(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **160459 B**

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **1851/80**

(51) Int.Cl.[5] **A 61 K 37/02**
A 61 K 37/26

(22) Indleveringsdag: **29 apr 1980**

(41) Alm. tilgængelig: **31 okt 1980**

(44) Fremlagt: **18 mar 1991**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **30 apr 1979 DE 2917535** **22 dec 1979 DE 2952119**

(71) Ansøger: ***Hoechst Aktiengesellschaft; Brueningstrasse 45; 6230 Frankfurt/Main 80, DE**

(72) Opfinder: **Horst *Thurow; DE**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.**

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af denatureringsbestandige vandige proteinopløsninger

(56) Fremdragne publikationer

DE off.g.skrift nr. 2212695, 2620483, 2641819
US pat. nr. 4179337
Andre publikationer. Chemical Abstracts, vol 72 (1970) 128686g
Chemical Abstracts, vol 89 (1978) 72205f

(57) Sammendrag:

1851-80

Vandige proteinopløsninger, der indeholder et overfladeaktivt stof med kædeformig grundstruktur, hvis led indeholder svagt hydrofobe og svagt hydrofile områder i alternerende anordning, undergår ikke en denaturering af de deri tilstedeværende proteiner ved grænseflader. De nævnte overfladeaktive stoffer kan også anvendes til behandling af overflader, der virker denaturerende på proteinopløsninger, og endvidere ved håndtering og rensning af proteiner. Det foretrukne protein er insulin.

Det overfladeaktive stof er f.eks. 1) en blokpolymer bestående af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 2250, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, 2) blokke af propylenoxidenheder og ethylenoxidenheder, der er omsat med en fedtalkohol eller med ethylendiamin, eller 3) polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 2000.

DK 160459 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en vandig proteinopløsning, der er bestandig mod denaturering af proteinerne ved grænseflader.

Det er kendt, at opløste proteiner adsorberes til hydrofobe grænseflader (dertil hører også grænsefladen mellem vandig opløsning og luft) (C.W.N. Cumper og A.E. Alexander, Trans. Faraday Soc. 46, 235 (1950)). Proteiner er amphifile stoffer, dvs. de har både hydrofile og hydrofobe områder. De hydrofobe områder danner kontakten med den hydrofobe grænseflade.

Som følge af adsorptionen af proteiner til grænseflader iagttages forskellige sekundærreaktioner, der alment sammenfattes under begrebet "denaturering". Der sker en formændring af de adsorberede proteinmolekyler (ændring af den tertiære og/eller sekundære struktur). Desuden kan der ske en aggregation af adsorberede proteinmolekyler til opløselige eller uopløselige polymere former. For mange proteiner kendes der således en overflade-aggregation, der f.eks. gør sig bemærket som en uklarhedsdannelse i opløsningen eller som en biologisk inaktivering af proteinerne ved omrøring eller rystning af de vandige opløsninger (A.F. Henson, I.R. Mitchell, P.R. Mussellwhite, J. Colloid Interface Sci. 32, 162 (1970)). Denne overfladeadsorption og -aggregation er særlig uheldig i apparater til transport af proteinopløsninger, f.eks. i automatiske doseringsapparater til lægemidler. I nogle tilfælde sker der også kemiske reaktioner mellem de adsorberede proteiner og opløste stoffer (F. MacRitchie, J. Macromol.Sci., Chem., 4, 1169 (1970)).

Dette gælder især for okse-, svine-, og humaninsulin eller disses des-B1-phenylalaninderivater. Disse er med et zinkindhold på indtil 0,8%, beregnet på insulinets vægt, klart opløst i vandige medier under en pH-værdi på 4,3 og over en pH-værdi på 6,5. De nævnte insuliner danner i vandige opløsninger aggregater, således at opløsningen udgør en

ligevægtstilstand mellem monomere, dimere, tetramere, hexamere og oligomere insulinmolekyler. Det er kendt, at insulin adsorberes stærkt til hydrofobe overflader, hvortil også regnes grænsefladen mellem opløsningen og luft (Weisenfeld et. al., Diabets 17, 766 (1968) og Browne et al., Eur. J. Biochem. 33 233 (1973)). Forsøg har vist, at det adsorberede insulin kan denaturere ved overfladen. Denne proces påvirkes af temperaturen og bevægelse af opløsningen. Det denaturerede produkt desorberes igen som polymert aggregat og udfælder ved en tilstrækkelig høj koncentration i opløsningen som et bundfald eller danner en tixotrop gel. Det denaturerede insulin er biologisk uvirksomt og fører til tilstopninger i transportslanger f.eks. i en kontinuerlig eller reguleret arbejdende insulin-infusionspumpe, der anvendes i kunstige betaceller.

