



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330504

(13) B1

NORGE

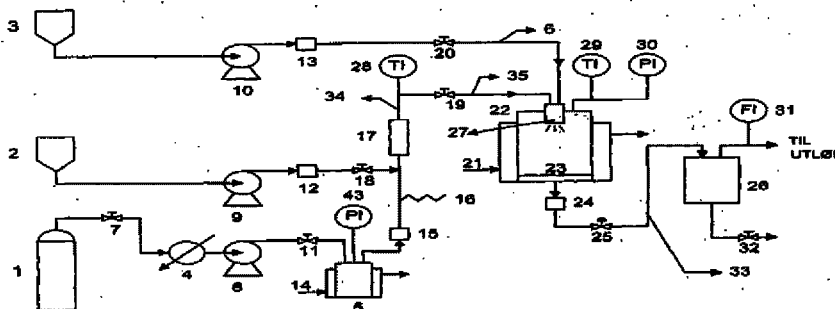
(51) Int Cl.
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/32 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20041634	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.10.21 PCT/EP2002/11761
(22)	Inng.dag	2004.04.21	(85)	Videreføringsdag	2004.04.21
(24)	Løpedag	2002.10.21	(30)	Prioritet	2001.10.22, WO, 01125048
(41)	Alm.tilgj	2004.06.17			
(45)	Meddelt	2011.05.02			
(73)	Innehaver	Dompé pha r ma SpA, Via Campo di Pile, IT-67100 L'AQUILA, Italia			
(72)	Oppfinner	Maria Candida Cesta, c/o Dompé SpA, Via Campo di Pile, IT-67100 L'AQUILA, Italia Cesare di Palma, c/o Domé SpA, Via Campo di Pile, IT-67100 L'AQUILA, Italia Marco Gentile, c/o Dompe SpA, Via Campo di Pile, IT-67100 L'AQUILA, Italia			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for samutfelling av et protein eller polypeptid med en stabilisator for disse og kopresipitat av protein eller polypeptid og stabilisator oppnådd ved fremgangsmåten
(56)	Anførte publikasjoner	JUNG, J. ET AL, "Particle design using supercritical fluids : Literature and patent survey", Journal of supercritical fluids, Pra Press US, vol. 20, nr. 3, 2001, side 179-219., WO 01/03821 A1, WO 00/69887 A2, US 5770559 A, US 5874029 A
(57)	Sammendrag	

Fremgangsmåte for samutfelling av en substans med en stabilisator for denne, ved GAS anti-løsningsmiddelprosess omfattende innføring i et partikkeldannelseskam av et superkritisk fluid, rent eller blandet med en modifikator; og en løsning omfattende nevnte substans og nevnte stabilisator oppløst i et løsningsmiddel; slik at nevnte løsningsmiddel blir ekstrahert fra løsningen av nevnte superkritiske fluid og samutfelling av substansen og stabilisator skjer. Fremgangsmåten kan utføres ved anvendelse av et apparat omfattende et partikkeldannelseskam (22) og en dyse (27) som har en sentral åpning (39) som tjener til å innføre en løsning av substansen og en rekke ytre åpninger (41) som tjener til å føre en strøm av superkritisk fluid inn i partikkeldannelseskaret (22), slik at løsningsmidlet blir ekstrahert fra løsningen av det superkritiske fluid og utfelling av mikrostørrelse partikler av substans/stabilisator skjer. Substansen er fortrinnsvis et protein av farmasøytisk interesse, som blir godt stabilisert for lagring ved denne prosessen.



Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for protein- og polypeptid-utfelling ved superkritisk fluidprosessering og kopresipitat fremstilt ved denne fremgangsmåten.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Behovet for stabile proteiner og polypeptider for mange anvendelser er kontinuerlig økende. Dette er spesielt markant for terapeutiske proteiner innen det farmasøytiske området. For bekvemmelighet for både produsenter og endelige brukere er vandige proteinløsninger ofte den foretrukne administreringsform. Videre er dette deres vanlige, naturlige form som tillater hydratisert, tre-dimensjonal foldet kompleksdannelse. Denne konformasjon er generelt angitt som tertiær struktur og dens integritet er av vital betydning for å opprettholde den biologiske aktiviteten til proteiner. Det irreversible tap av tertiær struktur av proteiner er betegnet som denaturering og forårsaker inaktivering. Fordi proteiner og polypeptider i løsning blir eksponert for mange påkjenninger som kan forårsake fysisk (denaturering) og kjemisk (dvs. reaksjoner så som hydrolyse, deamidering etc.) nedbrytning, blir ofte utvikling av flytende preparater utelukket. For tiden er den vanligste måte for å oppnå proteinstabilitet fjerning av vann ved egnede prosesser så som frysetørrking eller spray-tørrking. Imidlertid kan begge disse teknikker (ref. "Formulation and Delivery of Proteins and Peptides" J. L. Cleland and R. Langer American Chemical Society, Washington, DC1994) fremkalle protein utfolding. Spesielt med hensyn til lyofilisering kan proteinutfolding forekomme enten under det innledende frysetrinn eller ved akutt dehydratisering ved sublimering.

Når det gjelder spraytørrking er termisk nedbrytning, lav effektivitet, lavt utbytte og høye nivåer av gjenværende fuktighet, hovedbegrensningene ved teknikken.

Et annet problem er forskjellen i langtids stabilitet av analoge preparater oppnådd ved forskjellige tørkeprosesser. Avhengig av dehydratiseringsmetoden, kan proteinet faktisk anta forskjellige tre-dimensjonale strukturer med samme innledende biologiske aktivitet, men forskjellig holdbarhet.

WO 00/69887 vedrører isoleringen av et protein fra en vandig løsning, hvor proteinet samtidig dehydratiseres. Dette anvendes ved fremstillingen av proteinbelagte mikrokrystaller.

Den stabiliserende effekt av karbohydrater og spesielt trehalose på
5 proteiner under frysing og dehydratisering er godt dokumentert ("Formulation
and Delivery of Proteins and Peptides" J. L. Cleland og R. Lan ger American
Chemical Society, Washington, DC 1994 og "Freeze-Drying/Lyophilization of
Pharmaceutical and Biological Products" L. Rey og J. C. May, Marcel Dekker,
Inc. New York 1999). Selv om mange sukkere kan forhindre proteinskade
10 under dehydratisering, har produktene ofte en kort holdbarhet ved romtempera-
tur på grunn av Maillard-reaksjon. Stabilitet ved romtemperatur kan forbedres
ved anvendelse av ikke-reduserende sukkere så som sukrose og trehalose.

Britisk patentsøknad GB 2009198 beskriver lyofilisering av meningokokk-
polysakkarid og trehalose; GB 2126588 beskriver stabilisering av tumor-
15 nekrosefaktor (TNF) for lyofilisering og frysing ved å inkludere enten et ikke-
ionisk overflateaktivt middel eller trehalose (eller et annet sukker); og japansk
patentsøknad J 58074696 beskriver frysetørking av ATP i nærvær av trehalose.

Preparater av alkalisk fosfatase inneholdende trehalose er beskrevet for
å opprettholde deres aktivitet etter frysetørking og for å opprettholde ca. 70% av
20 den innledende aktivitet etter 84 dagers lagring ved 45°C (A. W. Ford et al.,
J. Pharm. Pharmacol. 1993, 45: 86-93). Selv om lyofilisering fortsatt er hoved-
prosessen anvendt for tørking av proteiner, må mange forholdsregler tas for å
unngå skade som alvorlige påkjenninger så som frysing-tinging og tørking kan
forårsake. Under det første trinn i frysetørket protein-formulering, garanterer
25 faktisk korrekt valg av betingelser (pH, ionestyrke, tilstedeværelse av stabili-
satorer, etc.) den beste beskyttelse mot protein-utfolding og inaktivering.
Mange tilsetningsmidler så som sukkere, aminosyrer, polymerer, overflateaktive
midler spesifikke ligander (substrater, kofaktorer, allosteriske modifikatorer etc.)
er kjent å stabilisere proteiner under frysetørking og er betegnet "lyoprotektan-
30 ter". Blant dem er karbohydrater og spesielt disakkarider så som sukrose og
trehalose omfattende undersøkt. Stabiliseringsmekanismen til disse forbindel-
ser, så vel som andre stabilisatorer er ikke fullstendig klarlagt. Imidlertid må en
effektiv lyoprotektant opprettholde stabilitet under både frysing-tinging og tørking.
Siden proteinomgivelsen er vandig under meget av fryseprosessen, er oppløste

stoffer som stabiliserer den native konformasjon i vandige løsninger meget ofte effektive som protein-kryoprotektanter. Karbohydrater og noen aminosyrer er eksempler. Arakawa et al. (J. Pharm. Res. 1991, 8, 285-291) har angitt at slike oppløste stoffer tenderer til å bli utelukket fra overflaten av proteinet i vandig
5 løsning. Den termodynamiske konsekvens av et slikt fenomen er stabilisering av proteinets native konformasjon.

