取缓冲液提取获得。
5. 一种药物组合物，其特征在于，它含有植物种子蛋白提取物、治疗有效量的活性蛋白质药物以及药学上可接受的载体。
6. 如权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述植物种子蛋白提取物的蛋白浓度为 $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 50\text{mg/ml}$ 。
7. 如权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述植物种子为可食用植物种子。
8. 如权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物为口服给药蛋白质药物、舌下及颊粘膜给药蛋白质药物、直肠及结肠给药蛋白质药物、透皮给药蛋白质药物、吸入给药蛋白质药物。
9. 如权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述植物种子蛋白提取物用不导致蛋白质严重降解或失活的去离子水或蛋白质提取缓冲液提取获得。

植物种子蛋白提取物及应用

技术领域

本发明属于生物药物技术领域，具体涉及用作蛋白质药物稳定剂的植物种子蛋白提取物及其用途。

背景技术

种子是植物界演化最高阶段的种子植物生活史中的一个时期，是下一代独立植株的开始。种子从结构和生理上已做好了传播的准备，也储藏了足够的养分以供幼苗长成为自养体。其中的蛋白质在种子形成、发育直至成苗的过程中扮演着及其重要的角色，它为种子生长发育提供养料，还调控着种子的各种生理生化反应和代谢过程。种子蛋白可分为储藏蛋白、蛋白酶抑制剂和凝集素等（种子蛋白质与蛋白质组的研究，植物学通报 2005，22（3）；257~266）。实践证明，成熟的种子在常温、干燥的条件下保存数年至数十年仍然具有活力，因此植物种子应该具有相应的机制来长期维持其生命。

蛋白质是生命的最基本物质之一，是生命活动的物质基础，生命活动几乎都是通过蛋白质实现的，有的蛋白质在生物体内是结构物质，有的蛋白质在生物体内是功能物质。许多蛋白质，如胰岛素、干扰素、免疫球蛋白等等，都可以作为治疗疾病的药物。

由于蛋白质的分子量大，结构复杂，蛋白质分子很不稳定，易受物理或化学因素的影响而变性，丧失其生物活性。尤其当蛋白类药物制剂中所含生物活性蛋白浓度较低时，易出现蛋白降解或蛋白被管壁吸附等现象，从而影响蛋白质制剂的药效。蛋白质类药物制剂的研制关键之一是解决这类药物的稳定性问题。解决蛋白质类药物的稳定性的方法之一是在低浓度的蛋白药物中加入蛋白稳定剂，从而保护蛋白不被降解。这些蛋白稳定剂通常是动物来源的蛋白，例如人血清白蛋白。然而，采用动物蛋白存在着严重的潜在风险，即动物蛋白被未完全杀灭的动物病毒污染。例如，人血清白蛋白制品中因为爱滋病毒的污染而发生公共危害的案例时有所闻。另外，动物蛋白一般仅仅是竞争性地防止生物活性蛋白被管壁物理性地吸附，或被环境中的物理、化学和生物因子损伤。

本领域中迫切需要提供一种安全、廉价、高效的新型蛋白质制剂稳定剂。

发明内容

为实现上述目的，本发明提供了一种以植物种子蛋白提取物作为原料和主要有效成分的蛋白质制剂稳定剂。

具体而言，本发明第一方面涉及植物种子蛋白提取物作为蛋白质药物的稳定剂的用途。植物种子蛋白提取物是指用现有技术中的常规提取方法从植物种子提取出来的含有蛋白组分的混合物。获得这样的植物种子蛋白质的方法可以有很多，且提取方法随各种植物种子的变化而异。在一个较佳的实施方案中，所述植物种子蛋白提取物用以下方法制得：

- (a)对植物种子进行脱脂处理；
- (b)使经脱脂处理的植物种子与提取缓冲液接触；
- (c)无菌处理步骤(b)所得的溶液，获得所述植物种子蛋白提取物。

本发明另一方面提供了一种药物组合物，其特征在于，它含有植物种子蛋白提取物、治疗有效量的活性蛋白质药物以及药学上可接受的载体，其中所述植物种子蛋白提取物的浓度为 $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 50\text{mg/ml}$ 。

