



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

C (45) Patentti myönnetty - Patent beviljats
Patent publicerat 10 05 1990
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07K 15/00, A 61K 37/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	842798
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	11.07.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	11.07.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	14.01.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
13.07.83 DE 3325223	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt/Main, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Thurow, Horst, Parkstrasse 20, Kelkheim (Taunus), BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Denaturoimiselta suojattuja proteiinien vesiliuoksia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö
Mot denaturering skyddade vattenlösningar av proteiner, förfarande för deras framställning och deras användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 823702 (A 61 K 37/26), FI A 830871 (A 61 K 37/26), FI C 70671 (A 61 K 37/02)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee proteiinien, joiden molekyylipaino on yli 8500 daltonia, vesiliuoksia, jotka ovat tunnettuja siitä, että ne sisältävät yhdistettä, jolla on kaava I,

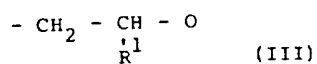
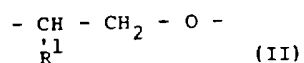
$$R^2O - X_n - R^3 \quad (I)$$

jossa X_n on ketju, jossa on n jäsentä, joilla on kaava II tai III,



mielivaltaisessa järjestyksessä, n on 2-200 ja R^1 on vety, metyyli tai etyyli, jolloin ryhmät R^1 voivat olla samoja tai eri ryhmiä kuitenkin siten, että vähintään puolessa ketjun jäsenistä R^1 on vety, ja R^2 ja R^3 ovat samoja tai eri ryhmiä, joita ovat vety ja orgaaninen ryhmä; menetelmää tällaisten liuosten valmistamiseksi sekä niiden käyttöä. Lisäksi keksintö koskee kaavan I mukaisten yhdisteiden käyttöä hydrofobisten pintojen esikäsittelyyn proteiinien adsorboitumisen ja denaturoitumisen estämiseksi.

Uppfinningen berör vattenlösningar av protein med en molekylvikt över 8500 dalton, vilka karakteriseras av att de innehåller en förening med formeln I, vari X_n är en kedja av n komponenter med formeln II eller III, i valfri ordningsföljd, n är 2-200 och R^1 betyder väte, metyl eller etyl, varvid resterna R^1 kan vara lika eller olika men R^1 föreligger åtminstone i hälften av kedjekomponenterna som väte, och R^2 och R^3 är lika eller olika och betyder väte eller en organisk rest, ett förfarande för deras framställning och deras användning. Uppfinningen hänförs vidare till användningen av föreningar med formeln I för förbehandling av hydrofoba ytor för undvikande av adsorption eller denaturering av protein.



Denaturoitumiselta suojattuja proteiinien vesiliuoksia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö

5 Keksintö koskee proteiinien, joiden molekyylipaino on yli 8500 daltonia, vesiliuoksia, jotka on suojattu adsorptiolta rajapinnoille, denaturoitumiselta ja proteiinin saostumiselta, sekä menetelmää tällaisten liuosten valmistamiseksi.

10 On tunnettua, että liuotetut proteiinit adsorboituvat hydrofobisille rajapinnoille (näihin kuuluu myös vesiliuoksen ja ilman rajapinta) [C.W.N. Cumper ja A.E. Alexander, Trans. Faraday Soc. 46 (1950) 235]. Proteiinit ovat amfi-fiilisiä aineita, toisin sanoen niissä on sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia alueita. Hydrofobiset alueet muodostavat
15 yhteyden hydrofobisiin rajapintoihin.

 Proteiinien rajapinnoille adsorboitumisen seurauksena havaitaan erilaisia sekundaarireaktioita. Se voi aiheuttaa esimerkiksi adsorboituneiden proteiinimolekyylien "denaturoitumista", so. muodonmuutoksia (tertiaari- ja/tai sekundaarirakenteen muutoksia). Sen lisäksi voi tapahtua adsorboituneiden proteiinimolekyylien aggregoitumista liukoiksi tai liukenemattomiksi polymeerisiksi muodoiksi. Niinpä monien proteiinien yhteydessä tunnetaan pinta-aggregoituminen, joka ilmenee esimerkiksi liuoksen samenemisena tai proteiinien
20 biologisen aktiivisuuden heikkenemisenä sekoitettaessa tai ravisteltaessa vesiliuoksia [A.F. Henson, I.R. Mitchell, P.R. Mussellwhite, J. Colloid Interface Sci. 32 (1970) 162]. Tällainen pinta-adsorptio ja -aggregoituminen on erityisen haitallista proteiiniliuosten siirtämiseen käytettävissä
25 laitteissa, esimerkiksi lääkkeiden automaattisissa annostelulaitteissa. Joissakin tapauksissa tapahtuu myös adsorboituneiden proteiinien kemiallisia reaktioita liuenneiden aineiden kanssa [F. MacRitchie, J. Macromol. Sci., Chem. 4
30 (1970) 1169].