Stabilitet under tørking og lagring blir best forklart av både vannsubstitusjon- og glassdannelse-hypoteser. Den første angir at stabilisatorer interagerer med proteinet som vann gjør ved å erstatte det fjernede vann og
10 forklarer den termodynamiske kontroll av tørkeprosessen. Den sistnevnte angir at stabilisatorer er gode glass-dannere og forblir amorfe under og etter tørking slik at de mekanisk immobiliserer proteiner inne i en glassaktig matriks. Dette er et rent kinetisk argument som gjelder like godt for både tørkings- og lagringsstabilitet. ("Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and
15 Biological Products" L. Rey og J. C. May, Marcel Dekker, Inc. New York 1999).

Således, ved å referere til stabiliseringshypotesen for tørkede proteiner ovenfor, kan det postuleres at glassdannelse er et av hoved-poengene for lang-
tids stabilitet. Anvendelse av spray-tørking for proteintørking er i mindre grad undersøkt. Selv om fine amorfe partikler kan produseres, krever denne proses-
20 sen varm luft som en tørkeenergi som kan føre til termisk nedbrytning av proteinet. Videre er lav effektivitet, lavt utbytte og høye nivåer av gjenværende fuktighet andre begrensninger.

En annen rapportert teknikk for tørking av proteiner som skulle unngå inaktivering er luft-dehydratisering ved romtemperatur. US 4,891, 319 til
25 Quadrant Bioresources Ltd (UK) beskriver preservering av mange proteiner og andre makromolekyler ved 37-40°C ved tørking i nærvær av trehalose ved atmosfærisk trykk.

US 5874029 beskriver en fremgangsmåte og apparatur for fremstilling av mikropartikler og nanopartikler ved anvendelse av superkritiske fluider på
30 atomiserte dråper for å bruke opp løsningsmiddelet og produsere partikler. Det benyttes en GAS prosess.

Anvendelse av superkritisk fluidteknologi har også vært angitt som en anvendelig metode for å oppnå proteiner som tørre fine mikropartikler. Hovedfordelene med denne teknikk er muligheten for å opprettholde proteinet i en

fordelaktig vandig omgivelse før en rask utfelling for å minimalisere denature-ring og prosesslengde som er kortere enn frysetørking og mindre dyr.

Jung et al. (J. Supercritical fluids, vol. 20, nr. 3 2001 s. 179-219) beskri-ver mikrosammensetninger oppnådd ved GAS-prosess. Partikkeldesign ved an-
5 vendelse av superkritiske fluider er undersøkt.

S. P. Sellers et al (J. Pharm. Sci.,2001, 90, 785- 797) rapporterer en dehydratiseringsmetode for proteinpulver-produksjon basert på superkritisk CO₂-assistert forstøvning. Denne teknikk kan assimileres til spray-tørking; faktisk blir superkritisk CO₂ anvendt for å forbedre løsningsforstøvning og ikke
10 som et anti-løsningsmiddel for utfelling av oppløst stoff. GAS- (Gas Anti-Solvent omkrystallisering) prosess for å danne protein-mikropartikler er angitt av Debenedetti (US 6,063,910). I dette tilfellet blir proteinløsningen sprayet gjen-nom en laserboret platinaplate med en diameter på 20 µm og en lengde på 240 µm inne i partikkeldannelse-karet på forhånd fylt med superkritisk fluid som
15 blir innført gjennom et annet innløp. Denne teknikk har vært anvendt for å danne partikler av katalase og insulin (0,01% vekt/volum) fra etanol/vann (9:1 volum/volum) løsninger ved anvendelse av karbondioksid som det super-kritiske fluid. I denne prosessen blir det superkritiske fluid-innløp ikke optimali-sert: løsningsinjeksjonen skjer i en nesten statisk atmosfære av superkritisk
20 fluid, med lav turbulens. Hanna M. og York P. (W096/00610) har foreslått en ny metode og et nytt apparat for å oppnå meget små partikler ved en spesifikk superkritisk fluid-teknikk betegnet SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Solution).

Fremgangsmåten er basert på en ny koaksial dyse: løsningen
25 ekspanderer gjennom et kapillar-innløp, superkritisk fluid ekspanderer gjennom en ytre koaksial bane med en konisk formet ende. Blandingen mellom super-kritisk fluid og løsning forekommer i den koniske sonen. De foreslår også an-vendelse av en treveis dyse: en modifikator kan tilføres for å forbedre blandingen. De anvendte SEDS-teknologien til utfelling av små partikler av
30 vannoppløselige forbindelser, så som sukkere (laktose, maltose, trehalose og sukrose) og proteiner (R-TEM beta-laktamase). Samutfelling av proteiner og stabilisatorer er ikke nevnt eller eksemplifisert deri.

Videre beskriver samme oppfinnere (W001/03821) en forbedret ut-fellingsmetode ved anvendelse av samme apparat, men tilføring til partikkel-

dannelseskaret av et superkritisk fluid og to ublandbare løsningsmidler. Denne metoden tillater samutfelling av to eller flere stoffer oppløst i de to ublandbare løsningsmidlene. Fluid-innløp blir dannet ved en koaksial dyse hvor kontakt mellom de to løsningsmidler skjer kort før deres dispersjon av det superkritiske anti-løsningsmiddel, hvilket unngår utfelling av oppløste stoffer inne i dysen. Imidlertid tillater denne metoden dannelse av homogene kopresipitater; den er generelt anvendelig når to oppløste stoffer med forskjellig polaritet skal prosesseres. Videre, hvis denne blir anvendt for en vandig løsning, må det andre løsningsmidlet være minst delvis oppløselig i vann slik at det tillater at vannet dispergeres i det superkritiske anti- løsningsmidlet. Dette trinnet er nødvendig for å tillate utfelling av vann-oppløselig oppløst stoff. Samutfelling av proteiner og stabilisatorer er ikke beskrevet i dette dokumentet.

US 5770559 beskriver oppløsningen av en farmasøytisk forbindelse i et organisk løsningsmiddel og fremstilling av farmasøytiske pulvere på denne måten. En biodegraderbar polymer kan bli oppløst sammen med den farmasøytiske forbindelse fulgt av GAS-utfelling.

Walker (WO01/15664) beskriver en metode for ko-formulering av en aktiv (fortrinnsvis en farmasøytisk aktiv) substans og et oligomert eller polymert tilsetningsmiddel hvor en mengde mellom 80 og 100% av den aktive substans er i amorf i motsetning til krystallinsk form. I disse preparater er de aktive substanser mer stabile sammenlignet med de krystallinske former når lagret ved temperaturer mellom 0 og 10°C. Bare kopreparatet av en farmasøytisk aktiv substans med et oligomert eller polymert tilsetningsmiddel er beskrevet og proteinstabilisering er ikke nevnt i dette dokumentet. Proteinstabilisering blir derfor oppnådd på området gjennom frysetørking og spraytørking. Samutfelling av proteiner med stabilisatorer ved anvendelse av superkritiske fluider er ikke beskrevet før og det er gjenstand for foreliggende oppfinnelse.

Vi har nå funnet en metode for å produsere stabile tørre proteinmikropartikler ved samutfelling med en stabilisator ved anvendelse av superkritiske fluider. Foretrukne stabilisatorer er karbohydrater, aminosyrer, overflateaktive midler og polymerer. Mer foretrukket er stabilisatoren et sukker, mest foretrukket trehalose.

Samutfelling tillater intime interaksjoner mellom protein/stabilisator-molekyler og et optimalt vekt/vekt-forhold eksisterer for hvert par av protein/stabilisator.

5 Siden det ikke skjer noen frysing-tining er det faktisk ikke behov for kryobeskyttelse. Videre, selv om naturen av protein/stabilisator interaksjoner må klargjøres bedre, spiller i foreliggende tilfelle stabilisatoren en essensiell rolle ved å forbedre lagringsstabilitet heller enn den å beholde proteinaktivitet under tørking. Utfelling med et superkritisk fluid tillater faktisk i seg selv protein-partikkelproduksjon uten denaturering under tørkeprosessen.

10

Angivelse av oppfinnelsen

Betegnelsen "superkritisk fluid" betyr et fluid ved eller over dets kritiske trykk og dets kritiske temperatur.

15 Betegnelsen "løsningsmiddel" betyr en væske som er i stand til å danne en løsning av proteinet og stabilisatoren.

Betegnelsen "stabilisator" betyr et fast farmasøytisk tilsetningsmiddel som er i stand til å stabilisere, for eksempel proteiner, som er oppløselige i løsningsmidlet og som i det vesentlige er uoppløselige i den superkritiske væsken.

