



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **323460**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C12N 9/74 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19971104	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.09.21 PCT/CA95/00541
(22)	Inng.dag	1997.03.11	(85)	Videreføringsdag	1997.03.11
(24)	Løpedag	1995.09.21	(30)	Prioritet	1994.09.21, US, 309583
(41)	Alm.tilgj	1997.04.24			
(45)	Meddelt	2007.05.14			
(73)	Innehaver	Haemacure Corp, 16771 Chemin Sainte-Marie, Kirkland, QC H9H 5H3, Canada			
(72)	Oppfinner	Trung Bui-Khac, Montréal, QC, Canada Zbigniew Proba, Chomedey, QC, Canada Nicolas Dupuis, Longueuil, QC, Canada Teresa Brodniewics, Chomedey, QC, Canada			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte til fremstilling i stor skala av en lagringsstabil trombinsammensetning med terapeutisk kvalitet som hovedsakelig er fri for virus			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0443724 A, EP378208 A, DE3809991 A, JP04-371221 A, JP02-167232 A, US 5304372 A			
(57)	Sammendrag				

Denne oppfinnelse tilveiebringer en forbedret fremgangsmåte for fremstilling i stor skala av trombin av terapeutisk kvalitet og med utmerket virussikkerhet og lagringsstabilitet, omfattende rensing av viricdbehandlet råtrombin ved ionebytter-kromatografi og en enkelt kolonne ved anvendelse av et sulfalkyl-aktivert polysakkarid, spesielt sulfopropyl-Spherodex® som ionebytter medium og økende konsentrasjoner av fosfatbuffer for eluering. Etter gjenvinning av trombin i slutteluatet, blir fosfatbufferen utvekslet med en stabiliserende formuleringsbuffer, og stabilisert trombin underkastet virusfiltrering og eventuell tørr varmebehandling for ytterligere virus-inaktivering. Sluttproduktet har høy spesifikk aktivitet og oppnås i godt utbytte.

Bakgrunn for oppfinnelsen

1. Område for oppfinnelsen

Denne oppfinnelse vedrører fremgangsmåte til fremstilling av trombinprodukter av terapeutisk kvalitet for klinisk anvendelse (innbefattende veterinær anvendelse) i stor skala. Trombinet karakteriseres ved høy virussikkerhet, høy spesifikk aktivitet, lagringsstabilitet og lav pyrogenisitet.

Trombin blir bredt anvendt i kliniske anvendelser som koagulasjonsfaktor for å stanse blødning av sår, ved omdanning av fibrinogen til fibrin. Det er en vanlig komponent av kirurgiske bandasjer, og er blitt anvendt i kombinasjon med fibrinogen og andre koaguleringsproteiner i to-komponent hemostatiske systemer, såsom fibrinlim, klebemidler og forseglingsmidler. Både humant og bovint plasma er anerkjent som en kilde for trombin for human klinisk anvendelse. Hovedsakelig, på grunn av vanskeligheten med å rense trombin fra ikke-autologt humant plasma, med betydelig fjerning eller inaktivering av eventuelle virus som kan være tilstede i utgangspasma, vil imidlertid trombinprodukter av terapeutisk kvalitet for human anvendelse og som er generelt kommersielt tilgjengelig være avledet fra bovint plasma, som har lavt iboende potensial for å inneholde virus som er skadelige for mennesker, uansett det vel anerkjente immunogene potensial for bovint trombin hos mennesker som er av betydelig klinisk interesse.

For klinisk anvendelse blir trombin typisk avledet fra blodplasma som et proteinkompleks med protrombin, vanligvis etterfulgt av omdanning av proenzymet til trombin ved omsetning med tromboplastin i nærvær av kalsiumioner. Det rå trombinprodukt blir deretter bearbeidet for å skille trombin fra forurensede blodproteiner, og for å inaktivere eller fjerne eventuelle toksiner eller patogener som kan være tilstede. Ideelt er det gjenvunnede produkt et trombin av terapeutisk kvalitet (trombin i overensstemmelse med USFDA-standarder for human anvendelse), som har høy spesifikk aktivitet, god lagringsstabilitet, lav pyrogenisitet, og som er i alt vesentlig virusfritt.

Dette ideal blir imidlertid sjelden oppfylt. I rensemetoder i generell anvendelse for fremstilling av trombin av terapeutisk kvalitet, blir gjenvinning av svært rent trombin typisk gjennomført ved tap av betydelige mengder aktivt trombin, gjennom tap eller inaktivering av trombin i utgangsmaterialet under rensingen. I mindre rene produkter vil tilstedeværelsen av fremmede plasmaproteiner (enten bovine eller ikke-autologe humane proteiner) øke risikoen for mulige alvorlige immunologiske reaksjoner hos pasienten, og typisk skadelig påvirke produktets egenskaper. Spesielt vil aktuelle rensefremgangsmåter vanligvis tillate en svært begrenset grad av plasmarensing med hensyn til virusforurensninger uten uakseptabelt tap av

trombinaktivitet. Videre vil mange trombinrensefremgangsmåter, som er rapportert å være relativt effektive i laboratoriet til å fremskaffe terapeutisk-attraktive trombinprodukter, ikke være egnet til økonomisk fremstilling i stor kommersiell skala. Som resultat vil trombinprodukter som er blitt foreslått for human klinisk anvendelse, i varierende grad innebære en signifikant toksisk risiko, ikke være konsistent svært virkningsfulle, og/eller kreve komplekse fremstillingsfremgangsmåter som ikke lar seg tilpasse til fremstilling i stor skala. Videre vil kjente rensefremgangsmåter eller produktene derav mangle allsidighet: f.eks., vil produktene i praksis vanligvis ikke være anvendelige innenfor veterinærmedisinen, og fremgangsmåtene vil være altfor komplekse eller ineffektive for anvendelse i klinisk sammenheng for autolog plasmarensing.

