

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 940909 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **940909**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 47/26
A61K 37/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **25.02.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.02.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.08.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

25.02.1993 US 023182

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Sanofi, 32/34 rue Marbeuf 75008 Paris, France, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Phillips, Christopher P., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Snow, Robert A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Lyofilisoituja polyalkyleenioksidimodifioituja proteiini- ja polypeptidikomplekseja, joissa on syklodekstriiniä

Lyofiliserade komplex av polyalkylenoxidmodifierade proteiner och polypeptider med cyklodextrin

Lyofilisoituja polyalkyleenioksidimodifioituja proteiini- ja polypeptidikomplekseja, joissa on syklodekstriiniä

5 Tämä keksintö koskee fysiologisesti aktiivisten, vähädioliseen polyalkeenioksidiin sidottujen ja kylmäsuojaavan syklodekstriinin kanssa yhdistettyjen proteiinien ja polypeptidien kylmäkuivattuja parenteraalisia vesiliuoksia.

10 Aivan erityisesti tämä keksintö koskee vähädioliseen polyeteeniglykoliin sidotun ja kylmäsuojaavan syklodekstriinin kanssa yhdistetyn peroksididismutaasin kylmäkuivattua parenteraalista vesiliuosta.

15 Biologisesti aktiivisia proteiineja, erityisesti entsyymejä ja peptidihormoneja, on pitkään pidetty ihanteellisina lääkkeinä erilaisten sairauksien hoitoon niiden spesifisyyden ja nopean katalyyttisen vaikutuksen vuoksi. Sellaisiin entsyymeihin kuuluvat seuraavat:

Oksidoreduktaasit, kuten uraatti: happioksidoreduktaasi (1.7.3.3, "urikaasi");

20 vetyperoksidi: vetyperoksidioksidoreduktaasi (1.11.1.6, "katalaasi");

kolesteroli, pelkistynyt NADP: happioksidoreduktaasi (20-B-hydroksyloiva) (1.14.1.9, "kolesteroli-20-hydroksylaasi").

25 Transferaasit, kuten UDP-glukuronaatti: glukuronyylitransferaasi (substraatin suhteen epäspesifinen) (2.4.1.17, "UDP-glukuronyylitransferaasi");

UDP-glukoosi: α -D-galaktoosi-1-fosfaattiuridylyylitransferaasi (2.7.7.12).

30 Hydrolaasit, kuten mukopeptidi-N-asetyyylimuramyylhydrolaasi (3.2.1.17, lysotsyymi), trypsiini (3.4.4.4), L-asparagiiniaminohydrolaasi (3.5.1.1, "asparaginaasi").

Lyaasit, kuten fruktoosi-1,6-difosfaatti- ja D-glyseraldehydi-3-fosfaattilyaasi (4.1.2.12, "aldolaasi").

Isomeraasit, kuten D-ksyloosi: ketoli-isomeraasi (5.3.1.5, "ksyloosi-isomeraasi").

Ligaasit, kuten L-sitrulliini: L-aspartaattiligaasi (AMP) (6.3.4.5).

5 Peptidihormoneihin kuuluvat insuliini, ACTH, glukagoni, somatostatiini, somatotropiini, tymosiini, parathormoni, pigmenttihormonit, somatomeidiini, erytropoietiini, luteinisoiva hormoni, koriongonadotropiini, hypotalamuksen vapautustekijät, antidiureettiset hormonit, kilpirauhasta
10 stimuloiva hormoni, kalsitoniini ja prolaktiini.

 Hoito fysiologisesti aktiivisilla proteiinia sisältävillä aineilla, erityisesti muun kuin ihmisen entsyymeillä, ei ole ollut yhtä menestyksellistä osaksi niiden suhteellisen lyhyiden puoliintumisaikojen ja niiden oman
15 immunogeenisuuden johdosta. Heti antamisen jälkeen isännän puolustautumisjärjestelmä reagoi poistaakseen vieraat entsyymit käynnistämällä niiden vasta-aineiden tuotannon pienentäen siten niiden terapeutista tehoa tai poistaen sen. Vieraiden tai muuten lyhytikäisten ihmisen entsyymien antaminen toistuvasti on pohjimmiltaan tehotonta ja voi olla
20 vaarallista samanaikaisen allergisen reaktion vuoksi. On tehty erilaisia yrityksiä näiden ongelmien ratkaisemiseksi esimerkiksi mikrokapseloinnilla, liposomien sisään sulke-
25 malla, geenitekniikalla ja sitomalla entsyymit polymeereihin. Yrityksistä lupaavin näyttää olevan proteiinia sisältävien aineiden sitominen polyalkeenioksideihin (PAO) ja erityisesti polyeteeniglykoleihin (PEG). Seuraava valaisee mainittuja yrityksiä.

 US-patenttijulkaisussa 4 179 337 on tuotu esille
30 proteiineihin kytketyn polyeteeni- tai polypropeeniglykolin käyttö sellaisen fysiologisesti aktiivisen, ei-immunogeenisen, vesiliukoisen polypeptidikoostumuksen aikaansaamiseksi, jossa polyeteeniglykolin (jota nimitetään jäljempänä toisinaan PEG:ksi) tehtävänä on suojata polypeptidiä
35 aktiivisuuden menetykseltä aiheuttamatta mitään olennaista

immunogeenista vastetta. Mainitussa patenttijulkaisussa kuvatut menetelmät polyeteeniglykolin kytkemiseksi proteiiniin käsittävät joko proteiinin aminoryhmän muuntamisen amidi- tai pseudoamidiryhmäksi sillä seurauksella, että aminoryhmän varauksenkantokyky häviää, tai heteroatomin sisältävän substituentin, kuten hydroksyyli-ryhmän, tai polymeerirungossa toistumattoman rengasrakenteen liittämisen proteiinin aminoryhmään tai sen viereiseen asemaan.

F. M. Veronese, E. Boccu, O. Schaivon, G. P. Velo, A. Conforti, L. Franco ja R. Milanino raportoivat julkaisussa *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 35 (1983) 757 - 758, että muunnettaessa naudan punasoluista peräisin oleva peroksididismutaasi polyeteeniglykolikarboksyylihapon aktiivisella N-hydroksisukkiini-imidiesterillä entsyymin puoliintumisaika kasvaa muuntamattomaan proteiiniin verrattuna.

EP-hakemusjulkaisu 0 200 467 (Anjinomoto, Inc.) kuvaa peroksididismutaasia, jota on muunnettu kemiallisesti polyalkeenioksidilla (PAO), jonka polymeerin molemmat päät on tehty funktionaalisiksi aktivoituilla karboksyyli-kytkentäryhmillä, jotka kumpikin kykenevät reagoimaan proteiinin kanssa. Koska aktivoituneet kytkentäkohdat sijaitsevat polymeeriketjun vastakkaisissa päissä, on epätodennäköistä, että aktivoituneen ryhmän läsnäololla polymeerin toisessa päässä voi olla merkittävää vaikutusta polymeerin toisessa päässä esiintyvän ryhmän reaktiivisuuden luonteeseen. Mainitut polymeerit kykenevät reagoimaan kummassakin päässään proteiinien kytkemiseksi yhteen, jolloin muodostuu proteiinin ja polyalkeenioksidin välisiä kopolymeereja. Sellaisilla kopolymeereilla ei ole tarkasti määrättyjä tai molekyylistökiometrisiä koostumuksia.

F. M. Veronese et al. ovat julkaisussa *Journal of Controlled Release* 10 (1989) 145 - 154 raportoineet, että (su)peroksididismutaasin (jota nimitetään jäljempänä toisinaan SOD:ksi) muuntaminen monometoksipolyeteeniglykolil-

la (jota nimitetään jäljempänä toisinaan MPEG:ksi) antaa tulokseksi heterogeenisen tuoteseoksen. Heterogeenisuuden osoitettiin riippuvan difunktionaalisen polyeteeniglykolin (DPEG) esiintymisestä monofunktionaalisissa metoksyloiduissa molekyyleissä.

Edellä kuvatut yritykset ovat yleensä johtaneet proteiinia sisältävien, fysiologisesti aktiivisten aineiden jonkin verran pitempään puoliintumisaikaan ja pienempään immunogeenisuuteen. Vaikuttaa kuitenkin siltä, että lisäparannukset ovat välttämättömiä erilaisten sairauksien hoitamiseksi menestyksellisesti näillä lupaavilla biologisilla aineilla.

Samanaikaisesti avoinna olevassa US-patenttihakemuksessa 07/936 416 on tuotu esille, että voidaan valmistaa biologisesti aktiivisia, proteiinia sisältäviä aineita, joilla on pitempi puoliintumisaika ja vähemmän immunogeenisia ominaisuuksia, muuntamalla niitä kemiallisesti vähädiolista polyalkeenioksidia, edullisesti polyeteeniglykolia, käyttäen. Esitetyillä formuloilla on selviä etuja niihin tekniikan tasoa edustaviin formuloihin nähden, jotka sisältävät polyeteeniglykolilla muunnettuja, proteiinia sisältäviä aineita.

Nestemäisessä olomuodossa tapahtuvan varastoinnin aikana polyeteeniglykoli-proteiinimolekyylit hydrolysoituvat vapaan polyeteeniglykoli-, polyeteeniglykoli-proteiini- ja sukkinaatti-proteiiniosan seokseksi. Sellaisen destabiloitumisprosessin estämiseksi formulat voidaan kylmäkuivata. Kylmäkuivauksen myötä proteiinien ja stabilointiaineiden pitoisuudet muodostuvat kuitenkin korkeiksi ja vaikuttavat, käytettävistä täyteaineista riippuen, haitallisesti varastoinnin aikana tapahtuvan molekyyliden välisen aggregoitumisen asteeseen.

On todettu, että syklodekstriinit alentavat kovalenttisesti sidottujen vähädiolinen polyeteeniglykoli - proteiini-konjugaattien intermolekulaarisen aggregoitumi-

sen nopeutta niiden varastoinnin aikana ja saavat siten aikaan pitemmän puoliintumisajan.

5 Syklodekstriinit ovat alalla tunnettuja siitä, että niillä on kyky muodostaa inkluusiokomplekseja ja samanaikaisesti liukoiseksi tekeviä ominaisuuksia. Syklodekstriinien johdannaisilla tiedetään myös olevan mainitut ominaisuudet. Niiden käyttöä valaisevat seuraavat patenttijulkaisut.

10 US-patenttijulkaisu 4 596 795 koskee sukupuolihormonien antamista niiden ja syklodekstriinin hydrofiilisten johdannaisten, kuten poly- β -syklodekstriinin ja hydroksi-propyyli- β -syklodekstriinin, välisten kompleksien muodossa kielenalaisesti tai bukkalaisesti. Kompleksien havaittiin olevan erittäin hyvin veteen liukenevia ja tehokkaita ver-
15 rattaessa niitä muihin syklodekstriinijohdannaisiin.

US-patenttijulkaisussa 4 727 064 on esitetty lääkevalmisteita, jotka koostuvat lääkeaineesta, jonka liukenevuus veteen on pieni, ja amorfisesta vesiliukoisesta syklodekstriinipohjaisesta seoksesta. Syklodekstriinipohjaisen seoksen lisääminen parantaa lääkeaineen liukenemisominaisuuksia. Syklodekstriinipohjainen seos valmistetaan α -,
20 β - tai gamma-syklodekstriinistä, joka on tehty amorfiseksi epäselektiivisellä alkyloinnilla.

Kansainvälinen patenttihakemus PCT/US89/04 099
25 (WO 90/03 784) kuvaa kylmäkuivattua koostumusta, joka sisältää polypeptidiä sekä stabiloivan/liukoiseksi tekevän määrän syklodekstriiniä, jona voidaan käyttää β - ja gamma-syklodekstriinin hydroksipropyyli-, hydroksietyyli-, glukosyyli-, maltosyyli- ja maltotriosyylijohdannaisia.