本发明的植物种子蛋白提取物是植物来源，从而避免了动物蛋白所具有的易发生动物源性病原微生物，例如肝炎病毒或爱滋病病毒，对动物蛋白污染的风险。

与来自植物其它组织的蛋白提取物进行对比，本发明的植物种子蛋白提取物显示出更为优异的稳定效果。另外，本发明通过植物种子蛋白提取物作为蛋白稳定剂，从而能够在配制蛋白质制剂的时候实现合适的质量控制。本发明的其他目的和优点可以从下文中明显得出。

具体实施方式

具体而言，本发明第一方面提供了植物种子蛋白提取物在制备蛋白质药物用的稳定剂的用途。

本文所用的术语“植物种子”具有本领域技术人员通常认可或接受的含义。适用于本发明的植物种子来源可以包括，例如但不局限于，腰果属(*Anacardium*)、落花生属(*Arachis*)、天门冬属(*Asparagus*)、燕麦属(*Avena*)、西瓜属(*Citrullus*)、辣椒属(*Capsicum*)、红花属(*Carthamus*)、椰子属(*Cocos*)、咖啡属(*Coffea*)、黄瓜属(*Cucumis*)、南瓜属(*Cucurbita*)、贯众属(*Cyrtomium*)、胡萝卜属(*Daucus*)、油棕属(*Elaeis*)、草莓属(*Fragaria*)、大豆属(*Glycine*)、向日葵属(*Helianthus*)、*Heterocallis*、大麦属(*Hordeum*)、天仙子属

(*Hyoseyamus*)、莴苣属(*Lactuca*)、亚麻属(*Linum*)、黑麦草属(*Lolium*)、羽扇豆属(*Lupinus*)、番茄属(*Lycopersicon*)、苹果属(*Malus*)、木薯属(*Manihot*)、苜蓿属(*Medicago*)、烟草属(*Nicotiana*)、木犀榄属(*Olea*)、稻属(*Oryza*)、紫萁属(*Osmunda*)、黍属(*Panicum*)、*Pannasetum*、鳄梨属(*Persea*)、菜豆属(*Phaseolus*)、黄连木属(*Pistachia*)、豌豆属(*Pisum*)、梨属(*Pyrus*)、李属(*Prunus*)、萝卜属(*Raphanus*)、黑麦属(*Secale*)、千里光属(*Senecio*)、白芥属(*Sinapis*)、茄属(*Solanum*)、高粱属(*Sorghum*)、可可树属(*Theobromus*)、葫芦巴属(*Trigonella*)、小麦属(*Triticum*)、野豆花属(*Vicia*)、葡萄属(*Vitis*)、豇豆属(*Vigna*)和玉米属(*Zea*)等可食用的物种种类。在较佳的实施方案中,所述植物种子例如可以是玉米、小麦、水稻、高粱、南瓜、葫芦、莴苣、洋葱、西红柿、甜菜、花生、大豆、油菜、三叶苜蓿、茶叶、咖啡、可可等的种子,尤其是这些植物的成熟种子。本文所用的术语“植物种子”还包括了对植物种子经过加工(如干燥、研磨)后获得的产物或材料,如成熟的植物种子干燥后磨成的粉。

术语“植物种子蛋白提取物”指用现有技术中的各种提取方法从植物种子提取出来的含有蛋白组分的混合物。这些提取方法通常包括,但不限于,用水性溶液或有机溶剂(如醇等)提取等。在采用水性溶剂(如水、生理盐水、磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、碱性缓冲液)进行提取时,该水性溶剂的 pH 优选维持在 pH 4-11 范围内。为了除去不必要的杂质(如脂类),还可在提取过程中或提取前,可视需要对植物种子进行研磨、干燥、脱脂等预处理步骤。然而,应当注意的是,在制备植物种子蛋白提取物应当确保其中的蛋白不被降解、破坏或失活。

在本发明的一个较佳实施方案中,所述植物种子蛋白提取物是用以下步骤制得的:

(1)脱脂、干燥:将植物种子进行脱脂处理。为便于提取,可先将植物种子研磨成粉。从来源和成本的角度考虑,一个优选的方案采用由小麦种子研磨而成的面粉。所述脱脂剂优选丙酮、乙醚等有机溶剂。例如,可连续用丙酮浸泡植物种子进行脱脂 3 次,每次 0.1~24 小时。至脱脂后的丙酮为无色后,将脱脂后的固体物自然干燥至无丙酮味后称重。实验室操作应在通风橱内完成,中试采用真空浓缩提取罐。

