

PATENTSCHRIFT 140 259

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	140 259	(44)	20.02.80	Int. Cl. ³ 3(51)	C 12 N 9/00
(21)	AP C 07 G / 209 434	(22)	30.11.78		
(31)	P 27 55 799.9	(32)	14.12.77	(33)	DE

(71) siehe (73)

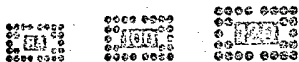
(72) Thum, Waldemar; Lang, Gunter; Vetter, Hellmuth, Dr.; Näher, Gotthilf, Dr., DE

(73) Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, DE

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 102 Berlin, Wallstraße 23/24

(54) Lagerfähige Cholesterinoxidasepräparation

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine lagerfähige, wäßrige Cholesterinoxidasepräparation mit einem Gehalt an Puffer und an Stabilisierungsmittel. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß sie pro Liter 2 bis 3,5 Mol NaCl oder KCl als Stabilisierungsmittel enthält. Aus dem Stand der Technik ist bekannt, daß die Stabilität von Cholesterinoxidase in Ammoniumsulfatlösung zu Beanstandungen Anlaß gibt. Bereits bei einer Konzentration von 1M treten gelegentlich grobflockige fettige Ausfällungen des Enzyms auf, die zwar immer noch enzymatisch aktiv sind, jedoch die Dosierung bei der Abfüllung beeinträchtigen. Überraschenderweise wurde nunmehr gefunden, daß diese Schwierigkeit beseitigt werden kann und einerseits Ausfällungen völlig zu vermeiden sind und andererseits eine überlegene Stabilisierung erzielt wird, wenn man als Stabilisierungsmittel Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in einer Konzentration zwischen 2,0 und 3,5 M anwendet.



Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine lagerfähige, wäßrige Cholesterin-oxidasepräparation mit einem Gehalt an Puffer und an Stabilisierungsmittel.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die enzymatische Aktivität eines Proteins wird von der räumlichen Anordnung der Aminosäurereste in seinen Polypeptidketten bestimmt. Diese "Konformation" wird in wäßriger Lösung durch die Anwesenheit von elektrisch geladenen oder ungeladenen anorganischen wie organischen Molekülen beeinflusst. Infolgedessen sind Enzyme in der Regel in wäßriger Lösung sehr empfindlich und erleiden leicht einen Aktivitätsverlust. Wäßrige Enzympräparationen müssen daher stabilisiert werden.

Hinsichtlich der Wirkung von niedermolekularen anorganischen Salzen ist bekannt, daß deren anionische wie kationische Komponenten entweder mehr stabilisierend oder mehr denaturierend auf die Konformation des Enzyms einwirken können. Derartige Anionen und Kationen sind hinsichtlich dieser Wirkung in der sogenannten Hoffmeister-reihe klassifiziert ("Structure and Stability of biological Macromolecules" von Timasheff und Fasman, Verlag Merckel Dekker, Inc. New York, 1969, Seite 427). Nach der Hoffmeister-reihe sind Anionen und Kationen jeweils unabhängig voneinander entweder mehr stabilisierend oder mehr

denaturierend wirksam. An der Spitze der Stabilisierungswirkung stehen dabei das Sulfatanion und quartäre Ammoniumionen, gefolgt von Ammoniumion. Es ist daher leicht erklärlich, daß die überwiegende Zahl der handelsüblichen Enzympräparate als Stabilisierungsmittel Ammoniumsulfat enthält, allein oder gegebenenfalls mit zusätzlichen spezifischen Stabilisierungsmitteln. Auch die Cholesterinoxidase ist in handelsüblicher wäßriger Lösung bisher mit Ammoniumsulfat stabilisiert worden.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Stabilität von Cholesterinoxidase in Ammoniumsulfatlösung zu Beanstandungen Anlaß gibt. Die beste Stabilisierungswirkung wurde bei etwa 1 M Ammoniumsulfat erzielt und nimmt bei höherer Ammoniumsulfatkonzentration ab. Bereits bei einer Konzentration von 1 M treten jedoch gelegentlich grobflockige fettige Ausfällungen des Enzyms auf, die zwar immer noch enzymatisch aktiv sind, jedoch die Dosierung bei der Abfüllung beeinträchtigen.

Ziel der Erfindung

Überraschenderweise wurde nunmehr gefunden, daß diese Schwierigkeit beseitigt werden kann und einerseits Ausfällungen völlig zu vermeiden sind und andererseits eine überlegene Stabilisierung erzielt wird, wenn man als Stabilisierungsmittel Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in einer Konzentration zwischen 2,0 und 3,5 M anwendet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine lagerfähige, wäßrige Cholesterinoxidasepräparation zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist daher eine lagerfähige wäßrige Cholesterinoxidasepräparation mit einem Gehalt an Puffer und an Stabilisierungsmittel, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie pro Liter 2 bis 3,5 Mole oder KCl als Stabilisierungsmittel enthält. Vorzugsweise enthält sie NaCl in einer Konzentration zwischen 2,5 und 3,2 M.

Die überlegene Stabilisierungswirkung der genannten Salze war nicht zu erwarten, da nach der Hoffmeister-reihe Kalium und Natrium beträchtlich weniger stabilisieren, d.h. stärker inaktivieren als Ammonium und auch Chlorid erheblich stärker inaktiviert als Sulfat. Hinzu kommt noch, daß bekanntlich Flavinenzyme, zu denen auch die Cholesterinoxidase gehört, durch Alkalichloride bei höherer Konzentration inaktiviert werden (Theorell, in Acta Chem. Scand. 3, 1954, S. 1649).