Desuden kan det denaturerede insulin give anledning til immunologiske uforeneligheder. Der kendes undersøgelser, der gør den fysiske tilstandsform af insulin ansvarlig for dannelsen af antistoffer mod insulin (Kumar et. al. Horm. Metab. Res. 6, 175 (1974)). Det er desuden kendt, at selv humaninsulin anvendt hos mennesker kan føre til immunologiske reaktioner (A. Teuscher et. al., Diabetologia 13, 435 (1977)).

Ifølge kendt teknik fremstillede vandige insulinopløsninger til terapeutiske formål kan foruden det virksomme stof, okse- eller svineinsulin eller et des-B1-phenylalaninderivat af disse insuliner, indeholde opløst zink i en mængde på indtil 0,8%, beregnet på insulinets vægt, et middel til indstilling af isotoni, såsom natriumchlorid, glycerol eller glucose, et konserveringsmiddel, såsom phenol, kresol eller p-hydroxybenzoesyremethylester og et salt til pufring af pH-værdien, såsom natriumphosphat, acetat eller citrat. Desuden kan der også være tilsat depothjælpestoffer, såsom "Protamin" eller "Surfen", til opnåelse en forlænget insulinvirkning, eller opløsningerne kan være blandet med krystallinske eller amorfe depotformer for insulin. Det har vist sig, at opløst insulin i alle disse præparater dena-

turerer ved grænseflader.

Forsøg har vist, at denatureringshastigheden stiger med temperaturen, bevægelsen af opløsningen og opløsningens pH-værdi. Humaninsulin denaturerer ligeledes i vandig opløsning. Tilsætninger, der forskyder aggregationsligevægten for insulin i vandig opløsning i retning af det monomere molekyle, såsom guanidin, urinstof, pyridin eller monomere detergenter, fremskynder denatureringen. Stoffer, der forskyder ligevægtene i den modsatte retning, såsom zink og andre divalente metalioner, forsinker denatureringen. Men selv en kombination af alle gunstige betingelser kan ikke forhindre denatureringen af insulin. Denne denaturering iagttages også, selvom den er langsommere, ved rolig oplagring af opløsningerne.

En speciel form for hydrofobe grænseflader dannes ved frysning af vandige opløsninger, f.eks. ved frysetørring af proteiner. Ved disse grænseflader sker der ligeledes de beskrevne denatureringer af proteiner (U.B. Hansson, Acta Chem. Scand., 22, 483 (1968)).

Denatureringsprocessen kan give et protein immunogene egenskaber (dvs. evnen til at inducere immunologiske afværgereaktioner i en organisme) eller forstærke allerede tilstedeværende immunogene egenskaber. Desuden kan biologiske egenskaber, såsom enzymatiske, serologiske eller hormonelle aktiviteter, ændres eller ødelægges.

Det er endvidere kendt, at adsorptionen af proteiner ved grænsefladen, der dannes mellem en vandig opløsning og en flydende hydrofob fase, kan forhindres ved, at der til dette system sættes monomere overfladeaktive stoffer såsom alkylalkoholer (R. Cecil og C.F. Louis, Biochem. J. 117, 147 (1970)).Disse stoffer adsorberes på deres side reversibelt til de hydrofobe grænseflader og fortrænger på denne måde proteinerne. Det er en ulempe ved denne fremgangsmåde, at anvendelseskoncentrationen af de overfladeaktive stoffer skal ligge nær deres mætningsgrænse i vandig opløsning, idet der kun på denne måde sikres en

optimal ladning af grænsefladen. I mange tilfælde er grænsefladens størrelse ikke konstant, men variabel (f.eks. grænsefladen mellem opløsning og luft ved omrøring eller rystning af proteinopløsninger), således at den vandige opløsning skiftevis skal aflevere og optage molekyler af disse overfladeaktive stoffer,dvs. skal indeholde et pufferforråd. Ved en nødvendig anvendelseskoncentration nærmætningsgrænsen er dette imidlertid kun muligt i begrænset omfang.

En yderligere ulempe ved denne fremgangsmåde er endvidere, at de nævnte monomere overfladeaktive stoffer ikke kun adsorberes til de hydrofobe grænseflader, men også til de hydrofobe områder i de opløste proteiner. Der bevirker de en denaturering af de opløste proteiner, der i mange tilfælde er irreversibel og netop er det, som man vil forhindre.

Styrken af bindingen af monomere overfladeaktive stoffer til både de hydrofobe grænseflader og de hydrofobe områder i de opløste proteiner er afhængig af stoffernes hydrofobicitet, dvs. f.eks. af længden af alkylkæderne. Jo længere alkylkæderne er, desto større er bindingsstyrken. Modsætningen mellem en mest mulig fuldstændig ladning af grænsefladerne med de overfladeaktive stoffer (der kan opnås ved en høj hydrofobicitet af stofferne eller en høj anvendelseskoncentration) og en mest mulig ringe binding til de hydrofobe områder i de opløste proteiner har forekommet uovervindelig.