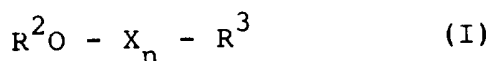
Kuvatut pintatapahtumat voivat lisäksi antaa protei-
nille immunogeenisia ominaisuuksia (so. kyvyn indusoida
immunologisia puolustusreaktioita elimistössä) tai vahvistaa
jo olemassa olevia immunogeenisia ominaisuuksia. Lisäksi
5 voivat biologiset ominaisuudet, kuten entsyymaattiset, serolo-
giset tai hormonaaliset aktiivisuudet, muuttua tai heikentyä.

Erityinen hydrofobisen rajapinnan muoto syntyy jääh-
dytettäessä vesiliuoksia, esimerkiksi kylmäkuivattaessa
proteiineja. Näillä rajapinnoilla tapahtuu samoin kuvatun-
10 kaltaista proteiinien denaturoitumista [Ü.B. Hansson, Acta
Chem. Scand., 22 (1968) 483].

EP-hakemusjulkaisussa 18609 kuvataan proteiinien vesi-
liuoksia, jotka sisältävät niissä olevien proteiinien dena-
turoitumisen estämiseksi rajapinnoilla pinta-aktiivista ai-
15 netta, jolla on ketjumainen perusrakenne, jonka rakenne-
osista vähintään puolet on metyyli- tai etyyli- tai etyyli-
substituoituja oksietyleeniyksiköitä. Lisäksi kuvataan pintojen käsittelyä
tällaisilla pinta-aktiivisilla aineilla ja niiden käyttöä
proteiinien eristämiseen ja puhdistukseen.

20 Lisäksi WO-hakemusjulkaisussa 83/00288 kuvataan sta-
biileja, polyoksietyleni- C_{8-15} -alkyyliettereitä sisältäviä
insuliinivalmisteita, jotka on tarkoitettu käytettäväksi
insuliinin annostelulaitteissa.

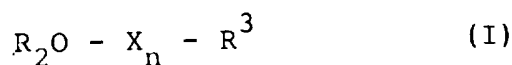
Yllättävästi on havaittu, että proteiinien, joiden
25 molekyylipaino on yli 8500 daltonia, vesiliuokset ovat eri-
tyisen hyvin stabiloitavissa sekoittamalla niihin aineita,
joilla on kaava I



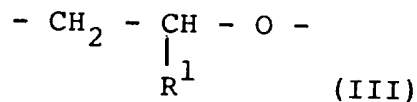
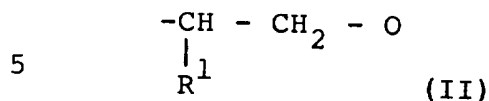
30

Siten keksintö koskee proteiinin, jonka molekyylipaino on 8500 daltonia, vesiliuosta, joka on tunnettu siitä, että se sisältää yhdistettä, jolla on kaava I

35



jossa X_n on ketju, jossa on n jäsentä, joilla on kaava II tai III,



mielivaltaisessa järjestyksessä, n on 2 - 200, edullisesti 4-100, erityisen edullisesti 8 - 50, ja R^1 on vety, metylyli tai etyyli, jolloin ryhmät R^1 voivat olla samoja tai eri ryhmiä kuitenkin siten, että vähintään puolessa ketjun jäsenistä R^1 on vety, ja R^2 ja R^3 ovat samoja tai eri ryhmiä, joita ovat vety ja C_{1-20} -alkyyli, C_{2-20} -alkanoyyli ja C_{1-10} -alkyylifenylyli. Edullisia ovat sellaiset kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa toinen ryhmistä R^2 ja R^3 on vety.

Esimerkkejä ryhmistä R^2 ja R^3 ovat metyyli, etyyli, propyyli ja butyyli.

Tämän tyyppisillä stabiloivilla lisäaineilla on EP-hakemusjulkaisun 18609 mukaisiin lisäaineisiin nähden se etu, että niillä on pitkäkhöjen polyoksietyleeniketjujen ($R^1 = H$) ansiosta parempi liukenevuus vesipitoisiin väliaineisiin. Lisäksi on osoittautunut, että lisäämällä kuvatus kaltaisia stabilisaattoreita voidaan suojata erityisesti suurehkoja proteiineja, so. sellaisia, joiden molekyylipaino on yli 8500 daltonia, rajapintailmiöiltä.