30 US-patenttijulkaisussa 4 983 586 on esitetty menetelmä lipofiilisen ja/tai veden läsnä ollessa labiilin lääkeaineen saostumisen esiintymistiheyden pienentämiseksi, jota saostumista tapahtuu injektointikohdassa annettaessa lääkeainetta parenteraalisesti, joka menetelmä käsittää
35 lääkeaineen antamisen vesiliuoksena, joka sisältää

noin 20 - 50 % hydroksipropyyli- β -syklodekstriiniä. Siinä on tuotu esille sen käyttö hyvin monien lääkkeiden yhteydessä, joihin kuuluvat antineoplastiset aineet, sedatiivit, trankvilloivat aineet, antikonvulsiiviset aineet, masennuslääkkeet, unilääkkeet, lihasrelaksantit, antispasmodiset aineet, tulehduksia ehkäisevät aineet, antikoagulantit, kardiotoniset aineet, verisuonia laajentavat aineet sekä rytmihäiriölääkkeet.

On yllättäen havaittu, että kylmäkuivatut parenteraaliset formulat, joka sisältävät konjugoitunutta vähädiolista polyalkeenioksidia ja fysiologisesti aktiivista proteiinia tai polypeptidiä kompleksoituna syklodekstriinin kanssa stabiilisuuden antamiseksi formuloille pitempiaikaisessa varastoinnissa ilman molekyylien välistä aggregoitumista.

Siten saadaan aikaan stabiileja parenteraalisia formuloita, jotka sisältävät fysiologisesti aktiivisia proteiineja, jotka on sidottu kovalenttisesti vähädioliseen polyalkeenioksidiin (jota nimitetään jäljempänä toisinaan LDPAO:ksi), edullisesti vähädioliseen polyeteeniglykoliin (jota nimitetään jäljempänä toisinaan LDPEG:ksi), kompleksoituina syklodekstriinien kanssa.

Tämän keksinnön mukaisesti saadaan siis kylmäkuivausta varten aikaan vesipitoinen, fysiologisesti aktiivinen, proteiinia sisältävä koostumus, joka sisältää noin 150 - 150 000 yksikköä kovalenttisesti sidottua vähädiolinen polyalkeenioksidi - proteiini-konjugaattia/ml, noin 0,1 - 20 % (m/V) syklodekstriiniä ja noin 0,01 - 50 mmol puskuriainetta/litra ja jonka koostumuksen pH on noin 5,7 - 6,5.

Edullisessa toteutusmuodossaan koostumus sisältää noin 25 000 - 150 000 yksikköä, edullisimmin noin 50 000 - 150 000 yksikköä, polyalkeenioksidi-proteiinikonjugaattia/ml ja noin 1,0 - 15 % (m/V), edullisesti noin 5 - 10 % (m/V), syklodekstriiniä.

Tässä selityksessä polyalkeenioksidin, kuten polyeteeniglykolin, yhteydessä käytettynä ilmaisu "vähädiolinen" tarkoittaa lineaarista polyalkeenioksidia, joka sisältää korkeintaan noin 10 % monoalkoksyloimatonta polyalkeenioksidia, edullisesti monometoksyloimatonta polyeteeniglykolia.

Edullisia vähädiolisia polyalkeenioksideja, joita käytetään hyväksi tässä keksinnössä, ovat edullisesti eteeniglykolipolymeerit, jotka sisältävät korkeintaan noin 10 paino-% monometoksyloimatonta polyeteeniglykolia ja joiden keskimääräinen moolimassa on noin 1 000 - 15 000 daltonia, jollaiset polymeerit ovat erityisen sopivia si-
dottaviksi kovalenttisesti biologisesti aktiivisiin protei-
iineihin, varsinkin peroksididismutaasiin. Vielä edulli-
semmin tässä keksinnössä käytetään hyväksi polyeteenigly-
koleja, joiden keskimääräinen moolimassa on noin 2 000 -
10 000 daltonia, edullisemmin noin 4 000 - 6 000 daltonia,
jolloin polyeteeniglykoli sisältää edullisesti vähemmän
kuin noin 7 paino-% ja edullisimmin vähemmän kuin noin
5 paino-% monometoksyloimatonta polyeteeniglykolia.

Biologisesti/fysiologisesti aktiivisiin proteiineihin, polypeptideihin ja hormoneihin, joita käytetään hyväksi tässä keksinnössä, kuuluvat ihmisen rekombinaatioin-
terleukiini 4 (rhuIL-4); proteaasi Subtilisin Carsberg;
peroksididismutaasit, kuten naudan, ihmisen ja erilaiset
rekombinaatioperoksididismutaasit, kuten ihmisen rekombi-
naatioperoksididismutaasi (rhuSOD); oksidoreduktaasit,
transferaasit, hydrolaasit, lyaasit, isomeraasit ja ligaa-
sit, kuten esimerkiksi edellä luetellut; sekä edellä lue-
teltujen peptidihormonien lisäksi seuraavat: interferonit
(α -, β - ja gamma-interferoni), vasta-aineet (IgG, IgE,
IgM, IgD), interleukiinit 1, 2, 3, 4 ja 7, granulositytti-
pesäkkeitä stimuloiva tekijä (DCSF), granulositytti-makro-
fagipesäkkeitä stimuloiva tekijä (GM-CSF), tuumorinekroo-
sitekijä (TNF), verihiutaleista peräisin oleva kasvutekijä

(PDGF), epidermaalinen kasvutekijä (EGF), hermokasvutekijä (NGF), luukasvutekijä (BGF), kasvuhormonia vapauttava tekijä (GHRF), papaiini, kymotrypsiini, termolysiini, streptokinaasi ja aktivaasi.

5 Syklodekstriinejä, joita käytetään hyväksi tässä keksinnössä, ovat α -, β - ja gamma-syklodekstriini, jotka koostuvat vastaavasti 6, 7 ja 8 glukosyyksiköistä. Ne ovat alalla tunnettuja ja niillä tiedetään olevan kyky muodostaa inkluusiokomplekseja tiettyjen lääkeaineiden, protei-

10 nien ja polypeptidien kanssa sekä samanaikaisesti liukoiseksi tekeviä ominaisuuksia.

Syklodekstriinin sisäontelo on lipofiilinen, kun taas sen ulkopuoli hydrofiilinen. Näiden ominaisuuksiensa vuoksi syklodekstriinejä on käytetty muodostettaessa inkluusiokomplekseja lääkkeiden kanssa. Vähädiolinen poly-

15 alkeenioksidi - proteiini-konjugaattien stabilointia ajatellen erityisen sopivia ovat β -syklodekstriinin hydroksietyyli-, hydroksipropyli-, glukosyyli-, maltosyyli- ja maltotriosyylijohdannaiset.

20 Tässä keksinnössä hyväksi käytettävä, farmaseuttisesti hyväksyttävä, vettä sisältävä kantaja on myrkytön inertti väliaine, johon syklodekstriinin ja vähädiolinen polyalkeenioksidi - proteiini-konjugaatin välinen kompleksi ja farmaseuttisesti hyväksyttävä puskuriaine, kuten

25 natriumfosfaatti, natriumasettaatti, natriumkarbonaatti tai mineraali- tai orgaanisista hapoista saatavat puskuriaineet liuotetaan. Farmaseuttisesti hyväksyttävillä puskuriaineilla tarkoitetaan sitä, että puskuriaineet ovat suhteellisen vaarattomia nisäkkäiden elimistölle lääkinnällisinä annoksina, jotta puskuriaineista aiheutuviksi katsottavissa olevat sivuvaikutukset eivät mitätöi aktiivisen kompleksin hyödyllisiä ominaisuuksia.

30

Menetelmässä tämän keksinnön mukaisten formuloiden valmistamiseksi vähädiolinen polyalkeeniglykoli, jota

35 edustaa tässä polyeteeniglykoli, liitetään ensin kovalent-

tisesti biologisesti aktiiviseen proteiiniin, mikä voidaan esittää kaaviona seuraavasti:

- a) LDPEG + karboksylointiaine $\rightarrow$ LDPEG-COOH
- 5 b) LDPEG-COOH + karboksyyliiryhmän aktivoiva aine $\rightarrow$
LDPEG-COOH:n aktiivinen esteri
- c) n LDPEG-COOH:n aktiivista esteriä + proteiini $\rightarrow$
(LDPEG-CO)_n-proteiini

10 jossa kaaviossa LDPEG-COOH on LDPEG, jonka hydroksyyliiryhmän sisältäneet asemat on karboksyloitu, ja n on niiden asemien lukumäärä, jotka sitovat proteiiniin LDPEG:n.

LDPEG:n ne asemat, jotka sisältävät hydroksyyliiryhmän, karboksyloidaan ja sen jälkeen karboksyyliiryhmät esteröidään karboksyyliiryhmän aktivoivalla aineella aktiivisten estereiden muodostamiseksi, jotka esterit kytketään sitten proteiinimolekyyliin. Proteiiniin sidottavien LDPEG-molekyylien lukumäärä vaihtelee proteiinimolekyyllisä läsnä olevien reaktiivisten ryhmien, kuten aminoryhmien, lukumäärän mukaan.

20 LDPEG liuotetaan sitten farmaseuttisesti hyväksyttävään, vettä sisältävään kantaja-aineeseen, mitä seuraa halutun syklodekstriinin lisäys ja liuotus. Sen jälkeen liuos kylmäkuivataan lyofilisointilaitteessa. Kylmäkuivattuun liuokseen lisätään steriiliä vettä ennen sen antamista potilaalle.

25 Toiselta kannalta katsottuna tämä keksintö tarjoaa siten menetelmän kylmäkuivatun, biologisesti aktiivisen, proteiinia sisältävän koostumuksen valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- 30 a) alle 10 paino-% monoalkoksyloimatonta polyalkeenioksidia sisältävän polyalkeenioksidin karboksyloinnin,
- b) mainitun karboksyloidun polyalkeenioksidin aktivoinnin aktiivisen polyalkeenioksidiesterin aikaansaamiseksi,

- c) mainitun aktiivisen polyalkeenioksidiesterin liittämisen kovalenttisesti biologisesti aktiiviseen esteriin,
- d) mainitun kovalenttisesti sidotun polyalkeenioksidiesterin ja mainitun biologisesti aktiivisen proteiinin liuottamisen vettä sisältävään väliaineeseen,
- e) syklodekstriinin liuottamisen mainittuun vettä sisältävään väliaineeseen homogeenisen liuoksen aikaansaamiseksi,
- f) mainitun liuoksen puskuroinnin suunnilleen pH-alueelle 5,7 - 6,5 sekä
- g) liuoksen kylmäkuivauksen.

Keksintöä kuvataan alla tarkemmin käsitellen nimenomaan (su)peroksididismutaasia (jota nimitetään jäljempänä toisinaan SOD:ksi).

Peroksididismutaasi on solunsisäinen entsyymi, jota esiintyy kaikissa happea metaboloivissa soluissa ja joka katalysoi peroksidiradikaalin muuttumista hapeksi ja vetyperoksidiksi. Peroksidiradikaalin ja siitä saatavien lajikkeiden uskotaan olevan aiheuttajina monissa eri tulehdussairauksissa. Peroksididismutaasia käytetään eräiden tulehdustilojen hoitamiseen kauppanimellä Orgotein. Lisäksi on tutkittu SOD:n käyttöä bronkopulmonaarisen kasvuhäiriön ja hyperbaarisen happimyrkytyksen, palovammoista ja infektioista aiheutuvien akuuttien tulehdusten, elinsiirtoja seuraavan reperfuusioaurion, mykiöntakaisen sidekudostumisen, ionisointisädehoidon sivuvaikutusten ja eräiden dermatologisten tilojen tapauksessa. Annettaessa SOD:tä nisäkkäälle laskimonsisäisenä ruiskeena kyseisen entsyymin puoliintumisaika on kuitenkin vain muutama minuutti ja se häviää verenkierrosta. Sen seurauksena entsymaattinen aktiivisuus ei ole riittävä myrkyllisten aineiden poistamiseksi verenkierrosta. Toistuva antaminen aiheuttaa toisaalta haitallisia reaktioita.