Endvidere kendes der fra DE fremlæggelsesskrift 2 620 483 insulinopløsninger, hos hvilke en tilsætning af 0,1-20 vægt-% af polyoxyethylenethere af højere alkoholer har til formål at give en beskyttelse mod geldannelse og udfældning under oplagringen.

Ved anvendelsen af disse polyoxyethylenethere, i hvis molekylkæde ethylenenheder alternerer med oxygenatomer, kan der imidlertid ikke observeres nogen beskyttelsesvirkning mod denaturering af vandige proteinopløsninger. De nævnte

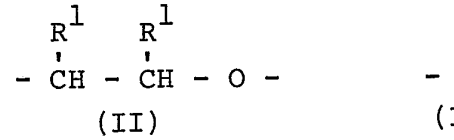
ethylenenheder har åbenbart ikke de for en sådan beskyttelsesvirkning nødvendige hydrofobe egenskaber, da de på grund af deres rumlige anordning i kæden ikke kan vekselvirke med de hydrofobe grænseflader eller med de hydrofobe områder af opløste proteiner.

Det har nu vist sig, at polymere stoffer med alternerende anordnede hydrofobe og hydrofile områder ændrer grænsefladerne på en sådan måde, at adsorptionen af proteiner til disse grænseflader og derved også de nævnte sekundære reaktioner, f.eks. grænsefladeaggregationen, forhindres på virksom måde.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af en vandig proteinopløsning, som er bestandig mod denaturering af proteinerne ved grænseflader, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der til den vandige proteinopløsning sættes en homopolymerisat, copolymerisat eller blokpolymerisat med formlen I

$$R^2Y - X_n - R_3 \qquad (I)$$

hvori X_n betyder en kæde af n led med formlerne II eller III



(II) (III)

i vilkårlig rækkefølge, og n betyder 2 - 80, fortrinsvis 8 - 45, Y betyder oxygen eller imino, R^1 betyder hydrogen, methyl eller ethyl, idet grupperne R^1 kan være ens eller forskellige, idet der dog i mindst halvdelen af kædeleddene X forekommer methyl eller ethyl, og R^2 og R^3 uafhængigt af hinanden betyder hydrogen eller en organisk gruppe.

Særlig foretrukne er forbindelser med formlen I, hvori R^3 betyder hydrogen, alkyl med 1 - 20 carbonatomer, carboxyalkyl med 2 - 20 carbonatomer eller alkylphenyl med 1 - 10 carbonatomer, og R^2 betyder hydrogen eller alkyl med

1 - 20 carbonatomer, men også, når Y betyder -O-, carboxyalkyl med 2 - 20 carbonatomer eller alkylphenyl med 1 - 10 alkyl-carbonatomer.

Som særlig foretrukne skal fremhæves forbindelser med formlen I, hvori R^3 betyder hydrogen eller alkyl med 1 - 20 carbonatomer, og R^2 betyder hydrogen, idet R^2 og R^3 = hydrogen har den største betydning.

Eksempler på grupperne R^2 og R^3 er methyl, ethyl, propyl, butyl eller grupper, der afledes af laurylalkohol eller myristylalkohol, carboxyalkylgrupper, der afledes af eddikesyre, propionsyre, smørsyre, palmitinsyre, eller stearinsyre, nonylphenyl eller oleyl.

R^2 eller R^3 kan også være afledt af en polyvalent alkohol, såsom glycerol eller pentaerythritol, eller en polyvalent carboxylsyre, såsom citronsyre, eller en polyvalent amin såsom ethylendiamin. Polyfunktionelle led R^2 eller R^3 kan være forbundet med tre eller flere polyalkoxykæder af den ovenfor angivne art, hvorved der ved tri- eller højerefunktionelle led dannes forgrenede produkter.

Fremstillingen af de ifølge opfindelsen anvendte, overfladeaktive stoffer gennemføres på i og for sig kendt måde ved kontrolleret tilsætning af alkylenoxider til alkylendiglykoler (eller til polyvalente alkoholer eller aminer, f.eks. pentaerytritol eller ethylendiamin, til fremstilling af forgrenede produkter). De endestillede hydroxylfunktioner kan eventuelt derpå forestres eller forethres. En almindelig forskrift til fremstilling af et egnet blokpolymerisat er beskrevet i eksempel 1a.

De her omhandlede overfladeaktive stoffer udmærker sig ved, at de allerede er virksomme i koncentrationer på 2-200 ppm i vandige medier. Man kan forestille sig, at disse stoffer ved grænsefladen er formet således at deres hydrofobe grupper rager ind i den hydrofobe fase, og de alternerende anordnede hydrofile grupper rager ind i den vandige fase. Da hydrofobiciteten af de enkelte hydrofobe grupper er relativt svag, må også

bindingen af disse enkelte hydrofobe grupper til fremmede hydrofobe strukturer, f.eks. til de hydrofobe områder i opløste proteiner, være så svag, at der kan ses bort fra den ved de omhandlede anvendelseskoncentrationer. Først summen af alle bindinger af de enkelte hydrofobe grupper til en større hydrofob flade (grænseflade, mod hvilken de hydrofobe områder af de opløste proteiner er meget lille) bevirker, at disse stoffer også ved ringe anvendelseskoncentration dækker grænsefladerne optimalt.