2. Diskusjon av beslektet teknologi

Vanligvis blir trombin renset fra det rå trombinprodukt ved kromatografi ved anvendelse som separasjonsmedia av forskjellige ionebytter-polymerer, spesielt aktiverte polysakkarider, såsom agarose, dextran, eller cellulose. For å oppnå et trombinprodukt som har en tilfredsstillende høy spesifikk aktivitet fra det rå trombin-utgangsmaterialet, blir det typisk anvendt flertrinns kromatografi ved bruk av alternerende anion- og kation-byttermedia, f.eks. DEAE (diethylaminoetyl), Sefarose® som anion-byttermedium og CM- eller S-Sefarose® som kation-byttermedium (se f.eks. US-patent 5 149 540 til Kunihiro et al., gitt 22. september 1992 eller US-patent 4 965 203 til Silbering et al., gitt 23. oktober 1990). Denne flertrinns kromatografi er tidskrevende, øker prosessens kostnader, og vil ofte ikke være egnet til fremstilling i stor skala av trombin av terapeutisk kvalitet.

Som kjent i teknologien kan trombin behandles i løpet av rensefremgangsmåten for å inaktivere lipidholdige virioner med en løsningsmiddeltensid-(SD) blanding, omfattende et ikke-ionisk tensid og et organisk løsningsmiddel som er i stand til å sprengte viruslipider og inaktivere viruset uten å denaturere trombinet. Selv om slike rensede trombinprodukter av og til karakteriseres som "virus frie" (se f.eks. EP 0 443 724 A1, publisert 28. august 1991), vil de ofte ikke være det. Selv om SD-behandling av det trombinholdige materialet vanligvis vil være effektivt for å inaktivere omhyllede virioner, vil ikke-omhyllede virioner, såsom parvovirus ikke inaktiveres ved denne fremgangsmåte, og eventuelle slike virioner som er tilstede i utgangsmaterialet kan føres gjennom rensefremgangsmåten og holde seg aktive i det endelig trombinprodukt, og således innebære en klinisk fare. Selv om dette problem er blitt anerkjent, har det vært vanskelig å løse, ettersom andre standard fremgangsmåter for virusinaktivering, såsom varmebehandling eller UV-behandling også vil inaktivere trombin, med uakseptabelt tap av aktivt trombin for kommersielle anvendelser.

- Det er således i fagområdet kjent flere fremgangsmåter til å fremstille humane trombinpreparater. Således angår EP 0443724 et humant trombinpreparat fremstilt ved en prosess i kommersiell skala. EP 378208 angår en generell fremgangsmåte til å fremstille en virus-inaktivert proteinholdig sammensetning. Videre angår DE 3809991 en fremgangsmåte hvori en vandig oppløsning som inneholder trombin blir oppvarmet i nærvær av minst ett stabiliserende middel valgt fra forskjellige sukkere, for derved å inaktivere vira som eventuelt kontaminerer trombinet. Videre angår JP 04371221 produksjonen av en koppperammonium regenerert cellulose porøs hulfibermembran som er høy med hensyn på LRV for et relativt lite virus, ved å bruke et uformet tynt rør som koagulasjonsbad når membranen blir fremstilt. Videre angår JP 02167232 fremstilling av et farmasøytisk preparat inneholdende en blod-koagulasjonsfaktor VIII med høyt utbytte og under sikker fjerning av vira uten å ødelegge aktiviteten ved å filtrere det farmasøytiske preparat inneholdende blod-koagulasjonsfaktor VIII gjennom et filter som utnytter hule garn av regenerert cellulose, fremstilt i henhold til en koppperammonium prosess. Avslutningsvis angår US 5,304,372 en fremgangsmåte til fremstilling av et humant trombinkonsentrat fra PPSB-fraksjonen i plasma, som ikke involverer noe tilsetning av faktorer av animalsk opprinnelse for å indusere aktivering av protrombin til å fremstille trombin, og som inkluderer et trinn for virusinaktivering ved å bruke oppløsningsmiddel-detergent og rensing ved kationutvekslingskromatografi.

Det er derfor en hensikt å tilveiebringe en fremgangsmåte til fremstilling av trombinsammensetninger uten ovennevnte ulemper. Denne hensikt er oppnådd ved foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av de vedlagte krav.

Sammendrag av oppfinnelsen

- Denne oppfinnelse tilveiebringer følgende i godt utbytte et lagringsstabil trombinkonsentrat av terapeutisk kvalitet, av høy spesifikk aktivitet og lav pyrogenisitet, i alt vesentlig rensed med hensyn på virioner. Rensefremgangsmåten inkluderer trinn for 1) inkubering av rått trombin- utgangsmåteriale med en viricid blanding for å inaktivere lipidholdige omhyllende virioner; 2) trinnvis ionebytter-kromatografi av det inkuberte materialet på et enkelt kation-byttermedium, ved anvendelse av økende konsentrasjoner av saltløsning og et sulfalkylaktivert polysakkarid medium, såsom agarose, dextran, eller cellulose med høy selektiv affinitet for trombin, med gjenvinning av et endelig eluat omfattende en saltløsning av trombin høyt rensed med hensyn på forurensninger innbefattet andre blodproteiner, toksiner, lipidholdige omhyllende virioner, og viricidrester; 3) utveksling av fosfatkromatografibufferen i det endelige eluat med en buffer av fysiologisk forlikelig formulering for å tilveiebringe en formuleringsløsning av høyt rensed trombin; 4) filtrering av trombinformuleringsløsningen over et virusfilter for å fjerne ikke-lipidholdige virioner; og 5) eventuell tørr

varmebehandling av filteret og lyofilisert trombin for å sikre inaktivering av eventuelle mulige gjenværende virioner (smittsomme virusmaterialer).

