



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 70671

- C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 06 10 1986
- (51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ A 61 K 37/02, 37/26,
C 07 K 1/02, 7/40
- (21) Patentihakemus — Patentansökning 801361
- (22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 28.04.80
- (23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag 28.04.80
- (41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 31.10.80
- (44) Nähtäväksiapanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utskriften publicerad 26.06.86
- (86) Kv. hakemus — Int. ansökan
- (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 30.04.79,
22.12.79 Saksan liittotasavalta-Föbundsrepub-
liken Tyskland(DE) P 2917535.7 P 2952119.5

- (71) Hoechst Aktiengesellschaft, 6230 Frankfurt/Main 80, Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Horst Thurow, Kelkheim (Taunus), Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä denaturoitumista kestävän vesipitoisen proteiiniliuoksen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av en mot denaturering beständig proteinlösning

Keksinnön kohteena on menetelmä proteiinivesiliuoksen valmistamiseksi, joka kestää rajapinnoilla tapahtuvaa proteiinin denaturoitumista, menetelmä kestovaikutteisen insuliinivalmisteen valmistamiseksi sekä tällaisen liuoksen käyttö hydrofobisten pintojen käsittelemiseksi, jotka denaturoivat proteiiniliuoksia. Lisäksi keksinnön kohteena on tällaisen liuoksen käyttö puhdistettaessa proteiineja kromatografoimalla tai ultrasuodattamalla sekä puhdistettaessa insuliinia kromatografoimalla tai kiteyttämällä.

On tunnettua, että liuenneet proteiinit adsorboituvat hydrofobisissa rajapinnoissa, joihin kuuluu myös vesiliuoksen ja ilman välinen rajapinta (C.W.N. Cumper ja A.E. Alexander, Trans. Faraday Soc. 46 (1950) 235). Proteiinit ovat amfofiilisiä aineita, so. niissä on sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia alueita. Hydrofobiset alueet muodostavat kosketuskohdan hydrofobisiin rajapintoihin.

Seurauksena proteiinien adsorptiosta rajapintoihin on havaittavissa erilaisia sekundaarireaktoita, joita yleensä kutsutaan yhteisnimellä "denaturointi". Adsorboituneiden proteiinimolekyylien muoto muuttuu (tertiäri- ja/tai sekundaarirakenteen muuttuminen). Lisäksi voi tapahtua adsorboituneiden proteiinimolekyylien aggregoitumista liukoiksi tai liukenemattomiksi polymeerimuodoiksi. Niinpä monilla proteiineilla tunnetaan pinta-aggregoitumista, mikä ilmenee esim. liuoksen samentumisena tai proteiinien biologisena inaktivoitumisena, kun vesiliuoksia sekoitetaan tai ravistellaan (A.F. Henson, I.R. Mitchell, P.R. Mussellwhite, J. Colloid Interface Sci. 32 (1970) 162). Tämä pinta-adsorptio ja -aggregoituminen on erityisen haitallista proteiiniliuosten siirtämiseen tarkoitetuissa laitteissa, esim. lääkkeiden automaattisissa annostelulaitteissa. Joissakin tapauksissa tapahtuu myös adsorboituneiden proteiinien ja liuenneiden aineiden välisiä kemiallisia reaktioita (F. MacRitchie, J. Macromol. Sci., Chem., 4 (1970) 1169).

Erityisesti tämä koskee nauta-, sika- ja ihmisinsuliinia tai niiden des-B1-fenyylialaniinijohdannaisia. Sinkkipitoisuuden ollessa jopa 0,8 % insuliinin painosta nämä liukenevat kirkkaina vesiväliaineisiin, joiden pH on alle 4,3 ja yli 6,5. Mainitut insuliinit muodostavat vesiliuoksissa aggregaatteja, jolloin liuos muodostuu tasapainotilassa olevista monomeerisistä, dimeerisistä, tetrameerisistä, heksameerisistä ja oligomeerisistä insuliinimolekyyleistä. On tunnettua, että insuliini absorboituu voimakkaasti hydrofobisiin pintoihin, joihin kuuluu myös liuoksen ja ilman välinen rajapinta (Weisenfeld et al., Diabetes 17 (1968) 766 ja Browne et al., Eur. J. Biochem. 33 (1973) 233). Omat kokeet ovat osoittaneet, että absorboitunut insuliini voi denaturoitua pinnassa. Lämpötila ja liuoksen liike vaikuttavat tähän tapahtumaan. Denaturoitunut tuote desorboituu jälleen polymeerisenä aggregaattina, joka liuoksen ollessa riittävän konsentroitu muodostaa sakan tai tiksotrooppisen geelin. Denaturoitunut insuliini on biologisesti tehoton ja tukkii siirtoletkuja esim. jatkuvatoimisessa tai ohjautusti toimivassa insuliini-infuusiopumpussa, jollaista käytetään keinoitekoisissa beeta-soluissa.

Lisäksi denaturoitu insuliini voi johtaa immunologisiin torjuntareaktioihin. On olemassa tutkimuksia, joiden mukaan insulii-

nin fysikaalinen olomuoto on syynä insuliinin vasta-aineiden syntymiseen (Kumar et al., Horm. Metab. Res. 6 (1974) 175). Lisäksi on tunnettua, että ihmiselle annettaessa jopa ihmisinsuliini johtaa immunologisiin reaktioihin (A. Teuscher et al., Diabetologia 13 (1977) 435).

