



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTCHRIFT

(19) **DD** (11) **270 466 A5**

4(51) A 61 K 37/36
A 61 K 37/24

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 312 552 8	(22)	29.01.88	(44)	02.08.89
(31)	009,291	(32)	30.01.87	(33)	US
(71)	siehe (73)				
(72)	Janski, Alvin M.; Marin, Jerome L.; Atkinson, Paul R., US				
(73)	International Minerals & Chemical Corp, Terre Haute, Indiana, 47808, US				
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD				
(54)	Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin aus verdünnten wäßrigen Lösungen				

(55) Verfahren, Rückgewinnung, bioaktives Somatotropin, verdünnte wäßrige Lösungen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin aus verdünnten wäßrigen Lösungen, dadurch gekennzeichnet, daß man zu der wäßrigen Lösung ein Salz eines Übergangsmetalle zugebt, um einen unlöslichen Komplex mit dem Somatotropin zu bilden. Der unlösliche Komplex kann aus der Lösung abgetrennt werden, entweder durch Zentrifugieren oder Filtration und kann mittels konventioneller Methoden getrocknet werden, beispielsweise durch Lyophilisieren oder durch Entfernung von Wasser bei niedrigen Temperaturen unter Vakuum. Das Verfahren führt zur Rückgewinnung eines trockenen, bioaktiven Somatotropins.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin aus verdünnten wäßrigen Lösungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zu der wäßrigen Lösung ein Salz eines Übergangsmetall in einer ausreichenden Menge zugibt, um einen unlöslichen Komplex mit dem Somatotropin zu bilden, und man den Komplex von der Lösung abtrennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die verdünnte wäßrige Lösung aus der Reinigung des Somatotropins aus einem Hypophysenhomogenisat oder aus einem Fermentationsmedium herrührt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, ein rekombinantes Somatotropin ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Schweine-Somatotropin ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, ein biologisch aktives Fragment von Schweine-Somatotropin ist, bei dem die ersten sieben Aminoterminalen Aminosäuren des reifen Proteins nicht vorhanden sind.
6. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Ochsen-Somatotropin ist.
7. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, ein biologisch aktives Fragment von Ochsen-Somatotropin ist, bei dem die ersten vier Amino-terminalen Säuren des reifen Proteins nicht vorhanden sind.
8. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Schaf-Somatotropin ist.
9. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Somatotropin eines Hühnervogels ist.
10. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Somatotropin eines Fisches ist.
11. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, rekombinantes Human-Somatotropin ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, ein natürliches Somatotropin ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, natürliches Ochsen-Somatotropin ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Somatotropin, das zurückgewonnen wird, natürliches Schweine-Somatotropin ist.
15. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zu den Metallen Zink, Kupfer, Mangan, Eisen oder Kobalt gehören.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Metall Zink ist.
17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zu den Übergangsmetallsalzen ein Chlorid, Sulfat, Acetat oder Tartrat eines Übergangsmetall gehören.
18. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zu den Salzen der Übergangsmetalle Zinkchlorid, Kupferchlorid, Manganchlorid, Eisenchlorid (II), Eisen(III)chlorid oder Kobaltchlorid gehören.
19. Verfahren nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Salz Zinkchlorid ist.
20. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der unlösliche Komplex aus der wäßrigen Lösung abfiltriert und getrocknet wird.
21. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der unlösliche Komplex aus der wäßrigen Lösung durch Zentrifugieren abgetrennt und getrocknet wird.
22. Verfahren nach Anspruch 1, 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß der abgetrennte unlösliche Komplex unter Vakuum getrocknet oder durch Lyophilisierung getrocknet wird.
23. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß der unlösliche Komplex bei einer Temperatur zwischen 0°C und 25°C getrocknet wird.
24. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die verdünnte wäßrige Lösung einen pH-Wert zwischen etwa 6,8 und etwa 9,8 aufweist und daß das Salz des Übergangsmetall in einem molaren Überschuß zur Menge des Somatotropins eingesetzt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH der verdünnten wäßrigen Lösung zwischen etwa 6,8 und etwa 9,0 liegt.

26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Übergangsmetallsalzes wenigstens etwa 0,12 mMol pro 0,025 mMol Somatotropin in 1,0 Liter Lösung beträgt.
27. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erhaltene unlösliche Komplex wenigstens etwa 1 bis etwa 8 Mole Metall pro Mol Somatotropin enthält.
28. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erhaltene unlösliche Komplex etwa 0,3 bis etwa 8 Massenanteile in % Übergangsmetall enthält.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der erhaltene unlösliche Komplex etwa 0,4 bis etwa 7 Massenanteile in % Übergangsmetall enthält.
30. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die verdünnte wäßrige Lösung einen Puffer enthält, der Carbonatpuffer, 50 mM Tris-HCl oder 60 mM Ethanolamin ist.
31. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der eingesetzte Puffer auf einen pH-Wert zwischen etwa 7,4 und etwa 9,8 eingestellt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Rückgewinnung bioaktiver Proteine aus verdünnten wäßrigen Lösungen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Rückgewinnung von bioaktivem Somatotropin aus wäßrigen Lösungen durch Zugabe von Übergangsmetallsalzen zu diesen Lösungen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Somatotropine, auch als Wachstumshormone bekannt, sind Polypeptidhormone, die von vielen Lebewesen über die Hypophyse abgesondert werden. Diese Hormone sind für eine Anzahl therapeutischer Anwendungen wertvoll, und Zusammensetzungen, die Somatotropine enthalten, können bei der Behandlung von Hypophysenmangelerscheinungen beim Menschen und bei gastrointestinalen Blutungen eingesetzt werden oder auch bei der Beschleunigung des Heilprozesses von Knochenfrakturen sowie für die Förderung des Heilprozesses bei Prellungen und anderen Wunden. Somatotropine ist auch einsetzbar zur Beschleunigung der Fleisch- und Milchproduktion bei Tieren, wenn sie über verschiedene Mittel zur Freisetzung von Arzneimitteln oder über eine Injektion verabreicht werden (siehe E. J. Turman „Some Effects of Pituitary Anterior Growth Factor“, Thesen, Purdue University, April 1953; L. J. Machlin, J. Anim. Sci. 35: 794-800 [1972]; T. R. Kasser et al., J. Anim. Sci. 53: 420-426 [1981]; L. J. Machlin, J. Dairy. Sci. 56: 575-580 [1973]). Obgleich Somatotropine einigermaßen artspezifisch sind, gibt es eine beträchtliche Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen tierischer Somatotropine, und diese Hormone haben ausgeprägte Wirksamkeit zwischen den Spezies gezeigt.

Darüber hinaus wurden verschiedene wirksame Fragmente von Somatotropine entdeckt.