20 Betegnelsen "modifikator" er en substans, fortrinnsvis et løsningsmiddel, som forbedrer oppløseligheten av "løsningsmidlet" i det superkritiske fluid.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for samutfelling av et protein eller polypeptid med en stabilisator for denne, ved en gass-antiløsningsmiddel-prosess som omfatter innføring i et partikkeldannelseskam av et superkritisk fluid blandet med en modifikator: og

25

en løsning omfattende nevnte protein eller polypeptid og nevnte stabilisator oppløst i et løsningsmiddel;

slik at nevnte løsningsmiddel blir ekstrahert fra løsningen av nevnte superkritiske fluid og samutfelling av substansen og stabilisatoren skjer, hvor

30 nevnte stabilisator er trehalose, nevnte løsningsmiddel er vann, nevnte superkritiske fluid er karbondioksid og nevnte modifikator er valgt fra metanol, etanol og isopropanol . Løsningen innføres i partikkeldannelseskaret blandet med en modifikator. Fremgangsmåten omfatter innføring i et partikkeldannelseskam av en løsning eller suspensjon av substansen og stabilisatoren og et superkritisk

fluid. I partikkeldannelseskaret skjer blanding av det superkritiske fluid med løsningsmidlet og ekstraksjon av løsningsmidlet av det superkritiske fluid slik at de oppløste stoffene (substans og stabilisator) samutfelles som fine partikler. Modifikatoren er en forbindelse som er oppløselig både i løsningsmidlet og i det
5 superkritiske fluid.

Mer foretrukket blir apparatet i figur 1 anvendt. I dette tilfellet blir løsningsmidlet av substans og stabilisator, det superkritiske fluid og modifikatoren, separat innført i partikkeldannelseskaret i en medstrøms strøm gjennom dysen 27. En slik dyse WO02/68107, som er vist i figurer 2 og 3, tilveiebringer
10 separate inntak for superkritisk fluid og løsning. Faktisk er dette en plate med en åpning i dens senter og to eller flere åpninger med samme avstand fra senteret og jevnt fordelt langs en omkrets. Alle åpningene står i forbindelse med det indre av partikkeldannelseskaret. Løsningen blir innført i partikkeldannelseskaret gjennom den sentrale åpningen, mens det superkritiske fluidet,
15 rent eller med modifikator, blir innført gjennom de ytre åpninger.

Modifikatoren og det superkritiske fluid blir blandet før innføring i partikkeldannelseskaret. I en annen versjon av fremgangsmåten blir modifikatoren innført i partikkeldannelseskaret til dels med løsningsmidlet og til dels med det superkritiske fluidet.

20 Substansen er en protein- eller polypeptid-forbindelse av farmasøytisk eller diagnostisk interesse, oppløselig i løsningsmidlet og i blandingen løsningsmiddel/modifikator og hovedsakelig uoppløselig i det superkritiske fluidet.

Stabilisatoren er fortrinnsvis et farmasøytisk tilsetningsmiddel som kan stabilisere substansen i det samutfelte produkt. Stabilisatoren er oppløselig i
25 løsningsmidlet og i blandingen løsningsmiddel/modifikator og hovedsakelig uoppløselig i det superkritiske fluidet. Stabilisatoren er trehalose. En blanding av stabiliseringsmidler kan også anvendes.

Løsningsmidlet er vann.

Det superkritiske fluid er karbondioksid.

30 Modifikatoren er etanol, metanol, eller isopropanol,

Beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser et skjematisk flytskjema av apparatet anvendt for å utføre fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

5 Figurer 2 og 3 viser dysen som blir anvendt for å utføre fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figurer 4, 5 og 6 viser partikkelstørrelsesdistribusjonen av superkritisk CO₂ samutfelte lysozym/trehalose-pulvere i vekt/vekt-forhold henholdsvis 1:10, 1:2 og 1:0.

10 Figur 7 viser termogrammene oppnådd ved differensiell scanningskalorimetri (DSC) av superkritisk CO₂ samutfelte lysozym/trehalose-pulvere vs de respektive rene produkter.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

15

Oppfinnelsen vil bli ytterligere beskrevet med spesiell referanse til substansen som er et protein. Det er funnet at det er mulig å produsere stabile tørre protein/stabilisator mikropartikler gjennom anvendelse av superkritiske fluider.

20 Det er overraskende funnet at samutfelling ved anvendelse av superkritiske fluider tillater spesielle intime interaksjoner mellom protein og stabilisator-molekyler og at for hvert protein/stabilisator-par er det et optimalt vektforhold. Hvis mengden av stabilisator overstiger den optimale mengden, interagerer overskuddet ikke direkte med proteinet, men danner heller partikler av ren stabilisator. Denne adferd er vist ved mikroskopi og ved differensiell
25 scanningskalorimetri- (DSC) analyse.

Proessen for samutfelling av en substans med en stabilisator ved en GAS-prosess som omfatter anvendelse av et superkritisk fluid blandet med en modifikator og en løsning i et partikkeldannelseskar, kan utføres med apparatet angitt i figur.

30 En fordel med apparatet i figur 1 er relatert til kontakten mellom superkritisk fluid og løsning siden denne finner sted bare i partikkeldannelses-karet. Således kan ikke noen pulverutfelling skje inne i dysen og forårsake blokkering. Det er viktig at det superkritiske fluidet virker som et anti-løsningsmiddel, men også fremmer omdannelse av løsningen til en fin spray ettersom den kommer

inn i partikkeldannelseskaret. Dette utvider løsnings/anti-løsningsmiddel grenseflate og tillater en raskere blanding av de to faser og således rask proteinutfelling uten noen denaturering. I tillegg tillater forbedring av masseoverføringshastighet mellom løsning og superkritisk fluid, operasjon ved milde temperatur- og trykk-betingelser, hvilket bidrar til å unngå en eventuell proteindenaturering. Apparatet i figur 1 omfatter et partikkeldannelseskar 22. Dette er et standard reaksjonskar med et passende volum. Temperaturen i karet blir holdt konstant ved hjelp av en varmekappe 21. Trykket i karet blir kontrollert ved hjelp av en mikro-doseringsventil 25.

10 Temperatur og trykk i partikkeldannelseskaret blir målt ved hjelp av et termoelement 29 og en trykktransducer 30.

Partiklene dannet blir holdt tilbake av filteret 23. Dette er en rustfri stål-kurv, hvis bunn er fremstilt av en sintret rustfri stålplate (0,5 μm). Et andre filter 24 (0,5 μm) er plassert ved karutløpet.

15 Det superkritiske fluid blir tatt fra sylinder 3, det blir kondensert med kjøler 4 og pumpet ved hjelp av pumpen 8 til partikkeldannelseskaret gjennom ledning 34. Før innføring i partikkeldannelseskar, blir det superkritiske fluid oppvarmet til den ønskede temperatur ved hjelp av en forvarmer 14 og varmer 17. Forvarmeren 14 virker også som pulseringsdemper. Det superkritiske fluid blir også filtrert ved hjelp av filteret 15 (0,5 μm). Temperatur og trykk til det superkritiske fluid før innføring i utfellingskaret blir målt ved hjelp av henholdsvis termoelement 29 og trykktransducer 30.

25 Modifikatoren blir tatt fra tank 2, den blir pumpet ved hjelp av pumpen 9 til ledningen 34 og den blir blandet med det superkritiske fluid før innføring i partikkeldannelseskaret. Modifikatoren blir også filtrert ved hjelp av filteret 12 (0,5 μm).

Ledning 34 er utstyrt med en sikkerhetsventil 16.

Løsningen blir tatt fra tank 1, den blir pumpet ved hjelp av pumpen 10 til partikkeldannelseskaret gjennom ledning 36. Løsningen blir også filtrert ved hjelp av filter 13 (0,5 μm).

30 I en annen versjon av fremgangsmåten kan modifikatoren innføres i partikkeldannelseskaret til dels med løsningen og til dels med det superkritiske

fluid. Det superkritiske fluid blandet med modifikatoren og løsningen blir matet inn i partikkeldannelseskaret ved hjelp av dysen 27.

Nedstrøms for utfellingskaret 22 blir blandingen av superkritisk fluid, modifikator og løsningsmiddel filtrert ved hjelp av filteret 24 ($0,5 \mu\text{m}$) for å holde
5 tilbake partiklene som til slutt ikke er holdt tilbake av filteret 23. Blanding av superkritisk fluid, modifikator og løsningsmiddel blir trykkavlastet ved hjelp av mikro-doseringsventil 25, det superkritiske løsningsmiddel blir separert fra modifikatoren og løsningsmidlet i separatoren 26, dets strømningshastighet blir målt ved hjelp av massestrømningsmåler 31 og det blir tømt ut.

10 Dysen som er vist i figur 2 og 3 tillater innføring av løsningen og det superkritiske fluid, rent eller blandet med modifikatoren, i partikkeldannelseskaret i medstrøms strøm. Hastigheten til løsningen og det superkritiske fluid ved dyseutløpet er relatert til massestrømningshastigheten og til diameteren til åpningene. Videre er det foretrukket at energitrykk til både løsning og super-
15 kritisk fluid blir omdannet til kinetisk energi med et minimum av energitap. Dysen i figur 2 og 3 ble faktisk utformet for dette formål. Det karakteristiske ved denne dysen er at ekspansjonen av løsning og superkritisk fluid skjer gjennom åpninger. En åpning er karakterisert ved et lengde til diameter forhold i området fra 5 til 10. Det har fordelen fremfor kapillar at det minimaliserer trykk-
20 energitap og gir effektiv omdannelse av trykkenergi til kinetisk energi. Dysen har åpninger med diameter i området fra 0,02 til 0,04 mm og lengde i området fra 0,1 til 0,2 mm. Slike dimensjoner tillater meget høye hastigheter ved åpningsutløpet for både løsning og superkritisk fluid.