(2)提取:使经脱脂处理的植物种子与提取液接触至少 60 小时。所述提取操作宜在低温下(优选大约 2~8℃)进行。所述提取液宜为水性提取液,优选生理盐水。提取操作应进行 0.1~72 小时,优选进行 1~24 小时。例如,将经脱脂干燥后的植物种子和生理盐水二者以 1: 2~1: 50(即每 1 克植物种子脱脂干燥后用 2-50 毫升生理盐水溶液提取)(较佳的为 1:5~1:15,更佳的为 1: 10)(W/V)比例提取,为保证有效成分不失活,提取宜在 1-16℃、更佳为 2-8℃的低温下完成。间歇磁力搅拌 72 小时(每次搅拌时间为

8 小时，静置过夜后再次磁力搅拌 8 小时，如此反复)。另外，在所述提取液中还可加入防腐剂，所述防腐剂可选自，但不限于，苯酚、硫柳汞等。

(3)除菌：将步骤(b)所得的溶液进行除菌处理，获得所述的植物种子蛋白提取物。在一个优选的实施方案中，在结束步骤(b)的搅拌后，先用普通滤纸过滤生理盐水溶液浸出液，得到粗滤液。然后，再将得到的粗滤液用孔径不大于 $1\mu\text{m}$ 的微孔滤膜进行精滤，得到所需的溶液形式的植物种子蛋白提取物。将检测合格的植物种子蛋白提取液于 4°C 低温保存。也可根据常规技术将所述植物种子蛋白提取物进行冻干、浓缩等。就此意义而言，本发明所用的术语“植物种子蛋白提取物”不仅仅指植物种子蛋白提取液，其也包括了其他形式(如固体形式)的植物种子蛋白提取物，只要该提取物仍然保留了所需的生物活性(即稳定剂作用)。

本发明的植物种子蛋白提取物表现出了使蛋白类药物(本文中也称为“蛋白质药物”、“生物活性蛋白”)在药物制剂或药物组合物中高度稳定的优异保护效果。虽然不希望拘泥于任何理论，发明者相信该效果的获得是由于植物种子蛋白提取物中存在着防止蛋白降解的蛋白酶抑制剂或帮助蛋白质维持其空间结构的分子，例如分子伴侣等。

因此，本发明另一方面涉及将上述获得的植物种子蛋白提取物与蛋白类药物配制在一起获得蛋白药物组合物(或蛋白药物制剂)。具体而言，所述蛋白药物组合物含有用上述方法制得的植物种子蛋白提取物、治疗有效量的蛋白类药物以及任选的药学上可接受的载体，其中所述植物种子蛋白提取物在药物组合物中的浓度为 $0.01\mu\text{g/ml}\sim 50\text{mg/ml}$ ，优选 $0.1\sim 10\text{mg/ml}$ 。

另外，可以预见的是，本发明的蛋白药物组合物中可以含有多种来自不同植物种子的蛋白提取物，以实现进一步稳定药物蛋白的效果。

在本发明的蛋白药物组合物中的蛋白类药物(或生物活性蛋白)可以是口服给药蛋白质药物、舌下及颊粘膜给药蛋白质药物、直肠及结肠给药蛋白质药物、透皮给药蛋白质药物、吸入给药蛋白质药物，具体包括，例如但不局限于，白细胞介素 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 和它们的所有的亚型如 IL- 1α 和 IL- 1β ，肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF- β 和- α)、I 型和 II 型干扰素(IFN- $\alpha 1$, IFN- $\alpha 2$, (IFN- ω)、IFN- β 、IFN- γ)、迁移抑制因子(MIF)、c-kit 配体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单核细胞巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、趋化因子如 IL-8、RANTES、前列腺素、粘附因子如可溶性 ICAM1、脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)、运铁蛋白、脱唾液酸糖蛋白、干细胞因子和促红细胞生成素(EPO)等。

本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本发明药物组合物中的生物活性蛋白相容，即能与其共混而不会在通常情况下大幅度降低药物组合物在治疗疾病方面的效果。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和土豆淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素；西黄蓍胶粉末；麦芽；明胶；滑石；固体润滑剂，如硬脂酸和硬脂酸镁；硫酸钙；植物油，如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油；多元醇，如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；海藻酸；乳化剂，如吐温；润湿剂，如月桂基硫酸钠；着色剂；调味剂；压片剂、稳定剂；抗氧化剂；防腐剂；无热原水；等渗盐溶液；和磷酸盐缓冲液等，其中较佳的载体选自生理盐水、甘油和磷酸盐缓冲盐水。