Traditionell erhält man Somatotropine durch Isolierung aus entnommenen Hypophysengewebe. Mit der Einführung der rekombinanten DNA-Technologie wurde es möglich, Somatotropine aus genetisch erzeugten Mikroorganismen zu erhalten, die rekombinante DNA enthalten, die die Produktion von Somatotropin lenkt (siehe beispielsweise europäische Patentanmeldung 83304574.3, Veröffentlichungsnummer 0 103 395, für Biogen N. V.). Ob die Herkunft des Somatotropins tierisch oder mikrobiell ist, ist eine Reinigung erforderlich, um Verunreinigungen wie andere Proteine, Polypeptide und zelluläres nekrotisches Gewebe zu entfernen, und um zu gewährleisten, daß das Protein in seiner richtig gefalteten, bioaktiven Form vorliegt. Das Somatotropin kann nach einer oder mehreren bekannten Proteinreinigungsmethoden gereinigt werden, zu denen die Gelchromatografie, Affinitätschromatografie, Ionenaustauschchromatografie, Ultrafiltration, Dialyse, Fällung mit Salzen wie Ammoniumsulfat, Extraktion aus Einschlußkörperchen unter Verwendung von Guanidin-HCl oder Natriumdodecylsulfat und eine Reihe anderer Verfahren gehören. Beispiele für einige der verschiedenen Reinigungstechniken können aus Kirk-Othmer, Enzyklopädie der Chemischen Technologie, 3. Auflage, Bd. 11 entnommen werden sowie aus der US-PS 4 371 462 (Hecht) und aus Hart et al., Biochem. J., 218: 573-581 (1984).

Das Ergebnis einiger dieser Reinigungsverfahren ist eine verdünnte wäßrige Lösung, die Somatotropin enthält. Somit ist ein Rückgewinnungsprozeß erforderlich, um das gereinigte Somatotropin aus diesen verdünnten wäßrigen Lösungen wieder zu erhalten.

Zu gängigen Methoden zur Rückgewinnung von Somatotropin gehören das Gefriertrocknen einer verdünnten Lösung des Hormons. Allerdings ist die Lyophilisierung eine kostspielige Rückgewinnungsmethode für getrocknete, biologisch aktive Materialien wegen der geringen Produktionsziffer, den hohen Kosten für die Geräte und der Notwendigkeit, sehr niedrige Drücke während der Sublimierung der Wassersubstanz aus dem gefrorenen Zustand zu gewährleisten. Die Lyophilisierung ist insbesondere bei einem großen Umfang kostenintensiv, da große Lösungsvolumina miteinbezogen sind.

Es ist daher ein Verfahren erforderlich, das weniger kostenintensiv ist, und keine Nebenwirkung hinsichtlich der Bioaktivität des Somatotropins aufweist.

Ziel der Erfindung

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein solches Verfahren bereitgestellt, das im Vergleich zu den Kosten für die Ausrüstung bei konventionellen Verfahren wesentlich niedrigere Kosten dafür erfordert.

Weiterhin wird ein Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin aus wäßrigen Lösungen bereitgestellt, das mit geringeren Arbeitskosten auskommt im Vergleich zu den Arbeitskosten bei konventionellen Rückgewinnungsverfahren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein billiges Rückgewinnungsverfahren von Somatotropin aus wäßrigen Lösungen ohne Verlust der Bioaktivität herzustellen.

Erfindungsgemäß beansprucht wird ein Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin aus wäßrigen Lösungen, gekennzeichnet durch Zusatz von Salzen der Übergangsmetalle zu den wäßrigen Lösungen, um mit dem Somatotropin unlösliche Komplexe zu bilden.

Die unlöslichen Komplexe können aus der Lösung abgetrennt werden, entweder durch Zentrifugieren oder Filtration, gefolgt von einer Trocknung durch Lyophilisieren, Entfernen des Wassers bei niedrigen Temperaturen unter Vakuum oder durch andere Verfahren. Das Verfahren führt zu einer Rückgewinnung eines trocknen, bioaktiven Somatotropins. Die Erfindung ist somit gerichtet auf ein Verfahren zur Rückgewinnung von Somatotropin (nachfolgend auch als ST bezeichnet) aus verdünnten wäßrigen Lösungen, die aus der Reinigung von Somatotropin aus einem Hypophysenhomogenisat oder einem Fermentationsmedium herrühren. Das Verfahren dieser Erfindung kann dazu verwendet werden, verschiedene Arten von Somatotropin aus verdünnten wäßrigen Lösungen zurückzugewinnen, einschließlich natürliche oder rekombinante vom Schwein, Ochsen, Schaf, Menschen, Hühnervögeln oder Fisch.

Der Begriff Somatotropin, wie er hier verwendet wird, erfaßt natürliches oder rekombinantes Somatotropin der vollen Länge sowie Derivate davon, die wachstumsbeschleunigende Eigenschaften aufweisen. Zu Derivaten gehören biologisch aktive Fragmente des Polypeptidhormons, wie die $\Delta 4$ -Konstruktion von Ochsen-somatotropin (ein Polypeptid mit 4 fehlenden Aminosäuren am N-Terminus, beschrieben in der obengenannten EP-Anmeldung von Biogen), und ein als $\Delta 7$ -Schweinesomatotropin bezeichnetes Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die der des Schweinesomatotropins entspricht, abzüglich der ersten sieben Aminosäuren des reifen Hormons der vollen Länge (beschrieben in der EP-Anmeldung 0 104 920 von Biogen N. V.). Der Begriff Somatotropin umfaßt auch ein aktives Fragment des Polypeptids, das ein äußeres N-terminales Methionin enthält.

Der Begriff „biologisch aktiv“, wie er hier verwendet wird, bedeutet ein Polypeptid, das bei Verabreichung an ein Lebewesen einen nachweisbaren Effekt auf einen biologischen Prozeß des Lebewesens ausübt. Ein biologisch aktives Somatotropin kann die Wachstumsrate eines Lebewesens erhöhen, wenn es dem Lebewesen in Mengen, die das Wachstum erhöhen, verabreicht wird. Ebenfalls erhöhen kann ein biologisch aktives Somatotropin die Nahrungsverwertung, Nährmittelverteilung oder Schlachtfleischqualität eines Lebewesens, wenn es dem Lebewesen in geeigneten Mengen verabreicht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht in der Zugabe von Übergangsmetallsalzen zu einer verdünnten wäßrigen Lösung, die das Somatotropin enthält. Es ist wünschenswert, wenn das in der Lösung befindliche Somatotropin in seiner richtig gefalteten bioaktiven Form vorhanden ist. Die Salze der Übergangsmetalle bilden unlösliche Komplexe mit dem Somatotropin, wodurch das Somatotropin aus den verdünnten wäßrigen Lösungen ausgefällt wird. Diese Komplexe werden gebildet durch Somatotropinmoleküle und Metallionen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} oder Fe^{3+} . Diese Komplexe enthalten Ligandbindungen zwischen dem Metallion und dem Stickstoffatom von einigen Aminosäureresten im Somatotropinmolekül. Nach der Fällung des Somatotropin-Metall-Komplexes wird der Niederschlag von der Hauptmenge des wäßrigen Mediums in Form einer konzentrierten wäßrigen Aufschlämmung abgetrennt. Die unlöslichen Komplexe können dann zwecks Entfernung des restlichen Wassers getrocknet werden. Das erhaltene Produkt ist ein trockener Somatotropin-Übergangsmetall-Komplex. Das Vorhandensein des Übergangsmetalls im Produkt zeigt keine signifikante Nebenwirkung auf die Bioaktivität des Somatotropins, wenn das Produkt einem Lebewesen verabreicht wird.