Dysen kan fremstilles av rustfritt stål eller av annet passende materiale.

25 Dysen er en plate med en åpning 39 i dens senter og to eller flere åpninger 41 boret i samme avstand fra senteret og jevnt fordelt langs en omkrets. Åpningene står i forbindelse med det indre av partikkeldannelseskaret. Løsningen blir innført i partikkeldannelseskaret gjennom den sentrale åpningen, det superkritiske fluid, rent eller med modifikator, blir innført i partikkeldannelseskaret gjennom de ytre åpninger. Løsningen 37 passerer gjennom en
30 passasje med diameter D3. Dens ende har en konisk form 40. Ved toppen av den koniske enden 40 er det en laser-boret åpning 39. Lengden L1 av den sentrale åpningen er 5 til 10 ganger dens diameter D1. Diameteren D1 kan

velges på en slik måte at det oppnås hvilken som helst ønsket hastighet av løsningen ved åpningsutløpet.

Det superkritiske fluid 38 passerer gjennom passasjen med diameter D4. Hver passasjeende har en konisk form 42. Ved toppen av den koniske ende 42 er det en laser-boret åpning 41. Lengden 21 av åpningen er 5 til 10 ganger dens diameter D2. Diameteren D2 kan velges på en slik måte at det oppnås hvilken som helst ønsket hastighet av det superkritiske fluid ved åpningsutløpet.

Forholdet mellom lengde (L1 eller L2) og diameter (D1 eller D2) av åpningene 39 og 41 blir valgt for å oppnå et minimum av energitap og for å oppnå høyere hastigheter ved omdannelse av energitrykk til kinetisk energi.

Løsningen kommer ut fra den sentrale åpning 39 med høy hastighet og den blir brutt opp i fine små dråper som kommer i kontakt med det superkritiske fluid. Dispersjonen av løsningsvæske-strålen blir forbedret av det superkritiske fluid som kommer fra åpning 41, forutsatt at hastigheten til det superkritiske fluid er meget høy, i størrelsesorden til lyd hastigheten ved arbeids-temperatur og -trykk. Effekten av det superkritiske fluidet ved forbedring av dispersjonen av løsningsvæske-strålen er viktig og bestemmer formen, størrelsen og utbyttet av produktet.

Åpninger kan bores med diametere ned til 0,02 mm. Dysene som har vært anvendt til å utføre testene har åpninger med diameter i området fra 0,02 til 0,04 mm. Ved en annen utførelsesform av oppfinnelsen blir én eller flere av de ytre åpninger boret på en slik måte at deres akser konvergerer mot aksene til den sentrale åpning. Vinkelen dannet av aksene av de ytre åpninger og aksene av den sentrale åpning er mellom 1 og 30°.

Et viktig punkt i prosessen for fin tørr protein-mikropartikkel-dannelse er blandingen av løsningen med det superkritiske fluid: en rask og intim blanding forårsaker utfelling av partikler med en liten diameter og gir et høyt pulverutbytte.

For å få en god blanding må løsningen bli dispergert i det superkritiske fluid i form av meget små dråper, som således gir høyt grenseflateareale for masseoverføring og en kort bane for diffusjon av superkritisk fluid i små dråper av løsningen og derved forhindrer vekst av oppløste partikler. Videre forårsaker høyt forhold mellom strømningshastighet av superkritisk fluid og strømningshastighet av løsning et stort overskudd av superkritisk fluid i forhold til løsning

på kontaktøyeblikket, hvilket forbedrer drivkraften for masse-overføring av det superkritiske fluid i løsningen og av løsningsmiddel inn i superkritisk fluid.

Når løsningsmiddel-oppløselighet i det superkritiske fluid er lav, tillater anvendelse av en modifikator en bedre blanding mellom løsning og superkritisk fluid.

Forholdet av modifikator-strømningshastighet og løsning-strømningshastighet må velges slik at en høy økning i oppløselighet av løsningsmiddel i det superkritiske fluid blir oppnådd. Modifikatoren kan innføres med det superkritiske fluid eller til dels med det superkritiske fluid og til dels med løsningen. Metoden for innføring av modifikatoren påvirker sterkt ekstraksjonen av løsningsmidlet og strukturen av partikler som blir dannet.

For utfelling av pulvere fra vandig løsning ved anvendelse av karbon-dioksid som superkritisk løsningsmiddel og etanol som modifikator er forholdet mellom superkritisk fluid-strømningshastighet og modifikator-strømningshastighet fortrinnsvis innen området 4-8, mer foretrukket 7, mens forholdet mellom modifikator-strømningshastighet og løsning-strømningshastighet fortrinnsvis er innen området 15-25 og mer foretrukket 20.

Som påpekt ovenfor er det nødvendig å ha en god dispersjon av løsningen i det superkritiske fluid for å oppnå meget små dråper av løsning.

Størrelsen av dannede små løsningsdråper blir bestemt av de fluid-dynamiske betingelser i blandingssonen og av de fysiske egenskaper til løsning og superkritisk løsningsmiddel, så som viskositet, overflatespenning, densitet. Disse egenskaper blir sterkt påvirket av temperaturen og trykket til det superkritiske fluid.

Superkritisk fluid-innløpene er posisjonert rundt løsningsinnløpet og med en meget kort avstand derfra (ca. 3 mm): denne konfigurasjon tillater at løsningen blir energisert av det superkritiske fluid og forbedrer således dispersjonen av løsningen til meget fine små dråper, som gir høy grenseflateoverflate mellom de to faser og rask ekstraksjon av løsningsmiddel inn i superkritisk fluid. Disse fenomener er spesielt effektive når superkritisk fluid-hastigheten ved åpningsutløpet når eller blir større enn lydets hastighet som forårsaker en Mach-platedannelse og løsningsdispersjon som meget fine små dråper (Matson D. W., Fulton J. L., Petersen R. C., Smith R.D., "Rapid expansion of supercritical fluid solutions: solute formation of powders, thin films, and fibers"

Ind. Eng. Chem. Res., 1987 26, 2298-2306). Lydhastigheten i et fluid er sterkt avhengig av trykk og temperatur: minimumsverdi for lydhastighet for karbondioksid i det superkritiske område er 208 m/s ved 8 MPa og 40°C. For å utnytte ovennevnte fenomener er det hensiktsmessig å arbeide rundt verdien av lydhastigheten for karbondioksid i det superkritiske område, f.eks. 208 m/s ved 8 MPa og 40°C.

For fremstilling av fine pulvere fra vandige løsninger med GAS-prosessen ved anvendelse av karbondioksid som superkritisk løsningsmiddel og etanol som modifikator ble det funnet at optimale operative betingelser er 8-12 Mpa og 35-50°C. I det eksperimentelle apparat anvendt for å utføre de eksperimentelle tester, var superkritisk fluid-massestrømningshastighet 30 g/min, løsning-strømningshastighet 0,2 g/min og modifikator-massestrømningshastighet 4 g/min, hvilket setter forholdet av superkritisk fluid til modifikator massestrømningshastighet til 7 og forholdet av modifikator til løsning massestrømningshastighet til 20 og superkritisk fluid-hastighet ved dyseutløpet til ca. 300 m/s. Ved anvendelse av dette apparatet utførte vi prosessen for å produsere stabile tørre mikropartikler av en substans og en stabilisator ved GAS-samutfelling. Proteiner så som alkalisk fosfatase og lysozym ble anvendt som substans og trehalose som stabilisator. Samutfelte pulvere med forskjellige protein/stabilisator-forhold ble produsert. Utbyttet av det oppsamlede pulver var 90%. Den beholdte enzymatiske aktivitet etter prosessen ble funnet å være innenfor 95% og 100%, sammenlignet med et uprosessert kommersielt reagens. Partikkelstørrelse-distribusjonen i disse pulvere viste at mer enn 90% av partiklene har en ekvivalent diameter mindre enn 10 µm med en smal størrelsesfordeling. Videre viste den fysisk-kjemiske karakterisering at samutfelling tillater intime interaksjoner mellom protein- og stabilisator-molekyler og for hvert protein/stabilisator-par er det et optimalt vekt/vekt forhold. Endelig viste stabilitetsundersøkelser at alkalisk fosfatase/trehalose samutfelte partikler var mer stabile enn det ekvivalente frysetørkede produkt.

Eksperimentell prosedyre

Det superkritiske fluid blir tilført til utfellingskaret ved hjelp av pumpen 8, som blir anvendt for å sette superkritisk fluid-strømningshastighet. Temperaturen til det superkritiske fluid i ledning 35 blir satt ved hjelp av varmeapparat 17
5 til en høyere verdi enn temperaturen inne i partikkeldannelseskaret, for å ta i betraktning temperaturnedsettelsen på grunn av ekspansjonen gjennom dyse-åpningene. Modifikatoren blir deretter tilsatt med en forutbestemt strømningshastighet til det superkritiske fluid ved hjelp av pumpe 9. Løsningen av protein og stabilisator blir pumpet ved hjelp av pumpe 10 inn i partikkeldannelseskaret
10 når stabile betingelser er oppnådd.