Formuleringsbufferen av vandige saltløsninger med en pH på ca. 7,2-7,4, omfattende et sitronsyresalt og 1) bovint albumin for bovint trombin, tiltenkt veterinære anvendelser, eller 2) humant albumin for bovint og humant trombin, ment for humane anvendelser er slike eksempler. Formuleringsløsningene ifølge denne oppfinnelse (beskrevet i mer detalj nedenfor) vil generelt bidra bl.a. til stabilisering av trombinenzymatisk aktivitet eller postkromatografibehandling og under lagring; den anvendte formulering vil også stabilisere trombin mot tap av aktivitet under antiviral tørr varmebehandling, ifølge trinn (5).

Produktet er et lagringsstabil trombin av terapeutisk kvalitet og med høy virussikkerhet og spesifikk aktivitet for generell klinisk anvendelse, innbefattet veterinær anvendelse. Den høye spesifikke aktivitet koblet med godt produktutbytte, reflekterer effektiviteten av fremgangsmåten for rensing av rått trombin med hensyn til forurensede proteiner, andre fremmede og potensielt toksiske utgangsmaterialkomponenter, viricidrester, og virioner, uten betydelig tap eller inaktivering av utgangstrombin. Viricidrester på mindre enn ca. 15 ppm kan typisk oppnås. Produktstabilitet mot signifikant tap av aktivitet for minst et år under lagring ved ca. 4°C, er blitt oppnådd. Fremgangsmåten er anvendbar for trombin fra hvilken som helst anvendelig kilde, spesielt human og bovin, og er spesielt anvendelig for fremstilling i stor skala av trombin med terapeutisk kvalitet. For anvendelser, hvori det ikke kreves i alt vesentlig fullstendig virussikkerhet av produktet, eller hvor virussikkerheten ellers ikke er betraktet som et problem, kan virusfiltrering og varmebehandling (trinnene 4 og 5) utelates.

25 Beskrivelse av oppfinnelsen

I en eksempelvis utførelse av oppfinnelsen for human klinisk anvendelse, blir et rått humant trombinpreparat først inkubert med et lipidsprengende lipid for å inaktivere lipidholdige virioner. Det behandlede preparat blir deretter i rekkefølge rensset ved ionebytter-kromatografi ved anvendelse av sulfopropyl Spherox® som det eneste adsorbsjonsmedium, og økende konsentrasjoner av saltløsning i hver passasje for å oppnå et endelig eluat omfattende en konsentrert løsning av trombin, i alt vesentlig rensset med hensyn til aktive lipidholdige virioner, forurensende proteiner og viricidrester. Til den oppsamlede trombintoppløsning blir det tilsatt stabiliserende albumin, og deretter blir kromatografibufferen utvekslet med en formuleringsbuffer-løsning ved diafiltrering. Den resulterende trombinformuleringsløsning omfattende formuleringsbufferkomponentene, albumin, vann, og rensset trombin, blir deretter filtrert for å fjerne ikke-lipidholdige virioner. Det virusrensede trombin blir deretter fortynnet til den nødvendige

5 konsentrasjon i formuleringsbuffer, endelig konsentrasjon av stabiliserende albumin justeres til 2% og løsningen sterilfiltreres, lyofiliseres, og lagres ved ca. 4°C. For å sikre et viriofritt produkt blir det virusfiltrerte, lyofiliserte trombin underkastet tørr varmebehandling ved ca. 100°C for å inaktivere eventuelle gjenværende aktive virus.

Rått trombinpreparat

Hvilket som helst egnet preparat inneholdende trombin kan anvendes som utgangsmateriale for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, innbefattet kommersielt fremstilte preparater. Den foreliggende oppfinnelse muliggjør sikker anvendelse av 10 humant plasma som kilde for trombin, og for human klinisk anvendelse blir humant plasma følgelig vanligvis foretrukket, ettersom dette reduserer risikoen for allergiske reaksjoner hos mottakeren. Bovint plasma er et generelt foretrukket utgangsmateriale for trombinprodukter, ifølge denne oppfinnelse for veterinær anvendelse. Som kjent i teknologien, kan råtrombin oppnås fra surgjort friskt 15 plasma, kryosupernatant, supernatant etter saltutfelling, eller hvilken som helst annen plasmafraksjon inneholdende dette protein. Et eksempel på en fremgangsmåte for fremstilling av et rått utgangstrombinmateriale som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse, er beskrevet i Ann. pharmaceutique francaise 48 (del 3): 129-1, 1990. I korthet vil den rapporterte fremgangsmåte 20 omfatte fortynning av utgangspasma eller plasmafraksjonen med destillert vann for å redusere saltkonsentrasjonen til under ca. 10% av den originale friske plasmakonsentrasjon med justering av pH av den fortynnede løsning til ca. 5,3; sentrifugering av løsningen for å fremstille et bunnfall inneholdende rått protrombin; oppløsning av bunnfallet i NaCl-løsning med justering av pH til ca. 25 7,0; og tilsetning av kalsiumioner til den resulterende løsning med inkubering i minst ca. 2 timer ved romtemperatur, for å omdanne protrombin til trombinet. Trombinløsningen blir deretter sentrifugert for å tilveiebringe en supernatant inneholdende råtrombin egnet for anvendelse som utgangsmateriale for denne oppfinnelsen; supernatanten blandes deretter med viricid som beskrevet nedenfor, 30 og bunnfallet kastes. I en foretrukket utførelse, spesielt anvendelig for fremstilling av trombin i stor skala, blir den ovenfor beskrevne fremgangsmåte forbedret ifølge den foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av diafiltrering, spesielt diafiltrering ved bruk av en ca. 0,015M NaCl-løsning i stedet for vann som etterfyllingsbuffer, for å redusere saltkonsentrasjonen av utgangspasma under bibehold av omtrent det 35 originale materialvolum; diafiltreringen kan omfatte enten ultrafiltrering ved konstant volum og med kontinuelig tilsetning av frisk buffer, eller gjentatt ultrafiltrering med tilsetning av frisk buffer, etter hver konsentreringssyklus. Dette vil effektivt redusere saltkonsentrasjonen av utgangspasmaet til det ønskede nivå, mens man unngår den svært store økning i volum av materialet som skal

sentrifugeres for å oppnå et rått protrombinbunnfall og som skriver seg fra fortynning, ifølge tidligere teknologi.