Wie bereits festgestellt, enthalten, wie bei konventionellen Verfahren zur Gewinnung eines Somatotropins, die Lösungen von natürlichen Somatotropinen in einem Hypophysenhomogenisat oder das rekombinante Somatotropin in einem Fermentationsmedium große Mengen Wasser im Verhältnis zum Somatotropin. Derartige Lösungen können beispielsweise etwa 100 Gramm Wasser pro Gramm Somatotropin enthalten oder mehr. Wie bei üblichen bekannten Rückgewinnungsverfahren wird die gesamte Wassermenge der Lyophilisation unterworfen. Wenn allerdings mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gearbeitet wird, und ein Übergangsmetallsalz der Lösung hinzugesetzt wird zwecks Ausfällung des Somatotropins aus der Lösung als Somatotropin-Übergangsmetall-Komplex, kann die Hauptmenge des anfänglichen großen Wasservolumens leicht vom Niederschlag abgetrennt werden, wobei ein konzentrierter wäßriger Schlamm anfällt, der getrocknet wird. Wenn man die obige Angabe des Verhältnisses 100:1 Wasser zu Somatotropin in der Anfangslösung als Beispiel weiterführt, so kann das Verhältnis von Wasser zu Somatotropin in der konzentrierten Aufschlämmung dagegen normalerweise 5 Gramm:1 Gramm betragen. Somit hat die entfernte große Wassermenge den Faktor um das Zwanzigfache erniedrigt.

Darüber hinaus kann das Wasser, das mit dem bioaktiven Komplex des Somatotropins mit einem Übergangsmetallion assoziiert ist, wesentlich leichter und mit einer weniger kostspieligen Technik entfernt werden als das bei der Lyophilisierung der Fall ist. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu sehr wesentlichen Einsparungen von Geldaufwendungen für technische Geräte und Gebäude sowie für die mit dem Trockenverfahren verbundene Arbeit.

Zu den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren Übergangsmetallen gehören Zink, Kupfer, Mangan, Eisen und Kobalt. Die bevorzugten Metalle sind Zink, Kupfer und Mangan, am bevorzugtesten ist Zink. Salze dieser Metalle, die für das erfindungsgemäße Verfahren besonders bevorzugt sind, sind die Chloride von Zink, Kupfer, Mangan, Eisen und Kobalt, jedoch können auch andere Salze, wie die Sulfate, Acetate oder Tartrate im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist nützlich für die Rückgewinnung von Somatotropin aus verdünnten wäßrigen Lösungen, die aus verschiedenen Reinigungsverfahren herrühren. Das Somatotropin, das mittels des Verfahrens der Erfindung zurückgewonnen werden kann, erhält man durch Isolierung aus entnommenen Hypophysengewebe oder von genetisch erzeugten Mikroorganismen, die rekombinante DNA enthalten, die für die Produktion von Somatotropin spezifisch ist.

Die wäßrigen Lösungen, aus denen Somatotropin zurückgewonnen werden kann, können unterschiedliche Mengen an Somatotropin enthalten. Das Übergangsmetallsalz wird in einer für die Fällung von Somatotropin wirksamen Menge hinzugegeben. Im allgemeinen kann bei Reaktionen im Labormaßstab das Metallsalz in solchen Mengen zugegeben werden, daß seine Konzentration im Bereich von etwa 0,12 mMol bis etwa 12 mMol pro 0,025 mMol Somatotropin in 1,0 Liter Lösung liegt. Eine typische eingesetzte Metallmenge in solchen Reaktionen kann etwa 1,2 mMol Metallsalz pro 0,025 mMol ST in 1,0 Liter wäßriger Lösung sein. Allerdings kann die für eine wirksame Fällung des Somatotropins ausreichende Menge an Übergangsmetallsalz schwanken. Bei einer großtechnischen Reaktion im Beispiel X dieser Anmeldung wurde beispielsweise gefunden, daß ein Verhältnis von etwa 10 Molen Zinksalz auf ein Mol rekombinantes Schweine-ST wirksam war, das ST auszufällen. Wirksame Mengen können vom Fachmann durch Routineuntersuchungen bestimmt werden. Üblicherweise wird für die vollständige Fällung des Somatotropins

in der Lösung ein Überschuß des Metallsalzes eingesetzt. Das Endprodukt, der Somatotropin-Metallsalz-Komplex, enthält im allgemeinen wenigstens 1-8 Mole Metall/ein Mol ST. Auf Basis von Massenanteilen in Prozent Übergangsmetall enthält das Produkt zwischen 0,3 und 8 Massenanteile in %. Vorzugsweise enthält das Produkt etwa 0,4 bis etwa 0,7 Massenanteile in % Metall. Die Fällung des Somatotropins wird vorzugsweise in nahezu neutralen oder basischen Lösungen durchgeführt. Der pH-Wert der wäßrigen Lösung liegt vorteilhaft zwischen 6,8 und 9,8. Die verdünnten wäßrigen Lösungen des Somatotropins liegen am bevorzugtesten bei einem pH zwischen etwa 7,4 und 9,0 für eine effektive Rückgewinnung des Somatotropins.

Es wurden verschiedene Puffer in den wäßrigen, Somatotropin enthaltenden Lösungen verwendet. Die Puffer werden hinzugegeben, um dabei zu helfen, das Somatotropin bei einem gegebenen pH-Wert vor der Zugabe des Übergangsmetallsalzes in Lösung zu halten. Solche Puffer sollten mit Vorsicht verwendet werden, die Anionen enthalten, die unlösliche Salze mit den Metallionen Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} oder Fe^{3+} bilden. Zu üblichen Puffern, die sich für das vorliegende Verfahren eignen, gehören Carbonatpuffer (0,42 mM Na_2CO_3 , 0,50 mM $NaHCO_3$, eingestellt auf einen pH zwischen 7,4 und 9,8); 50 mM Tris-HCl bei etwa pH 7,4; und 60 mM Ethanolamin bei etwa pH 9,8.

Die Zugabe des Übergangsmetallsalzes zu der verdünnten, wäßrigen Somatotropin enthaltenden Lösung führt zur Fällung eines Metall-Somatotropin-Komplexes. Die Lösung wird während des Ausfällens des Metall-Somatotropin-Komplexes aus der wäßrigen Lösung zweckmäßigerweise gerührt.