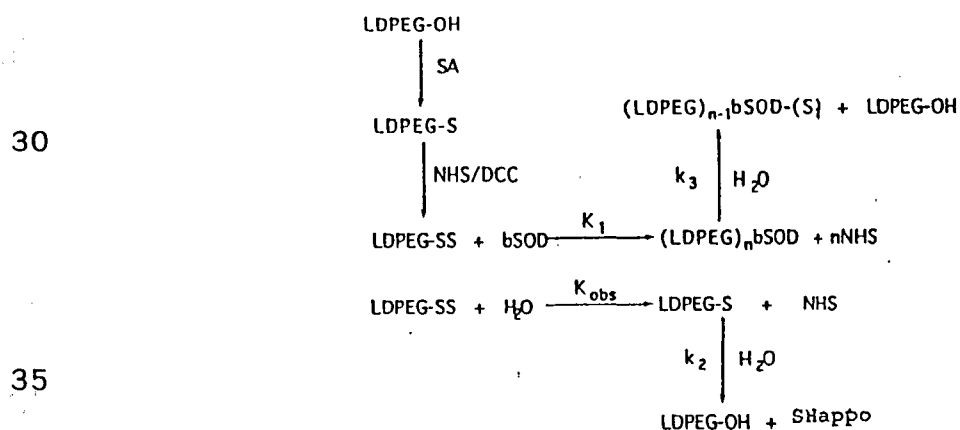
LDPAO, joka sisältää moolimassaltaan vaihtelevia polyalkeenioksidiketjuja ja ainakin yhden hydroksyyli ryhmän ketjua kohden, kuten LDPEG, liitetään SOD:hen sellai-

sen biologisesti aktiivisen koostumuksen muodostamiseksi, jolla on pitempi puoliintumisaika ja pienempi immunogeenisuus kuin pelkällä SOD:llä tai PAO-SOD:llä. Kylmäkuivattaessa LDPEG muodostaa epätoivottavia aggregaatteja, jotka vaikuttavat haitallisesti sen biologiseen aktiivisuuteen. Sen kompleksointi syklodekstriinin kanssa estää aggregaattien muodostumisen ja tekee takaisin laimennetusta formulasta pitkäaikaista varastointia kestävän.

Menetelmä LDPEG:n liittämiseksi SOD:hen (mitä nimitetään jäljempänä toisinaan LDPEGaatioksi) käsittää seuraavat vaiheet:

sellaisen vähädiolisen metoksi-PEG:n aktivoinnin, jonka keskimääräinen moolimassa on noin 1 000 - 15 000, edullisemmin noin 2 000 - 10 000 ja edullisimmin noin 4 000 - 6 000 daltonia ja joka sisältää korkeintaan noin 10 % monometoksyloimatonta PEG:tä, sukkinyloimalla se LDPEG-sukkinaatin (LDPEG-S) muodostamiseksi, edullisesti meripihkahappoanhydridillä (SA), mitä seuraavat reaktiivisen esterin muodostus, edullisesti N-hydroksisukkiini-imidin (NHS) avulla, jolloin muodostuu LDPEG-SS, ja LDPEG-SS:n saataminen sitten reagoimaan SOD:ssä helposti saavutettavissa olevien reaktiivisten asemien kanssa, edullisesti SOD:ssä esiintyvän primaarisen aminoryhmän kanssa, pääasiallisesti lysiinin ε-aminoryhmän kanssa.

Mitä tulee nimenomaan LDPEG-SOD:hen, prosessi on alla kuvatun kaltainen:



jossa kaaviossa

LDPEG-OH = vähädiolinen $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{OH}$, joka sisältää korkeintaan noin 10 paino-% $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$:ta;

LDPEG-S = vähädiolinen $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, joka sisältää korkeintaan 10 % $(\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO})_2\text{PEG}$:tä;

LDPEG-SS = vähädiolinen $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2)$, joka sisältää korkeintaan 10 % $[(\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2)\text{OOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}]_2\text{PEG}$:tä;

DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi;

bSOD = naudan peroksididismutaasi;

NHS = $(\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2)\text{OH}$, N-hydroksisukkiini-imidi;

$(\text{LDPEG})_n\text{bSOD}$ = (vähädiolinen $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$)_n-bSOD;

$(\text{LDPEG})_{n-1}\text{bSOD-S}$ = (vähädiolinen $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$)_{n-1}-bSOD- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$;

SHappo = meripihkahappo;

n on vähädiolisten PEG:iden lukumäärä SOD:tä kohden;

K_1 , K_{obs} , k_2 ja k_3 ovat reaktioiden nopeusvakioita.

Seuraavaksi kuvataan tämän keksinnön mukaisissa formuloissa käytettäviä olennaisia komponentteja.

Lähtöaineet, välituotteet ja reagenssit

Peroksididismutaasi

Peroksididismutaasi on ryhmälle entsyymejä, jotka katalysoivat anionisen peroksidiradikaalin (O_2^-) hajoamista hapeksi ja vetyperoksidiksi, annettu nimi.

SOD tunnetaan International Union of Biochemistryn systemaattisessa nimistössä peroksididioksidoreduktaasina, ja sen luokitusnumero on 1.15.1.1. Sellaisia aineita on kutsuttu orgoteiineiksi ja hemokupreineiksi samoin kuin peroksididismutaaseiksi, ja niiden moolimassa vaihtelee noin 4 000:sta noin 48 000:een. Kupari-sinkkidismutaasit ovat huomattavan hyvin säilynyt ryhmä, mitä rakenteellisiin kokonaisominaisuuksiin tulee. Puhdistettujen entsyymien on osoitettu olevan poikkeuksetta dimeerejä (moolimassa tavallisesti 31 000 - 33 000), jotka sisältävät kaksi moolia sekä kupari- että sinkki-ioneja moolia kohden. Mangaani-rautaryhmään kuuluvat entsyymit eivät ole yhtä

homogeenisia mainituilta perusominaisuuksiltaan, kuten moolimassansa, alayksikkörakenteensa ja metallipitoisuutensa suhteen. Toiset ovat dimeerejä ja toiset tetrameerejä. Metallipitoisuus vaihtelee noin 0,5 moolista 1 mooliin/mooli polypeptidiketjualayksikköä. Luonnossa esiintyvien Zn:ä ja Cu:a sisältävien entsyymien, jotka ovat peräisin nisäkkäistä, ja niiden funktionaalisesti sopivien analogien ja mut(anttiprot)eiinien katsotaan olevan nisäkkäiden Zn-Cu-peroksididismutaaseja (mSOD).

Tämän keksinnön mukaisissa formulaissa mSOD voi olla peräisin mistä tahansa. Sitä saadaan kaupallisesti naudan punasoluista ja ihmisen punasoluista samoin kuin rekombinaatiotekniikalla mikro-organismeissa, kuten *E. coli*ssa ja hiivassa, valmistamalla. Muiden lähteiden ohella naudan maksan kupari-sinkkiperoxididismutaasia (SOD, EC 1.15.1.1) on esimerkiksi saatavissa yhtiöltä DDI Pharmaceuticals, Inc. (Mountain View, Kalifornia).

Polyalkeenioksidi, josta käytetään tässä esimerkkinä polyeteeniglykolia

Sovellettaessa tätä keksintöä käytännössä biologisesti aktiivisiin proteiineihin liitettävänä polyalkeenioksidina käytetään edullisesti vähädiolista PEG:tä. Vaikka moolimassaltaan tietynlaisia metoksipolyeteeniglykoleja on kaupan (esimerkiksi metoksi-PEG₅₀₀₀:ta saatiin Union Carbide Corporationilta kahdessa muodossa: tavanomaisesti saatavissa olevana runsasdiolisena metoksi-PEG₅₀₀₀:na, joka sisälsi 14 - 17 % moolimassaltaan suurehkoa PEG-diolia, ja vähädiolisena tuotteena, joka sisälsi alle 4 % PEG-diolia), jotkut on tarpeen valmistaa ja puhdistaa PEGoidun proteiinin aikaansaamiseksi, jolla on pieni immunogeenisuus. Esimerkiksi SOD:n PEGointi jostakin kaupallisesta lähteestä peräisin olevalla metoksi-PEG-SS:llä johtaa tuotteeseen, joka sisältää suurimoolimassaisia komponentteja, minkä vahvistaa kokoekskluusiokromatografia. Mainitun suurimoolimassaisen tuotteen arvellaan olevan seuraus-

ta proteiinin silloittumisesta aktiivisen diesterin välityksellä, jota esteriä muodostuu niistä vaihtelevista määristä PEG-diolia, joita kaupallisissa M-PEG:n lähteissä esiintyy. Eri aktiiviset esterit ovat, vaikka sijaitsevatkin samassa polymeeriketjussa, kuitenkin kemiallisesti kaukana toisistaan. Toisen reaktiivisen funktionaalisen ryhmän esiintymisellä polymeerissa on siten yleensä yhä vähäisempi ja vähäisempi vaikutus ensimmäisen reaktiivisen funktionaalisen ryhmän reaktiokykyyn kyseisiä kahta funktionaalista ryhmää erottavan matkan kasvaessa. Reaktiivisuudet ovat siis yleensä riippumattomia polymeeriketjun vastakkaisissa päissä esiintyvistä osista eikä silloittumista voida välttää laimentamatta reagensseja määrättömästi. Niinpä on tärkeätä valmistaa M-PEG-SS, josta tiedetään, että se sisältää hyvin vähän eikä edullisesti sisällä lainkaan diesteriä. S. Zalipsky et al. ovat julkaisussa Journal of Bioactive and Compatible Polymers 5 (huhtikuu 1990) 227 - 231 kuvanneet polyeteeniglykoli 2000:n erottamista metoksipolyeteeniglykoli 2000:sta. Myös sukkinaatti-estereitä on valmistettu ja osoitettu saatavan erotetuiksi ioninvaihtokromatografian avulla DEAE-Sephadexia käyttäen. Valmistusmenetelmä on esitetty esimerkissä 3.

Vaikka esimerkissä 3 kuvattu menettelytapa toimii hyvin PEG 2000:n yhteydessä, se ei toimii suurempimoolimassaisten PEG:iden yhteydessä. Moolimassaltaan suuremmat PEG-hapot eivät sitoudu anionisiin eivätkä kationisiin hartseihin; polyeteenirungon suuremman massan arvellaan peittävän kaikki happosivuryhmän ioniset ominaisuudet. On todettu, että PEG-sukkinaattien sitomiseksi vaadittiin puskuriaine, jonka ionivahvuus on äärimmäisen pieni, ja ne eluoituivat niin, että ionivahvuus kasvoi hyvin vähän, mikä on merkki siitä, että hartsi pidättää niitä vain hyvin heikosti.

On havaittu, että moolimassaltaan suuremmat metoksi-PEG:t voidaan erottaa diolikomponenteista, jos funktio-

naaliset hydroksyyli-ryhmät muunnetaan ensin dimetoksitri-tyyli-ettereiksi (DMT-ettereiksi), ennen kuin sovelletaan käänteisfaasiohukkeroskromatografiaa. Hydroksyyli-ryhmät voidaan vapauttaa happokäsittelyllä.