Etter at en viss mengde av løsning er matet inn i partikkeldannelseskaret, blir pumper 9 og 10 stanset og bare det superkritiske fluid blir matet til partikkeldannelseskaret så lenge det utfelte pulver er fritt for løsningsmiddel og
15 modifikator.

Partikkeldannelseskaret blir trykkavlattet, pulveret blir oppsamlet og lukket i 10 ml medisinglass under tørr nitrogen.

De samutfelte proteiners stabilitet ble testet ved lagring av medisinglassene under de følgende betingelser: 25°C - 60% RH; 30°C - 65% RH;
20 40°C - 75% RH. Hver prøve ble analysert for biologisk aktivitet etter t= 0, 1, 2, 3 og 6 måneder. Som sammenligning ble en parallell undersøkelse utført på protein utfelt av superkritiske fluider som sådanne, på analoge frysetørkede produkter og på uprosessert kommersielt produkt, alle lagret under tørr nitrogen.

25

Eksempel 1

Fremstilling av alkalisk fosfatase (ALP)/trehalose sampresipitat-partikler

I dette eksemplet blir metoden ifølge foreliggende oppfinnelse anvendt for å samutfelle blandinger av alkalisk fosfatase (ALP) og trehalose.

30 Løsninger inneholdende ALP (Sigma Chemicals) i konsentrasjon 0,2% vekt/vekt og trehalose (Sigma Chemicals) i konsentrasjon innen området 0-2% vekt/vekt i avionisert vann ble anvendt.

ALP/trehalose-forhold av de oppnådde pulvere var som følger: 1:10, 1:2 og 1:0. Karbondioksid som superkritisk fluid og etanol som modifikator ble anvendt.

Løsningen ble innført i partikkeldannelseskaret 22 ved hjelp av pumpen
5 10 med en strømningshastighet på 0,2 g/min. Superkritisk karbondioksid ble tilført ved hjelp av pumpe 8 med en strømningshastighet på 30 g/min, etanol ble tilført ved hjelp av pumpe 9 til ledning 34 med en strømningshastighet på 4 g/min og den ble blandet med superkritisk karbondioksid før innføring i partikkeldannelseskaret.

10 Det superkritiske fluidet ble injisert i partikkeldannelseskaret gjennom de fire ytre åpninger i dysen, hver med en diameter på 0,04 mm. Løsningen ble injisert i partikkeldannelseskaret gjennom den sentrale åpning i dysen, som har en diameter på 0,04 mm. Lengden av alle åpninger var 0,2 mm.

Temperatur og trykk inne i partikkeldannelseskaret ble holdt konstant på
15 henholdsvis 40°C, ved hjelp av varmekappen 21, og 100±1 bar ved hjelp av mikro-doseringsreguleringsventil 25. Utfelte partikler ble oppsamlet på filteret 23 ved bunnen av partikkeldannelseskaret, mens superkritisk fluid, modifikator og vann ble oppsamlet i sylindren 26 ved atmosfærisk trykk.

Proessen ble utført så lenge en tilstrekkelig mengde av pulver ble opp-
20 nådd. Etter at løsning- og modifikator-tilførsel ble stanset ble bare ren karbondioksid matet inn i partikkeldannelseskaret for å ekstrahere eventuelt spor av løsningsmiddel og modifikator fra de utfelte pulvere. Typisk ble partikkeldannelseskaret vasket med to volumer av karbondioksid for å oppnå tørre pulvere.

25 Etter trykkavlastning ble partikkeldannelseskaret åpnet og pulveret ble oppsamlet og lagret i 10 ml medisinglass under tørr nitrogen.

Utbyttet av det oppsamlede pulver var 90%.

Den gjenværende enzymatiske aktivitet til ALP var innen 95% og 100%, sammenlignet med det uprosesserte kommersielle reagens. Pulver optisk
30 mikroskopi-analyse viser at ved høyt trehalose innhold som for ALP/trehalose forhold 1:10 blir pulveret dannet av to forskjellige partikkelpopulasjoner: én, som er den mest vanlige, blir dannet som nålformede partikler, mens den andre som runde partikler. De nålformede partikler er temmelig like de oppnådd med trehalose som er utfelt av superkritisk CO₂. Pulvere med lavere trehalose-

innhold viser bare den runde partikkel-populasjonen. Således kan trehalose samutfelles med ALP med superkritisk CO₂, hvilket bare gir én type partikler med det lavere trehalose-innhold (protein/trehalose forhold 1:2). Lignende karakteristika ble funnet for lysozym/trehalose sampresipitater (se eksempel 2).

5 Analoge produkter ble fremstilt ved fryse-tørking. I dette tilfellet var funnet gjenværende enzymatisk aktivitet til ALP innen 95% og 104%, sammenlignet med uprosessert kommersielt reagens.

Lignende medisinglass inneholdende uprosessert kommersiell ALP eller analoge frysetørkede produkter, alle under tørr nitrogen, ble fremstilt.

10

Stabilitetsundersøkelse

Mange medisinglass av hver kategori ble plassert under hver av de følgende betingelser: 25°C - 60% RH; 30°C - 65% RH; 40°C - 75% RH i 15 6 måneder. Ved t = 0, 1, 2, 3, 6 måneder, ble innholdet av medisinglasset undersøkt for ALP-aktivitet. Stabilitetsundersøkelsesresultater er oppsummert i Tabell 1.

Ren ALP utfelt med superkritisk CO₂ (prøve F6) viser en nedbrytning av enzymatisk aktivitet under alle betingelsene. Den gjenværende aktivitet etter 20 6 måneder ved 40°C - 75% RH (mest ekstreme betingelser), er 57% av t=0 verdi.

I motsetning ble ingen betydelige tap av aktivitet under alle betingelser opptil 6 måneder funnet for ALP/trehalose samutfelt med superkritisk CO₂ i forholdet 1:10 (prøve FT8).

25 Ved 40°C - 75% RH viser ren frysetørket ALP (prøve F8) og SIGMA kommersielt produkt lignende nedbrytning og bare 43% og 42% av den innledende enzymatiske aktivitet ble beholdt etter 6 måneder. Under de andre betingelsene viser SIGMA-produktet et langsommere aktivitetstap enn det rene frysetørkede ALP. Etter 6 måneder ble den følgende gjenværende enzymatiske 30 aktivitet detektert: 95% vs 83% ved 25°C - 60% RH, og 86% vs 76% ved 30°C - 65% RH.

Endelig viste frysetørket pulver som har ALP/trehalose-forhold på 1:10 (prøve FT10) et innledende raskt tap av aktivitet, deretter et langsommere opptil

seks måneder som synes å være uavhengig av lagringsbetingelsene. De beholdte enzymatisk aktiviteter ved 25°C - 60% RH, 30°C - 65% RH og 40°C - 75% er faktisk henholdsvis 90%, 88% og 90% av den innledende verdi.

5 Eksempel 2

Fremstilling av lysozym/trehalose sampresipitat-partikler

I dette eksemplet blir metoden ifølge foreliggende oppfinnelse anvendt for å fremstille sampresipitat-pulvere ved anvendelse av lysozym og trehalose.

Løsninger inneholdende lysozym (Sigma Chemicals) i konsentrasjon innen 0,2-1% vekt/vekt og trehalose (Sigma Chemicals) i konsentrasjon innen 10 området 0-2% vekt/vekt i avionisert vann ble anvendt. Lysozym/trehalose-forhold i de oppnådde pulvere var som følger: 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 og 1:0 (Tabell 2).

Karbondioksid ble anvendt som superkritisk fluid og etanol som 15 modifikator.

Den vandige løsningen inneholdende enzymet og stabilisatoren ble innført i partikkeldannelseskaret 22 ved hjelp av pumpen 10 med en strømningshastighet på 0,2 g/min. Superkritisk karbondioksid ble tilført ved hjelp av pumpen 8 med en strømningshastighet på 30 g/min, etanol ble tilført ved hjelp 20 av pumpen 9 til ledning 34 med en strømningshastighet på 4 g/min og den ble blandet med superkritisk karbondioksid før innføring i partikkeldannelseskaret.

Det superkritiske fluid ble injisert i partikkeldannelseskaret gjennom de fire ytre åpninger i dysen, hver med en diameter på 0,04 mm. Løsningen ble injisert i partikkeldannelseskaret gjennom den sentrale åpning i dysen, som har 25 en diameter på 0,04 mm. Lengde av alle åpninger er 0,2 mm.

Temperatur og trykk inne i partikkeldannelseskaret ble holdt på henholdsvis konstant 40°C, ved hjelp av varmekappen 21, og 100±1 bar ved hjelp av mikro-doserings-reguleringsventilen 25.

Utfelte partikler ble oppsamlet på filteret 23 ved bunnen av partikkeldannelseskaret, mens superkritisk fluid, modifikator, vann og oppløst stoff som 30 til slutt ikke var utfelt, ble oppsamlet i sylindere 26 ved atmosfærisk trykk.

Deretter ble en viss mengde av oppløst stoff innført i partikkeldannelseskaret, pumper 9 og 10 ble stanset og bare superkritisk fluid ble innført i

partikkeldannelseskaret for å tørke de utfelte pulvere: typisk kreves omtrent to ganger volumet av partikkeldannelseskaret for å oppnå tørre pulvere.