Tekniikan tason mukaisesti valmistetut terapeuttisesti käytettävät insuliinivesiliuokset voivat sisältää tehoaineen eli nau-ta- tai sikainsuliinin tai näiden insuliinien des-B1-fenyyliala-niini johdannaisen ohella jopa 0,8 % liuennutta sinkkiä insuliinin painosta, ainetta isotonian säätämiseksi kuten natriumkloridia, glyseriiniä tai glukoosia, säilöntäainetta kuten fenolia, kresolia tai p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä ja suolaa pH-arvon pusku-roimiseksi kuten natriumfosfaattia, -asetaattia tai -sitraattia. Lisäksi voidaan lisätä kesto vaikutusapuaineita kuten protamiinia tai surfeenia hidastetun insuliinivaikutuksen saavuttamiseksi tai liuokset on sekoitettu insuliinin kiteisiin tai amorfisiin kesto-vaikutusmuotoihin. Voitiin todeta, että kaikissa näissä valmis-teissa liuennut insuliini denaturoituu rajapinnoissa.

Omat kokeet ovat osoittaneet, että denaturoitumisnopeus kas-vaa liuosten lämpötilan, liikkeen ja pH-arvon mukaan. Samalla ta-voin ihmisinsuliini denaturoitui vesiliuoksissa. Insuliinin aggre-goitumistasapainoja vesiliuoksissa monomeerisen molekyylin suuntaan siirtävät lisäaineet, kuten guanidiini, urea, pyridiini tai mono-meeriset puhdistusaineet, nopeuttavat denaturoitumista. Aineet, jotka siirtävät tasapainoja päinvastaiseen suuntaan, kuten sinkki ja muut kaksiarvoiset metalli-ionit, hidastavat denaturoitumista. Mutta kaikkien edullisten olosuhteiden yhdistäminenkin ei pysty estämään insuliinin denaturoitumista. Tämä denaturoituminen, jos-kin hitaampana, oli havaittavissa myös varastoitaessa liuoksia le-potilassa.

Hydrofobisten rajapintojen erikoismuoto muodostuu jäädytet-täessä vesiliuoksia esim. jäädytyskuivattaessa proteiineja. Näis-säkin rajapinnoissa tapahtuu proteiinien kuvattua denaturoitumis-ta (U.B. Hansson, Acta Chem. Scand. 22 (1968) 483).

Denaturointiprosessi voi antaa proteiineille immunogeenisiä ominaisuuksia (so. kyvyn indusoida immunologisia torjuntareaktioi-ta elimistössä) tai voimistaa jo olemassa olevia immunogeenisiä ominaisuuksia. Lisäksi biologiset ominaisuudet kuten entsymaattinen,

serologinen tai hormonaalinen teho voivat muuttua tai hävitä.

Lisäksi on tunnettua, että proteiinien adsorptio rajapinnoissa, jotka muodostuvat vesiliuoksen ja nestemäisen hydrofobisen faasin väliin, voidaan estää siten, että tähän systeemiin lisätään monomeerisiä pinta-aktiivisia aineita kuten alkyylialkoholeja (R. Cecil ja C.F. Louis, Biochem, J 117 (1970) 147). Nämä aineet puolestaan absorboituvat palautuvasti hydrofobisiin rajapintoihin ja syrjäyttävät siten proteiinit. Tämän menetelmän haittana on, että vesiliuoksessa on pinta-aktiivisten aineiden käyttökonsentraation oltava lähellä kyllästymisarvoa, koska vain näin varmistetaan rajapinnan optimikuormitus. Monissa tapauksissa rajapinnan koko ei ole vakio, vaan vaihtelee (esim. liuoksen ja ilman rajapinta proteiiniliuoksia sekoitettaessa tai ravistellessa), jolloin vesiliuoksen on vuoroin luovutettava uudelleen ja vastaanotettava näiden pinta-aktiivisten aineiden molekyylejä, so. liuoksessa on oltava puskurivaranto. Koska käyttökonsentraation on oltava lähellä kyllästymisrajaa tämä on vain rajallisesti mahdollista.

Tämän menetelmän lisähaittana on, että mainitut monomeeriset pinta-aktiiviset aineet eivät adsorboidu vain hydrofobisiin rajapintoihin, vaan myös liuenneiden proteiinien hydrofobisiin alueisiin. Näissä ne denaturoivat liuenneita proteiineja. Monissa tapauksissa tämä denaturointi on palautumaton ja juuri tämä halutaan estää.

Monomeeristen pinta-aktiivisten aineiden hydrofobisiin rajapintoihin ja myös liuenneiden proteiinien hydrofobisiin alueisiin sitoutumisen voimakkuus riippuu aineiden hydrofobisuudesta, so. alkyyliketjujen pituudesta. Mitä pitempi alkyyliketju on sitä voimakkaampi on sitoutuminen. Ristiriita, joka vallitsee rajapintojen mahdollisimman täydellisen pinta-aktiivisilla aineilla kuormittamisen (saavutettavissa aineiden suurella hydrofobisuudella tai suurella käyttökonsentraatiolla) ja liuenneiden proteiinien hydrofobisiin alueisiin kohdistuvan mahdollisimman pienen sitoutumisen välillä tuntui ratkaisemattomalta.

Lisäksi DE-hakemusjulkaisusta 26 20 483 tunnetaan insuliini-vesiliuos, joka ei geeliydy ja jossa ei tapahdu erottumista varastoinnin aikana, kun liuokseen lisätään ennen varastointia 0,1-20 paino-% jonkin korkeamman alkoholin polyoksietyleenieetteriä.

Näiden polyoksietyleenieettereiden, joiden molekyyliketjuissa etyleeniyksiköt ja happiatomit vuorottelevat, ei todettu mitenkään suojaavan proteiinivesiliuoksia denaturoinnilta. Kyseisillä etyleeniyksiköillä ei ilmeisesti ole sellaiseen suojavaikutukseen tarvittavia hydrofobisia ominaisuuksia, koska ne sijaitsevat molekyyliketjussa siten, että ne eivät pääse vuorovaikutukseen hydrofobisten rajapintojen tai hydrofobisiin alueisiin liuenneiden proteiinien kanssa.