5 Metoksi-PEG₅₀₀₀-dimetoksitri-tyyli-johtannaisten (M-PEG-DMT) valmistuksen ja puhdistuksen kulku on seuraavanlainen, kun taas yksityiskohdat on esitetty esimerkeissä 4 - 7.

10 M-PEG-DMT ja DMT-PEG-DMT valmistetaan samalla tavalla. Polyeetteri liuotetaan etanolittomaan kloroformiin, ja liuos kuivataan tislamalla noin puolet kloroformista pois ilmakehän paineessa argonvaipan alla. Liuoksen annetaan sitten jäähtyä argonin alla huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen lisätään perätysten ylimäärin di-isopropyyli-etyyliamiinia (1,5 ekv.), katalyytiksi 10 mol-% dimetyyliamiinopyridiiniä ja lopuksi ylimäärin 4,4-dimetoksitri-tyyli-kloridia (1,2 ekv.). 15 tunnin reagoinnin jälkeen liuos väkevöidään pyöröhaihduttamalla ja lisätään vedettömään eetteriin trityloidun PEG:n saostamiseksi. Normaalifaasi-
 20 TLC erottaa lähtöaineen hyvin tuotteesta PEG-rungon ollessa värjäytynyt Dragendorfin reagenssilla. Vaikka normaali-faasi-TLC ei erota M-PEG-DMT:tä DMT-PEG-DMT:stä, käänteis-faasi-TLC-levyt (C-18) erottavat M-PEG-DMT:n, DMT-PEG-DMT:n, DMT-kloridin ja DMT-alkoholin hyvin toisistaan
 25 (liikkuvana faasina asetonitriili-vesi-isopropanoliseos suhteessa 4:1:1). PEG-rungon varmistaa värjäytyminen oranssiksi Dragendorfin reagenssia käytettäessä, ja tri-tyyli-ryhmien liittyminen varmistetaan asettamalla levy alttiiksi HCl-höyryille, jolloin syntyy oranssi väri.

30 Autenttinen M-PEG-DMT 5000 on osoitettu saatavan erotetuksi hyvin autenttisesta DMT-PEG-DMT 8000:sta Waters C-8 -kolonnissa (Prep-Pak Bondapak -patruuna, huokoskoko 30 nm, hiukkaskoko 15 - 20 µm). Raaka-M-PEG-DMT liuotettiin ultraäänikäsittelyn avulla asetonitriiliin (30 %) ja
 35 veden seokseen niin, että sen pitoisuudeksi tuli 12 mg/ml,

ja laskettiin 2,5 μ m:n suodattimen läpi. Näyte laitettiin kolonniin liikkuvassa faasissa (2 g 25 ml:ssa), joka sisälsi 30 % asetonitriiliä vedessä. 8 minuuttia kestäneen isokraattisen eluoinnin jälkeen eluoitui epäpuhtaushuippu (tunnistamaton; sillä oli suuri absorbanssi aallonpituudella 280 nm, mutta sen suhteellinen massa oli hyvin pieni). Sen jälkeen aloitettiin asetonitriilipitoisuuden muuttaminen vedessä 21 minuutin aikana 30 %:sta 70:iin, ja haluttu M-PEG-DMT eluoitui asetonitriilipitoisuuden ollessa 58 - 60 %. Autenttinen DMT-PEG-DMT eluoituu tyypillisesti asetonitriilipitoisuuden ollessa 80 %. Ensimmäiset 3/4 halutusta huipusta kerätään talteen ja viimeinen 1/4 hylätään. Tällä tavalla saatiin 22,6 g:sta raaka-M-PEG-DMT:tä 15,4 g puhdistettua M-PEG-DMT:tä.

Trityyliryhmän lohkaistu M-PEG-DMT:sta tapahtuu seuraavasti:

Yritys poistaa DMT-ryhmä M-PEG-DMT:stä HCl:lla tuotti TLC:n mukaan (laimentamaton raakareaktioseos) tulokseksi trityyliryhmän täydellisen poistumisen. Kloroformiuutteen väkevöinti sai kuitenkin aikaan takaisinreagoinnin, jonka tuloksena huomattava osa PEG:stä trityloitui uudelleen. Sitä ei ollut mahdollista puhdistaa selektiivisesti saostamalla. Hydratoitunut trityylikationi ja kloridi ovat ilmeisesti tasapainotilassa sillä seurauksella, että dehydratoituminen, jollainen tapahtuu esimerkiksi liuottimen poiston aikana, tuottaa huomattavia määriä DMT-kloridia. Tämä uudelleen trityloituminen voidaan estää käyttämällä vasta-iona, joka ei johda tasapainotilaan. Rikkihapon on osoitettu poistavan trityyliryhmän M-PEG-DMT:stä irreversiibelisti. Rikkihapolla lohkaistu M-PEG uutetaan kloroformiin, väkevöidään ja saostetaan eetterillä, jolloin saadaan puhdasta diolitonta M-PEG:tä. Tällä tavalla saatiin 10 g:sta M-PEG-DMT:tä lohkaistuksi 8,68 g diolitonta M-PEG:tä. Kokoekskluusiokromatografia osoittaa viimeksi mainitun aineen sisältävän alle 0,3 % diolia.

Muita metoksi-PEG-johdannaisia, joilla on suurehko moolimassa, voidaan valmistaa vastaavin menetelmin.

Keksintöä kuvataan nyt seuraavin esimerkein, jotka valaisevat vähädiolinen PEG - proteiini-konjugaattien valmistusta kompleksien muodostamiseksi syklodekstriinien kanssa mutta joita ei ole tarkoitettu keksintöä millään tavalla rajoittaviksi.

A. Metoksipolyeteeniglykolisukkinaatti (M-PEG-S)

Metoksi-PEG₅₀₀₀ (M-PEG; 100 g, 0,02 mol) liuotettiin 2 litran pullossa lämpimään (40 °C) vedettömään tolueeniin (300 ml) samalla sekoittaen. Tilavuutta pienennettiin poistamalla liuoksesta atseotrooppisesti tolueenia (147 ml) typpikaasukehän alla M-PEG:n vesipitoisuuden alentamiseksi 1,73 %:sta 0,23 %:iin. Ympäristön lämpötilaan jäähdytyksen jälkeen lisättiin kuivaa dikloorimetaania (233 ml), jota seurasivat meripihkahappoanhydridi (3,0 g, 0,09 mol) ja 4-dimetyyliaminopyridiini (DMAP; 1,1 g, 0,01 mol) Reaktioseosta sekoitettiin ja kuumentettiin palautusjäähdytysolosuhteissa yön yli, ja sen jälkeen poistettiin dikloorimetaania (200 ml) alennetussa paineessa. Jäännös lisättiin eetteriin (1,6 l), joka oli 4 litran pullossa, samalla sekoittaen. Seosta sekoitettiin 45 minuuttia ja se suodatettiin. Suodatuskakku pestiin eetterillä (70 ml) ja kuivattiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin 100,4 g M-PEG-sukkinaattiraakatuotetta (M-PEG-S) valkeana kiinteänä aineena, joka sisälsi DMAP:tä.

M-PEG-S-raakatuote (100 g) liuotettiin dikloorimetaaniin (633 ml) ja laskettiin pylvään läpi, joka sisälsi Dowex 50x8-100H+ -hartsia (114 g), joka oli sitä ennen pesty dioksaanilla (272 ml) ja sen jälkeen dikloorimetaanilla (316 ml). Pylväs huuhdottiin sitten lisäerällä (316 ml) dikloorimetaania, ja eluaatit yhdistettiin ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla. Dikloorimetaania (800 ml) poistettiin alennetussa paineessa. Jäljel-

le jäänyt liuos lisättiin eetteriin (1600 ml), joka oli 4 000 ml:n pullossa, samalla sekoittaen. 30 minuutin sekoituksen jälkeen suspension annettiin seistä 30 minuuttia ja sitten se suodatettiin. Suodatuskakku pestiin sitten eetterillä (75 ml) ja kuivattiin alennetussa paineessa. Näin saatiin 96,0 g (saanto 94 %) M-PEG-S:ää valkeana kiinteänä aineena, jonka protoni-NMR-spektri vastasi päämääräksi asetettua rakennetta: ^1H -NMR (CDCl_3): 4,27 (tripletti, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$), 3,68 (suuri singletti, joka ylitti asteikon, PEG-metyleenit $\text{O}-\text{CH}_2-$), 3,39 (singletti, 3 H, OCH_3) ja 2,65 (kapea multipletti, 4 H, $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$) ppm. Karboksyylihappopitoisuus 0,000207 mol/g mitattiin titraamalla.

B. Metoksipolyeteeniglykoli-N-sukkiini-imidyylisukkinaatti (M-PEG-SS)

Metoksipolyeteeniglykolisukkinaatti (M-PEG-S; 99,48 g, 0,0192 mol) liuotettiin 2 litran pullossa kuivaan tolueeniin (468 ml) lämmittäen ne lämpötilaan 40 °C. Liuos suodatettiin ja sen tilavuutta pienennettiin 263 ml atseotrooppisella tislauksella typen alla. Tulokseksi saatu viskoosi neste siirrettiin typen alla kolmikaulaiseen 1 litran pulloon kuivaa dikloorimetaania (225 ml) käyttäen. Siihen lisättiin NHS:ää (2,22 g, 0,0192 mol) ja reaktioseosta sekoitettiin, kunnes NHS liukeni. Reaktioseos jäähdytettiin sitten jäähähteessä lämpötilaan 5 °C, ja siihen lisättiin pisaroittain 5 minuutin aikana liuos, joka sisälsi DCC:tä (4,44 g, 0,0125 mol) dikloorimetaanissa (24 ml). Dikloorimetaani-DCC-liuoksen lisäyksen aikana reaktioseoksesta alkoi kiteytyä disykloheksyyliureaa (DCU). Reaktioseoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan ja sitä sekoitettiin yön yli. Reaktiopullon sisältö siirrettiin 2 litran pulloon käyttäen pullon huuhtomiseen dikloorimetaania (25 ml). Alipaineessa ja lämpötilassa 30 °C poistettiin dikloorimetaania (250 ml), suspensio suodatettiin ja suodatuskakku pestiin kuivalla to-

lueenilla (25 ml). Sen jälkeen suodos lisättiin vedettömään eetteriin (1,2 l) ja tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 45 minuuttia, ennen kuin se suodatettiin. Suodatuskakku huuhdottiin kuivalla eetterillä (100 ml) ja
 5 sitä kuivattiin lateksikumisulun alla 2 tuntia. Tulokseksi saatu kiinteä aine kuivattiin sitten suuressa alipaineessa ja siirrettiin pulloon käsittelypussissa argonin alla. Näin saatiin 96,13 g (saanto 96,1 %) otsikon mukaista yhdistettä (M-PEG-SS) valkeana kiinteänä aineena, jonka protoni-NMR-spektri vastasi päämääräksi asetettua rakennetta:
 10 ^1H -NMR (CDCl_3): 4,32 (tripletti, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$), 3,68 (suuri singletti, joka ylitti asteikon, PEG-metyleenit $\text{O}-\text{CH}_2-$), 3,39 (singletti, 3 H, OCH_3), 2,99 ja 2,80 (triplettipari, kumpikin 2 H, sukkinatoin $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$)
 15 sekä 2,85 (singletti, 4 H, sukkiini-imidin $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$) ppm. Aktiivisen esterin pitoisuus tuotteessa määritettiin antamalla sen reagoida ylimäärän kanssa bentsyyliamiinia tolueenissa, mitä seurasi takaisintitraus perkloorihapolla dioksaanissa metyyllipunapäätepiteeseen, ja
 20 sen todettiin olevan 0,000182 mol/g.