下面将结合实施例进一步详细地描述本发明。然而，应当理解，下面的实施例仅仅是为了起说明作用，这并不意味着本发明的适用范围仅仅限于所述的特定生物活性蛋白。

实施例 1 小麦种子蛋白提取物的制备

1)脱脂、干燥

将成熟的小麦(种子)晾干，研磨成粉，连续用丙酮浸泡脱脂 3 次，每次 4 小时，至脱脂后的丙酮为无色后，将脱脂后的固体物干燥后称重。脱脂过程宜在通风橱或真空浓缩提取罐内完成，以策安全。

2)提取

为保证有效成分不失活，提取应在 2—8℃低温下完成。详细步骤为：将步骤 1)获得的脱脂后的小麦粉和生理盐水二者以 1: 10(W/V)比例提取(即每 1 克脱脂后的小麦粉用 10 毫升生理盐水溶液提取)，4℃间歇磁力搅拌 72 小时(每次搅拌时间为 8 小时，静置过夜后再次磁力搅拌 8 小时，如此反复)。

3)去渣

结束搅拌后将生理盐水溶液浸出液用普通滤纸过滤，得到粗滤液。

4)精滤

将步骤 3)得到的粗滤液用孔径不大于 1 μ m 的微孔滤膜进行精滤，得到的滤液为面粉提取液，对其进行总蛋白浓度测定(用 BCA 蛋白测定法测定蛋白含量)。

实施例 2 小麦种子蛋白提取物对变应原制剂稳定性的影响

首先，用以下方法制备户尘螨变应原提取物：

1)清洗、研磨、脱脂、干燥

在培养基(2份实验室动物饲料，2份干酵母，1份干鱼粉，培养基湿度为16%)中培养户尘螨使其密度达到300—500只/克。用饱和NaCl溶液悬浮分离，收集户尘螨尸体。将获得的户尘螨尸体以生理盐水悬浮清洗，晾干后，置于-20℃保存备用。称取虫体，对虫体进行液氮研磨，连续用丙酮浸泡脱脂3次，每次4小时，至脱脂后的丙酮为无色后，将脱脂后的固体物自然干燥至无丙酮味后称重。

2)提取

将户尘螨虫体和生理盐水二者以1:25(W/V)浸泡提取(即每1克脱脂后的户尘螨虫体用25毫升生理盐水溶液提取)，4℃间歇磁力搅拌72小时(每次搅拌时间为8小时，静置过夜后再次磁力搅拌8小时，如此反复)。

3)去渣

结束搅拌后将生理盐水溶液浸出液用普通滤纸过滤，得到粗滤液。

4)精滤

将得到的粗滤液用孔径不大于1 μ m的微孔滤膜进行除菌过滤，得到的滤液为户尘螨变应原提取液，对其进行总蛋白浓度测定(用BCA蛋白测定法测定蛋白含量)，并于4℃低温保存。

然后，将户尘螨变应原提取物与小麦种子蛋白提取物按照表1的配方，配制成分不同的混合液。

将混合液过滤除菌之后放置在25℃进行稳定性试验，于3、6、9、12、18个月取样品进行变应原活性的测定。以0个月时的活性为100%，其他时间测定的数值与0个月时的数值对比进行比值分析，检测不同时间点的活性变化，判断小麦蛋白稳定剂对变应原活性(反映稳定性)的影响。

本实施例中不同配方的变应原制剂的稳定性考察测定结果见表2。表2中对照1是指在小麦种子蛋白提取物中加入胃蛋白酶和木瓜蛋白酶，水解小麦种子蛋白提取物6小时后，100℃使酶失活2小时然后再加入变应原提取物中；对照2是采用实施例1的方法从小麦的茎中提取的蛋白，在变应原制剂中小麦茎蛋白的浓度为20mg/ml。

实施例3 小麦种子蛋白提取物与变应原提取液混合液的制备

1) 将实施例1获得的小麦种子蛋白提取物和实施例2获得的户尘螨变应原提取物用生理盐水稀释，然后加入等体积甘油制成混合变应原制剂。按照治疗所需浓度，稀释成1:100(V/V)至1:100000000(V/V)范围内的多个浓度的制剂；