Viricid

- Hvilket som helst egnet viricid for inaktivering av lipidholdige virus som kjent i teknologien kan anvendes; blandinger omfattende et ikke-ionisk tensid slik som et polyoksyetylsorbitan tensid av Tween® eller Span® og/eller et organisk løsningsmiddel, såsom et di- eller trialkylfosfat som sprenger viruslipider og inaktiverer lipidholdige virioner uten signifikant denaturering av trombin, blir for tiden anbefalt. Slike viricidblandinger blir bredt referert heri som
- 10 "løsningsmiddeltensid-" eller SD-blandinger. SD-blandinger omfattende et di- eller trialkylfosfat eventuelt i kombinasjon med et ikke-ionisk tensid som fuktemiddel, og/eller alkohol eller eter, inkubert med det forurensede protein som beskrevet i US-patent 4 540 573 gitt 10. september 1985 til Neurath et al., (inkorporert heri ved referanse), er eksempler på slike blandinger. Ifølge fremgangsmåten i den
- 15 foreliggende oppfinnelse, blir den utvalgte løsningsmiddel/tensidblanding inkubert med det rå trombin- utgangsmaterialet før kromatografi, med fjerning under kromatografi nedenfor av viricidrester og forurensninger, spesielt andre koaguleringsfaktorer, inneholdt i utgangsmaterialet. En foretrukket ikke-denaturerende SD-blanding for anvendelse, ifølge denne oppfinnelse er basert på et
- 20 C₂-C₁₀-tri-alkylfosfat, såsom tri-n-butylfosfat og et polyoksyalkylenderivat av en sorbitol/fettsyre partialester, slik som Tween 80® (polyoksyetylsorbitan monooleat) ved fysiologisk pH.

Rensing med ionebytter

- 25 Ifølge denne oppfinnelse blir det viricidbehandlede rå trombinutgangs-materialet rensed ved sekvensiell kolonnekromatografi ved anvendelse av et enkelt adsorpsjonsmedium med økende konsentrasjoner av buffer i hver kjøring. Anvendelige kromatografiparametere er vel kjent i teknologien; en forbedret fremgangsmåte ifølge den foreliggende oppfinnelse, omfatter kjøring av den
- 30 kromatografiske separasjon ved en temperatur på ca. 12°C, heller enn konvensjonelt ved romtemperatur (ca. 20°C), hvilket signifikant øker utbyttet. Den kromatografiske rensing av trombin fra rått trombinutgangsmateriale inkubert med viricid, er beskrevet heri i form av kolonnekromatografi; imidlertid kan det anvendes et hvilket som helst annet sammenlignbart fysisk arrangement, slik som
- 35 patroner for å bringe adsorpsjonsmediet i kontakt med trombinpreparatet. Ved fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelse, vil ionebytter-rensfremgangsmåten tilveiebringe et trombinprodukt med høy spesifikk aktivitet og godt utbytte, hvilket

reflekterer den svært virksomme og effektive rensing av det rå trombin med hensyn til fremmede materialer i det rå preparat, spesielt andre blodproteiner eller bakterietoksiner, og viricidrester.

A. Adsorpsjonsmedier

- 5 Det kan anvendes hvilke som helst kationbytter-adsorpsjonsmedier egnet for separasjon av trombin fra det rå, viricidbehandlede utgangsmaterialet for å tilveiebringe et produkt av terapeutisk kvalitet, spesielt medier som er høyt selektive for trombin, såsom Sepharose® eller SP-Sephadex®, kommersielt tilgjengelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. I en utførelse av den
- 10 foreliggende oppfinnelse, som er spesielt foretrukket for fremstilling i stor skala, anvendes sulfopropyl-Spherox®-gel (tilgjengelig fra Separacor Inc., Marlborough, MA, USA), som ionebyttermidium. Dette medium er en ikke-kompressibel rigid komposittgel, omfattende silikapartikler jevnt dekket med det sulfopropylaktiverede dextran som har både høy kapasitet for trombinadsorpsjon og
- 15 utmerkede flytegenskaper, hvilket tillater hurtig og effektiv rensing. Mediet kan også hurtig og beleilig fornyes etter anvendelse ved vasking med f.eks. natriumhydroksydøsning, både for renhold og fjerning av proteiner eller andre materialer fra kolonnen. Vanligvis blir ikke-rigide geler slik som SP-Sephadex og sammenlignbare geler, ikke anbefalt for rensing av trombin i stor skala ifølge den
- 20 foreliggende oppfinnelse, ettersom det er blitt funnet at signifikant reduserte strømningshastigheter under trombinrensingen ifølge denne oppfinnelse, blir forårsaket av kompresjon av kolonnen p.g.a. fleksibiliteten av disse medier. Når den kromatografiske separasjon blir kjørt ved 12°C, vil det endelige kromatografieluat omfatte en blanding av bovin trombin med en spesifikk aktivitet
- 25 på minst 2000 NIH- enheter pr. mg naturlig protein (dvs. ikke innbefattet, eventuelt tilsatt protein slik som stabiliserende serumalbumin, se nedenfor), ved et utbytt på minst 70%, opptil ca. 90% bovin trombin (ca. 265000 NIH-enheter bovin trombin, opptil ca. 340000 enheter, ved å starte fra 6g av kommersielt rått trombin med spesifikk aktivitet 100 NIH/mg), eller en blanding av humant trombin med en
- 30 spesifikk aktivitet på minst ca. 1000 NIH-enheter pr. mg naturlig protein (dvs. ikke innbefattet eventuelt tilsatt protein, slik som stabiliserende serum albumin, se nedenfor) med et utbytte på minst ca. 70%, opptil ca. 90% humant trombin (minst ca. 150000 NIH-enheter humant trombin, opptil ca. 180000 enheter, ved å starte fra 5 l plasma supernatant etter saltutfelling. Når den kromatografiske separasjon
- 35 kjøres ved 20°C, vil den spesifikke aktivitet av humant trombin være på minst ca. 400 NIH-enheter pr. mg naturlig protein. Prosenttap av aktivitet under S/D-behandling og sats til sats variasjoner, er inkludert i det gitte enhetsområdet.