C. Vähädiolinen PEG-SOD

SOD:n vesiliuos (11,8 g), joka sisälsi 82,1 mg proteiinia/g, laimennettiin natriumfosfaattipuskurilla (0,1 mol/l, pH 7,8) kokonaismassaan 200 g. Saatuun liuokseen liuokseen, jota sekoitettiin magneettisesti ja joka oli lämmitetty 30 °C:seen, lisättiin esimerkissä 1B valmistettua vähädiolista metoksi-PEG-SS:ää (3,4 g). Reaktioseoksen pH pidettiin arvossa 7,8 käyttämällä Mettler DL25-titrauslaitetta, joka oli ohjelmoitu pitämään pH vakiona
 25 lisäämällä tarvittaessa 0,5 N natriumhydroksidiliuosta. Tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin vähän proteiinia sitovan polysulfonisuodattimen (0,2 μm) läpi, väkevöitiin suunnilleen tilavuuteen 60 ml käyttäen ruostumattomasta teräksestä valmistettua Millipore Mini-tan -laitetta, joka
 30 oli varustettu kalvolla (4pk), jonka NMWL on 30 000, ja

diasuodatettiin sitten natriumfosfaatilla (50 mmol/l) pus-
kuroitua fysiologista suolaliuosta (0,85 %, 2 l) vastaan,
jonka pH oli 6,2 - 6,3. Retentaattiliuos, joka sisälsi
vähädiolista PEG-SOD:tä, suodatettiin sitten 0,2 µm:n suo-
dattimen läpi.

Esimerkki 2

A. Monometoksipolyeteeniglykolisukkinaatti

Kolmikaulaiseen 12 litran pulloon laitettiin tolu-
eenia (4 l) ja metoksipolyeteeniglykolia (2,212 g), jotka
oli kuumennettu sitä ennen lämpötilaan 70 °C typen alla.
Tilavuutta pienennettiin poistamalla liuoksesta atseo-
trooppisesti tolueenia (1,3 l) alennetussa paineessa. Läm-
pötilaan 30 °C jäähdytyksen jälkeen lisättiin dikloorime-
taania (4 l), jota seurasivat SA (66,4 g) ja dimetyyliami-
nopyridiini (24,4 g). Reaktioseosta kuumennettiin palau-
tusjäähdytysolosuhteissa 32 tuntia, jonka jälkeen poistet-
tiin dikloorimetaania (3,8 l) ilmakehän paineessa. Reak-
tioseos jäähdytettiin ja kaadettiin lasiseen 32 litran
(7 gal) koripulloon, joka sisälsi metyyli-t-butyylieette-
riä (28 l), samalla sekoittaen. Tulokseksi saatua suspen-
siota sekoitettiin 1 tunti ja suspendoitunut aine kerät-
tiin Lapp-suodattimelle. Suodatuskakku pestiin metyyli-t-
butyylieetterillä (1 l). Yön yli kuivaus vakuumiuunissa
huoneenlämpötilassa tuotti tulokseksi 2,252 kg otsikon mu-
kaista yhdistettä puhdistamattomana, valkeana, kiinteänä
aineena.

Puhdistamaton otsikon mukainen yhdiste liuotettiin
dikloorimetaaniin (8 l) ja laskettiin lasisen painepyl-
vään läpi, joka sisälsi Dowex 50W-X8 -hartsia (kationin-
vaihdin, vetymuoto; 3,0 kg), joka oli pesty sitä ennen
asetonilla (5 l) ja sitten dikloorimetaanilla (4 l). Pyl-
väs huuhdottiin sitten dikloorimetaanilla (3 l). Pylvästä
saadut eluaatit yhdistettiin ja niistä poistettiin di-
kloorimetaania (10 l) ilmakehän paineessa. Jäljelle jäänyt
liuos kaadettiin metyyli-t-butyylieetteriin (26 l) samalla

sekoittaen. Tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 45 minuuttia ja kiinteä aine poistettiin suodattamalla. Viimeksi mainittu pestiin metyyli-t-butyylieetterillä 3 l). Kuivaus vakuumiuunissa huoneenlämpötilassa tuotti tulokseksi 2,46 kg otsikon mukaista yhdistettä valkeana kiinteänä aineena (saanto 95 %). Tämä aine sisälsi 1,5 % metoksisipolyeteeniglykolia ja analyysi antoi pitoisuudeksi $2,72 \cdot 10^{-4}$ mol/g (teoreettinen on $1,96 \cdot 10^{-4}$ mol/g).

10 **B. Metoksisipolyeteeniglykoli-N-sukkiini-imidyylisukkinaatti**

Monometoksisipolyeteeniglykolisukkinaatti (1,5 kg) liuotettiin 12 litran pullossa tolueeniin (7,2 l) samalla lämmittäen. Liuoksen tilavuutta pienennettiin alennetussa paineessa 2,8 litraa veden poistamiseksi. Tulokseksi saatu viskoosi neste jäähdytettiin lämpötilaan 40 - 45 °C, ja siihen lisättiin dikloorimetaania (3,4 l) ja sen jälkeen NHS:ää (33,89 g). Reaktioseosta sekoitettiin, kunnes kaikki NHS liukeni (1 tunti), sen jälkeen reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan 10 °C ja siihen lisättiin pisaroit-
 20 tain 30 minuutin aikana DDC:n (67,75 g) dikloorimetaaniliuos (368 ml). Reaktioseoksen annettiin lämmetä hitaasti huoneenlämpötilaan, samalla kun sitä sekoitettiin 18 tun-
 25 tia. Sen tilavuutta pienennettiin sitten 3,2 litraa ilmakehän paineessa. Suspensio jäähdytettiin lämpötilaan 0 -
 30 5 °C ja sitä sekoitettiin 30 minuuttia. Se suodatettiin ja suodatuskakku pestiin tolueenilla (250 ml). Suodos ja pesuliuos lisättiin metyyli-t-butyylieetteriin (28 l) samalla sekoittaen. Tulokseksi saatua suspensiota sekoitettiin 45 minuuttia ja sitten se suodatettiin Lapp-suodatinta käyttäen. Suodatuskakku pestiin metyyli-t-butyylieetterillä (1 l), ja sitä kuivattiin lateksisulun alla 4 tun-
 tia. Lisäkuivaaminen vakuumiuunissa alennetussa paineessa ja huoneenlämpötilassa yön yli tuotti tulokseksi 1,5 kg valkeaa kiinteää ainetta (saanto 100 %). Tämän aineen ana-

lyysi antoi pitoisuudeksi $1,79 \cdot 10^{-4}$ mol/g (teoreettinen on $1,92 \cdot 10^{-4}$ mol/g).

C. Metoksipolyeteeniglykolisukkinoyylisubstituoitu naudan peroksididismutaasi

- 5 Lämpimään (29 - 30 °C) fosfaattipuskuriin (pH 7,8, 32 l), joka oli pH-elektrodin sisältävässä 42 litran reaktorissa, lisättiin naudan punasoluista peräisin olevaa peroksididismutaasia (194,0 g). Tilavuus säädettiin 39,5 litraksi ja reaktioseos lämmitettiin 29 °C:seen. pH-titrauslaitteesta tuleva natriumhydroksidiputki säädettiin reaktorin keskustan ylle välittömästi liuoksen pinnan yläpuolelle. pH-titrauslaite käynnistettiin ja pH säädettiin 0,5 N natriumhydroksidilla arvoon 7,8. Tässä vaiheessa lisättiin 2 minuutin aikana metoksipolyeteeniglykoli-N-sukkiini-imidyylisukkinaatti (614,7 g) ja reaktioseosta sekoitettiin 41 minuuttia, samalla kun pH pidettiin 0,5 N natriumhydroksidilla arvossa 7,8 ja reaktiolämpötila arvossa 30 °C. Sen jälkeen reaktioseos suodatettiin 200 Millipak -suodattimen läpi ja väkevöitiin käyttämällä Milliporen ruostumattomasta teräksestä valmistettua Pellicon-diasuodatusjärjestelmää. Reaktori huuhdeltiin sitten fosfaattipuskurilla (pH 6,2, 600 ml). Millipore 200 -suodattimen ja diasuodatusjärjestelmän läpi suodatuksen jälkeen huuhteluliuos lisättiin konsentraattiin. Konsentraatin lopullinen tilavuus oli 9 litraa. Konsentraatti diasuodatettiin sitten Milliporen Pellicon-diasuodatusjärjestelmää käyttäen fosfaattipuskuria (pH 6,2, 200 litraa) vastaan (suodatusaika 2,17 tuntia). Diasuodatusjärjestelmä huuhdeltiin fosfaattipuskurilla (pH 6,2, 1,5 l). Konsentraatin lopullinen tilavuus oli noin 8 litraa. Konsentraatti siirrettiin sitten linjaan kytketyn Millipore 200 Millipak -suodattimen kautta puhtaaseen lasiseen 32 litran (7 gal) koripulloon, ja suodatin huuhdeltiin fosfaattipuskurilla (pH 6,2, 500 ml). Näin saatiin 11,98 kg (saanto 91,4 %)

otsikon mukaista yhdistettä kirkkaana vihertävänsinisenä liuoksena (aktiivisuus: 32 960 yksikköä/ml).

Esimerkki 3

A. Osittain karboksimetyloidun polyeteenioksidin valmistus

5

10

15

20

25

30

Polyeteenioksidi, jonka M_v oli 2000 (Fluka; 25 g, 25 mekv. OH-ryhmiä), liuotettiin tolueeniin (120 ml) ja sitä kuivattiin atseotrooppisesti, kunnes Dean-Stark-loukkuun ei ilmestynyt enää lisää vettä (tolueenia poistettiin noin 25 ml). Liuos jäähdytettiin lämpötilaan 50 °C ja käsiteltiin kalium-t-butoksidilla (1,7 g, 15 mmol). Liuos kuumennettiin palautusjäähdytysolosuhteissa kiehu-
vaksi ja siitä tislattiin pois lisää liuotetta (noin 25 ml). Reaktioseos jäähdytettiin lämpötilaan 25 °C, ja
sitä käsiteltiin yön yli etyylibromiasetaatilla (3,4 ml, 16 mmol). Saostuneet suolat poistettiin painovoimaan perustuvalla suodatuksella ja pestiin dikloorimetaanilla (30 ml). Polymeeri saatiin talteen väkevöimällä suodos
osittain (noin tilavuuteen 60 ml) ja kaatamalla väkevöity suodos hitaasti etyyllieetteriin (300 ml), jonka lämpötila
oli 5 °C, samalla voimakkaasti sekoittaen. Kerätty valkea polymeerijauhe kuivattiin alipaineessa. Saanto: 24 g. IR-spektrissä (laimentamattomana) esiintyi esterille karakteristinen absorptio aaltoluvulla 1753 cm^{-1} . Polymeeri liuo-
tettiin 1 N NaOH:iin (50 ml), ja lisättiin NaCl:a (10 g). Noin 45 minuutin kuluttua liuoksen pH säädettiin 6 N HCl:lla arvoon 3,0 ja se uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 60 ml). Yhdistetyt orgaaniset faasit kuivattiin (MgSO_4),
väkevöitiin (noin tilavuuteen 50 ml) ja kaadettiin kylmään eetteriin (300 ml), jota sekoitettiin. Saostunut tuote
kerättiin suodattamalla ja kuivattiin alipaineessa. Saanto: 22 g. IR-spektrissä (laimentamattomana) esiintyi aaltoluvulla 1730 cm^{-1} , joka vastaa -karboksyyli-ryhmää.