Molekylformen, som de omhandlede overfladeaktive stoffer udviser i vandig opløsning, må adskille sig fra den form, de antager ved overfladen. I vandig opløsning er den polymere kæde formet således, at de enkelte hydrofobe områder afmættes mod hinanden, og de hydrofile områder rager ud efter i de vandige omgivelser. Dette bevirker en tilstrækkelig høj opløselighed i vandige medier, således at der er en tilstrækkelig stor forrådspuffer til stede der også ved stadig ændring af størrelsen af grænsefladerne muliggør en optimal ladning af grænsefladerne med de nævnte stoffer.

Hindringen af adsorptionen og denatureringen med de omhandlede tilsætninger er så meget mere overraskende, som en tilsætning af monomere opløselige overfladeaktive stoffer (detergenter) som ovenfor beskrevet netop fremmer denatureringen af proteinopløsninger, især af insulin.

Metoden til stabilisering af vandige proteinopløsninger som beskrevet ifølge den foreliggende opfindelse er generelt anvendelig på peptider og polypeptider, der kan adsorberes til en hydrofob grænseflade fra en opløsning. Blandt anvendelige peptider og polypeptider kan der nævnes enzymer, f.eks. uricase, lysozym, streptokinase, myoglobin, neuraminidase, peptidhormoner, f.eks. secretin, glucagon,

calcitonin, gastrin, ACTH, bradykinin, chlolecystokinon, væksthormon, erytropoietin, skjoldbruskkirtelstimulerende hormoner, thymosin, hypothalamiske frigørelsesfaktorer, relazin samt proteiner med andre funktioner, f.eks. albumin, immunoglobuliner af forskellige klasser og arter, fibroblast-interferon, leukocyt-interferon og immuninduceret interferon af human oprindelse.

Tilsætningen af de nævnte polymere overfladeaktive stoffer til proteinopløsninger er ikke begrænset til opløsninger til terapeutiske formål. Man kan også sætte disse stoffer til proteinopløsninger under fremstillingen og rensningen af proteiner til undgåelse af adsorption og denaturering ved grænseflader, især ved gelchromatografering og ultrafiltrering af proteinopløsninger.

Denatureringen af insulin er en reversibel proces. Ved behandlingen af det denaturerede insulin med let opløselige detergenter (f.eks. natriumdodecylsulfat), med vandige alkaliske medier over en pH-værdi på 10,5 eller med koncentreret trifluoreddikesyre kan de denaturerede produkter renatureres. Det er altså muligt at renaturere de ringe andele af denatureret insulin i insuliner, der fremkommer ved en sædvanlig fremstillingsproces, under de nævnte betingelser, før opløsningerne af disse produkter bringes i kontakt med de her omhandlede overfladeaktive stoffer.

Insulinopløsninger til terapeutiske formål kan fremstilles ifølge følgende almene fremstillingsforskrift:

Indtil 1.500.000 IE okseinsulin, svineinsulin eller humaninsulin eller et des-B1-phenylalaninderivat af disse insuliner, der kan indeholde indtil 0,8 vægtprocent zink, opløses i 400 ml vand under tilsætning af 1 N saltsyre. Denne opløsning blandes med 500 ml af en opløsning, der indeholder et konserveringsmiddel, f.eks. phenol, kresol eller p-hydroxybenzoesyremethylester, et middel til indstilling af isotoni, f.eks. natriumchlorid, glycerol, glucose eller et lignende kulhydrat, og et salt til pufring

af pH-værdien, f.eks. natriumphosphat, acetat, citrat, veronalnatrium eller tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Desuden kan denne opløsning også indeholde et depothjælpestof såsom "Surfen" (1,3-bis-(4-amino-2-methyl-6-quinolyl)-urinstof), til opnåelse af en forlænget insulinvirkning. Med 1 N saltsyre eller 1 N natriumhydroxidopløsning indstilles en pH-værdi på 3,0-4,0 eller 6,8-7,5. Derpå tilsættes der 50 ml af en vandig opløsning, der indeholder 2 -200 mg af et af de omhandlede overfladeaktive stoffer. Opløsningen fyldes op med vand til 1,000 l. En sådan insulinopløsning til terapeutiske formål kan blandes med en suspension, der indeholder amorft eller krystallinsk insulin med forlænget virkning.