På dette tidspunkt ble partikkeldannelseskaret trykkavlastet, åpnet og pulveret oppsamlet.

5 Utbyttet av gjenvunnet pulver var 90%.

Funnet gjenværende enzymatisk aktivitet til lysozym var innenfor 96% og 100%, sammenlignet med det uprosesserte kommersielle reagens.

10 Tabell 2 angir for hver prøve lysozym/ trehalose-forhold, beholdt enzymatisk aktivitet, proteininnholdet som er relatert til homogenitet av utfellingen, antallet partikkelpopulasjoner og partikkelstørrelsene. Som det kan bemerkes er, for alle prøvene, både enzymatisk aktivitet og proteininnhold meget nær teoretiske verdier. Således tillot forsøksbetingelsene vi anvendte en lignende utfelling for både protein og sukker og garanterte en nesten fullstendig gjenvinning av biologisk aktivitet.

15 Partikkelstørrelsesdistribusjonen av pulvere beregnet ved bildeanalyse av SEM mikrografer viste at for alle pulverne oppnådd ved superkritisk CO₂-utfelling, har mer enn 90% av partiklene en ekvivalent diameter mindre enn 10 µm med en smal størrelsesfordeling. Figurer 4, 5, 6 viser partikkelstørrelsesdistribusjonen av superkritisk CO₂ samutfelt med lysozyme/trehalose-forhold
20 henholdsvis 1:10, 1:2 og 1:0. De andre kopresipitater ga lignende fordelinger. Videre viste pulver-observasjon ved optisk mikroskopianalyse ved høyt trehalose innhold som for både lysozym/trehalose-forhold 1:10 og 1:5, at pulveret var sammensatt av to partikkel-populasjoner: den ene, som var vesentlig den hyppigste, ble dannet som nålformede partikler, mens den andre
25 ble dannet som runde partikler. De nålformede partikler var helt lignende de oppnådd ved trehalose som utfelt med superkritisk CO₂. I motsetning, ved lavere trehalose-innhold (lysozym/trehalose-forhold 1: 2) viste pulveret bare den rundformede partikkel-populasjon. Således kan lysozym samutfelles med trehalose med superkritisk CO₂ for å danne bare én type partikkel ved det
30 lavere trehalose-innhold (høyere protein/trehalose-forhold). Således eksisterer en optimal verdi for protein/trehalose-forhold som garanterer den beste interaksjon mellom de to typer av molekyler. Denne adferd blir bekreftet ved DSC-analyse. Figur 7 viser DSC termogrammer av forskjellige samutfelte lysozym-pulvere. Som referanse er rent utfelt lysozym og trehalose også angitt.

Som det kan bemerkes, ved høyere trehalose-innhold (forhold 1:5), inneholder prøver amorf trehalose som gjenvinner den krystallinske "abit" (eksoterm topp ved 197°C) og deretter smelter ved 214°C på samme måte som utfelt trehalose selv. Den termiske adferd til prøver med lavere innhold av trehalose er helt forskjellig. Prøvene med forhold 1:2 til 4:1 viser termogrammer lignende de til lysozym selv. Den mest relevante forskjell er skift mot lavere temperaturer av den karakteristiske overgang av lysozym ved $T=204^{\circ}\text{C}$. Jo høyere trehalose-innhold jo lavere overgangstemperatur. Således har vi sterke bevis for at samutfelling av superkritiske fluider tillater en intim interaksjon mellom protein og trehalose. Opptil en definert mengde av sukker (1:2 forhold) oppnådde vi faktisk en homogen fast fase. Dette forhold er i stand til å gi den beste protein/sukker interaksjon og den beste langtidsstabilitet for protein.

TABELL 1

Prøve / tørke-metode	ALP / trehalose-forhold	Lagrings-betingelser	Enz. aktivitet etter 1 mnd (% av t=0)	Enz. aktivitet etter 2 mnd. (% av t=0)	Enz. aktivitet etter 3 mnd. (% av t=0)	Enz. aktivitet etter 6 mnd. (% av t=0)
ALP Sigma frysetørking	1:0	-20°C	---	---	---	96
		25°C/60%RH	101	100	101	95
		30°C/70%RH	103	103	94	86
		40°C/75%RH	94	85	75	42
ALP F6 SCF	1:0	-20°C	---	---	---	---
		25°C/60%RH	91	72	69	67
		30°C/70%RH	101	71	59	59
		40°C/75%RH	64	69	58	57
ALP F8 fryse-tørking	1:0	-20°C	---	---	---	---
		25°C/60%RH	88	89	89	83
		30°C/70%RH	83	87	87	76
		40°C/75%RH	75	75	62	43
ALP FT8 SCF	1:10	-20°C	---	---	---	101
		25°C/60%RH	111	99	113	99
		30°C/70%RH	104	97	102	99
		40°C/75%RH	113	98	101	99
ALP FT10 frysetørking	1:10	-20°C	---	---	---	95
		25°C/60%RH	95	95	93	90
		30°C/70%RH	94	96	92	88
		40°C/75%RH	94	93	92	90

TABELL 2

Prøve	Lysozym / trehalose- forhold	Enz. aktivitet (mg enz./mg protein	Protein- innhold (% av nominelt)	Antall partikkel- populasjoner	Partikkel- størrelse (% < 10 µm)
L3	1:0	0,96	102,6	1	99
LT2	1:10	1,04	104,3	2	---
LT3	1:1	0,96	100,8	1	98
LT6	1:5	0,96	104,0	2	92
LT8	4:1	1,01	103,2	1	97
LT9	1:2	0,98	104,0	1	93
LT10	2:1	0,97	103,9	1	97

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for samutfelling av et protein eller polypeptid med en stabilisator for disse, ved en gass-anti-løsningsmiddel-prosess omfattende
5 innføring i et partikkeldannelseskar av et superkritisk fluid blandet med en modifikator; og
en løsning omfattende nevnte protein eller polypeptid og nevnte stabilisator oppløst i et løsningsmiddel;
slik at nevnte løsningsmiddel blir ekstrahert fra løsningen av nevnte super-
10 kritiske fluid og samutfelling av substansen og stabilisatoren skjer, hvor nevnte stabilisator er trehalose, nevnte løsningsmiddel er vann, nevnte superkritiske fluid er karbondioksid og nevnte modifikator er valgt fra metanol, etanol og isopropanol .
- 15 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor substansen er et protein.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor nevnte løsning og nevnte superkritiske fluid blir innført i nevnte partikkeldannelseskar via separate innløpsdyser.
20
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvor nevnte superkritiske fluid blir innført i nevnte partikkeldannelseskar via en rekke innløpsdyser.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor nevnte dyser er tilstede på en plate,
25 idet løsningsinnløpsdysen er i senteret på nevnte plate omgitt av en rekke innløpsdyser for det superkritiske fluid jevnt fordelt langs en omkrets.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 5, hvor løsningen blir innført i partikkeldannelseskaret blandet med en modifikator.
30
7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor modifikatoren er etanol.

8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7 hvor forholdet av protein eller polypeptid til stabilisator i løsningen er 1:1 til 10 vekt/vekt.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor forholdet av protein eller polypeptid til stabilisator i løsningen er 1:2 vekt/vekt.
10. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor det superkritiske fluid innføres i partikkeldannelseskaret med lydets hastighet i fluidet eller over.
11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvor forholdet mellom superkritisk fluid- strømningshastighet og modifikator-strømningshastighet er i området 4:1 til 8:1 vekt/vekt.
12. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor forholdet mellom modifikator-strømningshastighet og løsning-strømningshastighet er i området 15:1 til 25:1 vekt/vekt.
13. Kopresipitat av protein eller polypeptid og stabilisator oppnådd ved en fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 12, og karakterisert ved en homogen fast fase, hvori forholdet mellom protein:trehelose er opptil 1:2.