分装、灌装；过滤除菌，即得舌下含服剂；

2) 取上述原液按常规制剂方法制得片剂或胶囊剂。

实施例 4 大豆蛋白提取物的制备

1) 脱脂、干燥

将成熟的大豆晾干，研磨成粉，连续用丙酮浸泡脱脂 5 次，每次 4 小时，至脱脂后的丙酮为无色后，将脱脂后的固体物自然干燥至无丙酮味后称重。实验室操作应在通风橱内完成，中试采用真空浓缩提取罐。

2) 提取

为保证有效成分不失活，提取在 4℃ 完成。详细步骤为：将步骤 1) 获得的脱脂后的大豆粉末和生理盐水二者以 1: 10(W/V) 比例提取(即每 1 克脱脂后的大豆粉用 10 毫升生理盐水溶液提取)，4℃ 间歇磁力搅拌 72 小时(每次搅拌时间为 8 小时，静置过夜后再次磁力搅拌 8 小时，如此反复)。

3) 去渣

结束搅拌后将生理盐水溶液浸出液用普通滤纸过滤，得到粗滤液。

4) 精滤

将步骤 3) 得到的粗滤液用孔径不大于 1 μ m 的微孔滤膜进行精滤，得到的滤液为大豆蛋白提取液，对其进行总蛋白浓度测定(BCA 法，具体是采用 Pierce 公司的 BCA 蛋白测定试剂盒)。

实施例 5 大豆蛋白提取物对干扰素生物学活性稳定性影响

将干扰素(IFN α -2b)与大豆蛋白提取物按照表 3 的配方，配制成不同的混合液。向混合液中加入抛射剂并按常规方法制成喷剂，除菌之后放置在 4℃ 进行稳定性试验，于 2、4、6、8、10 个月取样品进行活性测定。测定按 SFDA 规定的干扰素生物学活性标准方法“细胞病变抑制法”进行(中华人民共和国药典 2005 年版 三部 附录 56~57 页)。以 0 个月时的活性为 100%，其他时间测定的数值与 0 个月时的数值对比进行比值分析，检测不同时间点的活性变化，判断大豆蛋白对干扰素生物学活性(反映稳定性)的影响。测定结果见表 4。表 4 中对照 1 是指在大豆蛋白提取物中加入胃蛋白酶和木瓜蛋白酶，水解大豆蛋白提取物 6 小时后 100℃ 使酶失活 2 小时然后再加入干扰素中；对照 2 是采用实施例 4 的方法从大豆植株茎中提取的蛋白，在干扰素药物制剂中，大豆茎蛋白浓度为 20mg/ml。

将干扰素与大豆蛋白提取物按照表 3 的配方，配制成不同的混合液。向混合液中加入栓剂常用基质如吐温-61 并按常规方法制成栓剂，放置在 4℃ 进行稳定性试验，于 2、4、6、8、10 个月取样品，溶于 1ml 生理盐水，进行活性测定，测定结果见表 5。对照 1 是指在大豆蛋白提取物中加入胃蛋白酶和木瓜蛋白酶，水解大豆蛋白提取物 6 小时后 100℃ 使酶失活 2 小时然后再加入干扰素中制成栓剂；对照 2 是采用实施例 4 的方法从大豆植株茎中提取的蛋白，在干扰素药物制剂中，大豆茎蛋白浓度为 20mg/ml。

实施例 6 玉米种子蛋白提取物的制备

1) 脱脂、干燥

将成熟的玉米种子晾干，研磨成粉，连续用乙醚浸泡脱脂 3 次，每次 4 小时，至脱脂后的乙醚为无色后，将脱脂后的固体物干燥后称重。脱脂过程宜在通风橱或真空浓缩提取罐内完成，以策安全。

2) 提取

将步骤 1) 获得的脱脂后的玉米粉和去离子水二者以 1: 6(W/V) 比例分散(即每 1 克脱脂后的玉米粉用 6 毫升去离子水溶液提取)，在室温下边搅拌边用 1mol/L NaOH 溶液将 pH 调至 9~10 (pH 调节应在 15min 内完成)，提取 15~60min，13000g 离心 10min，保留上清。