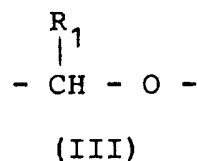
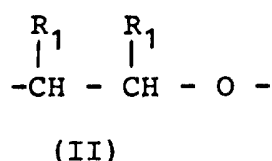
DE-hakemusjulkaisusta 26 41 819 tunnetaan lisäksi farmaseuttinen peräpuikkovalmiste, joka sisältää (1) insuliinia, (2) peräpuikkoperusmassaa ja (3) vähintään yhtä absorptiota nopeuttavaa ainetta ja muiden muassa ionitonta pinta-aktiivista poly(etyleenioksidipropyleenioksidia), jonka määrä on 0,001-0,5-kertaa peräpuikkoperusmassan määrä. Tämän julkaisun antamien tietojen perusteella ei ollut mahdollista valmistaa stabiilia proteiinivesiliuosta, joka kestää rajapinnoilla tapahtuvaa proteiinien denaturoitumista.

Nyt on havaittu, että ketjumaisen perusrakenteen omaavat polymeeriset aineet, joiden rakenteissa on vuorotellen heikosti hydrofobisia ja heikosti hydrofiilisiä alueita, muuttavat rajapintoja siten, että proteiinien adsorptio näihin rajapintoihin ja siten mainitut sekundaarireaktiot kuten rajapinta-aggregoituminen estyvät tehokkaasti.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle stabiilin proteiinivesiliuoksen valmistamiseksi, joka kestää rajapinnoilla tapahtuvaa proteiinien denaturoitumista, on tunnusomaista, että proteiinivesiliuokseen lisätään pinta-aktiivista homopolymeraattia, sekapolymeraattia tai möhkälepolymeraattia, jolla on kaava (I)



jossa X_n on ketju, joka sisältää halutussa järjestyksessä n jäsentä, joilla on kaava (II) tai (III)



ja n on 2-80, edullisesti 8-45, R_1 on H , $-CH_3$ tai $-C_2H_5$, jolloin ryhmät R_1 voivat olla samoja tai erilaisia ja vähintään puolessa ketjun jäsenistä X on $-CH_3$ tai C_2H_5 , Y on $-O-$ tai $-NH-$ ja R_2 ja R_3 ovat toisistaan riippumatta H tai orgaaninen ryhmä.

Eräs keksinnön suoritusmuoto käsittää insuliinivesiliuoksen valmistuksen, jolloin liuokseen mahdollisesti lisätään insuliiniliuoksissa tavanomaisia lisäaineita isotonian, säilyvyyden ja/tai kesto vaikutuksen säätämiseksi.

Keksinnön mukainen menetelmä proteiinivesiliuosten stabiloimiseksi soveltuu yleensä peptideille ja polypeptideille, jotka adsorboituvat liuoksesta hydrofobiselle rajapinnalle. Tällaisista peptideistä ja polypeptideistä voidaan mainita entsyymit, kuten urikaasi, lysotsyymi, streptokinaasi, myoglobiini, neuraminidaasi; peptidihormonit, kuten sekretiini, glukagoni, kalsitoniini, gastriini, ACTH, bradykiniini, kolekystokiniini, kasvuhormoni, erytropoietiini, kilpirauhasta stimuloivat hormonit, tymosiini, hypotalamusta säätelevät tekijät, relaksiini; sekä proteiinit, joilla on muita tehtäviä, kuten albumiini, erilaiset immunoglobuliinit, fibroblasti-interferoni, leukosyytti-interferoni ja ihmisestä peräisin oleva immuuni-indusoitu interferoni.

Erityisen edullisia ovat kaavan (I) mukaiset yhdisteet, joissa R_2 ja R_3 merkitsevät vetyä. Vähemmän edullisia ovat kaavan (I) mukaiset yhdisteet, joissa R_3 on 1-20 hiiliatomia sisältävä alkyyli, 2-20 hiiliatomia sisältävä karboksyylialkyyli tai 1-10 alkyylihiiliatomia sisältävä alkyylifenylyli. Edullisissa yhdisteissä R_2 on samoin 1-20 hiiliatomia sisältävä karboksialkyyli tai 1-10 alkyylihiiliatomia sisältävä alkyylifenylyli.

Esimerkkejä ryhmistä R_2 ja R_3 ovat metyyli, etoksi, propoksi, butoksi tai ryhmät, jotka ovat peräisin lauryylialkoholista tai myristyylialkoholista, karboksialkyyli-ryhmät, jotka ovat peräisin etikkahaposta, propionihaposta, voihaposta, palmitiinihaposta tai steariinihaposta, nonyylifenoksi, oleyyliamino tai stearyyliamino.

R_2 tai R_3 voidaan myös johtaa moniarvoisesta alkoholista kuten glyseriinistä tai pentaerytriitistä tai moniarvoisesta karboksyylihaposta kuten sitruunahaposta tai moniarvoisesta amiinista kuten etyleenidiamiinista. Monifunktionaalinen ryhmä R_2 tai R_3 voi olla sitoutunut kahteen tai useampaan yllä kuvattuun polyalkoksi-ketjuun, jolloin muodostuu haarautuneita tuotteita.

Keksinnössä käytettävien pinta-aktiivisten aineiden valmistus tapahtuu tunnettuun tapaan lisäämällä kontrolloidusti alkyleenioksideja alkyleenidiglykoleihin (tai moniarvoisiin alkoholeihin tai amiineihin kuten pentaerytriittiin tai etyleenidiamiiniin, jolloin saadaan haarautuneita tuotteita). Päätehydroksyylifunktiot voidaan mahdollisesti esteröidä tai eetteröidä. Yleisohje sopivan möhkälepolymeraatin valmistamiseksi on esitetty esimerkissä 1a.