Eksempel 1

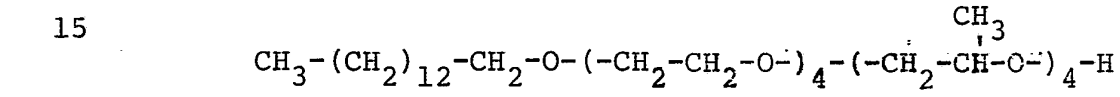
(a) I en 10 liters glaskolbe med omrører, varmebad, tilbagesvaler og en anordning til dosering af alkylenoxider under nitrogen anbringes 152,1 g propylenglykol og 125 g 40%'s kaliumhydroxidopløsning. Der afvandes ved vakuumdestillation. Derpå tilsættes der langsomt ved 120°C under omrøring successivt 4141 g propylenoxid og 476 g ethylenoxid. Efter afsluttet omsætning neutraliseres kaliumhydroxidet ved tilsætning af mælkesyre. De letflygtige andele fraskilles og produktet afvandes ved vakuumdestillation. Den gennemsnitlige molekylvægt af produktet er 2000 ved et indhold af polyoxyethylen på 10 vægt% i molekylet.

(b) 2 prøver med hver 10 ml af en 0,1%'s opløsning af okseserum-albumin eller human-albumin i en 0,01 M phosphatpuffer med en pH-værdi på 7 og to prøver af samme art med en tilsætning af stabilisator på 10 ppm (beregnet på vægten af opløsningen) af et blokpolymerisat bestående af en lineær kæde af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, omrystes ved 37°C. De to første prøver udviser efter 7 og 30 dage en stærk uklarhedsdannelse. der er fremkaldt af denatureret protein. De to prøver,

der indeholder stabilisator, er stadig klare efter flere måneder.

Eksempel 2

10 prøver med hver 10 ml af en 0,01%'s opløsning af enzymet β-galactosidase fra E. coli i 0,01 M phosphatpuffer med en pH-værdi på 7 og med 3 x 10^6 µU/ml tilsættes trinvis 10-100 mg siliconolie AK 350. Suspensionerne omrystes i 48 timer ved 5°C. Derved dannes en emulsion, der ved ultracentrifugering (40.000 g, 30 minutter, 4°C) kan adskilles i to faser. I den vandige fase bestemmes enzymaktiviteten. Det viser sig, at silikoneolieemulsionen har adsorberet indtil 70% af enzymet. En gentagelse af forsøget i nærværelse af 100 ppm (beregnet på opløsningens vægt) af følgende forbindelse



viser, at der i nærværelse af denne overfladeaktive forbindelse ikke adsorberes enzymaktivitet til silikonolien.

Eksempel 3

10 ml af en vandig suspension af polystyrenkugler ("Dow-Latex" ®) med en gennemsnitlig diameter på 0,481 µ deles i to lige store dele. Medens den første del forbliver ubehandlet, omrystes den anden del med 50 mg af et blokpolymerisat bestående af en lineær kæde af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 2250, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, ved stuetemperatur i 2 dage. Derpå fjernes overskuddet ved dialyse mod en vandig opløsning, der indeholder 20 ppm af dette polymere overfladeaktive stof.

Af de i den efterfølgende tabel angivne proteiner fremstilles hver gang 2 x 3 ml af en opløsning med den nævnte koncentration i phosphatpuffer med en pH-værdi på 7. Hver af disse opløsninger omrystes ved 5°C med 500 µl af den ubehandlede og den som ovenfor beskrevet

forbehandlede polystyrensuspension. Derpå klarfiltreres hver prøve gennem et 0,2 µ filter. Tabellen viser proteinkoncentrationerne i filtraterne.

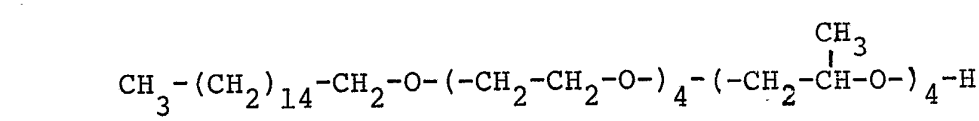
Protein	Proteinkoncentration i opløsningerne		
	A	B	C
Human-γ-globulin	1,2 mg/ml	1,2 mg/ml	0,2 mg/ml
Æg-albumin	0,5 mg/ml	0,50 mg/ml	0,22 mg/ml
Lysozym	1,0 mg/ml	0,95 mg/ml	0,25 mg/ml
Secretin	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	0,3 mg/ml
Glucagon	1,0 mg/ml	0,9 mg/ml	0,3 mg/ml
Insulin	1,0 mg/ml	1,0 mg/ml	0,2 mg/ml

A = 3 ml af den anvendte proteinopløsning + 450 µl puffer
B = efter kontakt med forbehandlede polystyrenflader
C = efter kontakt med ubehandlede polystyrenflader

Dette forsøg gentages ved 37°C. Derved undersøges filtraterne desuden ved gelkromatografering i en søjle. Det viser sig, at proteinopløsningerne, der har været i kontakt med de ubehandlede polystyrenkugler, indeholder højmolekylære aggregater. I proteinopløsningerne, der har været i kontakt med de forbehandlede polystyrenkugler, findes der ikke sådanne aggregater.