B. Kromatografibuffer

- Kromatografibufferen kan omfatte en vandig fosfatløsning, omfattende $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (for bovint trombin) og $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (for humant trombin); komponentene av de individuelle bufferløsninger blir blandet sammen med
- 5 fortrinnsvis destillert vann, i alt vesentlig i ekvimolare forhold, og deretter blir de en-basiske og to-basiske fosfatløsninger blandet sammen i forhold, som gir en endelig bufferløsning med en pH på i alt vesentlig 6,5. Kolonnen ekvilibrerer først med en lav konsentrasjon av fosfatbuffer (ca. 0,25M), og vaskes med økende konsentrasjoner av den samme buffer inntil alt
- 10 UV-absorberende materiale er eluert. Det endelige eluat (trombin-toppløsning) blir gjenvunnet og virusbehandlet, som beskrevet nedenfor, for virussikkerhet som hensiktsmessig for den tilsiktede anvendelse. For bovint trombin blir kolonnen fortrinnsvis vasket med tre økende konsentrasjoner av bufferen, (ca. 0,025M, 0,35M og 0,4M); den tredje vasking med 0,4M buffer eluerer
- 15 trombintoppløsningen. Viricide rester og forurensende proteiner blir fjernet under de første to vaskinger. For humant trombin blir kolonnen fortrinnsvis vasket med fire økende konsentrasjoner av buffer (ca. 0,025M, 0,15M, 0,20M og 0,25M); den fjerde vasking med 0,25M buffer eluerer trombintoppløsningen. Viricide rester og forurensende proteiner blir fjernet under de første tre vaskinger.
- 20 Alternativt kan kromatografien gjennomføres med en lineær gradient av økende konsentrasjon av natriumkloridløsning. Rensing av humant trombin er blitt oppnådd ved anvendelse av en kolonne som er ekvilibrert i 80mM av NaCl, og vasket med en lineær gradient av NaCl-løsning med økende molariteter (80-150 mM). Trombinet elueres i 400 mM NaCl-løsning. Dette eksperiment er blitt
- 25 gjennomført ved 20°C, og den spesifikke aktivitet var sammenlignbar (500 NIH) med den som ble oppnådd ved den samme temperatur, ved anvendelse av den økende fosfatbuffer-trinngradient (> 400 NIH). Bufferen eller saltløsningen som ble anvendt under den kromatografiske rensing, er derfor ikke kritisk, forutsatt at den er egnet for
- 30 trombinrensing med hensyn til ionestyrke og pH. Den dyktige fagmann kunne derfor lett finne ekvivalenter til den ovenfor anvendte buffer på saltløsningene, for å oppnå lignende rensing.

C. Bufferutveksling

- Gjenvunnet trombintoppløsning fra ovenfor blir diafiltrert eller på annen måte
- 35 behandlet, ifølge kjente fremgangsmåter for å utveksle kromatografi-bufferløsningen med formuleringsbufferløsning. En hvilken som helst formuleringsbufferløsning, hvori trombin er løselig og som stabiliserer trombinløsningen mot de beskrevne påfølgende bearbeidingstrinn for den tilsiktede

anvendelse, kan anvendes, spesielt løsninger av Tris-HCl (ca. 0,20-0,30 vektprosent av den samlede blanding) i vandig saltløsning (ca. 0,40 til ca. 0,50 vektprosent NaCl av den samlede blanding). Spesielt gode resultater, ifølge den foreliggende oppfinnelse for stabilisering av trombin mot

- 5 postkromatografi-viricidbehandling og lagringsnedbrytning, blir oppnådd f.eks. ved anvendelse av en formuleringsbufferløsning omfattende en vandig løsning av ca. 0,25% natriumcitrat, 0,45% natriumklorid, 0,25% Tris-HCl (alle vekt/vol%); pH 7,3.