Keksinnössä käytettäville pinta-aktiivisille aineille on ominaista, että vesipitoisessa väliaineessa jo 2-200 ppm:n pitoisuus on tehokas. Voidaan olettaa, että nämä aineet sijoittuvat rajapintaan siten, että niiden hydrofobiset ryhmät tunkeutuvat hydrofobiiseen faasiin ja niitä lomittavat hydrofiiliset ryhmät vesifaasiin. Koska yksittäisten hydrofobisten ryhmien hydrofobisuus on suhteellisen heikko, näiden yksittäisten hydrofobisten ryhmien sitoutuminen muihin hydrofobisiin rakenteisiin kuten liuenneiden proteiinien hydrofobisiin alueisiin lienee myös niin heikko, että se keksinnön mukaisia pitoisuuksia käytettäessä voidaan jättää huomiotta. Vasta kaikkien yksittäisten hydrofobisten ryhmien sidosten summa saa suuressa hydrofobisessa pinnassa (rajapinta, johon verrattuna liuenneiden proteiinien hydrofobiset alueet ovat hyvin pieniä) aikaan sen, että nämä aineet peittävät rajapinnat pienilläkin käyttöpitoisuuksilla optimaalisesti.

Molekyyli muodon, joka keksinnössä käytettävillä pinta-aktiivisilla aineilla on vesiliuoksessa, on poikettava muodosta, joka niillä on pinnassa. Vesiliuoksessa polymeeriketjun muoto on sellainen, että hydrofobiset alueet kumoavat toisensa ja hydrofiiliset alueet tunkeutuvat ulospäin vesipitoiseen ympäristöön. Tämä aikaansaa erittäin hyvän liukoisuuden vesiväliaineisiin ja tarjolla on riittävän suuri puskurivaro, joka rajapintojen koon jatkuvastikin muuttuessa mahdollistavat rajapintojen optimikuormituksen mainituilla aineilla.

Adsorption ja denaturoinnin esto keksinnössä käytettävillä lisäaineilla on sitäkin yllättävämpää, koska kuten yllä kuvattiin monomeeristen, liukoisten pinta-aktiivisten aineiden (puhdistusaineiden) lisäys nopeuttaa proteiiniliuosten ja erityisesti insuliinin denaturoitumista.

Keksinnön mukaiset polymeeriset pinta-aktiiviset aineet voidaan joko sekoittaa proteiiniliuokseen tai niillä voidaan esikäsitellä pintoja, jotka joutuvat kosketukseen proteiiniliuoksen kanssa.

Mainittujen polymeeristen pinta-aktiivisten aineiden lisäksi proteiiniliuoksiin ei rajoitu vain hoitoon käytettäviin liuoksiin. Näitä aineita voidaan lisätä proteiiniliuoksiin myös proteiinien valmistus- ja puhdistusprosessissa estämään adsorptiota ja denaturointia rajapinnoissa erityisesti proteiiniliuosten geelikromatografiassa ja ultrasentrifugoinnissa.

Insuliinin denaturoituminen on palautuva prosessi. Käsittelemällä denaturoitunutta insuliinia helppoliukoisilla puhdistusaineilla (esim. natriumdodekyylisulfaattilla), vesipitoisilla, emäksisillä väliaineilla pH-arvossa yli 10,5 tai konsentroidulla trifluorietikkahapolla voidaan denaturoituneet tuotteen palauttaa alkuperäiseen tilaan. On myös mahdollista mainituissa olosuhteissa palauttaa alkuperäistilaan tavanomaisessa valmistusprosessissa saatavien insuliinien denaturoituneen insuliinin vähäinen osa ennen kuin näiden tuotteiden liuokset saatetaan kosketukseen keksinnössä käytettävien pinta-aktiivisten aineiden kanssa.

Hoitoon käytettävät insuliiniliuokset voidaan valmistaa seuraavan yleisvalmistusohjeen mukaan.

Liuotetaan jopa 1 500 000 kansainvälistä yksikköä (IE) nautasika- tai ihmisinsuliinia tai näiden insuliinien des-B1-fenyylialaniinijohdannaista, jossa voi olla jopa 0,8 paino-% sinkkiä, 400 ml:aan vettä ja lisätään samalla 1-n kloorivetyhappoa. Tämä liuos sekoitetaan 500 ml:aan liuosta, jossa on säilöntäainetta kuten fenolia, kresolia tai p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä, ainetta isotonian säätämiseksi kuten natriumkloridia, glyseriiniä, glukosia tai vastaavaa hiilihydraattia ja suolaa pH-arvon puskuroimiseksi kuten natriumfosfaattia, -asetaattia, -sitraattia, 5,5-dietyyli-barbitaalinatriumia tai tris-(hydroksimetyyli)-aminometaania. Lisäksi tämä liuos voi sisältää kesto vaikutusapuainetta kuten surfeenia hidastetun insuliinivaikutuksen saavuttamiseksi. pH säädetään arvoon 3,0-4,0 tai 6,8-7,5 1-n kloorivetyhapolla tai 1-n natriumhydroksidiliuoksella. Sitten lisätään 50 ml vesiliuosta, jossa on 2-200 mg keksinnössä käytettävää pinta-aktiivista ainetta. Liuos täytetään 1,0 litraksi.

Tällainen hoidollinen insuliiniliuos voidaan sekoittaa amorfista tai kiteistä, hitaasti vaikuttavaa insuliinia sisältävään suspensioon.