3) 沉淀

用 1mol/L HCl 溶液调整 pH 为 3.5~4.5，沉淀出蛋白。13000g 离心 15min，沉淀用去离子水分散并调节 pH 为 6.5~7.5。

4) 精滤

将步骤 3) 得到的溶液用孔径不大于 1 μ m 的微孔滤膜进行精滤，得到的滤液为玉米种子蛋白提取液，对其进行总蛋白浓度测定(BCA 法，具体是采用 BCA 蛋白测定法)。

实施例 7 玉米种子蛋白提取物对胰岛素口服制剂活性的影响

按照表 6 的配方配制胰岛素口服制剂，然后将制剂通过口服喂食给糖尿病小鼠。按照 SFDA 规定的胰岛素生物测定法(中华人民共和国药典 2005 年版 二部 附录 104 页)测定胰岛素活性。以 0 个月时的活性为 100%，其他时间测定的数值与 0 个月时的数值对比进行比值分析，检测不同时间点的活性变化，判断玉米种子蛋白提取物对胰岛素生物学活性(反映稳定性)的影响，测定结果见表 7。对照 1 是指在玉米种子蛋白提取物中加入胃蛋白酶和木瓜蛋白酶，水解玉米种子蛋白提取物 6 小时后 100℃ 使酶失

活 2 小时然后再加入胰岛素中;对照 2 是采用实施例 6 的方法从玉米植株茎中提取的蛋白,在胰岛素药物制剂中,玉米茎蛋白浓度为 20mg/ml。

实施例 8 玉米种子蛋白提取物对重组人表皮生长因子外用溶液生物学活性稳定性影响

将重组人表皮生长因子与玉米种子蛋白提取物按照表 8 的配方,配制成不同的混合液,除菌后制成外用溶液。

测定按 SFDA 规定的重组人表皮生长因子生物学活性测定方法“细胞增殖法/MTT 比色法”进行(中华人民共和国药典 2005 年版 三部 附录 60 页)。以 0 周时的活性为 100%,其他时间测定的数值与 0 周时的数值对比进行比值分析,检测不同时间点的活性变化,判断大豆蛋白提取物对重组人生长因子外用溶液生物学活性(反映稳定性)的影响。测定结果见表 9。对照 1 是指在玉米种子蛋白提取物中加入胃蛋白酶和木瓜蛋白酶,水解玉米种子蛋白提取物 6 小时后 100℃使酶失活 2 小时然后再加入重组人表皮生长因子外用溶液中;对照 2 是采用实施例 6 的方法从玉米植株茎中提取的蛋白,在重组人表皮生长因子外用溶液中,玉米茎蛋白浓度为 20mg/ml。

表1 户尘螨变应原提取物与小麦种子蛋白提取物的不同配制方法

配方	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
变应原提取物	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg	1.2mg
小麦种子蛋白提取物	0 μ g	10 μ g	1mg	100mg	1000mg	5000mg	10000m g	20000m g	30000m g	50000m g
甘油	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml
硫柳汞	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg	100mg
生理盐水加至	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

表2 小麦种子蛋白提取物对户尘螨变应原提取物活性的影响

时间(月) 25 °C	配方活性(%)											
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	对照 1	对照 2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	95.26	94.93	97.37	95.72	96.34	92.66	96.73	96.43	97.27	96.16	92.96	94.66
6	75.23	85.09	92.69	94.47	96.08	98.37	94.62	95.06	96.36	97.41	76.37	79.21
9	60.04	65.04	83.76	89.26	90.46	97.72	96.95	92.92	94.54	97.58	59.03	62.73
12	45.47	53.44	79.91	87.69	92.93	94.68	92.34	93.73	97.41	96.03	56.19	49.82
18	32.62	49.12	81.42	84.03	90.86	96.96	94.71	95.24	98.19	95.42	30.54	45.69

表3 IFN α -2b 与大豆蛋白提取物的不同配制方法

配方	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
IFN α -2b	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg
大豆蛋白提取物	0 μ g	0.01 μ g	1 μ g	100 μ g	1mg	5mg	10mg	20mg	30mg	50mg
生理盐水加至	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