B. Puhtaan α -hydroksi-omega-karboksimetyylipolyeteenioksidin valmistus erottamalla osittain karboksimetyloitu PEO DEAE-Sephadexilla

Homo- ja heterofunktionaalisen PEO:n seos (22 g)

5 liuotettiin veteen (40 ml) ja laitettiin pylvääseen, joka sisälsi DEAE-Sephadex A-25:tä (Sigma; 27 g, 0,1 mol ionin-

10 vaihtoasemia) tetraboraattimuodossa. Ensimmäinen jae, joka sisälsi muuttumatonta polymeeria, eluoitiin deionisoidulla vedellä. Eluaatin muututtua negatiiviseksi jäljellä olevan

15 PEG:n toteamiseen tarkoitettussa polyakryylitestissä (PAA-testissä) sovellettiin ammoniumvetykarbonaatin asteittais-

20 ta ionigradianttia (pitoisuudesta 6 mmol/l pitoisuuteen 22 mmol/l pitoisuuden kohotessa joka 100 ml:n jälkeen 1 - 2 mmol/l) ja aloitettiin jakeiden (kukin noin 40 ml) ke-

25 räys. Jakeet 2 - 21 olivat PAA-testissä positiivisia ja sisälsivät puhdasta monokarboksyloitua PEO:ta ($R_1 = 0,49$). Seuraavat 3 jaetta eivät sisältäneet PEO:ta, kun taas ja-

30 keet 25 - 36 sisälsivät puhdasta PEO-dihappoa ($R_1 = 0,26$). Jakeet, jotka sisälsivät α -hydroksi-omega-karboksimetyyli-

polyeteenioksidia, yhdistettiin ja väkevöitiin (noin tila-

vuuteen 100 ml). Saatuun liuokseen lisättiin natriumklori-

dia (35 g), ja sen jälkeen liuoksen pH säädettiin arvoon 3 ja se uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 100 ml). Yhdistet-

ty CH_2Cl_2 -liuos kuivattiin (MgSO_4), väkevöitiin (noin tila-

vuuteen 100 ml) ja kaadettiin hitaasti kylmään eetteriin

(500 ml), jota sekoitettiin. Saostunut polymeeri kerättiin

talteen ja kuivattiin perinpohjaisesti alipaineessa, jol-

loin saatiin 8,8 g tuotetta. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 172,7

(COOH), 72,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 70,4 (PEO), 69,0 (CH_2COOH), 61,3

(CH_2OH) ppm.

Myös pylväästä eristetty biskarboksimetyylipolyeteenioksidi analysoitiin. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 172,4 (COOH), 70,4 (PEO), 68,8 (CH_2COOH) ppm.

Esimerkki 4**Dimetoksitrityyylimetoksipolyeteeniglykolin valmistus**

Metoksipolyeteeniglykoli (keskimääräinen moolimassa
5 5000 daltonia; 36,3 g, 7,23 mmol) liuotettiin kloroformiin
(500 ml), mitä seurasi kloroformin (250 ml) poisto tislaa-
malla veden poistamiseksi. Pulloon kiinnitettiin kuivaus-
putki, ja liuoksen annettiin jäähtyä noin lämpötilaan
50 °C. Lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (1,8 ml,
10 10,3 mmol) ja sen jälkeen 4-dimetyyliaminopyridiiniä
(100 mg, 0,8 mmol, 10 mol-%) ja 4,4-dimetoksitrityyliklo-
ridiä (98 %, 2,9 g).

Seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa,
minkä jälkeen liuote poistettiin pyöröhaihduttamalla läm-
15 pötilassa 60 °C. Jäännös liuotettiin pieneen määrään klo-
roformia, ja M-PEG-DMT saostettiin lisäämällä liuos vedet-
tömään eetteriin (2 l). Sakka kerättiin talteen, kuivat-
tiin ja käsiteltiin kromatografisesti preparatiivisessa
käänteisfaasipylväässä (C-8 300A) Waters LC4000 -systee-
20 missä käyttäen 20 minuutin aikana 30 %:sta 95 %:iin muut-
tuvaa asetonitriilipitoisuutta (vedessä). Haluttu tuote
eluoitui asetonitriilipitoisuuden ollessa 58 - 60 %. Näy-
te (2 g) laitettiin asetonitriiliin (30 %) ja veden seok-
sessa (20 ml) pylvääseen virtausnopeudella 50 ml/min. Tä-
25 män eluentin (30 % asetonitriiliä vedessä) annettiin jat-
kaa isokraattisesti, kunnes saatiin eluoiduksi suuri epä-
puhtaushuippu (tyypillisesti 3 - 5 min, 280 nm). Tämän
ensimmäisen huipun eluoiduttua aloitettiin pitoisuuden
muuttaminen. Seuraavaksi eluoituva huippu oli haluttu me-
30 toksi-PEG-DMT 5000. Ensimmäiset 3/4 huipusta kerättiin
talteen ja huipun loppupää hylättiin.

Tällä tavalla puhdistettiin 22,6 g raaka-M-PEG-DMT
5000:ta 2 g:n erissä, jolloin saatiin 15,44 g otsikon mu-
kaista tuotetta.

Esimerkki 5**Diolittoman metoksipolyeteeniglykolin valmistus dimetoksitrityyylimetoksipolyeteeniglykolista**

M-PEG-DMT 5000 (10 g) laitettiin 500 ml:n pulloon
 5 ja liuotettiin Milli-Q-veteen (320 ml). Lisättiin hitaasti
 rikkihappoa (80 ml), jolloin sen pitoisuudeksi tuli 20 %.
 Liuos muuttui punaiseksi ja homogeeniseksi. Yön yli sekoi-
 tuksen jälkeen happoliuos uutettiin kloroformilla (2 x
 500 ml), yhdistetyt uuttoliuokset kuivattiin MgSO_4 :lla ja
 10 väkevöitiin, ja punainen öljy kaadettiin ohuena virtana
 vedettömään eetteriin (2 l), jonka lämpötila oli 20 °C.
 Sakan annettiin laskeutua 24 tuntia. Se kerättiin karkeal-
 la lasisintterillä varustettuun suppiloon ja pestiin sit-
 ten vedettömällä eetterillä (2 x 200 ml). Sakkakakku ri-
 15 kottiin ja kuivattiin alipaineessa, jolloin saatiin 8,68 g
 metoksi-PEG 5000:ta (diolitonta).

Esimerkki 6**Diolittoman metoksipolyeteeniglykolisukkinaatin valmistus diolittomasta metoksipolyeteeniglykolista**

20 M-PEG-OH 5000 (4,7 g, 0,94 mmol) liuotettiin tolu-
 eeniin (100 ml). Liuos kuumennettiin palautusjäähdytysolo-
 suhteissa kiehuvaaksi ja käytettiin Dean-Stark-loukkua mah-
 dollisen veden poistamiseksi. Tunnin palautusjäähdytyksen
 jälkeen poistettiin kaikkiaan 80 ml tolueenia tislaamalla
 25 ja astian, joka sisälsi 20 ml tolueenia, annettiin jäähtyä
 argonylipaineen alla. Lisättiin meripihkahappoanhydridiä
 (110 mg, 1,1 mmol) ja sen jälkeen 4-dimetyyliaminopyridiiniä
 (137 mg, 1,12 mmol). Koska meripihkahappoanhydridi ei
 liuennut, lisättiin kuivaa etanolitonta kloroformia ja
 30 liuosta pidettiin palautusjäähdytysolosuhteissa uunissa
 kuivattua jäähdytintä käyttäen. 15 tunnin palautusjäähdy-
 tyksen jälkeen liuos jäähdytettiin, ja sen jälkeen sitä
 sekoitettiin kationinvaihtohartsin (10 g) kanssa, se suo-
 datettiin ja suodos väkevöitiin, jolloin saatiin otsikon
 35 mukaista yhdistettä.

Esimerkki 7**Diolittoman metoksipolyeteeniglykolisukkiini-imidyylisukkinaatin valmistus diolittomasta metoksipolyeteeniglykolisukkinaatista**

5 Liuos, joka sisälsi esimerkissä 6 valmistettua M-PEG-sukkinaattia (4,15 g, 0,83 mmol) tolueenissa (100 ml), kuivattiin atseotrooppisesti. Osa tolueenista (60 ml, jolloin reaktiopulloon jäi 40 ml) tislattiin pois, ja lisättiin NHS:ää (100 mg, 0,87 mmol) ja sen jälkeen
 10 varovasti kuivaa etanolitonta kloroformia (30 ml). Lisää (25 ml) sekaliuotetta poistettiin tislaamalla, ja liuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan argonin alla. Lisättiin DCC:tä (200 mg, 9,7 mmol) ja sekoitettiin liuosta. 10 minuutin kuluttua alkoi kiteytyä disykloheksyyliureaa
 15 (DCU). Kahden vuorokauden sekoituksen jälkeen lisättiin lisää (25 mg, 0,22 mmol) NHS:ää. DCU-liete suodatettiin ja sakka pestiin tolueenilla. Suodos väkevöitiin pyöröhaihduttamalla, jolloin saostui lisää DCU:ta. Suodatettu konsentraatti lisättiin pisaroittain vedettömään eetteriin
 20 (1 l). Sakka kerättiin Whatman 6F/F -lasikuitusuodattimelle (9 cm) ja sitä kuivattiin sitten suuressa alipaineessa 15 tuntia, jolloin saatiin 3,37 g M-PEG-SS:ää.

 Aktiivisen esterin pitoisuus: $1,71 \cdot 10^{-4}$ mol/g. HPLC osoitti seuraavat: M-PEG-S:ää 1,3 %; muita epäpuhtauksia
 25 1,2 %; CDU:ta ei havaittu lainkaan; epäpuhtauksia yhteensä 3 %.

Esimerkki 8**Diolittoman PEG-SOD:n valmistus**

 Peroksididismutaasi (1,33 ml varastoliuosta, jonka
 30 väkevyys on 75 mg/ml) lisättiin reaktiopuskuriin (100 mmol natriumfosfaattia/l, pH 7,8; 18,67 ml) ja liuos lämmitettiin 30 °C:seen. Lisättiin esimerkissä 7 valmistettua M-PEG-SS:ää (300 mg) yhdessä erässä ja pH pidettiin arvossa 7,8 käyttämällä pH:n vakiona pitävää laitetta. 28
 35 minuutin kuluttua reaktioseoksen pH ei pyrkinyt enää muut-

tumaan ja näyte väkevöitiin käyttämällä Centrium-sentrifugointikalvoa, jolla katkaisumoolimassaraja on 10 000. Väkevöity näyte vaihdettiin tällä tavalla Dulbeccon PBS:n kanssa, jonka pH oli säädetty 1 M HCl:lla arvoon 6,2. Tehtiin viisi vaihtoa, joiden tilavuus oli yhteensä 60 ml. Kokoekskluusio-HPLC toi esille mitättömän suurta moolimassaa edustavan huipun, mikä on merkki siitä, että otsikon mukainen yhdiste sisälsi mitättömiä määriä diolista saatua ainetta (ts. se oli "dioliton").

10 Muiden PEG:hen kovalenttisesti liitettyjen, biologisesti aktiivisten proteiinien valmistus

Esimerkki 9

(Vähädiolinen metoksipolyeteeniglykoli)sukkinoyylikatalaasin valmistus

15 Katalaasin vesisuspensio (4,17 ml), joka sisälsi 24,0 mg proteiinia/ml, laimennettiin natriumfosfaattipuskurilla (0,1 mol/l, pH 7,8; 15,84 ml). Laimennettuun liuokseen, jota sekoitettiin magneettisesti ja joka oli lämmitetty 30 °C:seen, lisättiin vähädiolista metoksi-PEG-SS:ää (550 mg). Reaktioseoksen pH pidettiin arvossa 7,8
20 käyttämällä Mettler DL25 -titrauslaitetta, joka oli ohjelmoitu pitämään pH vakiona lisäämällä tarvittaessa 0,5 N natriumhydroksidiliuosta. 0,5 tunnin kuluttua reaktioseos suodatettiin vähän proteiinia sitovan polysulfonisuo-
25 dattimen (0,45 µm) läpi ja sijoitettiin kahteen Amicon Centriprep 30 -väkevöintilaitteeseen (kalvon NMWL 30 000) ja puskuri vaihdettiin useaan kertaan Dulbeccon PBS:n kanssa. Retentaattiliuos, joka sisälsi vähädiolista PEG-katalaasia, suodatettiin sitten 0,2 µm:n suodattimen läpi. Konjugaat-
30 in muodostuminen osoitettiin SEHPLC:n ja geelielektroforeesin avulla.