Esimerkki 1

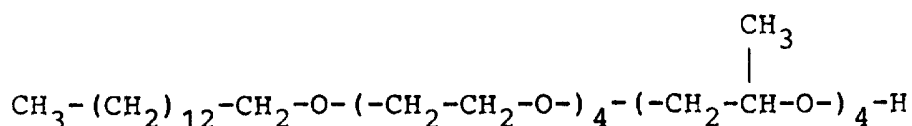
a) Kymmenen litran lasikolviin, joka oli varustettu sekoittimella, kuumennushauteella, palautusjäähdyttimellä ja laitteella alkyleenioksidien annostelemiseksi typpisuojassa, lisättiin 152,1 g propyleeniglykolia ja 125 g 40 %:sta kaliumhydroksidiliuosta. Vesi poistettiin tislamalla vakuuissa. Sitten lisättiin hitaasti ja sekoittaen 120°C:ssa peräkkäin 4141 g propyleenioksidia ja 476 g etyleenioksidia. Reaktion päätyttyä kaliumhydroksidi neutraloitiin lisäämällä maitohappoa. Helposti haihtuvat komponentit poistettiin tislamalla vakuuissa ja tuotteesta poistettiin vesi. Tuotteen keskimääräinen molekyylipaino oli 2000 Daltonia ja sen polyoksietyleenipitoisuus molekyylissä oli 10 paino-%.

b) Kaksi näytettä, joissa kummassakin oli 10 ml nautaseerumi-
albumiinin tai ihmisalbumiinin 0,1 %:sta liuosta 0,01-m fosfaattipuskurissa, pH 7, ja kaksi samanlaista näytettä, joihin oli lisätty stabilisaattorina 10 ppm (liuoksen painosta) möhkälepolymeraattia, joka muodostui polypropyleeniglykolin suorasta ketjusta, keskimääräinen molekyylipaino 1750 Daltonia, johon molemminpuolisesti oli kummallekin puolelle sekapolymeroitu 5 % polyetyleeniglykolia, ravisteltiin 37°C:ssa. Molemmissa ensimmäisissä näytteissä näkyi 7 ja vastaavasti 30 vuorokauden kuluttua voimakas, denaturoituneen proteiinin aiheuttama samennus. Molemmat stabilisaattoria sisältävät näytteet olivat vielä usean kuukauden kuluttua kirkkaita.

Esimerkki 2

Kymmeneen näytteeseen, joissa kussakin oli E. colista saadun β -galaktosidaasientsyymin 0,01 %:sta liuosta 0,01-m fosfaattipuskurissa, pH 7, ja 3×10^6 μ U/ml, lisättiin kasvavana sarjana 10 - 100 mg silikoniöljyä AK 350. Suspensioita ravisteltiin 48 tuntia 5°C:ssa. Tällöin muodostui emulsio, joka ultrasentrifugoimalla (40 000 g, 30 minuuttia, 4°C) jakaantui kahdeksi faasiksi. Entsyy-miaktiivisuus määritettiin vesifaasista. Osoittautui, että sili-koniöljyemulsio oli adsorboinut entsyymin 70 %:iin saakka. Kun koe toistettiin lisäten 100 ppm (liuoksen painosta) seuraavaa yhdis-tettä:

70671



voitiin havaita, että tämän pinta-aktiivisen yhdisteen läsnäollessa yhtään entsyymiaktiivisuutta ei ollut adsorboitunut silikoniöljyyn.

Esimerkki 3

Jaettiin kahteen yhtä suureen osaan 10 ml vesisuspensiota, jossa oli polystyreenihelmiä (Dow-Latex^(R)), keskimääräinen halkaisija 0,481 µm. Toista osaa ei käsitelty ja toista osaa sekä 50 mg möhkälepolymeraattia, joka muodostui polypropyleeniglykolin suorasta ketjusta, keskimääräinen molekyylipaino 2250 Daltonia, johon molemminpuolisesti oli kummallekin puolelle sekapolymeroitu 5 % polyetyleeniglykolia, ravisteltiin kaksi vuorokautta huoneen lämpötilassa. Sitten ylimäärä poistettiin dialysoimalla vesiliuoksen suhteen, jossa oli 20 ppm tätä polymeeristä pinta-aktiivista ainetta.

Seuraavassa taulukossa mainituista proteiineista valmistettiin kustakin kaksi 3 ml:n liuosta, jossa oli merkitty konsentraatio pH 7-fosfaattipuskurissa. Kutakin näistä liuoksista ja vastavasti 500 µl käsittelemätöntä ja yllä kuvatulla tavalla esikäsiteltyä polystyreenisuspensiota ravisteltiin 5°C:ssa. Sitten jokainen näyte suodatettiin kirkkaaksi 0,2 µm suodattimen läpi. Suodosten proteiinipitoisuudet ilmenevät taulukosta:

Proteiini	Proteiinipitoisuus liuoksissa		
	A mg/ml	B mg/ml	C mg/ml
Ihmis- γ-globuliini	1,2	1,2	0,2
Muna-albumiini	0,5	0,50	0,22
Lysotsyymi	1,0	0,95	0,25
Sekretiini	1,0	1,0	0,3
Glukagoni	1,0	0,9	0,3
Insuliini	1,0	1,0	0,2

A = 3 ml käytettyjä proteiiniliuoksia + 450 µl puskuria

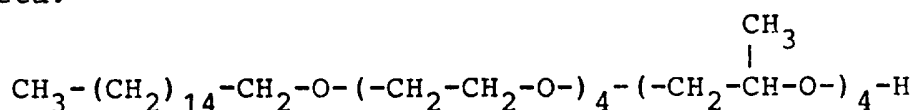
B = esikäsiteltyjen polystyreenipintojen kanssa kosketuksen jälkeen

C = käsittelemättömien polystyreenipintojen kanssa kosketuksen jälkeen

Tämä koe toistettiin 37°C:ssa. Tällöin suodoksia lisäksi tutkittiin geelikromatografioimalla pylväässä. Osoittautui, että käsittelemättömien polystyreenihelmien kanssa kosketuksessa olleet proteiiniliuokset sisälsivät suurimolekyyllisiä aggregaatteja. Esi- käsiteltyjen polystyreenihelmien kanssa kosketuksessa olleissa proteiiniliuoksissa ei voitu havaita tällaisia aggregaatteja.