Keksinnön mukaiset proteiiniliuokset voivat sisältää myös useamman erilaisen kaavan I mukaisen yhdisteen seosta. Lisäksi voivat nämä liuokset sisältää tavanomaisia isotooniseksi tekeviä aineita, kuten glyseriiniä, natriumkloridia, glukoosia tai vastaavaa hiilihydraattia, säilöntäaineita, kuten fenolia, kresolia tai p-hydroksibentsoehappometyyliesteriä, puskuriaineita, kuten natriumfosfaattia, asetaattia, sitraattia, barbitaalia tai tris(hydroksimetyyli)aminometaania, sekä depot-vaikutuksen aikaansaavia aineita.

Keksintö koskee lisäksi menetelmiä tällaisten stabiilien proteiiniliuosten valmistamiseksi, joka on tunnettu siitä, että lisätään proteiinin vesiliuokseen kaavan I mukaista pinta-aktiivista ainetta.

5 Otaksutaan, että keksinnön mukaiset pinta-aktiiviset aineet asettuvat rajapintaan nähden siten, että segmentti-polymeerien hydrofobiset alueet ovat kosketuksessa rajapinnan kanssa ja hydrofiiliset polyoksietyleenialueet suuntautuvat vesifaasiin, siten, että ne estävät suoran vuorovaikutuksen
10 liuenneen proteiinin ja rajapinnan välillä.

Stabilaattoreiden suhteellisen suuret hydrofiiliset polyoksietyleenialueet, jotka todennäköisesti suuntautuvat vesifaasiin, vaikuttavat mahdollisesti siten, että saadaan aikaan vain rajapinnan karkeajakoinen kuormitus, niin että
15 pienekköjen proteiinimolekyylien adsorptiota rajapinnalle ei voida estää.

Siitä syystä soveltuvat keksinnön mukaiset aineet erityisesti suurehkomolekyylisten proteiinien vesiliuosten stabilointiin. Nämä proteiinit koostuvat yhdestä tai useam-
20 masta polypeptidiketjusta, ja voivat aminohappojen lisäksi sisältää muitakin rakenneosia (sokereita, lipidejä, jne).

Keksinnön mukaiset pinta-aktiiviset aineet ovat yleensä soveltuvia sellaisten liuotettujen proteiinien, joiden molekyylipaino on yli 8500 daltonia, ja jotka voivat
25 absorboitua hydrofobisiin rajapintoihin, kuten esimerkiksi polypeptidien, pallomaisten proteiinien ja yhdistelmäproteiinien (proteidien), erityisesti glykoproteiinien stabilointiin.

Esimerkkeinä sellaisista proteiineista mainittakoon
30 proteiinihormonit, kuten proinsuliini ja preproinsuliini, entsyymit, kuten neuramidaasi, galaktosidaasi, glykosyyli-transferaasit, asparaginaasi, katalaasi ja streptokinaasi, myoglobiini sekä proteiinit, joilla on muita toimintoja, kuten eri ryhmien ja lajien immunoglobuliinit, albumiini,
35 veren hyytymistekijät, interferonit, interleukiinit, kasvu-

ja erilaistumistekijät. Edullisia ovat proteiinit, joiden molekyylipaino on isompi kuin noin 30 000.

Keksintö koskee lisäksi yllä määriteltujen stabiilien proteiiniliuosten käyttöä proteiinien puhdistamiseen kiteyt-
5 tämällä, kromatografisesti tai ultrasuodatuksella.

Hydrofobiset pinnat, jotka joutuvat kosketuksiin proteiiniliuosten kanssa, on edullisesti mahdollista esikäsitellä kaavan I mukaisilla pinta-aktiivisilla aineilla proteiinien adsorboitumisen tai denaturoitumisen estämiseksi.

10 Keksinnön mukaisesti käytettävien pinta-aktiivisten aineiden valmistus tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla alkyleenioksidin ja alkyleenidiglykolin (tai vastaavien hydroksiyhdisteiden) valvotulla additioreaktiolla. Pääteasemassa
15 olevat hydroksyylioryhmät voidaan mahdollisesti sen jälkeen esteröidä tai eetteröidä. Yleinen ohje soveltuvan segmentti-
polymeraatin valmistamiseksi annetaan esimerkissä 1a.