Nachdem das Salz des Übergangsmetalls zu der verdünnten wäßrigen Somatotropin enthaltenden Lösung hinzugegeben worden ist und das Somatotropin-Metallsalz-Komplex ausgefällt wurde, können die unlöslichen Komplexe aus der wäßrigen Lösung abgetrennt und getrocknet werden. Die Abtrennung kann mittels üblicher Methoden erfolgen, wie z. B. Zentrifugieren oder Filtrieren oder einer Kombination beider Verfahren. Das ausgefällte Material kann durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur pelletisiert werden oder durch Filtration abgetrennt werden, und kann danach mittels einer üblichen Methode getrocknet werden, wie z. B. durch Entfernung von Wasser bei niedrigen Temperaturen unter Vakuum oder durch Lyophilisierung. Wenn das zentrifugierte oder filtrierte Somatotropin bei niedrigen Temperaturen unter Vakuum getrocknet wurde, kann die Temperatur zwischen 0° und 25°C liegen. Das beim erfindungsgemäßen Verfahren anfallende getrocknete Somatotropin weist im wesentlichen die gleiche Bioaktivität auf wie das durch Lyophilisierung gewonnene Somatotropin oder wie natürliches Somatotropin. Darüber hinaus zeigten vorgenommene in vitro-Versuche von rekombinantem Schweine-Somatotropin, daß die Aufrechterhaltung der Löslichkeit (in Anwesenheit von EDTA) verbessert wurde, wenn das Somatotropin nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zurückgewonnen wurde, im Vergleich zum Rückgewinnungsverfahren bei der üblichen Lyophilisierung.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung und sind nicht als einschränkend für den Schutzzumfang anzusehen.

Beispiel I

Fällung von rekombinantem Schweine-Somatotropin

Gereinigtes, lyophilisiertes $\Delta 7$ -rekombinantes Schweine-Somatotropin ($\Delta 7$ rpST) von International Minerals and Chemical Corporation, Chargennummer CF 008-OBA.94.1, wurde in deionisiertem Wasser (dH_2O) auf eine Konzentration von 10 mg $\Delta 7$ rpST pro ml rekonstituiert. Das Material wurde dialysiert gegen > 100 Volumina Carbonatpuffer (0,42 mM Na_2CO_3 ; 0,50 mM $NaHCO_3$, eingestellt auf einen pH von 7,4 mit HCl), und eine Portion dieses dialysierten Materials wurde in neun Teilen Carbonatpuffer, pH 7, verdünnt. Die beiden erhaltenen Lösungen von $\Delta 7$ rpST (10,0 und 1,0 mg $\Delta 7$ rpST/ml) wurden mit markiertem ^{125}I - $\Delta 7$ rpST (dieselbe IMC-Chargennummer) bis zu einer Endkonzentration von 0,02 μ Curie pro ml versetzt, um den Prozentsatz der Fällung durch Messung der Radioaktivität in der überstehenden Fraktion nach der Zentrifugierung zu bestimmen. Zu den Übergangsmetallsalzen, die für diesen Fällungsversuch ausgewählt worden waren, gehörten Zinkchlorid, Manganchlorid und Kupferchlorid. 2,4 mM, 2,4 mM und 0,24 mM Lösungen jedes dieser Salze wurden hergestellt. Als positives Fällungskontrollmittel diente Trichloressigsäure (20%). Die Metallsalzlösungen oder Trichloressigsäurelösungen (0,5 ml) wurden zu den wäßrigen Lösungen hinzugegeben, die das $\Delta 7$ rpST (0,5 ml) Somatotropin enthielten, und die Fällung wurde über eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das ausgefällte Material wurde durch Zentrifugieren bei $15000 \times g$ über 10 Minuten bei Raumtemperatur pelletisiert. Aus den Doppelröhrchen wurden einfache 0,5 ml Aliquote des Überstehenden entnommen und in Polypropylenröhrchen gezählt. Die Minimalanzahl der Counts lag beim Vierfachen über der Untergrundzählrate. Die Pelletbildung wurde visuell beurteilt, und es zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen der Pelletgröße und dem Prozentsatz an pelletisiertem ^{125}I - $\Delta 7$ rpST. Daraus geht hervor, daß sich das ^{125}I - $\Delta 7$ rpST ähnlich wie das nicht markierte $\Delta 7$ rpST verhielt. Tabelle I erläutert das Ergebnis der Versuche. Bei 0,5 mg $\Delta 7$ rpST/ml und 5 mg $\Delta 7$ rpST/ml zeigten sowohl Zinnchlorid als auch Kupferchlorid gute Fällungseigenschaften bei einer oder mehreren Reagenzkonzentrationen. Steigende Mengen an Metallsalz führten zu gleicher oder steigender $\Delta 7$ rpST-Fällung, außer im Falle des Kupferchlorids.

Tabelle I

Fällungs- mittel	Konzentration	Temperatur	% ¹²⁵ pelletisiert*	
			5 mg/ml rpST	0,5 mg/ml rpST
Metalle				
Zink- chlorid	12 mM	ZT*	76 ± 0,38	77 ± 0,96
	1,2 mM	ZT	76 ± 1,5	74 ± 0,56
	0,12 mM	ZT	55 ± 0,41	61 ± 0,21
Mangan- chlorid	12 mM	ZT	27 ± 1,2	21 ± 1,6
	1,2 mM	ZT	22 ± 0,31	19 ± 2,4
	0,12 mM	ZT	8,7 ± 0,64	15 ± 2,0
Kupfer- chlorid	12 mM	ZT	23 ± 4,6	17 ± 2,9
	1,2 mM	ZT	64 ± 8,7	44 ± 6,7
	0,12 mM	ZT	42 ± 0,11	67 ± 0,12
Kontrolle				
nichts	—	ZT	4,3 ± 0,89	13 ± 1,2
	—	4°C	7,2 ± 2,1	18 ± 0,80
Trichlor- essigsäure	10% Lsg.	ZT	98 ± 0,33	96 ± 0,59
	10% Lsg.	4°C	98 ± 0,24	97 ± 0,26

a Die dargestellten Daten bedeuten ± Standardabweichung, wobei n = 2

* ZT = Zimmertemperatur

Beispiel II

Wirkung von unterschiedlichem Puffer und pH-Bedingungen der Fällung von Δ7rpST

Gereinigtes lyophilisiertes Δ7rpST (gleiche Chargennummer wie im Beispiel I) wurde in dH₂O bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml wieder rekonstituiert, und es wurden Aliquots gegen einen der folgenden Puffer dialysiert: (1) Carbonatpuffer, pH 7,4, (2) 40 mM TrisHCl, pH 7,4 oder (3) 60 mM Ethanolamin, pH 9,8. Die drei Proben wurden mit markiertem ¹²⁵I-Δ7rpST wie im Beispiel I versetzt. Jede Probe wurde 1:1 mit einer Lösung von 24 mM ZnCl₂ verdünnt und der Prozentsatz der Fällung von Δ7rpST wie im Beispiel I bestimmt. Tabelle II erläutert die Ergebnisse des Versuchs. Die aufgeführten Werte zeigen, daß Zink für eine effektive Fällung von Δ7rpST aus einer Vielzahl von Puffern bei unterschiedlichen pH-Werten wirksam ist.