Esimerkki 4

Viisi näytettä, joissa kussakin oli 10 ml glukagonin 0,1 %:sta liuosta 0,05-m tris/HCl-puskurissa, pH 8,0, ja viisi samanlaista näytettä, joihin oli lisätty 50 ppm (liuoksen painosta) seuraavaa yhdistettä:



ravisteltiin huoneen lämpötilassa. Viidessä ensimmäisessä näytteessä näkyi neljän vuorokauden kuluttua saostuneen, denaturoituneen proteiinin aiheuttama samennus. Näytteet, joihin oli lisätty pinta-aktiivista ainetta, säilyivät useita viikkoja kirkkaina.

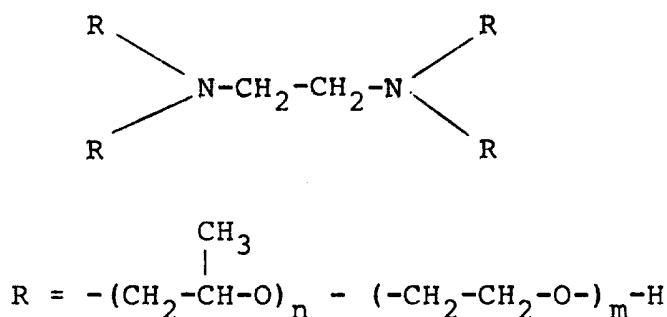
Esimerkki 5

Ampulleja, joissa kussakin oli 1-5 ml 0,1 %:na liuoksena peptidihormoneja sekretiini, kalsitoniini, glukagoni, gastriini, adrenokortikotrooppinen hormoni (ACTH), bradykiniini, kolekystokiniini (CCK), gastriinia inhiboiva polypeptidi (GIP), vasoaktiivinen suolipolypeptidi (VIP) ja luteinisoiva-releasing-hormoni (LHR) 0,05-m tris/HCl-puskurissa, pH 7,5 ja samanlaisia näytteitä, joihin oli lisätty 10 ppm (liuoksen painosta) möhkälepolymeraattia, joka muodostui polypropyleeniglykolin suorasta ketjusta, keksimääräinen molekyylipaino 2000 Daltonia, johon molemminpuolisesti oli kummallekin puolelle sekapolymeroitu 5 % polyetyleeniglykolia, ravisteltiin 37°C:ssa. Näytteissä ilman stabilisaattoria näkyi muutama vuorokauden kuluttua voimakas, denaturoituneen proteiinin aiheuttama samennus. Stabiloidut näytteet olivat useankin kuukauden kuluttua kirkkaita.

Esimerkki 6

Muna-albumiinin, ihmisimmunoglobuliini-G:n tai valaan myoglobiinin 0,1 %:sta liuoksista 0,01-m fosfaattipuskurissa, pH 7, ja samanlaisista liuoksista, joihin oli lisätty 0,1 % (liuoksen painosta) seuraavaa yhdistettä:

70671



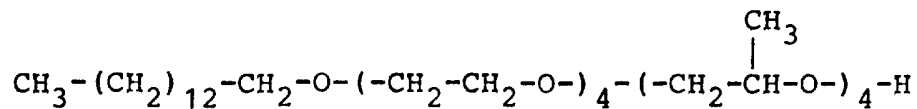
jolloin n ja m valittiin siten, että yllä olevan yhdisteen keskimääräiseksi molekyylipainoksi tuli 12 500 Daltonia ja sen etyleenioksidiosuudeksi 40 %, poistettiin aggregaatit ultrasentrifugoimalla (esim. 100 000 g, 90 minuuttia). Ravisteltiin 37°C:ssa ampulleja, jotka sisälsivät 10 ml näitä liuoksia. Näytteissä ilman stabilisaattoria näkyi muutaman tunnin kuluttua voimakas, saostuneen, denaturoituneen proteiinin aiheuttama samennus. Näytteet, joihin oli lisätty pinta-aktiivisia aineita, säilyivät useita kuukausia kirkkaina ja analyttisen ultrasentrifugoinnin jälkeen niissä ei ollut uusia aggregaatteja.

Esimerkki 7

Kiteytettyä nautainsuliinia (40 000 IE), jossa oli 0,5 paino-% sinkkiä, liuotettiin 200 ml:aan vettä 3 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 700 ml liuosta, jossa oli 1 g p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä, 16 g glyseriiniä ja 1,4 g natriumasetaatti·3 H₂O:ta. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,9-7,4 1-n natriumhydroksidiliuoksella. Kun oli lisätty 5 ml lineaarisen polypropyleeniglykolin, keskimääräinen molekyylipaino 2000 Daltonia, 0,1 %:sta vesiliuosta, täytettiin vedellä 1,0 litraksi ja liuos steriilisuodatettiin.

Esimerkki 8

Naudan kiteytettyä des-B1-fenyylialaniini-insuliinia (100 000 IE), jossa oli 0,6 paino-% sinkkiä, liuotettiin 200 ml:aan vettä 3 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 700 ml liuosta, jossa oli 2 g fenolia, 17 g glyseriiniä ja 6,057 g tris-(hydroksimetyyli)-aminometaania, jonka pH oli säädetty arvoon 7,6 35 ml:lla 1-n kloorivetyhappoa. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,2-7,6. Kun oli lisätty 10 ml yhdisteen



1 %:sta vesiliuosta täytettiin vedellä 1,0 litraksi ja liuos steriilisuodatettiin.

Esimerkki 9

Amorfista nautainsuliinia (1 000 000 IE), jossa oli 0,8 paino-% sinkkiä, liuotettiin 400 ml:aan vettä 5 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 500 ml liuosta, jossa oli 2,5 g fenolia, 16 g glyseriiniä ja 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$:ta. Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,2-7,5. Kun oli lisätty 5 ml lineaarisen polypropyleeniglykolin, keskimääräinen molekyylipaino 1750 Daltonia, 0,1 %:sta vesiliuosta täytettiin vedellä 1,0 litraksi ja liuos steriilisuodatettiin.