Esimerkki 1

a) Sekoittimella, lämpöhauteella, palautusjäähdyttimellä ja laitteella alkyleenioksidien syöttämiseksi typpi
20 suojakaasuna varustettuun 30 l:n lasiastiaan laitetaan 152,1 g propyleeniglykolia ja 125 g 49 % kaliumhydroksidiliuosta. Vesi poistetaan alipainetislauksella. Sen jälkeen lisätään 120°C:n lämpötilassa sekoittaen ensin 4141 g propyleenioksidia ja sitten 17170 g etyleenioksidia. Reaktion päätyttyä kaliumhydroksidi neutraloidaan lisäämällä maitohappoa.
25 Helposti haihtuvat osat erotetaan ja tuotteesta poistetaan vesi alipainetislaamalla. Tuotteen keskimääräinen molekyylipaino on 8750 daltonia, ja molekyyli sisältää 80 p-% polyoksietyleeniä.

30 b) 5 näytettä, jotka kukin muodostuivat 7 ml:sta munan albumiinin 0,5 % liuosta 0,01 M fosfaattipuskurissa (pH 7), ja 5 samanlaista näytettä, joihin oli lisätty stabi-
lisaattoriksi 0,1 % (liuoksen painosta laskettuna) segmentti-

- polymeraattia, joka koostui lineaarisesta polypropyleeniglykoliketjusta, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli 1750 daltonia, ja jonka molempiin päihin oli polymeroitu 40 % polyetyleeniglykolia, suljettiin 10 ml:n lasiampulleihin.
- 5 Tutkittavat liuokset sijoitettiin koeputkien pyörityslaitteeseen 20 cm:n etäisyydelle pyörimisakselista ja pyöritettiin inkubaattorissa 37°C:ssa nopeudella 60 rpm. Näytteissä, jotka eivät sisältäneet stabilointiainetta, ilmeni 5 vrk:n kuluttua voimakasta samenumista, joka aiheutui denaturoituneesta proteiinista. Sen sijaan näytteet, jotka sisälsivät stabilointiainetta, olivat kirkkaita vielä usean kuukauden kuluttua.

Esimerkki 2

- 7 ml:n liuosnäytteet, jotka sisälsivät 5 % ihmisen immunoglobuliinia, 0,5 % myoglobiinia (naudan) tai 0,1 % β -galaktosidaasia, ja samanlaiset näytteet, joihin oli lisätty 0,1 % (liuoksen painosta laskettuna) segmenttipolymeraattia, joka koostui lineaarisesta polypropyleeniglykoliketjusta, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli 1750 daltonia, ja jonka molempiin päihin oli polymeroitu 50 % polyetyleeniglykolia, suljettiin 10 ml:n lasiampulleihin.

- Näytteitä sekoitettiin esimerkissä 1b kuvatulla tavalla 37°C:ssa. Stabilointiainetta sisältämättömät näytteet olivat muutaman vrk:n kuluttua sameita. β -galaktosidaasin ollessa kyseessä oli entsymaattinen aktiivisuus laskenut alle 3 prosenttiin lähtöarvosta. Sitä vastoin näytteet, jotka sisälsivät stabilointiainetta, olivat vielä usean viikon kuluttua kirkkaita. Entsyymiaktiivisuus oli käytännöllisesti katsoen ennallaan.

Esimerkki 3

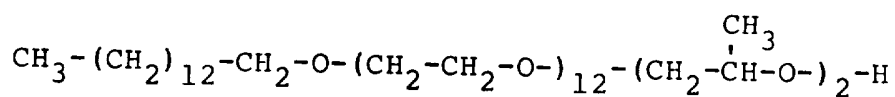
- 30 Valmistettiin liuos, joka sisälsi 1 % ihmisen immunoglobuliinia 0,01 M fosfaattipuskurissa (pH 7) ja stabilointiaineena 0,2 % (liuoksen painosta laskettuna) segmenttipolymeraattia, joka koostui lineaarisesta polypropyleeniglykoliketjusta, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli 1750 daltonia, ja jonka molempiin päihin oli polymeroitu 40% polyetyleeniglykolia.

Liuos pakattiin automaattiseen annostelulaitteeseen. Liikeseimulaattorissa inkubaattorissa 37°C:ssa syötti annostelulaite kirkasta liuosta usean viikon ajan. Syötetyn kirkkaan liuoksen immunoglobuliinipitoisuus mitattiin. Se oli
 5 yhtä suuri kuin alkupitoisuus.

Koe toistettiin 1 % immunoglobuliiniliuoksella, joka ei sisältänyt stabilointiainetta. Tällöin muodostui sakka annostelulaitteen syöttöletkuihin muutamassa päivässä. Kirkas liuos ei sisältänyt juuri ollenkaan immunoglobuliinia.