Tabelle II

Prozentsatz Fällung von ¹²⁵I-Δ7rpST aus einer Lösung, bestehend aus gleichen Volumina von 10 mg pro ml Δ7rpST und 24 mM ZnCl₂ in Anwesenheit von (1) Carbonatpuffer pH 7,4 (2) 50 mM Tris, pH 7,4 oder (3) 60 mM Ethanolamin

Puffer	pH	Prozentsatz ¹²⁵ I-Δ7rpST pelletisiert (a)
Carbonat	7,4	76 ± 0,38
50 mM Tris	7,4	81 ± 0,11
60 mM Ethanolamin	9,8	90 ± 0,52

a Die dargestellten Daten bedeuten ± Standardabweichung, wobei n = 2

Beispiel III

Löslichkeit und Bioaktivität von gefällttem Δ7rpST

Für die Vorbereitung des Fällungsversuches wurden 500 mg Δ7rpST (dieselbe Chargennummer wie im Beispiel I) in 50 ml deionisiertem Wasser (dH₂O) rekonstituiert, wobei man einen pH von 13,0 wegen restlicher Carbonationen erhielt. Das Material wurde extensiv gegen Carbonatpuffer von etwa pH 7,4 dialysiert bis der pH des Dialysates 7,0 betrug. Die Volumenzunahme betrug 5 ml während der Dialyse. Der pH des Dialysates wurde auf 7,4 durch 3 mÄq. HCl verringert und die Lösung durch Zentrifugieren bei 1500 × g bei Zimmertemperatur geklärt.

10 Milliliter Aliquots der neutralen Δ7rpST-Lösung wurden mit einem gleichen Volumen von entweder 2,4 mM ZnCl₂ oder 2,4 mM CuCl₂ vereinigt. Nach einer Stunde Rühren bei Zimmertemperatur wurden die Suspensionen durch dreißigminütiges Zentrifugieren bei 15000 × g pelletisiert. Jedes Pellet wurde bei -80°C eingefroren und lyophilisiert, zusammen mit einer Roll-Schicht-gefrorenen Kontrollprobe, bestehend aus 20 ml der Δ7rpST-Lösung mit neutralem pH verdünnt in 20 ml dH₂O.

Es wurden die Trockenmasse und der Prozentsatz der Proteinreinheit (gemessen mit dem BCA-Proteintest, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois) der lyophilisierten Proben bestimmt, um eine Berechnung der Wirksamkeit jeder Fällungsmethode im Verhältnis zur Lyophilisierungsbehandlung ohne Fällung zu gestatten. Tabelle III zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmungen.

Tabelle III

Fällungs- methode	Prozentsatz $\Delta 7\text{rpST}$ (Masse/Masse)	Trocken- masse (mg)	Masse $\Delta 7\text{rpST}$ (mg)	relative Fällungs- effektivität
ZnCl ₂	115	54,5	62,7	81
CuCl ₂	105	48,0	50,4	65
Lyophilisierung	118	65,7	77,5	100

Um die Wirkung der Metallsalze auf die Bioaktivität des $\Delta 7\text{rpST}$ zu bestimmen, wurde ein Wachstumstest durchgeführt (Bestimmung der Körpermassezunahme) unter Verwendung von Hypophysen-ausgeschalteten Ratten (siehe Parlow, S. F., et al., *Endocrinology* 77: 1126 bis 1134 [1965]). Der Test erfolgte, um die Bioaktivität des Somatotropins durch Messung der wachstumsbeschleunigenden Aktivität bei Ratten bei einer Dosierung von $\Delta 7\text{rpST}$ zu demonstrieren, wobei das ST nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zurückgewonnen worden war.

Zur Durchführung des Tests wurden junge (36 Tage alt bei Beginn des Testzeitraumes) weibliche, Hypophysen-ausgeschaltete Ratten in Gruppen von 10 Ratten eingeteilt. Die Ratten wurden nach Körpermasse aufgeteilt, wobei die Masse und die Verteilung auf die Gruppen so eingerichtet wurde, daß die mittlere Startmasse jeder Gruppe nahezu gleich war. Jede Gruppe der Ratten wurde einer Behandlung unterworfen.

Die Ratten wurden subkutan an jedem der neun Tage entweder mit einer Somatotropinlösung oder mit einer Kontrollösung injiziert. Die Injektionen erfolgten unterhalb des Schädels nahe des subscapulären Bereiches. Um das Somatotropin zu solubilisieren, wurden die folgenden Parlow-Puffer eingesetzt.

I. NaHCO₃ (0,03 M), NaCl (0,15 M), pH erhöht auf 10,8 mit 8 M NaOH.
 II. NaHCO₃ (0,03 M), NaCl (0,15 M), pH erhöht auf 9,5 mit 8 M NaOH.

Eine bekannte Menge des $\Delta 7\text{rpST}$ (siehe Tabelle III) wurde in pH 10,8-Puffer gelöst, mit 2 N HCl auf pH 9,5 eingestellt und mit pH 9,5-Puffer auf das Volumen gebracht.

Eine Gruppe von 10 Ratten wurde als negative Kontrollgruppe eingesetzt und mit der Trägersubstanz injiziert, die zur Solubilisierung des Somatotropins verwendet worden war. Eine zweite Gruppe wurde mit einer Lösung von lyophilisiertem $\Delta 7\text{rpST}$ injiziert. Die anderen Gruppen wurden mit Lösungen einer ausgewählten Dosis von Übergangsmetall-gefälltem $\Delta 7\text{rpST}$ dieser Erfindung injiziert. Die Ratten wurden am 1., 2., 9. und 10. Tag gewogen und ihre Körpermasse notiert. Am Ende des Testzeitraumes (10. Tag) wurden die Daten der Zunahme der Rattenkörpermasse analysiert.

Der Wachstumstest mit den Hypophysen-ausgeschalteten Ratten (einzelne tägliche Dosis 14 Mikrogramm) zeigte, daß ZnCl₂-gefälltes $\Delta 7\text{rpST}$ eine signifikant höhere (p größer als 0,01) wachstumsbeschleunigende Aktivität aufwies als die negative Kontrollgruppe und daß dessen Aktivität von der der lyophilisierten $\Delta 7\text{rpST}$ -Kontrolle, die keine Übergangsmetallsalze enthielt, nicht unterscheidbar war. Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei der Fällung mit Kupferchlorid.

Tabelle IV

Probe	Dosis (μg)	mittl. Prozentsatz	Massezu- nahme \pm S. D.
neg. Kontrolle	0	4,0	4,2
$\Delta 7\text{rpST}$ ZnCl ₂ -gefällt	24	18,6*	1,7
$\Delta 7\text{rpST}$ CuCl ₂ -gefällt	24	15,6*	4,7
$\Delta 7\text{rpST}$ lyophilisiert	24	17,1*	2,4

* signifikant höher (P größer als 0,01) gegenüber negativer Kontrolle bei Einsatz eines einseitigen Dunnett-Tests nach Varianzanalyse.