Esimerkki 10

Nautainsuliinia (40 000 IE), joka möhkälepolymeraatin läsnäollessa, joka muodostui polypropyleeniglykolin suorasta ketjusta, keskimääräinen molekyylipaino 1750 Daltonia, johon molemminpuolelta oli kummallekin puolelle sekapolymeroitu 5 % polyetyleeniglykolia, oli puhdistettu kromatografoimalla ja joka sisälsi 0,6 paino-% sinkkiä, liuotettiin 200 ml:aan vettä 3 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 700 ml liuosta, jossa oli 2,5 g m-kresolia, 50 g glukoosia, 1,4 g natriumasetaatti $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$:ta ja 10 mg yllä mainittua möhkälepolymeraattia. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,9-7,4 1-n natriumhydroksidiliuoksella, täytettiin 1,0 litraksi ja steriilisuodatettiin.

Esimerkki 11

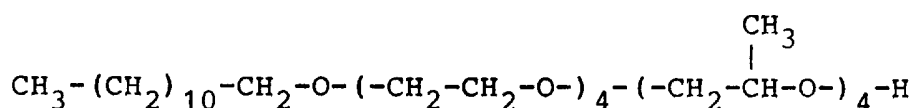
Kiteytettyä sikainsuliinia (40 000 IE), jossa oli 0,6 paino-% sinkkiä, liuotettiin 200 ml:aan vettä 3 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 700 ml liuosta, jossa oli 1 g p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä, 17 g glyseriiniä, 1,4 g natriumasetaatti $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$:ta ja 10 mg lineaarista polypropyleeniglykolia, keskimääräinen molekyylipaino 1750 Daltonia. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,9-7,4. Täytettiin vedellä 1,0 litraksi ja liuos steriilisuodatettiin.

Esimerkki 12

Kiteytettyä nautainsuliinia (450 000 IE), joka möhkälepolymeraatin läsnäollessa, joka muodostui polypropyleeniglykolin suorasta ketjusta, keskimääräinen molekyylipaino 1750 Daltonia, johon molemminpuolisesti oli kummallekin puolelle sekapolymeroitu 5 % polyetyleeniglykolia, oli puhdistettu tavanomaisen kromatografiamenetelmän avulla ja joka sisälsi 0,5 paino-% sinkkiä, liuotettiin 400 ml:aan 0,03-n kloorivetyhappoa ja tähän liuokseen lisättiin liuos, jossa oli 150 mg ZnCl_2 :ta ja 5 mg kromatografiassa käytettyä möhkälepolymeraattia 100 ml:ssa 0,03-n kloorivetyhappoa. Liuos steriilisuodatettiin ja siihen sekoitettiin 500 ml samoin steriilisuodatettua liuosta, jossa oli 70 g natriumkloridia, 14 g natriumasetaatti $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$:ta, 5 mg kromatografiassa käytettyä möhkälepolymeraattia ja 10 ml 1-n natriumhydroksidivesiliuosta. Seoksen pH säädettiin arvoon 5,4 ja sekoitettiin 48 tuntia huoneenlämpötilassa, jolloin insuliini kiteytyi romboedreiksi. Kidesuspensioon lisättiin 10,25 litraa steriiliä liuosta, jossa oli 20 g natriumkloridia, 1,75 g natriumasetaatti $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$:ta, 11,25 g p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä ja 102,5 mg kromatografiassa käytettyä möhkälepolymeraattia. pH säädettiin arvoon 6,9-7,3 lisäämällä tiputtaen 1-n natriumhydroksidiliuosta.

Esimerkki 13

Kiteytettyä nautainsuliinia (40 000 IE), joka oli yhdisteen



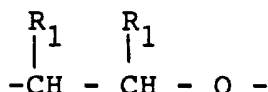
läsnäollessa puhdistettu tavanomaisen kromatografiamenetelmän avulla ja joka sisälsi 0,5 paino-% sinkkiä, liuotettiin 200 ml:aan vettä 3 ml:n kera 1-n kloorivetyhappoa. Tähän liuokseen lisättiin 700 ml liuosta, jossa oli 1 g p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä, 50 g glukoosia, 0,175 g surfeenia ja 100 mg samaa ainetta kuin kromatografiassa käytetty. Liuoksen pH säädettiin arvoon 3,3-3,5 valinnaisesti 1-n kloorivetyhapolla tai 1-n natriumhydroksidiliuoksella, täytettiin vedellä 1,0 litraksi ja steriilisuodatettiin.

Patenttivaatimukset

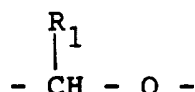
1. Menetelmä vesipitoisen proteiiniliuoksen valmistamiseksi, joka kestää rajapinnoilla tapahtuvaa proteiinien denaturoitumista, t u n n e t t u siitä, että vesipitoiseen proteiiniliuokseen lisätään pinta-aktiivista homopolymeraattia, sekapolymeraattia tai mähkäläpolymeraattia, jolla on kaava (I)



jossa X_n on ketju, joka sisältää halutussa järjestyksessä n jäsentä, joilla on kaava (II) tai (III)



(II)



(III)

ja n on 2 - 80, edullisesti 8 - 45, R_1 on H, $-CH_3$ tai $-C_2H_5$, jolloin ryhmät R_1 voivat olla samoja tai erilaisia ja ovat vähintään puolessa ketjun X_n jäsenistä $-CH_3$ tai $-C_2H_5$, Y on $-O-$ tai $-NH-$ ja R_2 ja R_3 ovat toisistaan riippumatta H tai orgaaninen ryhmä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_2 ja R_3 merkitsevät vetyä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että R_2 ja/tai R_3 ovat vähintään kolmiarvoisia ja ne ovat sitoutuneet kolmen tai useamman polyalkoksiketjun $-X_n$ kanssa haarautuneiksi tuotteiksi.