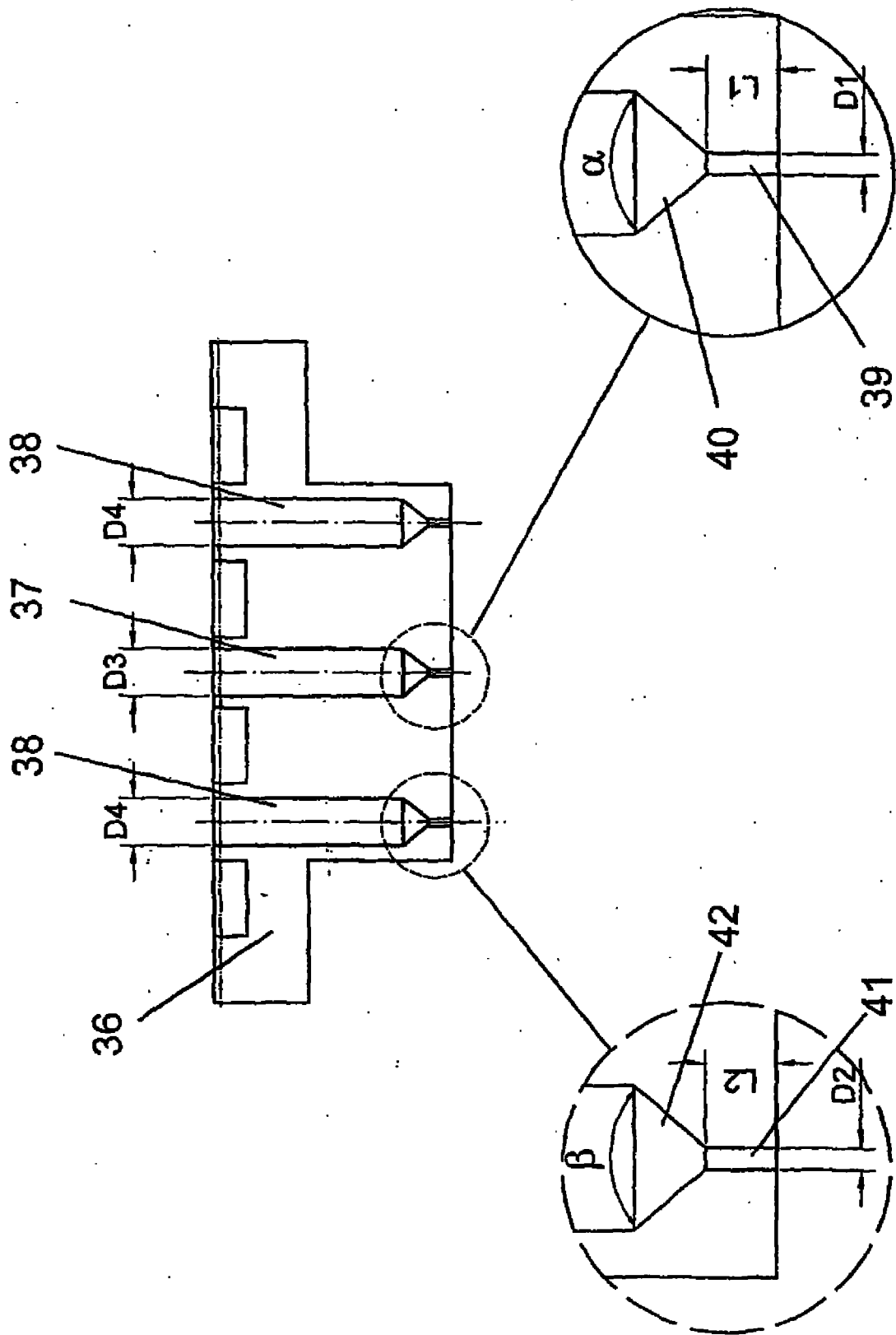
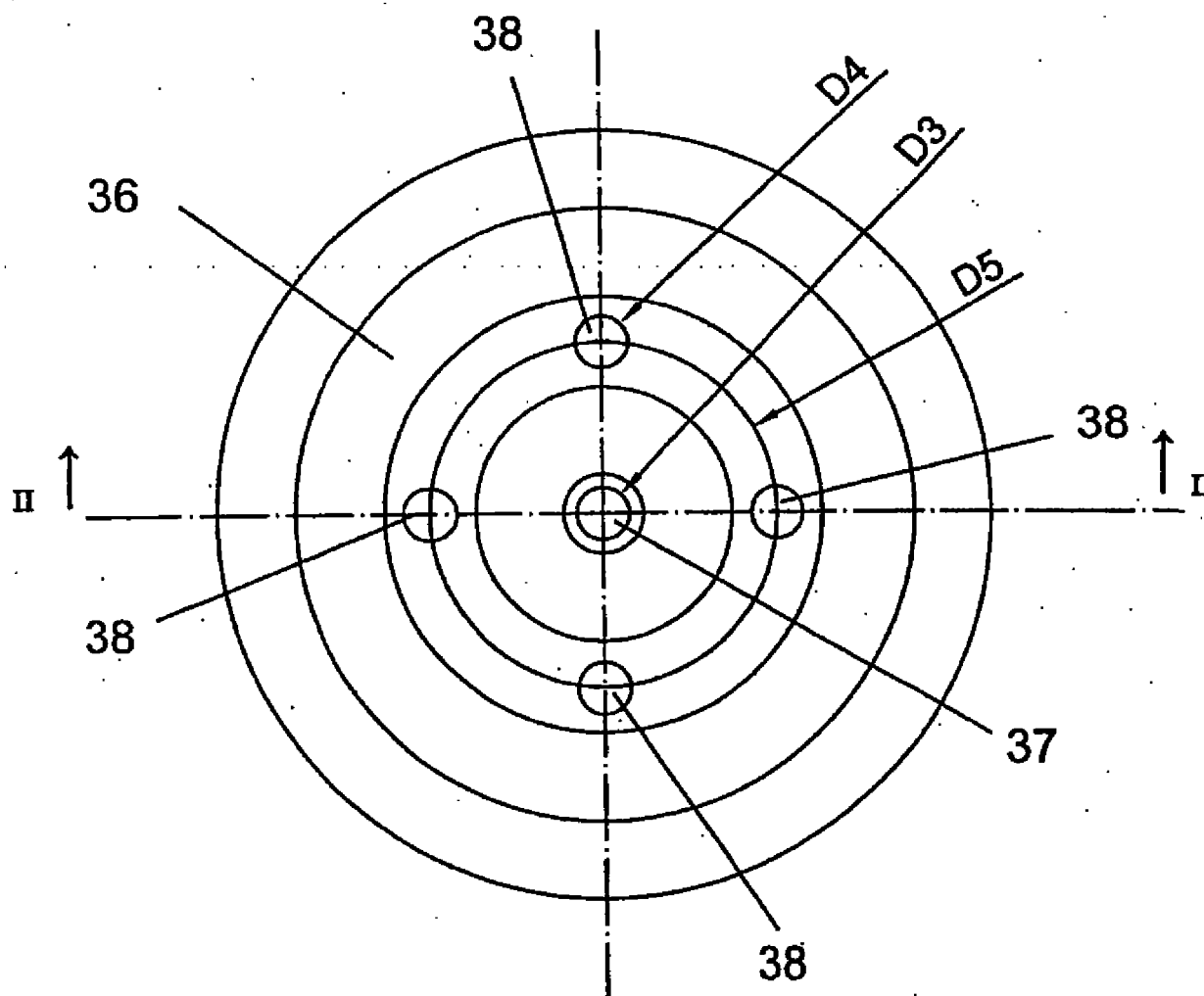


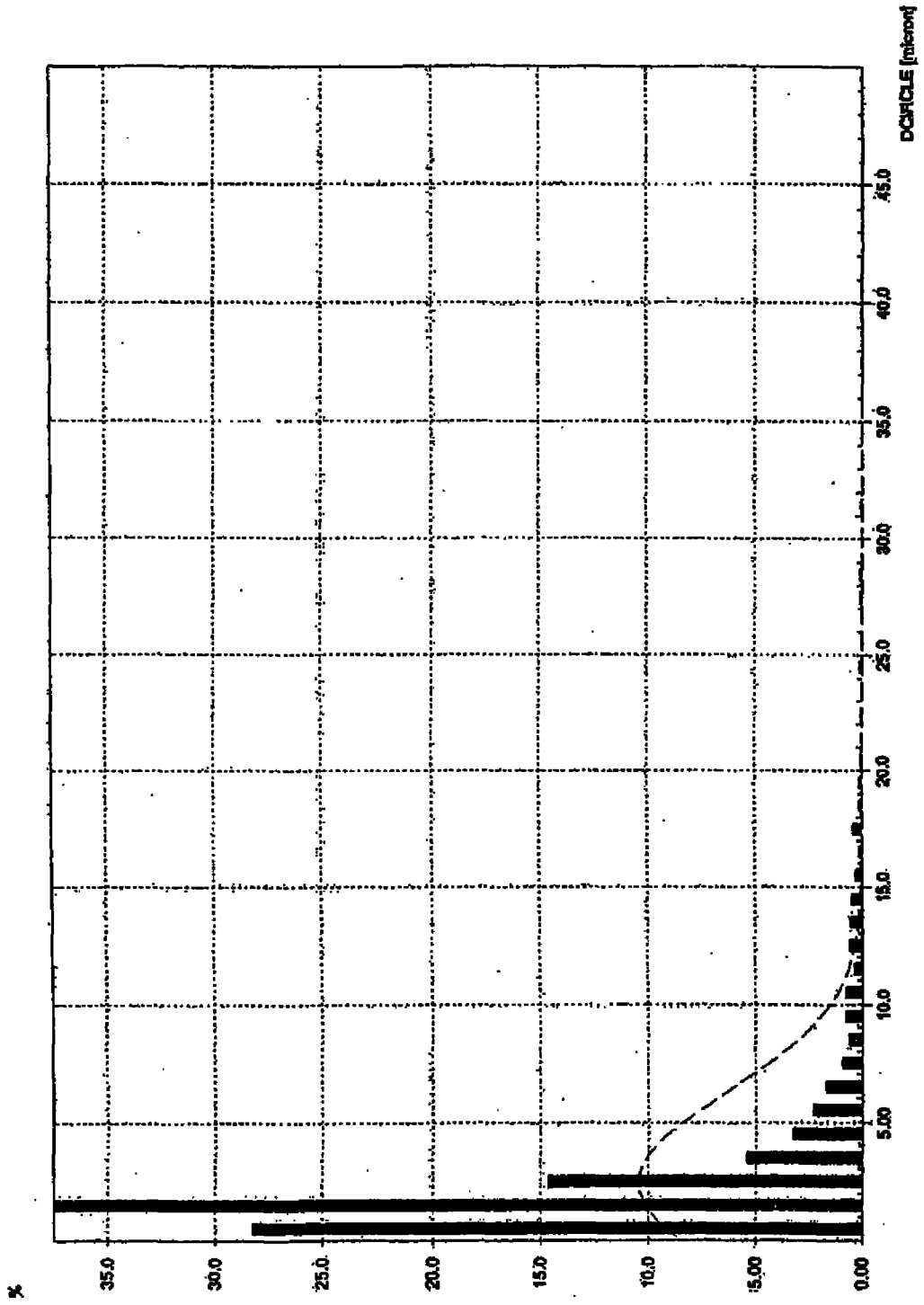
Fig. 2.