表4 大豆蛋白提取物对干扰素（喷剂）活性的影响

时间（月）4 $^{\circ}$ C	配方										对照	
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	1	2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	90.29	92.89	99.32	94.64	105.74	94.89	96.42	96.72	107.84	96.97	90.96	92.26
4	86.54	93.14	90.47	92.57	93.29	92.72	94.34	95.37	95.71	95.65	87.37	90.18
6	73.31	87.29	91.91	90.86	89.17	91.64	102.81	93.01	96.62	96.24	74.03	67.62
8	60.26	79.82	80.06	84.03	82.38	87.39	90.16	93.75	95.93	94.86	52.14	55.29
10	44.72	51.17	83.51	79.42	82.54	102.16	95.98	94.17	97.96	93.39	33.85	41.13

表5 大豆蛋白提取物对干扰素(栓剂)活性的影响

时间(月) 4°C	配方		活性(%)										对照	
	1#	2#	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	1	2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	91.73	92.62	91.98	93.86	95.67	96.49	97.21	96.84	96.92	91.17	92.36	92.36	91.17	92.36
4	85.69	92.69	90.26	91.28	92.64	93.05	94.69	96.12	94.32	86.19	89.62	89.62	86.19	89.62
6	74.27	78.36	89.72	88.96	88.26	90.86	104.37	95.53	96.06	73.26	66.09	66.09	73.26	66.09
8	50.94	67.92	82.09	86.24	82.19	86.47	92.65	93.26	93.24	51.69	52.64	52.64	51.69	52.64
10	33.82	42.16	83.37	81.17	82.76	91.22	95.08	96.18	102.18	34.06	28.28	28.28	34.06	28.28

表6 胰岛素口服制剂的配方(每一颗胶囊的含量)

配方	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
Insulin	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU
玉米蛋白提取物	0 μg	0.01 μg	1 μg	100 μg	1mg	5mg	10mg	20mg	30mg	50mg
含10%Ve的精制植 物油	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g	0.32g
淀粉	50mg	50mg	50mg	49.9mg	49mg	45mg	40mg	30mg	20mg	0mg

表7 玉米种子蛋白提取物对胰岛素生物学活性的影响

时间 (月) 25 °C	配方										对照 1	对照 2	
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#			
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	86.19	90.06	91.24	100.63	93.24	94.19	93.95	94.62	96.66	95.48	85.72	87.43	
4	80.26	86.54	87.47	91.12	90.66	90.98	90.62	91.09	92.96	92.07	82.37	82.16	
6	67.94	80.27	82.36	86.79	87.12	87.62	88.49	89.73	90.26	91.69	60.16	61.29	
8	50.41	74.36	79.68	82.24	83.76	84.38	86.06	88.62	92.47	90.86	53.71	45.16	
10	34.52	69.82	72.31	79.68	81.05	80.69	82.47	84.07	88.62	86.24	36.09	28.42	

表8 重组人表皮生长因子 (rEGF) 外用溶液与玉米种子蛋白提取物的不同配制方法

配方	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
rEGF	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU	50IU
甘油	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
甘露醇	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
大豆蛋白提取物	0 μg	0.01 μg	1 μg	100 μg	1mg	5mg	10mg	20mg	30mg	50mg
生理盐水加至	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

表9 玉米种子蛋白提取物对iEGF活性的影响

时间(周) 4 °C	配方		活性(%)									
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	对照 1	对照 2
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	66.53	67.09	74.68	76.19	77.04	80.06	83.64	82.09	80.34	82.34	66.24	67.42
4	54.82	56.47	66.39	67.86	70.64	74.39	76.89	77.36	75.26	74.69	55.31	58.09
6	37.68	44.26	58.14	60.24	64.29	68.42	70.26	72.49	70.13	69.86	36.49	40.16
8	30.07	36.39	48.73	54.39	58.72	62.19	66.53	68.54	69.62	64.38	31.16	31.04
10	24.16	29.62	40.26	46.81	50.19	56.24	59.72	60.62	54.76	57.62	25.08	23.86

从表 2、4、5、7、9 的结果可以看出，在蛋白质制剂中加入植物种子蛋白提取物可以提高药物制剂的稳定性，这种提高药物制剂稳定性的能力随着加入的植物种子蛋白提取物的浓度的增加而有一定程度的提高。

尽管本发明描述了具体的例子，但是有一点对于本领域技术人员来说是明显的，即在不脱离本发明的精神和范围的前提下可对本发明作各种变化和改动。因此，所附权利要求覆盖了所有这些在本发明范围内的变动。