Beispiel IV

Fällung von $\Delta 4$ -rekombinantem Ochsens-Somatotropin

Gereinigtes, lyophilisiertes $\Delta 4$ -rekombinantes Ochsens-Somatotropin ($\Delta 4\text{rbST}$) wurde in deionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von 10 mg $\Delta 4\text{rbST}$ pro ml rekonstituiert. Dieses Material wurde gegen mehr als 100 Volumina Carboratpuffer (wie in Beispiel I definiert) dialysiert, und ein Teil dieses Materials wurde in neun Teilen Carbonatpuffer, pH 7,4, verdünnt. Die erhaltenen Lösungen wurden mit markierter ¹²⁵I- $\Delta 4\text{rbST}$ bis zu einer Endkonzentration von 0,02 Mikro-Curie pro ml versetzt, um eine Bestimmung der prozentualen Fällung durch Messung der Radioaktivität in der überstehenden Fraktion nach dem Zentrifugieren zu ermöglichen.

Zu den verwendeten Übergangsmetallsalzen gehörten Zinkchlorid, Manganchlorid und Kupferchlorid. Es wurden 24-mM-, 2,4-mM- und 0,24-mM-Lösungen von jedem Salz hergestellt. Als positive Fällungskontrolle wurde Trichloressigsäure (20%) eingesetzt. Die Metallsalze oder Trichloressigsäure-Lösungen (0,5 ml) wurden zu den wäßrigen, $\Delta 4\text{rbST}$ enthaltenden (0,5 ml) Lösungen hinzugegeben, und die Fällung unter Rühren über eine Stunde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Das gefällte Material wurde durch Zentrifugieren bei 15000 \times g über 10 Minuten bei Zimmertemperatur pelletisiert. Einzelne 0,5 ml Aliquote des Überstehenden wurden aus den Doppelröhrchen entfernt und in Polypropylenröhrchen gezählt. Die Minimalzahl der Counts lag beim Vierfachen über der Untergrundzählrate. Die Pelletbildung wurde visuell beurteilt. Die Versuchsergebnisse sind ähnlich denen in Beispiel I.

Beispiel V

Löslichkeit und Bioaktivität von gefälltem $\Delta 4\text{rbST}$

Zur Vorbereitung dieses Fällungsexperimentes wurden 500 mg des im Beispiel III hergestellten $\Delta 4\text{rbST}$ in 50 ml deionisiertem Wasser (dH₂O) rekonstituiert. Das Material wurde extensiv gegen Carbonatpuffer von pH 7,4 dialysiert, bis der pH des Dialysates 7,6 betrug. Der pH des Dialysates wurde mit 3 mÄqu. HCl auf pH 7,4 erniedrigt und die Lösung durch eine 1500 \times g Zentrifugierung bei Zimmertemperatur geklärt.

Zehn Milliliter Aliquote der neutralen $\Delta 4rbST$ -Lösung wurden mit einem gleichen Volumen von entweder 2,4 mM $ZnCl_2$ oder 2,4 mM $CuCl_2$ vereinigt. Nach einer Stunde Röhren bei Zimmertemperatur wurden die Suspensionen durch eine $15000 \times g$ Zentrifugierung über 30 Minuten pelletisiert. Jedes Pellet wurde bei $-80^\circ C$ eingefroren und zusammen mit einer Roll-Schicht-gefrosteten Kontrollprobe lyophilisiert, bestehend aus 20 ml der neutralen $\Delta 4rbST$ -Lösung, verdünnt auf 50% in dH_2O .

Die Trockenmasse und der Prozentsatz an Reinheit der lyophilisierten Proben wurde bestimmt, um eine Berechnung der Effektivität jeder Fällungsmethode im Vergleich zu der Lyophilisierungsbehandlung ohne Fällung zu ermöglichen.

Um die Wirkung der Metallsalze auf die Bioaktivität von $\Delta 4rbST$ zu bestimmen, wurde ein Wachstumstest unter Verwendung von Ratten (Hypophysen-ausgeschaltet) wie im Beispiel III durchgeführt. Bei der Durchführung des Tests wurden junge (36 Tage alt bei Beginn des Versuchszeitraumes) weibliche Ratten ohne Hypophyse (Hypophysen-ausgeschaltet) in Gruppen von 10 Ratten eingeteilt. Die Ratten wurden nach Gewicht gruppiert, wobei die Masse und die Verteilung auf die Gruppen so ausgeglichen wurde, daß die mittlere Startmasse jeder Gruppe nahezu gleich war. Jede Gruppe der Ratten wurde einer Behandlung unterzogen.

Die Ratten wurden subkutan an jedem der neun Tage entweder mit Somatotropin oder einer Kontrolllösung injiziert. Die Injektionen erfolgten unterhalb des Schädels nahe des subscapulären Bereiches.

Zur Solubilisierung von Somatotropin wurden die folgenden Parlow-Pufferlösungen verwendet.

I. $NaHCO_3$ (0,03 M), $NaCl$ (0,15 M), pH erhöht auf 10,8 mit 8 M $NaOH$.

II. $NaHCO_3$ (0,03 M), $NaCl$ (0,15 M), pH erhöht auf 9,5 mit 8 M $NaOH$.

Eine bekannte Menge des $\Delta 4rbST$ wurde in pH 10,8-Puffer gelöst, mit 2 N HCl auf pH 9,5 eingestellt und mit pH 9,5-Puffer auf das Volumen gebracht.

Eine Gruppe von 10 Ratten wurde als negative Kontrollgruppe eingesetzt und mit der Trägersubstanz injiziert, die zur Solubilisierung des Somatotropins verwendet worden war. Eine zweite Gruppe wurde mit einer Lösung von lyophilisiertem $\Delta 4rbST$ injiziert. Die anderen Gruppen wurden mit Lösungen einer ausgewählten Dosis von Übergangsmetall-gefälltem $\Delta 4rbST$ dieser Erfindung injiziert. Die Ratten wurden am 1., 2., 9. und 10. Tag gewogen und ihre Körpermasse notiert. Am Ende des Testzeitraumes (10. Tag) wurden die Daten der Zunahme der Rattenkörpermasse analysiert.

Beispiel VI

Fällung von natürlichem Ochsen-Somatotropin

Gereinigte, lyophilisiertes Ochsen-Somatotropin (bST), das original aus Hypophysen erhalten worden war, wurde in deionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von 10 mg bST pro ml rekonstituiert. Dieses Material wurde gegen mehr als 100 Volumina Carbonatpuffer (wie im Beispiel I definiert) dialysiert, und ein Teil dieses Materials wurde in neun Teilen Carbonatpuffer, pH 7,4, verdünnt. Die erhaltenen Lösungen von bST wurden anschließend mit markiertem ^{125}I -bST bis zu einer Endkonzentration von 0,02 Mikro-Curie pro ml versetzt, um eine Bestimmung der prozentualen Fällung durch Messung der Radioaktivität in der überstehenden Fraktion nach dem Zentrifugieren zu ermöglichen.