Eksempel 4

5 prøver med hver 10 ml af en 0,1%'s opløsning af glucagon i 0,05 M tris/saltsyrepuffer med en pH-værdi på 8,0 og 5 prøver af samme art med tilsætning af 50 ppm (beregnet på vægten af opløsningen) af følgende forbindelse:



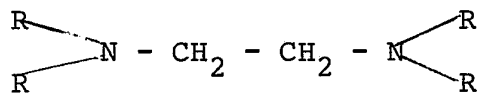
omrystes ved stuetemperatur. De første 5 prøver udviser efter 4 dages forløb en uklarhedsdannelse, der er forårsaget af udfældet denatureret protein. Prøverne hvortil der er sat overfladeaktivt stof, forbliver klare i flere uger.

Eksempel 5

Ampuller med 1-5 ml af en 0,1%'s opløsning af peptidhormonerne secretin, calcitonin, glucagon, gastrin, adrenocorticotropt hormon (ACTH), bradykinin, cholecystokinin (CCK), gastrininhiberende polypeptid (GIP) vasoaktivt intestinalt polypeptid (VIP) og luteiniserings-frigørende-hormon (LHR) i 0,05 M tris/saltsyrepuffer med en pH-værdi på 7,5 og prøver af samme art med en tilsætning af 10 ppm (beregnet på opløsningens vægt) af et blokpolymerisat bestående af en lineær kæde af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 2000, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, omrystes ved 37°C. Prøverne uden stabilisator udviser efter nogle dage en stærk uklarhedsdannelse, der er fremkaldt af denatureret protein. De stabiliserede prøver er stadig klare efter flere måneder.

Eksempel 6

0,1%'s opløsninger af æg-albumin, human-immunglobulin-G eller hval-myoglobin i 0,01 M phosphatpuffer med en pH-værdi på 7 og opløsninger af samme art med en tilsætning af 0,1% (beregnet på vægten af opløsningen) af følgende forbindelse:



$$R = -(CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-O)_n-(CH_2-CH_2-O)_m-H$$

hvorved n og m vælges således, at der fås en gennemsnitlig samlet molekylvægt af forbindelsen på 12.500 og en ethylenoxidandel deri på 40%, befries for aggregater ved ultracentrifugering (f.eks. 100.000 g/90 minutter). Ampuller med 10 ml af disse opløsninger omrystes ved 37°C. Prøverne uden stabilisator udviser efter nogle få timer en stærk uklarhedsdannelse, der er forårsaget af udfældet denatureret protein. De prøver, hvortil der er sat de overfladeaktive

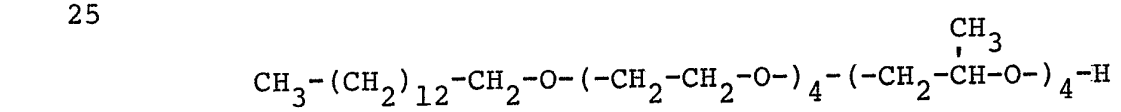
stoffer, forbliver klare i flere måneder og udviser ingen nye aggregater ved en analytisk ultracentrifugering.

Eksempel 7

Krystalliseret okseinsulin (40.000 I.E.) med 0,5 vægtprocent zink opløses i 200 ml vand under tilsætning af 3 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 700 ml af en opløsning af 1 g p-hydroxybenzoesyremethylester, 16 g glycerol og 1,4 g natriumacetat, 3 H_2O. Opløsningen indstilles til en pH-værdi på 6,9 - 7,4 med 1 N natriumhydroxidopløsning. Efter tilsætning af 5 ml af en vandig 0,1% 's opløsning af lineær polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 2.000 fyldes der op med vand til 1,000 liter, og opløsningen sterilfiltreres.

Eksempel 8

Krystalliseret Des-B1-phenylalanininsulin fra okse (100.000 I.E.) med 0,6 vægtprocent zink opløses i 200 ml vand under tilsætning af 3 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 700 ml af en opløsning af 2 g phenol, 17 g glycerol og 6,057 g tris-(hydroxymethyl)--amino-methan, der er indstillet til en pH-værdi på 7,6 med 35 ml 1N saltsyre.Opløsningen indstilles til en pH-værdi på 7,2 - 7,6. Efter tilsætning af 10 ml af en vandig 1% 's opløsning af forbindelsen.



fyldes der op med vand til 1,000 l, og opløsningen sterilfiltreres.

Eksempel 9

Amorft okseinsulin (1.000.000 I.E.) med 0,8 vægtprocent zink opløses i 400 ml vand under tilsætning af 5 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 500 ml af en opløsning af 2,5 g phenol, 16 g glycerol og 1,78 g dinatriumhydrogenphosphat, 2 H_2O. Opløsningen indstilles til en pH-værdi på 7,2 - 7,5. Efter tilsætning af 5 ml af en vandig 0,1% 's opløsning af lineær polypropylenglycol.

med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750 fyldes der op med vand til 1,000 l, og opløsningen sterilfiltreres.