- 10 For best resultater blir bovint eller humant serumalbumin (ifølge den tilsiktede anvendelse) først tilsatt til trombintoppløsningen før utveksling av kromatografibuffer med formuleringsbufferløsningen, i en mengde på ca. 20 ganger det totale løsningsprotein (dvs. "naturlig protein") på vektprosent- basis. Den endelige konsentrasjon av albumin blir øket til 2% (vekt/vol) etter at trombinløsningen er fortynnet til nødvendig konsentrasjon ved slutten av
- 15 bearbeidingen akkurat før fylling. For å utveksle bufferen blir den gjenvunne trombintoppløsning fortrinnsvis diafiltrert, ved anvendelse av f.eks. et volum av formuleringsbuffer, lik ca. 8 ganger volumet av trombintoppløsningen, og en 30000 molekylvekt cut-off-membran eller en annen beleilig membran som holder tilbake trombin (mw 36000, som varierer noe etter kilden), og albumin (molekylvekt
- 20 66000, som varierer noe etter kilden), men ikke mindre proteiner. Selv om forbedrede resultater kan oppnås ved tilsetning av albuminet (eller, mindre fortrinnsvis på det nåværende tidspunkt, hvilket som helst annet stabiliserende protein) på hvilket som helst tidspunkt før lagring, blir det foretrukket at albuminet inkluderes i formuleringsløsningen før den blir utvekslet med kromatografibuffer-
- 25 løsningen, ettersom albuminet bidrar til stabilisering av trombinet under alle postkromatografitrinnene. Som beskrevet ovenfor, blir det mest foretrukket at albuminet blir tilsatt til trombintoppløsningen før bufferutvekslingstrinnet. Egnert serumalbumin for anvendelse til praktiseringen av denne oppfinnelse, er vanligvis kommersielt tilgjengelig; f.eks. vil et anvendelig humant serumalbumin omfatte
- 30 Plalbumin-25[®] Miles Canada Inc., Etobicoke, Ontario, Canada), omfattende en USP 25% albuminløsning, som dessuten inneholder to stabilisatorer: 0,02M acetyltryptofan og 0,02M natriumcaprylat, uten noen konserveringsmidler, laget av oppsamlet humant veneplasma ved anvendelse av den kolde etanol fraksjonerings-
- 35 fremgangsmåte ifølge Cohn, og varmebehandlet ved 60°C i 10 timer mot muligheten for overføring av hepatittvirus. I et foretrukket trinn ifølge den foreliggende søknad, blir ca. 10 ml av albuminløsning først tilsatt til ca. 500 ml trombintoppløsning, etterfulgt av diafiltrering av den albumin-modifiserte oppløsning med ca. 8 ganger volumet av formuleringsbuffer for bufferutveksling. Ved dette trinn blir minst ca. 99%, mer vanlig ca. 99,9%, av lav molekylære
- 40 forurensninger utvekslet av formuleringsbufferen, og etterlater på innsiden alle

proteiner større enn molekylvekt cut-off-kapasiteten av diafiltreringsmembranen. Fortrinnsvis anvendes humant serumalbumin for både humant og bovin trombin som er tiltenkt humane anvendelser, og bovin serumalbumin anvendes for bovin trombin som er tiltenkt veterinære anvendelser.

- 5 Avhengig av den tilsiktede anvendelse kan det rensede trombinprodukt i formuleringsbuffer fra ovenfor, anvendes som det er etter endelig formulering, sterilfiltrering og lyofilisering, spesielt rensed bovin trombin for veterinær anvendelse. For humane anvendelser blir produktet fortrinnsvis underkastet ytterligere virusrensing som følger:

10 **D. Virusfiltrering**

- For ytterligere å rense trombin med hensyn til ikke-lipidholdig virus blir det gjenvunne trombin i formuleringsbuffer, fortrinnsvis innbefattet serumalbumin eller annet stabiliserende protein, filtrert over en hul-fiber-membran, slik som en BMM mikroporøs membran (Bemberg Microporous Membrane Development, Asahi Chemical Industries), omfattende en cuprammonium regenerert cullulosefiber med en porestørrelse på ca. 15 nm av typen som fremstilles av Asahi Chemical Industries, Tokyo, Japan, og selges under varemerket Planova BMM. Denne teknikk fjerner i alt vesentlig ikke-lipidholdige virioner som ikke kan inaktiveres ved SD-behandlingen, ifølge denne fremgangsmåte. Filteret er spesielt egnet for trombinrensing, ettersom det kan håndtere en høy konsentrasjon av trombin ved lavt løsningsvolum: f.eks., ved å starte fra 5l humant plasma ble et volum på ca. 125 ml av oppnådd rensed trombinløsning (600-800 NIH/ml) filtrert ved anvendelse av 0,01 m², 15 nm Planova BMM-filter. Under disse betingelser var den testede fjerningsrate av små poliovirus mer enn 7 logg.

25 **E. Tørr oppvarming**

- Selv om den beskrevne SD-behandling typisk vil fjerne mellom 4 og 6 logg av lipidholdige omhyllede virus, og 15 nm virusfiltreringen mellom 4 og 8 logg av eventuelle små virus som overlevde SD-behandlingen, for å garantere virussikkerhet kan trombinpreparatene lyofilisert i ampuller, dessuten underkastes en tørr varmebehandling ved ca. 100°C i ca. 1-2 timer. Lavt fuktighetsinnhold av produktet under behandlingen er viktig, for å unngå unødvendig deaktivering av trombin.

Eksempel I. Fremstilling av løsningsmiddel-tensidbehandlet bovint trombin.

6 gram av rått kommersielt bovint trombin (levert fra GenTrac, Inc., Middleton, WI, USA), med en spesifikk aktivitet på 100 NIH, ble løst i 75 ml vandig buffer inneholdende 1% Tris-HCl og 1,62% natriumcitrat (alle vekt/vol%), pH 7,0. 75 ml
 5 vandig løsningsmiddel-tensidløsning ble tilsatt (1% Tris-HCl, 1,62% NaCitrat, 2% Tween 80®, 0,6% tri-n butylfosfat (tnBP), alle vekt/vol%; pH 7,0 og blandingen ble omrørt i 6 timer ved 25°C.