Esimerkki 10**Vähädiolinen PEG - ovalbumiini-konjugaatin valmistus**

Ovalbumiini (Sigma; 503 mg) liuotettiin polyeteeni-dekantterissa, joka sisälsi teflonpäällysteisen magneettisekoitussauvan, huoneenlämpötilassa fosfaattipuskuriin (0,25 mol/l, pH 7,8; 50 g). 15 minuutin sekoituksen jälkeen lisättiin yhdellä kertaa vähädiolinen M-PEG₅₀₀₀-SS (1900 g). Reaktioseoksen pH pidettiin arvossa 7,8 Mettler DL25 -säätelylaitteella, joka lisäsi tarvittaessa 0,5 N NaOH:a. Reaktion annettiin jatkua 1 tunti huoneenlämpötilassa, ja sen jälkeen reaktioseos diasuodatettiin Amicon YM30 -kalvon läpi käyttämällä sekoituskammiolla varustettua laitetta, jota käytettiin argonin alla [paine 170 kPa (25 psi)] yön yli jääkaapissa, jossa lämpötila oli 4 °C. Sen jälkeen kun 800 ml puskuria oli diasuodatettu, tuote väkevöitiin ultrasuodattamalla, suodatettiin 0,2 µm:n polysulfonisuodattimen läpi ja pakattiin pieniin steriileihin lasipulloihin, jolloin saatiin 44,3 g liuosta, jonka proteiinipitoisuus oli 10,5 mg/ml. Proteiinin muuntoasteeksi määritettiin 71,4 % lyysiiniaminoryhmien titrausanalyysillä.

Esimerkki 11**(Vähädiolinen M-PEG_{5K})-S-ovalbumiinin valmistus**

Vähädioliseen M-PEG_{5K}-SS:ään (382 mg) lisättiin kylmä liuos (10 ml), joka sisälsi 10 mg/ml ovalbumiinia (Sigma, laatu VI) fosfaattipuskurissa (0,25 mol/l, pH 7,4), ja seosta sekoitettiin 16 tuntia lämpötilassa 5 °C. Tuote puhdistettiin Centriprep 30 -väkevöintilaitteessa (Amicon; kalvon NMWL 30 000) käyttäen vaihtopuskurina Dulbeccon PBS:ää. Puhdistettu liuos suodatettiin 0,2 µm:n suodattimen läpi, jolloin saatiin 6,539 g tuotetta, joka sisälsi 13,8 mg proteiinia/ml, jonka proteiinin muuntoaste oli 74 % (TNBS-titrausmenetelmä).

Ovalbumiinin (100 mg) annettiin reagoida samalla tavalla vähädiolisen M-PEG_{5K}-SS:ään (283 mg), jolloin saatiin 6,274 g tuotetta, joka sisälsi 13,8 mg proteiinia/ml, jonka proteiinin muuntoaste oli 74 %.

- 5 Ovalbumiinin (100 mg) annettiin reagoida samalla tavalla vähädiolisen M-PEG_{5K}-SS:ään (190 mg), jolloin saatiin 5,704 g tuotetta, joka sisälsi 16,8 mg proteiinia/ml, jonka proteiinin muuntoaste oli 67 %.

Esimerkki 12

- 10 (Vähädiolinen M-PEG_{5K})-S-rhuIL4:n valmistus

- 15 Liuos (190 µl), joka sisälsi 5,26 mg rhuIL-4:ää (Immunex)/ml, laimennettiin boraattipuskurilla (0,1 mol/l, pH 8,5; 772 µl). rhuIL-4-liuokseen lisättiin sitten liuos (29,2 µl), joka sisälsi 24 mg vähädiolista metoksi-PEG-SS:ää/ml DMF:ssä. Sen jälkeen kun reaktioseosta oli pidetty huoneenlämpötilassa 1 tunti 20 minuuttia, se sentrifugoitiin ja ruiskutettiin suoraan preparatiiviseen SEHPLC-pylvääseen. Puhdistettu konjugaatti osoittautui geelielektroforeesissa pohjimmiltaan yhdeksi ainoaksi vyöhykkeeksi.

- 20 Esimerkki 13

(Vähädiolinen M-PEG_{5K})-S-NT:n valmistus

- 25 Vähädioliseen M-PEG_{5K}-SS:ään (174 mg) lisättiin liuos, joka sisälsi neurotensiiniä (NT) (BaChem; 8,7 mg) fosfaattipuskurissa (0,25 mol/l, pH 7,8; 2,175 ml). Reaktioseos pidettiin 1,75 tuntia huoneenlämpötilassa ja laitettiin sitten jääkaappiin. Puhdas monometoksi-PEG_{5K}-S-NT saatiin sen jälkeen, kun se oli erotettu NT-PEG_{8K}-NT:stä preparatiivisen käänteisfaasi-HPLC:n avulla C-8-pylväässä käyttäen eluoinnissa vesi-asetonitriiligradiienttia.

- 30 Tämän keksinnön mukaiset formulat valmistetaan tavanomaisin menettelytavoin, jotka ovat ammattimiehille tuttuja. Formulot voivat haluttaessa sisältää sakkaroosia tai trehaloosia.

- 35 Yksityiskohtaisia formuloita on kuvattu taulukossa I, jossa HPCD tarkoittaa hydroksipropyylisyklodekstriiniä.

Taulukko I

	Esim.	PEG-SOD (yks./ml)	Fosfaatti- puskuri (mmol/l)	pH	HPCD (%, m/v)	Sakkaroosi (%, m/v)
5						
	14	25,000	10	6,2	--	5
	15	50,000	10	6,2	--	5
	16	75,000	10	6,2	--	5
10	17	100,000	10	6,2	--	5
	18	125,000	10	6,2	--	5
	19	150,000	10	6,2	--	5
	20	25,000	10	6,2	--	10
	21	50,000	10	6,2	--	10
15	22	75,000	10	6,2	--	10
	23	100,000	10	6,2	--	10
	24	125,000	10	6,2	--	10
	25	150,000	10	6,2	--	10
	26	25,000	10	6,2	--	20
20	27	50,000	10	6,2	--	20
	28	75,000	10	6,2	--	20
	29	100,000	10	6,2	--	20
	30	125,000	10	6,2	--	20
	31	150,000	10	6,2	--	20
25	32	25,000	10	6,2	5	--
	33	50,000	10	6,2	5	--
	34	75,000	10	6,2	5	--
	35	100,000	10	6,2	5	--
	36	125,000	10	6,2	5	--
30	37	150,000	10	6,2	5	--
	38	25,000	10	6,2	10	--
	39	50,000	10	6,2	10	--
	40	75,000	10	6,2	10	--
	41	100,000	10	6,2	10	--
35	42	125,000	10	6,2	10	--
	43	150,000	10	6,2	10	--

Taulukko I - jatkoa

	Esim.	PEG-SOD (yks./ml)	Fosfaatti- puskuri (mmol/l)	pH	HPCD (%, m/v)	Sakkarooosi (%, m/v)
5						
	44	25,000	10	6,2	20	--
	45	50,000	10	6,2	20	--
	46	75,000	10	6,2	20	--
10	47	100,000	10	6,2	20	--
	48	125,000	10	6,2	20	--
	49	150,000	10	6,2	20	--
	50	25,000	10	6,2	5	5
	51	50,000	10	6,2	5	5
15	52	75,000	10	6,2	5	5
	53	100,000	10	6,2	5	5
	54	125,000	10	6,2	5	5
	55	150,000	10	6,2	5	5
	56	25,000	10	6,2	10	10
20	57	50,000	10	6,2	10	10
	58	75,000	10	6,2	10	10
	59	100,000	10	6,2	10	10
	60	125,000	10	6,2	10	10
	61	150,000	10	6,2	10	10
25	62	25,000	10	6,2	15	5
	63	50,000	10	6,2	15	5
	64	75,000	10	6,2	15	5
	65	100,000	10	6,2	15	5
	66	125,000	10	6,2	15	5
30	67	150,000	10	6,2	15	5
	68	25,000	10	6,2	5	15
	69	50,000	10	6,2	5	15
	70	75,000	10	6,2	5	15
	71	100,000	10	6,2	5	15
35	72	125,000	10	6,2	5	15
	73	150,000	10	6,2	5	15

Tämän keksinnön mukaiset formulat kylmäkuivataan seuraavaa menetelmää käyttäen.

Formulalla täytettäväksi valitaan tarvittavan kokoisia pulloja ottaen huomioon annosvaatimukset. Valittaessa pulloja annoksen mahduttamiseksi täyttötilavuuden ei tulisi olla kohtuuton pullon halkaisijaan verrattuna. Esimerkiksi 5 ml:n suuruista täytettä ei pitäisi laittaa pienempään kuin 10 ml:n pulloon. Täytön jälkeen pullot lastataan kuivauskammioon ja sijoitetaan suoraan jäähdytettävälle hyllyille, jotka on esijäähdytetty lämpötilaan 4 °C. Usean pullon sisään sijoitetaan lämpöpari formulan lämpötilan tarkkailemiseksi kylmäkuivausprosessin aikana. Pullojen annetaan sitten asettua hyllyjen lämpötilaan (4 °C), ennen kuin hyllyjen lämpötila alennetaan arvoon -40 °C. Pullojen saavutettua lämpötilan -40 °C niitä pidetään kyseisessä lämpötilassa noin 6 tuntia formulan antamiseksi jäätyä täydellisesti. Tämän ajanjakson jälkeen jäähdytinkierukat jäähdytetään lämpötilaan -80 °C ja käynnistetään vakuumipumppu alipaineen muodostamiseksi jäähdytyskammioon, mitä seuraavat primaarinen ja sekundaarinen kuivausprosessi. Primaarisessa kuivausprosessissa avataan jäähdytyskammion ja kuivauskammion välinen pääventtiili ja kuivauskammioon muodostetaan noin 13 Pa:n paine laskemalla typpikaasu pois. Paineen 13 Pa saavuttamisen jälkeen hyllyjen lämpötila nostetaan arvoon -20 °C sublimoitumisprosessin käynnistämiseksi. Tämä osa kylmäkuivaussykliä kestää noin 10 - 18 tuntia. Primaarinen kuivausprosessi päättyy, kun kaikki jää häviää jäädytetystä matriksista ja lämpöparin lämpötila on saavuttanut arvon -20 °C. Sekundaarisessa kuivausprosessissa lämpötila nostetaan arvosta -20 °C arvoon +25 °C kaiken sen jään poistamiseksi, joka ei ole poistunut kylmäkuivausprosessissa. Tämä poisto kestää noin 4 - 8 tuntia.

Sekundaarisen kuivausprosessin päätyttyä pääventtiili suljetaan ja kuivauskammio täytetään typellä niin,

että kammiossa säilyy lievä alipaine. Sen jälkeen käynnistetään korkituslaite ja painetaan korkit pulloihin. Kuivauskammio saatetaan sitten normaalipaineiseksi ja kammion ovi avataan pullojen ottamiseksi pois ja puristuskapseleiden asettamiseksi paikoilleen. Pulloja säilytetään sitten ennalta määrätyssä lämpötilassa, kunnes niihin lisätään uudelleen vettä injektointia varten.