Eksempel 10

Okseinsulin (40.000 I.E.),der er renset ved chromatografering i nærværelse af et blokpolymerisat bestående af en lineær kæde af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, og som indeholder 0,6 vægtprocent zink, opløses i 200 ml vand under tilsætning af 3 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 700 ml af en opløsning af 2,5 g m-kresol, 50 g glucose, 1,4 g natriumacetat, $3H_2O$ og 10 mg af det ovennævnte blokpolymerisat. Opløsningen indstilles med 1 N natriumhydroxidopløsning til en pH-værdi på 6,9 - 7,4, fyldes op med vand til 1000 l og sterilfiltreres.

Eksempel 11

Krystalliseret svineinsulin (40,000 I.E.) med 0,6 vægtprocent zink opløses i 200 ml vand under tilsætning af 3 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 700 ml af en opløsning af 1 g p-hydroxybenzoesyremethylester, 17 g glycerol, 1,4 g natriumacetat, 3 H_2O og 10 mg lineær polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 1.750. Opløsningen indstilles til en pH-værdi på 6,9-7,4. Der fyldes op med vand til 1,000 l og opløsningen sterilfiltreres.

Eksempel 12

Krystalliseret okseinsulin (450.000 I.E.), der er renset ved chromatografering i nærværelse af et blokpolymerisat bestående af en lineær kæde af polypropylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 1.750, der på begge sider er tilpolymeriseret 5% polyethylenglycol, og som indeholder 0,5 vægtprocent zink, opløses i 400 ml 0,03 N saltsyre, og til denne opløsning sættes en opløsning af 150 mg zinkchlorid og 5 mg af det til chromatograferingen anvendte blokpolymerisat i 100 ml 0,03 N saltsyre. Opløsningen sterilfiltreres og blandes med 500 ml af en ligeledes sterilfiltreret opløsning af 70 g natriumchlorid, 14 g natriumacetat, 3 H_2O, 5 mg af det til chromatograferingen

anvendte blokpolymerisat og 10 ml 1N natriumhydroxid-opløsning i vand. Blandingen indstilles til en pH-værdi på 5,4 og omrøres i 48 timer ved stuetemperatur, hvorved insulinet krystalliserer i rhomboedre. Til krystalsuspensionen sættes 10,25 l af en steril opløsning af 20 g natriumchlorid, 1,75 g natriumacetat, 3 H_2O, 11,25 g p-hydroxybenzoesyremethylester og 102,5 mg af det til chromatograferingen anvendte blokpolymerisat. Ved tildrypning af 1 N natriumhydroxidopløsning indstilles pH-værdien til 6,9 - 7,3.

Eksempel 13

Krystalliseret okseinsulin (40.000 I.E.), der er renset ved sædvanlig chromatografering i nærværelse af forbindelsen

$$(CH_3.(CH_2)_{10}-CH_2-O-(-CH_2-CH_2-O-)_4-(-CH_2-\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H-O-)_4-H$$

og indeholder 0,5 vægtprocent zink, opløses i 200 ml vand under tilsætning af 3 ml 1 N saltsyre. Til denne opløsning sættes 700 ml af en opløsning af 1 g p-hydroxybenzoesyremethylester, 50 g glucose, 0,175 g "Surfen" og 100 mg af det samme stof som det, der er anvendt til chromatograferingen. Opløsningen indstilles eventuelt med 1 N saltsyre eller 1 N natriumhydroxidopløsning til en pH-værdi på 3,3-3,5, fyldes op med vand til 1,000 l og sterilfiltreres.

Eksempel 14

Fem prøver på hver 1,5 ml af en opløsning af 5000 enheder humant fibroblast-interferon i phosphatpuffer, pH-værdi 7, og fem analoge prøver, der som stabilisator indeholder 10 ppm (beregnet på opløsningens vægt) af en blokpolymer bestående af en lineær kæde af 1,2-propylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750 dalton, til hvilken der på hver side er bundet 5% polyethylenglycol ved polymerisation, omrystes ved 37°C. I de fem første prøver konstateres et tab af biologisk aktivitet på mere end 97% efter to dage. Den biologiske aktivitet af interferonet i de fem prøver indeholdende stabilisator forbliver imidlertid uændret, selv efter flere uger.

En gentagelse af forsøget ved stuetemperatur viser et lignende tab af biologisk aktivitet i de ustabiliserede prøver efter 5 dage. I prøverne indeholdende stabilisator forbliver aktiviteten af interferonet uændret efter flere uger.