Blandingen ble direkte påsatt på en sulfopropyl-Spherox-kolonne (2,5 cm x 13 cm, Pharmacia) ekvibrert med 0,025M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ i vandig løsning
 10 (fremstilt som beskrevet ovenfor), ved pH 6,5. Kolonnen ble vasket med tre økende konsentrasjoner av denne buffer (0,025M, 0,35M og 0,4M, alle ved pH 6,5), inntil alt UV-absorberende materiale var eluert. Materialet som eluerte med 0,025M og 0,35M bufferene inneholdt SD-blandings-komponenter og forurensende proteiner, og ble kastet. Den tredje eluering med 0,4M buffer inneholdt rensset,
 15 løsningsmiddeltensid antivirusbehandlet bovint trombin med en spesifikk aktivitet høyere enn 2000 NIH-enheter pr. mg protein, med et utbytte på 70-90%. Rensingen ble gjennomført ved 12°C. Bovint serumalbumin ble tilsatt til den oppsamlede trombintoppløsning i en mengde lik 20 ganger totalt protein, og den resulterende løsning ble underkastet en 8 gangers volum diafiltrering ved
 20 anvendelse av en 30000 molekylvekt cut-off-membran (Amicon YM 30 membran, Amicon Division, W.R. Grace & Co.-Conn., Beverly, Massachusetts, USA), med utveksling av kromatografibufferen med følgende formuleringsbuffer: 0,25% natriumcitrat, 0,45 natriumklorid, 0,25% Tris-HCl (tris)hydroksymetyl)aminometanhydroklorid) (alle mengder i vekt/vol%), i vandig løsning ved pH 7,3. Etter
 25 diafiltrering ble trombinløsningen fortynnet til en konsentrasjon på 220 NIH/ml med den samme formuleringsbuffer, albuminnholdet i bovint serum ble øket til 2% og løsningen ble sterilfiltrert, fylt i ampuller og lyofilisert. Ampullene ble lagret ved 4°C. Før tilsetning av serumalbumin, var trombinets spesifikke aktivitet høyere enn 2000 NIH/mg protein. SD-rest tilstede i sluttproduktet rekonstituert i 1
 30 ml vann var: Tween 80<15 ppm; TnBP<15 ppm. Ampullene ble hver fylt med 220 NIH-enheter av det bovine trombin. Akselererte stabilitetsstudier ved 37°C i 2 mnd. (tilsvarende 6 mnd. ved 4°C) viste intet signifikant tap av trombinaktivitet.

Eksempel II. Dobbelte antivirusbehandlet humant trombin.

Fem liter fraksjon av humant plasma, etterlatt etter saltutfelling av
 35 koaguleringsproteiner anvendt ved fremstillingen av fibrinforsegling-middel, ble bearbeidet ifølge fremgangsmåten beskrevet i Ann. pharmaceutique francaise, op.cit., supra., ved anvendelse av et diafiltreringstrinn heller enn den rapporterte fortynningsfremgangsmåte, som beskrevet ovenfor. Utgangsplasmafraksjonen ble

diafiltrert med 0,015M konsentrasjon av NaCl i vandig løsning til ca. 10% av den originale konsentrasjon i friskt plasma, og pH justert til 5,3 med 2% eddiksyre, og blandingen ble omrørt i 30 min. ved romtemperatur. Materialet ble deretter sentrifugert i 20 min. ved 4200 opm, og det resulterende bunnfall løst i

5 250 ml av 0,9 NaCl pr. liter plasma med justering av pH til 7,0 med 2% natriumkarbonat. Protrombin ble omdannet til trombin ved tilsetning av kalsiumklorid for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 21mM, etterfulgt av inkubering ved romtemperatur i 2 timer, og sentrifugering ved 4200 opm i

10 20 min. 200000-250000 NIH-enheter av rått trombin ble oppnådd fra 5 l utgangsplasmafraksjon.

Proteinkonsentrasjonen av det rå trombinpreparat ble justert til ca. 10-15 mg/ml, og løsningen ble underkastet løsningsmiddelensid-antivirusbehandling ved tilsetning av et like stort volum av følgende SD-blanding: vandig løsning av 1% Tris-HCl, 1,62% natriumcitrat, 2% Tween 80® (Sigma Chemical Co.), og 0,6% tri-n-butylfosfat (alle vekt/vol%) under omrøring i 6 timer ved 25°C.

15

Etter inkubering ble det rå trombinmaterialet påsatt direkte på en sulfopropyl-Spheredex-kolonne (5 cm x 13 cm, Pharmacia) ekvilibrert med 0,025M fosfatbuffer som i eks. 1. Kolonnen ble vasket med fire økende konsentrasjoner av fosfatbuffer (nedenfor) inntil alt UV-absorberende materiale var eluert.

20 Det materialet som eluerte med de første tre buffere (0,025M, 0,15M og 0,20M), inneholdt SD-blandingskomponenter og forurensede proteiner, og ble kastet. Den fjerde eluering med 0,25M buffer inneholdt rensset SD-antivirusbehandlet humant trombin med en spesifikk aktivitet på 1200 NIH-enheter pr. mg. protein, oppnådd med 90% utbytte. Kromatografien ble gjennomført ved 12°C. Til den oppsamlede

25 trombintoppøsning ble det tilsatt en løsning av humant serumalbumin, godkjent for human anvendelse, (Plasbumin-25®) i en mengde lik 20 ganger (etter vekt) av totalt protein tilstede i trombintoppøsningen, og løsningen ble underkastet 8 gangers volum diafiltrering ved anvendelse av en 30000 molekylvekt cut-off-membran og følgende sterile formuleringsbuffer: 0,25% natriumcitrat, 0,45

30 natriumklorid, 0,25% Tris-HCl (alle vekt/vol%) i vandig løsning, pH 7,3.