10 Esimerkki 4

5 näytettä, joista kukin koostui 7 ml:sta liuosta, joka sisälsi 350 000 ky ihmisen sidekudosinterferonia fosfaattipuskurissa (pH 7), ja 5 samanlaista näytettä, jotka sisälsivät lisäksi 0,01 % (liuoksen painosta laskettuna)
 15 seuraavaa yhdistettä,



20 suljettiin 10 ml:n lasiampulleihin. Tutkittavia liuoksia pyöritettiin esimerkissä 1b kuvatulla tavalla 37°C:ssa. 5 stabiloimattomassa näytteessä havaittiin 2 vrk:n kuluttua biologisen aktiivisuuden yli 95-prosenttinen aleneminen. 5 stabilointiainetta sisältävän näytteen interferonin biologinen aktiivisuus oli muuttumaton vielä usean viikon kuluttua.

Patenttivaatimukset

1. Proteiinin, jonka molekyylipaino on yli 8500 daltonia, vesiliuos, tunnetaan siitä, että se sisältää yhdistettä, jolla on kaava I



jossa X_n on ketju, jossa on n jäsentä, joiden kaava on II tai III



15



mielivaltaisessa järjestyksessä,
n on 2 - 200, edullisesti 4 - 100, ja
 R^1 on vety, metyyli tai etyyli, jolloin ryhmät R^1 voivat olla samoja tai erilaisia kuitenkin siten, että vähintään puolessa ketjun jäsenistä R^1 on vety, ja
 R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety, C_{1-20} -alkyyli, C_{2-20} -alkanoyyli tai C_{1-10} -alkyylifenyyl.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiinin vesiliuos, tunnetaan siitä, että liuos sisältää vähintään kahden erilaisen, kaavan I mukaisen yhdisteen seosta.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen proteiinin vesiliuos, tunnetaan siitä, että liuos sisältää tavanomaisia lisäaineita isotoonisuuden säätämiseksi, säilöntäainetta, puskuraineita ja/tai depot-vaikutuksen aikaansaamiseen käytettäviä aineita.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen proteiinin vesiliuos, tunnetaan siitä, että liuos sisältää vähintään kahta erilaista proteiinia.

5. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen stabiilin proteiiniliuoksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että proteiinin vesiliuokseen lisätään patenttivaatimuksen 1 mukaista pinta-aktiivista ainetta.

5

6. Menetelmä hydrofobisten pintojen käsittelymiseksi niiden proteiineja adsorboivan vaikutuksen poistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että pinnat käsitellään patenttivaatimuksessa 1 määritellyn yleisen kaavan I mukaisen pinta-aktiivisen aineen vesiliuoksella.

10

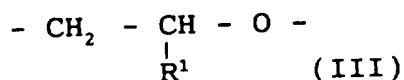
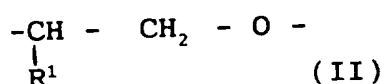
7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen liuoksen käyttö, t u n n e t t u siitä, että liuoksia käytetään proteiinien puhdistukseen kiteyttämällä, kromatografisesti tai ultrasuodatuksella.

Patentkrav

1. Vattenlösning av ett protein med en molekyylvikt över 8500 dalton, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller en förening med formeln I



- vari X_n är en kedja av en komponenter med formeln II eller III



- i valfri ordningsföljd,
n är 2 - 200, företrädesvis 4 - 100 och
 R^1 är väte, metyl eller etyl,
varvid grupperna R^1 kan vara lika eller olika, varvid dock
 R^1 föreligger som väte i åtminstone hälften av kedjekomponenterna, och
 R^2 och R^3 oberoende av varandra betyder väte, C_{1-20} -alkyl, C_{2-20} -alkanoyl eller C_{1-10} -alkylfenyl.

2. Vattenlösning av ett protein enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att lösningen innehåller en blandning av åtminstone två olika föreningar med formeln I.

3. Vattenlösning av ett protein enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att lösningen innehåller sedvanliga tillsatser för inställning av isotonin, konserveringsmedel, buffertämnen och/eller medel för uppnående av en depå-verkan.

4. Vattenlösning av ett protein enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a d därav, att lösningen innehåller åtminstone två olika proteiner.

5. Förfarande för framställning av en stabil pro-

teinlösning enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a d därav, att man i en vattenlösning av proteinet tillsätter en ytaktiv substans enligt patentkravet 1.

5 6. Förfarande för behandling av hydrofoba ytor för undanröjande av deras absorberande inverkan 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 den i patentkravet 1 definierade allmänna formeln I.

10 7. Användning av lösning enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a d därav, att lösningarna används vid reningen av protein genom kristallisation, kromatografi eller ultrafiltering.