Eksempel 15

10 ml af en vandig suspension af polystyrenperler ("Dow Latex") med en gennemsnitlig diameter på 0,481 µ deles i to portioner, hvoraf den ene forbliver ubehandlet, medens den anden omrystes i to dage ved stuetemperatur med 50 mg af en blokpolymer bestående af en lineær 1,2-propylenglycol-kæde med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750 dalton, til hvilken der på hver side er bundet 10% polyethylenglycol ved polymerisation. Overskuddet fjernes derpå ved dialyse mod en vandig opløsning indeholdende 150 ppm af det samme polymere overfladeaktive stof.

Der fremstilles to prøver på hver 3 ml af en opløsning af 10.000 enheder humant fibroblast-interferon i en phosphatpuffer, pH-værdi 7, og hver opløsning omrystes ved 5°C i 20 timer med 500 µliter af den ubehandlede polystyrensuspension eller polystyrensuspensionen, der er behandlet som beskrevet ovenfor. Hver prøve klarfiltreres derefter gennem et 0,2 µ-filter. Den biologiske aktivitet af interferonet i filtratet bestemmes. I opløsningerne, som var i kontakt med

de ubehandlede polystyrenperler, konstateres mindre end 1% af den beregnede aktivitet. I opløsningerne, som var i kontakt med polystyrenperler behandlet som beskrevet ovenfor, bevares mere end 95% af den aktivitet, der bestemmes ved forsøgets begyndelse.

Eksempel 16

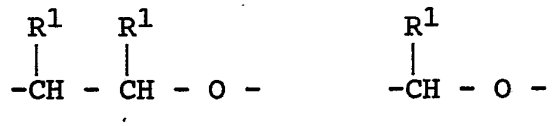
To ampuller, der hver er fyldt med 10 ml af en opløsning af humant insulin (500 enheder pr. ml) i 0,05M tris/-HCl-puffer, pH-værdi 7, og to analoge prøver, der som stabilisator indeholder 10 ppm (beregnet på opløsningens vægt) af en blokpolymer bestående af en lineær 1,2-polypropylenkæde med en gennemsnitlig molekylvægt på 1750 dalton, til hvilken der på hver side er bundet 5% polyethylenglycol ved polymerisation, omrystes ved 37°C. De to førstnævnte prøver bliver stærkt uklare efter 5 dage på grund af denatureret insulin, og den biologiske aktivitet af hormonet falder til mindre end 10% af den aktivitet, der bestemmes ved forsøgets begyndelse. De to prøver, der indeholder stabilisator, forbliver klare, selv efter mere end 1 år, og det konstateres, at den biologiske aktivitet er uændret.

Patentkrav.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en vandig proteinopløsning, som er bestandig mod denaturering af proteinerne ved grænseflader, kendetegnet ved, at der til den vandige proteinopløsning sættes et overfladeaktivt homopolymerisat, copolymerisat eller blokpolymerisat med formlen I

$$R^2Y - X_n - R^3 \qquad (I)$$

hvor X_n betyder en kæde af n led med formlerne II eller III



(II) (III)

i vilkårlig rækkefølge, og n betyder 2-80, fortrinsvis 8-45, Y betyder -O- eller -NH-,
R^1 betyder hydrogen, methyl eller ethyl, idet grupperne R^1 kan være ens eller forskellige, idet der dog i mindst halvdelen af kædeledene X forekommer methyl eller ethyl, og R^2 og R^3 uafhængigt af hinanden betyder hydrogen eller en organisk gruppe.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at R^2 og R^3 hver især betyder alkyl med 1-20 carbonatomer, carboxyalkyl med 2-20 carbonatomer eller alkylphenyl med 1-10 alkyl-carbonatomer, ider R^2 dog, såfremt Y betyder -NH-, kun kan betyde alkyl med 1-20 carbonatomer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at R^2 og/eller R^3 er tri- eller polyvalente og er forbundet med tre eller flere polyalkoxykæder $-X_n$ til forgrenede produkter.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at proteinet er insulin, og at opløsningen eventuelt indeholder de ved insulinopløsninger gængse tilsæt-

ninger til indstilling af isotoni, konservering og/eller depotvirkning.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at en opløsning af okseinsulin, svineinsulin eller humaninsulin eller et des-B1-phenylalaninderivat af disse insuliner, der indeholder indtil 0,8% zink, beregnet på insulinets vægt, blandes med en opløsning, der indeholder en forbindelse med formlen I, og der tilsættes eventuelt et middel til indstilling af isotoni, såsom glycerol, natriumchlorid, glucose, eller et lignende kulhydrat, til konservering en tilsætning af phenol, cresol eller p-hydroxybenzoesyremethylester, og til pufring af pH-værdien natriumphosphat, acetat, citrat, 5,5-diethylbarbitalnatrium eller tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.

6. Fremgangsmåde til fremstilling af et insulinpræparat med depotvirkning, k e n d e t e g n e t ved, at der til en insulinopløsning, der er fremstillet ifølge krav 5, sættes en depotkomponent for insulin med forlænget virkning.