Trombinløsningen ble deretter antivirusfiltrert ved anvendelse av et 0,01 m² (filtreringsareal) 15 nm (porestørrelse), Planovas BMM-filter (Asahi Chemical Co., ovenfor), og 69 kPa trykk. Det filtrerte trombin ble fortynnet til den nødvendige konsentrasjon (i dette tilfelle 220 NIH/ml), med den samme sterile

35 formuleringsbuffer, konsentrasjonen av humant albumin ble øket til 2%, løsningen ble sterilfiltrert, fylt i ampuller, lyofilisert, og lagret ved 4°C. Ampullene ble fylt med 200 NIH-enheter av humant trombin, og akselererte stabilitetsstudier ble gjort ved 37°C i 2 mnd., tilsvarende 6 mnd. ved 4°C. Intet signifikant tap av

trombinaktivitet ble observert (som målt ved standard leveringsmetoder). Spesifikk aktivitet av produktet ble derfor opprettholdt under lagring.

Eksempel III. Trippel antivirusbehandlet humant trombin.

5 Ampullene inneholdende lyofilisert humant trombin ble underkastet oppvarming ved 100°C i 1-2 timer. Intet tap av trombinaktivitet ble observert.

Fremgangsmåtene vist i eks. I, II og III kan lett skaleres opp for kommersiell fremstilling.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte til fremstilling i stor skala av en lagringsstabil trombinblanding av terapeutisk kvalitet, hovedsakelig fri for virus,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter
 - a) å oppnå rått protrombin fra plasma,
 - b) å konvertere protrombin til trombin for således å oppnå rått trombin,
 - c) å inkubere rått trombin med et viricid for lipidholdige virus i en mengde tilstrekkelig til å inaktivere disse virus, dersom de er tilstede,
 - 10 d) å rense det inkuberte materialet ved trinnvis ionebytter-kromatografi ved anvendelse av et enkelt sulfakyl-aktivert polysakkarid, kationbyttermedium som har høy selektivitet for trombin, og økende konsentrasjoner av en vandlig saltoppløsning som elueringsmiddel
 - e) å gjenvinne trombintoppeluatet fra kromatografien og utveksle saltoppløsningen
 15 av eluatet med en fysiologisk akseptable stabiliserende formuleringsbufferoppløsning som omfatter en vandig oppløsning av citratsalt, natriumklorid, Tris-HCl og serumalbumin med en pH på ca. 7,3, i mengder tilstrekkelig til å stabilisere trombinet mot hovedsakelig tap av aktivitet ved varmebehandling,
 - 20 f) å filtrere trombinformuleringsbufferoppløsningen over en hulfiber cupramonium cellulosemembran for å filtrere ut virioner som er tilstede i formuleringsbufferoppløsningen, og gjenvinne en hovedsakelig virionfri bufferoppløsning av trombin, og
 - g) å utsette den lyofiliserte trombinformuleringsbufferoppløsning til
 25 varmebehandling ved 100°C i 1 time til 2 timer for å inaktivere ethvert gjenværende virion uten å denaturere det gjenvunnende trombin, hvorved både ikke-lipidholdige virus og lipidholdige innkapslede virus blir inaktivert.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t de økende konsentrasjoner av en vandig
 30 saltoppløsning i trinn d) består av en vandig bufferoppløsning som omfatter KH_2PO_4 og natrium eller kaliumsaltet av $\text{HPO}_4^{=}$ som har en pH på cirka 6,5.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 eller 2,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t de økende konsentrasjoner av en vandig
 saltoppløsning i trinn d) består av økende konsentrasjoner på ca. 0,025M, 0,35M,
 35 og 0,4M buffer for bovin trombin og økende konsentrasjoner på ca. 0,025M, 0,20M, og 0,25M buffer for humant trombin.

4. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-3,
karakterisert ved at det enkle sulfakyl-aktiverte polysakkarid cation
utvekslingsmedium er valgt fra gruppen som består av en sulfakyl-aktivert
polyagarose, en sulfakyl-aktivert polydekstran og et ikke-kompressibel
5 komposittmedium av sulfakyl-aktiverte dextran og silica partikler.
5. Fremgangsmåte som angitt i krav 4,
karakterisert ved at kationutvekslingsmediet er et hovedsakelig ikke-
kompressibelt komposittmedium av sulfoalkyl-aktivert dextran og silica partikler.
6. Fremgangsmåte som angitt i krav 5,
10 karakterisert ved at cation utvekslingsmediet er et hovedsakelig
ikke-komprimerbart komposittmedium av sulfopropyl-aktivert dextran og silica
partikler.
7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
karakterisert ved at den fysiologisk akseptable stabiliserende
15 formuleringsbufferløsning omfatter en vandig oppløsning på ca. 0,25%
natriumsitrat, 0,45% natriumklorid, 0,25% TrisHCl, alle vekt/volum%,
serumalbumin i en mengde som tilsvarer ca. 20 ganger det totale proteinet i
trombintoppeluatet og justert før lyofilisering til 2% (vekt/vol) og som har en pH
på ca. 7,3.
8. Fremgangsmåte som angitt i krav 7,
20 karakterisert ved at serumalbuminet er humant serumalbumin når
trombinet er ment for humane applikasjoner og serumalbumin er bovint
serumalbumin når trombinet er ment for veterinærapplikasjoner.
9. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-8,
25 karakterisert ved at trinn d) blir utført ved 12°C.
10. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-9,
karakterisert ved at råtrombinet er bovint trombin, og
trombinproduktet har en spesifikk aktivitet på minst ca. 2000 NIH-enheter/mg
nativt protein og en viricidrest på mindre enn ca. 15ppm.
11. Fremgangsmåte som angitt i ethvert av kravene 1-9,
30 karakterisert ved at råtrombinet som er humant trombin, og
trombinproduktet har en spesifikk aktivitet på minst ca. 1000 NIH-enheter/mg
nativt protein og en viricidrest på mindre enn ca. 15 ppm.