Zu den verwendeten Übergangsmetallsalzen gehören Zinkchlorid, Manganchlorid und Kupferchlorid. Es wurden 24-mM-, 2,4-mM- und 0,24-mM-Lösungen von jedem Salz hergestellt. Als positive Fällungskontrolle wurde Trichloressigsäure (20%) eingesetzt. Die Metallsalze oder Trichloressigsäure-Lösungen (0,5 ml) wurden zu den wäßrigen, bST enthaltenden (0,5 ml) Lösungen hinzugegeben und die Fällung unter Röhren über eine Stunde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Das gefällte Material wurde durch Zentrifugieren bei $15000 \times g$ über 10 Minuten bei Zimmertemperatur pelletisiert. Einzelne 0,5 ml Aliquote des Überstehenden wurden aus den Doppelröhrchen entfernt und in Polypropylenröhrchen gezählt. Die Minimalzahl der Counts lag beim Vierfachen über der Untergrundzählrate. Die Pelletbildung wurde visuell beurteilt. Die Versuchsergebnisse sind ähnlich denen im Beispiel I.

Beispiel VII

Löslichkeit und Bioaktivität von gefällttem bST

Zur Vorbereitung dieses Fällungsexperimentes wurden 500 mg des im Beispiel VI hergestellten bST in 50 ml deionisiertem Wasser (dH_2O) rekonstituiert. Das Material wurde extensiv gegen Carbonatpuffer von pH 7,4 dialysiert und die Lösung durch eine $1500 \times g$ Zentrifugierung bei Zimmertemperatur geklärt.

Zehn Milliliter Aliquote der neutralen bST-Lösung wurden mit einem gleichen Volumen von entweder 2,4 mM $ZnCl_2$ oder 2,4 mM $CuCl_2$ vereinigt. Nach einer Stunde Röhren bei Zimmertemperatur wurden die Suspensionen durch eine $15000 \times g$ Zentrifugierung über 30 Minuten pelletisiert. Jedes Pellet wurde bei $-80^\circ C$ eingefroren und zusammen mit einer Roll-Schicht-gefrosteten Kontrollprobe lyophilisiert, bestehend aus 20 ml der neutralen bST-Lösung, verdünnt auf 50% in dH_2O .

Die Trockenmasse und der Prozentsatz an Reinheit der lyophilisierten Proben wurde bestimmt, um eine Berechnung der Effektivität jeder Fällungsmethode im Vergleich zu der Lyophilisierungsbehandlung ohne Fällung zu ermöglichen.

Um die Wirkung der Metallsalze auf die Bioaktivität von bST zu bestimmen, wurde ein Wachstumstest unter Verwendung von Hypophysen-ausgeschalteten Ratten wie im Beispiel III durchgeführt. Bei der Durchführung des Tests wurden junge (36 Tage alt bei Beginn des Versuchszeitraumes) weibliche Hypophysen-ausgeschaltete Ratten in Gruppen von 10 Ratten eingeteilt. Die Ratten wurden nach Gewicht gruppiert, wobei die Masse und die Verteilung auf die Gruppen so ausgeglichen wurde, daß die mittlere Startmasse jeder Gruppe nahezu gleich war. Jede Gruppe der Ratten wurde einer Behandlung unterzogen.

Die Ratten wurden subkutan an jedem der neun Tage entweder mit Somatotropin oder einer Kontrolllösung injiziert. Die Injektionen erfolgten unterhalb des Schädels nahe des subscapulären Bereiches. Zur Solubilisierung von Somatotropin wurden die folgenden Parlow-Pufferlösungen verwendet.

I. $NaHCO_3$ (0,03 M), $NaCl$ (0,15 M), pH erhöht auf 10,8 mit 8 M $NaOH$.

II. $NaHCO_3$ (0,03 M), $NaCl$ (0,15 M), pH erhöht auf 9,5 mit 8 M $NaOH$.

Eine bekannte Menge des bST wurde in pH 10,8-Puffer gelöst, mit 2 N HCl auf pH 9,5 eingestellt und mit pH 9,5-Puffer auf das Volumen gebracht.

Eine Gruppe von 10 Ratten wurde als negative Kontrollgruppe eingesetzt und mit der Trägersubstanz injiziert, die zur Solubilisierung des Somatotropins verwendet worden war. Eine zweite Gruppe wurde mit einer Lösung von lyophilisiertem bST injiziert. Die anderen Gruppen wurden mit Lösungen einer ausgewählten Dosis von Übergangsmetall-gefälltem bST dieser Erfindung injiziert. Die Ratten wurden am 1., 2., 9. und 10. Tag gewogen und ihre Körpermasse notiert. Am Ende des Testzeitraumes (10. Tag) wurden die Daten der Zunahme der Rattenkörpermasse analysiert.

Beispiel VIII**Fällung von natürlichem Schweine-Somatotropin**

Gereinigtes, lyophilisiertes Schweine-Somatotropin (pST), das original aus Hypophysen erhalten worden war, wurde in deionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von 10 mg pST pro ml rekonstituiert. Dieses Material wurde gegen mehr als 100 Volumina Carbonatpuffer (wie im Beispiel I definiert) dialysiert, und ein Teil dieses Materials wurde in neuen Teilen Carbonatpuffer, pH 7,4, verdünnt. Die erhaltenen Lösungen von pST wurden im Anschluß daran mit markiertem ^{125}I -pST bis zu einer Endkonzentration von 0,02 Mikro-Curie pro ml versetzt, um eine Bestimmung der prozentualen Fällung durch Messung der Radioaktivität in der überstehenden Fraktion nach dem Zentrifugieren zu ermöglichen. Zu den eingesetzten Übergangsmetallsalzen gehörten Zinkchlorid, Manganchlorid und Kupferchlorid. Es wurden 24-mM-, 2,4-mM- und 0,24-mM-Lösungen von jedem Salz hergestellt. Als positive Fällungskontrolle wurde Trichloressigsäure (20%) eingesetzt. Die Metallsalze oder Trichloressigsäure-Lösungen (0,5 ml) wurden zu den wäßrigen pST enthaltenden (0,5 ml) Lösungen hinzugegeben und die Fällung unter Rühren über eine Stunde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Das gefällte Material wurde durch Zentrifugieren bei $15000 \times g$ über 10 Minuten bei Zimmertemperatur pelletisiert. Einzelne 0,5 ml Aliquote des Überstehender, wurden aus den Doppelröhrchen entfernt und in Polypropylenröhrchen gezählt. Die Minimalzahlen der Counts lag beim Vierfachen über der Untergrundzählrate. Die Pelletbildung wurde visuell beurteilt. Die Versuchsergebnisse sind ähnlich denen im Beispiel I.

Beispiel IX**Löslichkeit und Bioaktivität von gefälltem pST**

Zur Vorbereitung dieses Fällungsexperimentes wurden 500 mg des im Beispiel VIII hergestellten pST in 50 ml deionisiertem Wasser (dH_2O) rekonstituiert. Das Material wurde extensiv gegen Carbonatpuffer von pH 7,4 dialysiert und die Lösung durch eine $1500 \times g$ Zentrifugierung bei Zimmertemperatur geklärt.