37



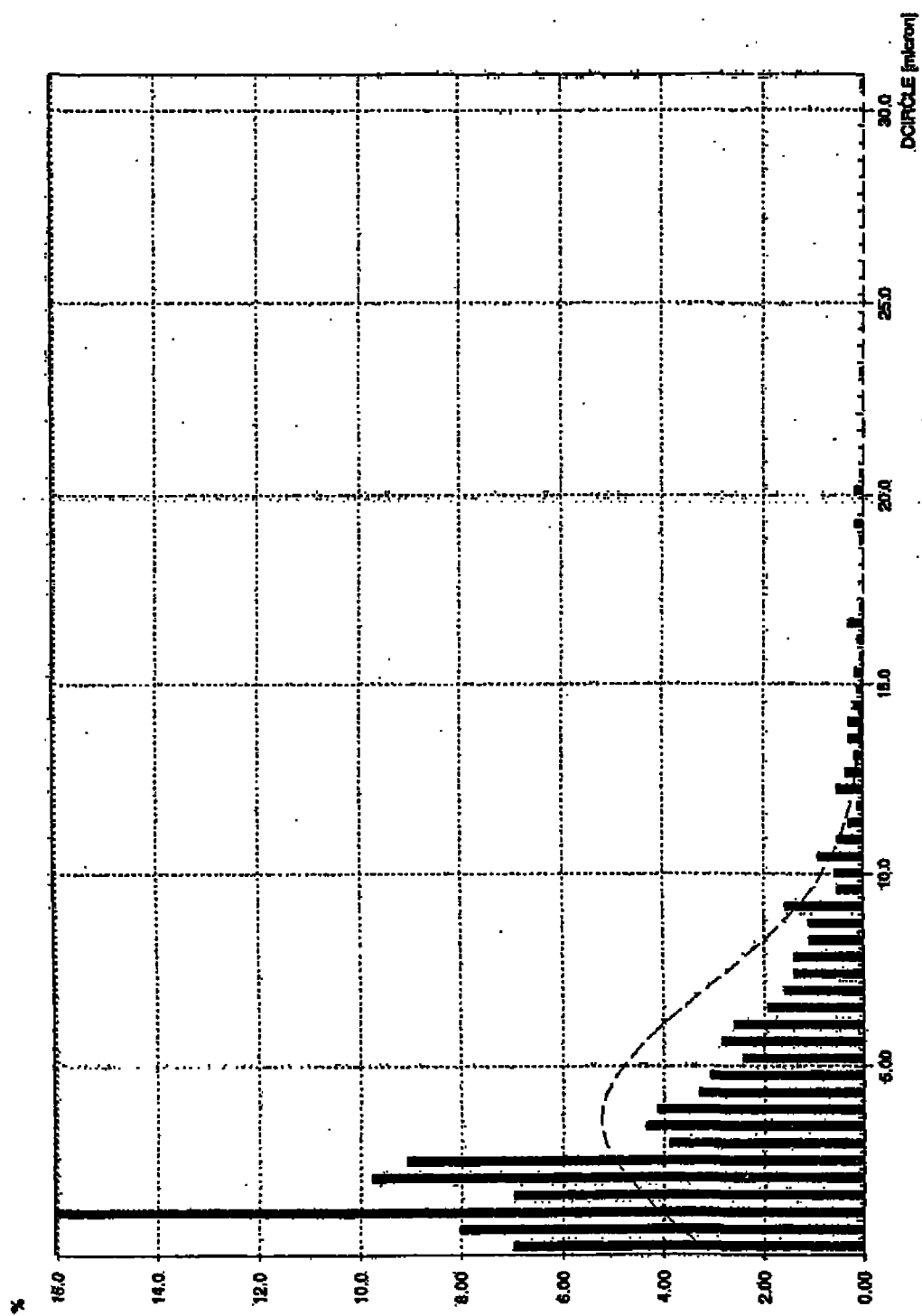
Figur 3

4/7



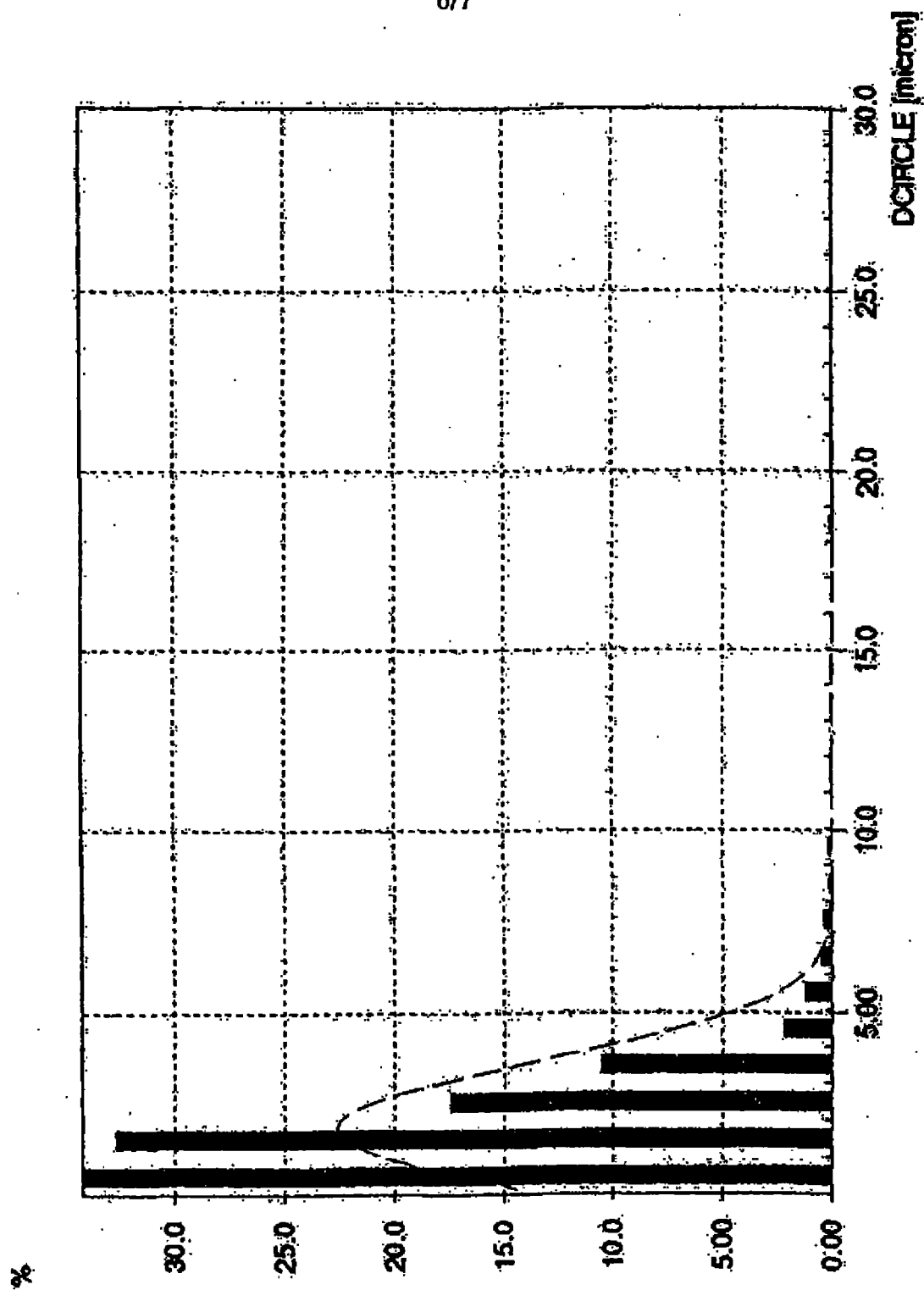
Figur 4.

5/7



Figur 5.

6/7



Figur 6.

77

FIG. 7

Termisk analyse av superkritisk CO₂ samutfelt lysozym/trehalose-pulvere.

a: ren trehalose; b: lysozym/trehalose 1:5 forhold; c: rent lysozym;

d: lysozym/trehalose; e: lysozym/trehalose 2:1 forhold; f: lysozym/trehalose 1:2 forhold