Unter den vorstehend angegebenen Bedingungen liegt gute Stabilität bei pH-Werten zwischen 4,5 und 3,5 vor. Vorzugsweise besitzt die erfindungsgemäße Cholesterinoxidasepräparation einen pH-Wert zwischen 5,0 und 6,5. Die Puffermolarität liegt im allgemeinen zwischen 0,01 M und 0,2 M, bevorzugt wird der Bereich von 0,01 M bis 0,1 M.

Als Puffersubstanzen können alle im oben angegebenen Bereich puffernden Salze verwendet werden, beispielsweise Kaliumphosphatpuffer, Natriumphosphatpuffer, Kaliumphosphat/Zitronensäure-puffer, Natriumacetatpuffer usw..

Man hat zwar in Einzelfällen bereits Enzyme in Alkalichloridlösungen gelagert. Hierfür waren jedoch Verfahrensgründe maßgebend, beispielsweise die bessere Kristallisierfähigkeit von Papain in Natriumchlorid, verglichen mit Ammoniumchlorid oder

die Reinigung der Lectine durch Chromatographie in Natriumchloridlösungen, so daß man eine verschlechterte Stabilität in Kauf nehmen konnte. Für Flavinenzyme war jedoch eine derartige Lagerungsform nicht bekannt, da sie zur Abspaltung der prostetischen Gruppe bei sauren pH-Werten führt.

Ausführungsbeispiele

Die überlegene Lagerungsstabilität der erfindungsgemäßen Cholesterinoxidasepräparate gegenüber mit Ammoniumsulfat stabilisierten Cholesterinoxidasepräparaten ergibt sich aus folgenden Versuchen:

Eine Charge Cholesterinoxidase mit einem Gehalt von 450 U/ml Enzym in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6, wurde auf die in der nachstehenden Tabelle aufgeführte Salzkonzentration eingestellt und 4 Wochen bei 4°C bzw. + 35°C gehalten. Die nach Ablauf dieser Zeit festgestellte Restaktivität zeigt nachstehende Tabelle (2-Wochenwerte in Klammern).

TABELLE I

<u>Belastungstemperatur</u>	<u>Art und Konzentration der Zusätze</u>					
	1 M AS		3 M NaCl		3 M KCl	
+ 4°C	(100%) trüb	100%	(96%) blank	96%	(100%) blank	100%
+ 33°C	(86%) trüb	55%	(88%) blank	88%	(91%) blank	87%

AS = Ammoniumsulfat

Die überlegene Stabilisation gemäß Erfindung wird unabhängig von der Enzymkonzentration und von der Enzymcharge (einzelne Ansatzchargen unterscheiden sich vielfach in ihrer Stabilität) erhalten und ist noch stärker ausgeprägt, wenn nicht mit 1 M Ammoniumsulfat, sondern mit 3 M Ammoniumsulfatlösung verglichen wird.

Es wurden zwei verschiedene Enzymchargen auf eine Konzentration von 300 U/ml bzw. 30 U/ml mit dem oben angegebenen Puffer eingestellt und dann wie oben beschrieben 4 Wochen auf 35°C gehalten. Nachstehende Tabelle gibt die nach 4 Wochen gemessenen Restaktivitäten an. In Klammern sind die 2-Wochenwerte angegeben.

TABELLE II

Charge	Enzymkonzentration	1 M AS	3 M AS	3 M NaCl
1	300 U/ml	(73%) 58%		(100%) 92%
	30 U/ml	(77%) 67%	(68%) 49%	(100%) 96%
2	300 U/ml	(73%) 68%		(100%) 88%
	30 U/ml	(55%) 55%	(87%) 33%	(100%) 88%

Um zu zeigen, daß die überlegene Stabilisierung gemäß Erfindung auf einen bestimmten Konzentrationsbereich beschränkt ist, wurde bei einer Enzymcharge mit einer Konzentration von

-6- 209434 12.3.1979
54 428/18

30 U/ml der oben beschriebene Alterungstest bei 4°C bzw. 35°C 4 Wochen (2 Wochen) mit zwei verschiedenen Ammoniumsulfat- und vier verschiedenen Natriumchlorid-konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle III.

TABELLE III

Temp.	Ammoniumsulfat				Natriumchlorid		
	1 M	3,2 M	2 M	3 M	4 M	5M	
+ 4°C	(95%)100%	(100%)90%	(72%)95%	(64%)95%	(76%)80%	(100%)80%	
+ 35°C	(72%) 46%	(61%) 45%	(88%)71%	(88%)77%	(26%)40%	(16%) 0	

Erfindungsanspruch

1. Lagerfähige, wäßrige Cholesterinoxidasepräparation mit einem Gehalt an Puffer und an Stabilisierungsmittel, gekennzeichnet dadurch, daß sie pro Liter 2 bis 3,5 Mole NaCl oder KCl als Stabilisierungsmittel enthält.
2. Präparation nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß sie pro Liter 2,5 bis 3,2 Mole NaCl enthält.
3. Präparation nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß sie einen pH-Wert zwischen 4,5 und 8,5 aufweist.
4. Präparation nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß sie einen pH-Wert zwischen 5 und 6,5 aufweist.
5. Präparation nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß sie eine Puffersalzkonzentration von 0,01 bis 0,5 M aufweist.