Zehn Milliliter Aliquote der neutralen pST-Lösung wurden mit einem gleichen Volumen von entweder 2,4 mM ZnCl_2 oder 2,4 mM CuCl_2 vereinigt. Nach einer Stunde Rühren bei Zimmertemperatur wurden die Suspensionen durch $15000 \times g$ Zentrifugierung über 30 Minuten pelletisiert. Jedes Pellet wurde bei -80°C eingefroren und zusammen mit einer Roll-Schicht-gefrosten Kontrollprobe lyophilisiert, bestehend aus 20 ml der neutralen pST-Lösung, verdünnt auf 50% in dH_2O . Die Trockenmasse und der Prozentsatz an Reinheit der lyophilisierten Proben wurde bestimmt, um eine Berechnung der Effektivität jeder Fällungsmethode im Vergleich zu der Lyophilisierungsbehandlung ohne Fällung zu ermöglichen.

Um die Wirkung der Metallsalze auf die Bioaktivität von pST zu bestimmen, wurde ein Wachstumstest unter Verwendung von Hypophysen-ausgeschalteten Ratten wie im Beispiel III durchgeführt.

Bei der Durchführung des Tests wurden junge (36 Tage alt bei Beginn des Versuchszeitraumes) weibliche Hypophysen-ausgeschaltete Ratten in Gruppen von 10 Ratten eingeteilt. Die Ratten wurden nach Gewicht gruppiert, wobei die Masse und die Verteilung auf die Gruppen so ausgeglichen wurde, daß die mittlere Startmasse jeder Gruppe nahezu gleich war. Jede Gruppe der Ratten wurde einer Behandlung unterzogen.

Die Ratten wurden subkutan an jedem der neun Tage entweder mit Somatotropin oder einer Kontrollösung injiziert. Die Injektionen erfolgten unterhalb des Schädels nahe des subscapulären Bereiches. Zur Solubilisierung von Somatotropin wurden die folgenden Parlow-Pufferlösungen verwendet.

I. NaHCO_3 (0,03 M), NaCl (0,15 M), pH erhöht auf 10,8 mit 8 M NaOH .

II. NaHCO_3 (0,03 M), NaCl (0,15 M), pH erhöht auf 9,5 mit 8 M NaOH .

Eine bekannte Menge des pST wurde in pH 10,8-Puffer gelöst, mit 2 N HCl auf pH 9,5 eingestellt und mit pH 9,5-Puffer auf das Volumen gebracht.

Eine Gruppe von 10 Ratten wurde als negative Kontrollgruppe eingesetzt und mit der Trägersubstanz injiziert, die zur Solubilisierung des Somatotropins verwendet worden war. Eine zweite Gruppe wurde mit einer Lösung von lyophilisiertem pST injiziert. Die anderen Gruppen wurden mit Lösungen einer ausgewählten Dosis von Übergangsmetall-gefälltem pST dieser Erfindung injiziert. Die Ratten wurden am 1., 2., 9. und 10. Tag gewogen und ihre Körpermasse notiert. Am Ende des Versuchszeitraumes (10. Tag) wurden die Daten der Zunahme der Rattenkörpermasse analysiert.

Beispiel X

Dreiundvierzig Liter gereinigtes $\Delta 7\text{pST}$ mit einer Konzentration von 590 mg/l in 60 mM Ethanolaminpuffer, pH 9,0, erhielt man aus *E. coli* HB 101, die in einem Fermentationsmedium gezüchtet worden waren. Die Lösung wurde auf etwa 810 mg/l in einer Querstrom-Ultrafiltrationseinheit (Romicon HF) aufkonzentriert, ausgerüstet mit einer 75 -Kubikfuß-Membranpatrone, die eine Molekülmassen-Nennbegrenzung von nahezu 5000 Dalton aufwies. Die erhaltene konzentrierte Produktlösung in dem Ethanolpuffer von pH 9,0 wurde in der gleichen UF-Einheit gegen $6 \times$ Volumina von 50% Carbonatpuffer (0,21 mM Na_2CO_3 ; 0,25 mM NaHCO_3) bei pH 8,0 bis 10,0 diafiltriert. Das erhaltene Restprodukt, nunmehr in 50% Carbonatpuffer mit einem pH oberhalb von 8,0, wurde leicht trüb ($\text{OD}_{595} = 0,01$) und wurde in einer Querstrom-Mikroporenfiltrationseinheit (Amicon DC-10), ausgerüstet mit einer 5-Quadratfuß-Membranpatrone, die eine 0,1-Mikrometer-Membran hatte, geklärt.

Die obige geklärte Lösung, 26 Liter mit 800 mg/l ST-Konzentration und einem pH von 9,0, wurde vorsichtig gerührt und mit 3,7 Litern 0,2 Mikrometer-filtrierter 2,4 mM ZnCl_2 -Lösung mit einer Zugaberate versetzt, bei der die Zugabe in einem Zeitraum von 5 bis 30 Minuten beendet wurde. Die Menge an Zn^{2+} -Zugabe bei diesem Versuch führte zu einem Zn/ST-Molarverhältnis von annähernd 10. Vor der anschließenden Rückgewinnung des Zn- $\Delta 7\text{pST}$ -Niederschlags wurde die Lösung für weitere 20 Minuten gemischt. Die erhaltene Zn- $\Delta 7\text{pST}$ -Suspension, nunmehr mit einer Konzentration von 0,08% mit Teilchengrößen von 2 bis 5 Mikrometer, wurde auf annähernd 2 bis 5% in einer Querstrom-Mikroporenfiltrationseinheit mit einer 0,1 Mikrometer Membranbegrenzung aufkonzentriert.

Die erhaltene Suspension wurde weiterhin auf etwa 250000 mg/l aufkonzentriert mit Hilfe einer kontinuierlichen Trommel-Zentrifugierung. Alternativ dazu kann die erhaltene Suspension direkt sprühgetrocknet werden oder kann weiter aufkonzentriert werden auf etwa 100000 mg/l entweder mittels Querstrom-Mikroporenfiltration oder durch Mehrfach-Tellerzentrifugieren (disc-stack centrifugation). Die erhaltene Paste wurde dann bis zu einer Dicke von etwa 2 cm ausgebreitet und über zwei Tage gefriergetrocknet, wobei die maximale Produkttemperatur auf 25°C begrenzt war. Das gefriergetrocknete Material, das im allgemeinen eine Teilchengröße von 10 bis 200 Mikrometer aufwies und eine Schüttdichte von annähernd 0,5, war geeignet für eine direkte Formulierung in ein System zur Abgabe dieses Produktes.

Beispiel XI

Beispiel X wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß der 50% Carbonatpuffer durch 2 mM Tris-Puffer bei pH 7,4 ersetzt wurde. Die Charakteristika des Endproduktes und die Fällungseffektivität war bei Tris ähnlich wie bei 50% Carbonatpuffer.