Tämän keksinnön mukaisilla formuloilla on havaittu olevan erinomainen varastoinninkestävyys. Varastoinninkestävyyttä valaistaan seuraavin vertailututkimuksin, joissa käytetään uudelleen laimennettuja liuoksia, formuloiden ulkonäön merkillä panemiseksi ja kokoekskluusiosuurtehonestekromatografian avulla (SEHPLC) esimerkeissä 74 ja 75 esitettyihin formuloihin sisältyvän suurimoolimassaisen (HMW) aineen prosenttiosuuden määrittämiseksi.

Formula A, joka on tämän keksinnön mukainen, sisälsi 10 % HPCD:tä.

Formula B, joka on esitetty vertailua varten, sisälsi 10 % sakkaroosia eikä lainkaan HPCD:tä.

Molemmat formulat sisälsivät 10 mmol fosfaattipuskuria/l (pH 6,2) ja 75 000 yksikköä PEG-SOD:tä/ml. Pullojen täyttötilavuus oli 0,5 ml, lämpötilaolosuhteet olivat 4 °C, 22 °C, 30 °C ja 50 °C, ja molemmat formulat kylmäkuivattiin, pidettiin edellä mainituissa lämpötiloissa 30 kuukautta ja sen jälkeen laimennettiin uudelleen ja testattiin kuvatulla tavalla.

Esimerkki 74

Uudelleen laimennettujen formuloiden ulkonäkö

Formula A	Ulkonäkö	Formula B	Ulkonäkö
4 °C	kirkas, sinivihreä	4 °C	kirkas, sinivihreä
22 °C	kirkas, sinivihreä	22 °C	kirkas, sinivihreä
30 °C	kirkas, sinivihreä	30 °C	kirkas, sinivihreä
50 °C	kirkas, sinivihreä	50 °C	samea, kellertävä- väruskea

HMW-määrittäminen SEHPLC:tä käyttäen

SEHPLC toteutetaan tasapainottamalla Shodex WS-803F -pylväs (0,8 x 30 cm) fosfaattipuskurissa (0,1 mol/l, pH 6,5), joka sisältää natriumkloridia (0,15 mol/l), virtausnopeudella 1 ml/min ja pumppaamalla liuos detektorin läpi, joka on säädetty aallonpituudelle 280 nm. Kyseinen pylväs kykekee paljastamaan erot moolimassassa fraktionti-alueensa ja ekskluusiorajansa ($M > 1\,000\,000$) perusteella. Näissä olosuhteissa suurimoolimassainen aine eluoituu ennen pienimoolimassaista ainetta (suoloja ja pienimoolimassaisia komponentteja). Detektorin yhdistetään tietokoneeseen, joka on ohjelmoitu integroimaan huiput lukuisten parametrien perusteella ja laskemaan huippuja vastaavat määrät prosentteina.

Todettu ja esimerkissä 75 esitetty HMW-lajikkeiden prosenttiosuus on varastoinnin aikana tapahtuvan polypeptidien aggregoitumisen asteen mitta. Esimerkissä 75 on esitetty myös "vapaa PEG" (joka on sukkinaattiesteri- doksen hydrolysoitumisasteen ilmaisin) ja prosentuaalinen entsyymiaktiivisuus.

Esimerkki 75

Stabiilisuustutkimukset kylmäkuivatuilla PEG-SOD-formuloilla, jotka sisälsivät 10 % sakkaroosia tai 10 % B-hydroksipropyylisyklodekstriiniä (HPBCD) ja joita varastoitiin 2 ja 10 kuukautta eri lämpötiloissa¹

Formula (75,000 yks./mg)	Lämpötila (°C)	HMW ² (%)		Vapaa PEG ³ (mg/ml)		Aktiivisuus ⁴ (%)	
		2 kk	10 kk	2 kk	10 kk	2 kk	10 kk
10 % sakka- roosia	4	0,3	0,2	0,35	0,1	99	- -
	22	0,4	0,6	0,36	0	100	- -
	30	0,7	0,9	0,44	0	98	100
	50	20	>50	3,45	~10	71	- -
10 % HPBCD:tä	4	0,3	- -	0,12	- -	100	- -
	22	0,4	- -	0,08	- -	99	- -
	30	0,4	0,7	0,14	0,9	100	100
	50	0,6	4,8	0,87	3,23	95	92

¹ Kylmäkuivattujen kakkujen tutkiminen silmämääräisesti ennen uudelleen laimentamista osoitti, että lämpötilassa 50 °C varastoidun formulan väri oli muuttunut.

² HMW kuvaa epäpuhtauksia, kuten polypeptidiaggregaatteja, ja ilmaistaan prosentuaalisena poikkeamana vertailuolosuhteista (aika).

³ Vapaa PEG kuvaa sukkinyyliesterisidoksen hydrolysoitumista ja ilmaistaan prosentuaalisena poikkeamana vertailuolosuhteista (aika).

⁴ Ilmaistaan prosentteina alkuarvosta.

Kuten esimerkissä 75 esitetyistä tiedoista voidaan havaita, HPBCD-formulalla on erinomainen stabiilisuus varastoitaessa sitä lämpötilassa 30 °C. Mitään merkittävää entsyymiaktiivisuuden muutosta ei havaittu edes 10 kuukauden varastoinnin jälkeen, mikä osoittaa, että entsyymillä säilytettiin tyydyttävä stabiilisuus. HPBCD:n selvä paremmuus stabilointiaineena on ilmeneinen verrattaessa sakkarosi- ja HPBCD-formulan prosentuaalisia HMW-arvoja toisiinsa varastoitaessa niitä lämpötilassa 50 °C: HMW-arvo HPBCD-formulalle oli lämpötilassa 50 °C 10 kuukautta kestäneen lämpörasituksen jälkeen vain 4,8 %, kun se sakkarosiformulan tapauksessa oli samoissa olosuhteissa yli 50 %. HPBCD:n dramaattinen stabilointikyky jopa korkeassa lämpötilassa varastoitaessa on osoitus tämän stabilointiaineen tarjoamasta ainutlaatuisesta stabilointimekanismista, joka minimoi proteiinien välisen vuorovaikutuksen ja vähentää siten HMW-lajikkeiden muodostumista. Voidaan esittää teoria, että koska syklodekstriini sisältää rakenteessaan onteloita, on todennäköistä, että suojausmekanismi on yhteydessä tiettyjen reaktiivisten keskusten (jotka liittyvät HMW-aggregaattien muodostumiseen) kotelointiin, mikä minimoi vuorovaikutuksen ja aggregoitumisen.

Tämän keksinnön tarjoama lisääntynyt stabiilisuus mahdollistaa tuotteen varastoinnin huoneenlämpötilassa ja

- pidentää sen varastointiaikaa. Tämä kylmäkuivattu tuote soveltuu pakattavaksi joko tavanomaiseen pieneen lasipulloon tai esitäytettyyn ruiskuun. Esitäytetty ruisku tarjoaa "käyttövalmiin" tuotteen, joka edellyttää mahdollisimman vähän käsittelyä ja soveltuu hyvin käytettäväksi hätätapauksissa. Formuloista on siten suurta, ennen koke-
matonta hyötyä kliinisisissä, sairaala- ja hätätilanteissa.

Patenttivaatimukset:

1. Kylmäkuivattavaksi tarkoitettu, vesipitoinen, fysiologisesti aktiivinen, proteiinia sisältävä koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää noin 150 - 150 000 yksikköä kovalenttisesti sidottua vähädiolinen polyalkeenioksidi - proteiini-konjugaattia/ml, 5 noin 0,1 - 20 % (m/V) syklodekstriiniä ja noin 0,01 - 50 mmol puskuriainetta/litra mainitun koostumuksen pH:n ollessa noin 5,7 - 6,5.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, 10 t u n n e t t u siitä, että mainittua syklodekstriiniä on mukana noin 1,0 - 15 % (m/V).
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu vähädiolinen polyalkeenioksidi on lineaarinen polyalkeenioksidi, joka sisäl- 15 tää korkeintaan noin 10 paino-% monoalkoksyloimatonta polyalkeenioksidia.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu monoalkoksyloimatonta polyalkeenioksidi on monometoksyloimatonta polyeteeniglyko- 20 li.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitun polyeteeniglykolin keskimääräinen moolimassa on noin 1000 - 15 000 daltonia.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, 25 t u n n e t t u siitä, että mainittu syklodekstriini on β -syklodekstriinin johdannainen.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittuna proteiinina tulevat kysymykseen ihmisen rekombinaatiointerleukiini 4 30 (rhuIL-4); proteaasi Subtilisin Carsberg; oksidoreduktaasi, katalaasi; kolesteroli, pelkistynyt NADP: happioksidoreduktaasi (20- β -hydroksyloiva) (1.14.1.9, "kolesteroli-

20-hydroksylaasi); transferaasi; UDP-glukoosi; hydrolaasi; trypsiini (3.4.4.4.); L-asparagiiniaminohydrolaasi (3.5.1.1., "asparaginaasi"); lyaasi; isomeraasi ja ligaa-si.

5 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittuna proteiinina tulevat kysymykseen insuliini, ACTH, glukagoni, somatostatiini, somatotropiini, tymosiini, parathormoni, pigmenttihormoni, somatomeidiini, erytropoietiini ja luteinisoiva hor-
10 moni.

 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittuna proteiinina tulevat kysymykseen koriongonadotropiini, hypotalamuksen vapautustekijä, antidiureettinen hormoni, kilpirauhasta stimuloiva hormoni, kalsitoniini, prolaktiini, interferonit (α -, β - ja -interferoni), vasta-aineet (IgG, IgE, IgM, IgD), interleukiinit 1, 2, 3, 4 ja 7, granulosityttipesäkkeitä stimuloiva tekijä (DCSF) ja granulositytti-makro-
15 fagipesäkkeitä stimuloiva tekijä (GM-CSF).

20 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittuna proteiinina tulevat kysymykseen tuumorinekroositekijä (TNF), verihiutaleista peräisin oleva kasvutekijä (PDGF), epidermaalinen kasvutekijä (EGF), hermokasvutekijä (NGF), luukasvutekijä (BGF), kasvuhormonia vapauttava tekijä (GHRF), papaiini, kymotrypsiini, termolysiini, streptokinaasi ja aktivaasi.
25

 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini on peroksididismutaasi.

30 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu peroksididismutaasi on ihmisen rekombinaatioperoksididismutaasi.

 13. Menetelmä kylmäkuivatun, biologisesti aktiivisen, proteiinia sisältävän koostumuksen valmistamiseksi,
35 t u n n e t t u siitä, että

- a) alle 10 paino-% monoalkoksyloimatonta polyalkeenioksidia sisältävä polyalkeenioksidi karboksyloidaan,
- b) mainittu karboksyloitu polyalkeenioksidi aktivoidaan aktiivisen polyalkeenioksidiesterin aikaansaamiseksi,
- 5 c) mainittu aktiivinen polyalkeenioksidiesteri liitetään kovalenttisesti biologisesti aktiiviseen esteriin,
- d) mainittu kovalenttisesti sidottu polyalkeenioksidiesteri ja mainittu biologisesti aktiivinen proteiini liuotetaan vettä sisältävään väliaineeseen,
- 10 e) syklodekstriini liuotetaan mainittuun vettä sisältävään väliaineeseen homogeenisen liuoksen aikaansaamiseksi,
- f) mainittu liuos puskuroidaan suunnilleen pH-alueelle 5,7 - 6,5 ja
- g) liuos kylmäkuivataan.
- 15 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu koostumus on jonkin patenttivaatimuksista 1 - 12 mukainen.
- 20 15. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukaisen koostumuksen käyttö sellaisen lääkkeen valmistamiseen, joka soveltuu peroksidianionien nisäkkään kudoksessa aiheuttaman tautitilan hoitoon.



Missing part