4. Yhden tai useamman patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesipitoisessa väliaineessa on 2 - 200 ppm pinta-aktiivista ainetta.

5. Yhden tai useamman patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on insuliini ja että liuos mahdollisesti sisältää insuliiniliuoksissa tavantomaaisia lisäaineita isotonian, säilyvyyden ja/tai kesto vaikutuksen säätämiseksi.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u

t u siitä, että sekoitetaan nauta-, sika- tai ihmisinsuliinin tai näiden insuliinien des-B1-fenyylialaniinijohdannaisen liuos, joka sisältää jopa 0,8 % sinkkiä insuliinin painosta, ja kaavan (I) mukaista yhdistettä sisältävä liuos ja mahdollisesti lisätään isotonian säätöainetta kuten glyseriiniä, natriumkloridia, glukosia tai vastaavaa hiilihydraattia, säilöntäainetta kuten fenolia, kresolia tai p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä ja pH-arvon puskuroimisainetta kuten natriumfosfaattia, -asetaattia, -sitraattia, 5,5-dietyylibarbitaalinatriumia tai tris-(hydroksimetyyli)-aminometaania.

7. Menetelmä kesto-vaikutteisen insuliinivalmisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukaisesti valmistettuun insuliiniliuokseen lisätään hitaasti vaikuttavaa insuliinin kesto-vaikutuskomponenttia.

8. Menetelmä hydrofobisten pintojen käsittelymiseksi poistamaan niiden proteiineihin kohdistama adsorboiva ja denaturoiva vaikutus, t u n n e t t u siitä, että pintoja käsitellään jollakin patenttivaatimuksissa 1 - 4 määritellyllä kaavan (I) mukaisen pinta-aktiivisen aineen vesiliuoksella.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisesti valmistetun liuoksen käyttö puhdistettaessa proteiineja kromatografoimalla tai ultrasuodattamalla.

10. Patenttivaatimuksen 5 mukaisesti valmistetun liuoksen käyttö puhdistettaessa insuliinia kromatografoimalla tai kiteyttämällä.

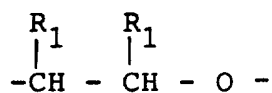
11. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukaisesti määritellyn kaavan (I) mukaisen pinta-aktiivisen aineen käyttö hydrofobisten pintojen esikäsittelymiseksi estämään proteiinien ja erityisesti insuliinin adsorptio tai denaturoituminen.

Patentkrav

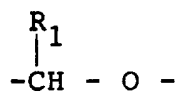
1. Förfarande för framställning av en vattenhaltig proteinlösning, som är beständig mot denaturering av proteinerna vid gränstorna, k ä n n e t e c k n a t därav, att man till en vattenhaltig proteinlösning sätter ett ytaktivt homopolymerisat, blandpolymerisat eller blockpolymerisat med formeln (I)



vari X_n är en kedja med n leder med formeln (II) eller (III)



(II)



(III)

i godtycklig ordningsföljd och n är 2 - 80, fördelaktigt 8 - 45, R_1 är H, $-CH_3$ eller $-C_2H_5$, varvid resterna R_1 kan vara lika eller olika och är i åtminstone hälften av kedjelederna $X_n -CH_3$ eller $-C_2H_5$, Y är $-O-$ eller $-NH-$ och R_2 och R_3 är oberoende av varandra H eller en organisk grupp.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att R_2 och R_3 är väte.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att R_2 och/eller R_3 är åtminstone trevärda och förenade med tre eller flera polyalkoxikedjor $-X_n$ till förgrenade produkter.

4. Förfarande enligt ett eller flera av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att det vattenhaltiga mediet innehåller 2 - 200 ppm av en ytaktiv substans.

5. Förfarande enligt ett eller flera av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att proteinet är insulin och att lösningen eventuellt innehåller de vid insulinlösningar sedvanliga tillsatsämnen för reglering av isotoni, hållbarhet och/eller depåverkan.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att man blandar en lösning av nötk-, svin- eller

humaninsulin eller av ett des-B1-fenylalaninderivat av dessa insuliner, vilken innehåller upp till 0,8 % zink av insulinets vikt, med en lösning innehållande en förening med formeln (I) och eventuellt tillsätter ett isotonireglerande medel såsom glycerin, natriumklorid, glukos eller motsvarande kolhydrat, ett konserveringsmedel såsom fenol, kresol eller p-hydroxibensoesyrametylester och ett buffertmedel för reglering av pH-värdet såsom natriumfosfat, -acetat, -citrat, 5,5-dietylbarbitalnatrium eller tris-(hydroximetyl)aminometan.

7. Förfarande för framställning av ett insulinpreparat med depåverkan, k ä n n e t e c k n a t därav, att man till en enligt patentkravet 5 eller 6 framställd insulinlösning sätter en fördröjande verkande depåkomponent av insulin.

8. Förfarande för behandling av hydrofoba ytor för avlägsnande av deras adsorberande och denaturerande verkan på proteiner, k ä n n e t e c k n a t därav, att man behandlar ytorna med en vattenlösning av en ytaktiv substans med formeln (I), som definierats i patentkraven 1 - 4.

9. Användning av en lösning framställd enligt något av patentkraven 1 - 4 vid rening av proteiner genom kromatografi eller ultrafiltrering.

10. Användning av en lösning framställd enligt patentkravet 5 vid rening av insulin genom kromatografi eller kristallisering.

11. Användning av en ytaktiv substans med formeln (I), definierad enligt något av patentkraven 1 - 3 vid förbehandling av hydrofoba ytor för att undvika av adsorption eller denaturering av proteiner och i synnerhet av insulin.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 620 483 A1 (A 61 K 37/26), 2 641 819 A1 (A 61 K 37/26).