



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324627**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20016174	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.06.08 PCT/SE00/01193
(22)	Inng.dag	2001.12.18	(85)	Videreføringsdag	2001.12.18
(24)	Løpedag	2000.06.08	(30)	Prioritet	1999.06.23, SE, 9902388
(41)	Alm.tilgj	2002.02.21			
(45)	Meddelt	2007.11.26			
(73)	Innehaver	Octapharma AG, Seidenstrasse 2, 8853 LACHEN CZ, CH			
(72)	Oppfinner	Stefan Winge, Årsta, SE			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte ved opprensning av antitrombin-III			
(56)	Anførte publikasjoner	JP-A-8109140, US-A-4340589			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet fremgangsmåter for opprensning av antitrombin-III (AT-III) ved utfelling av urenheter. Nevnte fremgangsmåter omfatter (a) å tilsette til en oppløsning omfattende antitrombin-III, et sakkarid samt citrat, i en mengde som er tilstrekkelig for urenheter å felle ut mens antitrombin-III i hovedsak forblir i oppløsning; (b) å tillate urenheter å felle ut; og (c) å fjerne de utfelte urenheter for derved å oppnå en oppløsning omfattende renset antitrombin-III. Det er også beskrevet farmasøytiske sammensetninger som kan fremstilles ved nevnte fremgangsmåter, omfattende renset antitrombin-III, så vel som rekonstituerte farmasøytiske sammensetninger som i hovedsak er fri for synlige partikler.

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåter ved opprensning av antitrombin-III (AT-III) ved utfelling av urenheter med et sakkarid samt citrat som angitt i krav 1.

Tidligere teknikk

Antitrombin III (AT-III) er et plasmaglykoprotein som inhiberer serinproteaser i koaguleringskaskaden og spiller således en hovedrolle i reguleringen av blodkoagulering. En liten minskning i AT-III-innholdet i blodet er assosiert med øket risiko for tromboemboli. AT-III-konsentrater blir brukt ved profylakse og behandling av tromboemboliske sykdommer hos pasienter med ervervet eller arvemessig antitrombindefisiens.

Generelt blir AT-III isolert fra humant plasma og administrert til blodstrømmen hos pasienten. Følgelig er virus-inaktivering av AT-III-konsentrater ønskelig. Utfelling med polyetylenglykol (PEG) har blitt mye brukt i AT-III-opprensning for å konsentrere proteinet og for å felle ut virus (se for eksempel Wickerhauser et al. (1979) Vox Sanguinis 36, 281). I tillegg til PEG, har også bariumsulfat, etanol, trikloreddiksyre, dekstran- og ammoniumsulfat blitt brukt som utfellingsmidler under opprensning av AT-III. Mange av disse utfellende midler ville være skadelige om de var til stede i den endelige AT-III-formulering. Følgelig er etterfølgende fjerning av disse stoffer nødvendig, og gjenvinningen av AT-III blir derved redusert.

PEG-utfelling alene er ikke tilstrekkelig til å sikre fullstendig fjerning av hepatitt-virus. AT-III-konsentrater for terapeutisk bruk blir følgelig normalt pasteurisert, vanligvis ved +60 °C i 10 timer. Generelt taper plasmaproteiner aktivitet under varmebehandling. Av denne grunn blir stabiliserende midler brukt under pasteurisering.

Citrat og karbohydrater, slik som sukrose, har blitt brukt som stabiliserende midler for AT-III under pasteurisering (Mitra et al. (1982) Biotechnology and Bioengineering vol. XXIV, 97-107; Tengborn et al. (1987) Thrombosis Research 48, 701-711; Einarsson et al. (1989) Transfusion 29, 148-152). Imidlertid er det ingen indikasjon i disse dokumenter at citrat og sakkarider kan bli brukt som utfellingsmidler ved opprensningen av AT-III.

Som et slutt-trinn i opprensningen av AT-III, blir formuleringen ofte frysetørket.

Mange forsøk har blitt foretatt for å forlenge oppbevaringstiden for frysetørket AT-III.

US 4 340 589 (Uemura et al.) beskriver et frysetørket preparat av AT-III, stabilisert med minst en substans valgt fra aminosyrer, sakkarider, polysakkarider, etc., mer spesielt albumin, urokinase, gelatin, mannitol, heparin, glysin og lysin.

Ashizawa et al. (Japansk patentsøknad nr. 1994-199566) beskriver frysetørkede preparater av modifisert AT-III stabilisert med ett eller flere elementer valgt fra organiske syresalter, sakkarider, aminosyrer og natriumklorid. De organiske salter kan være natriumsuksinat eller natriumcitrat. Nevnte sakkarider kan være D-mannitol, laktose, glukose og D-sorbitol. Det finnes ingen indikasjon i dette dokument av frysetørkede AT-III-preparater omfattende citrat i kombinasjon med sukrose.

Fra JP-A-8109140 er det kjent sammensetninger omfattende antitrombin-III (AT-III) og stabiliserende additiver valgt fra en liste omfattende blant annet sakkarider, sitronsyre og polyoksyetylenorbitan-fettsyre-ester for behandling av hypertensjon og sirkulasjonssykdommer.

Fra US A 4 340 589 er det kjent frysetørkede AT-III-sammensetninger.

Sammensetningene fremstilles ved å frysetørke en vandig løsning av rensed AT-III ved tilstedeværelse av én eller flere stabilisatorer valgt fra sukkere og organiske salter så som natrium- og kalium-citrat.

Et mer eller mindre kjent problem med flytende farmasøytiske preparater er dannelsen av partikler (omtrent 2-75 μm) etter fylling av produktet i kapsler eller etter rekonstituering av frysetørkede produkter med en oppløsning. Spesielt når det arbeides med større molekyler, lik proteiner er dette et fenomen som relativt ofte opptrer og mekanismen bak dette er ikke nøyaktig forstått. Sannsynligvis er dette en kombinasjon av påvirkingsfaktorer hvor mengden og størrelsen av partiklene inngår innbefattende molekylstørrelse av produktet, eksipienter av produktet, materiale av produktbeholder og oppløsningen hvor produktet blir rekonstituert. Det har ikke blitt vist at det skulle foreligge noen fare ved å ha disse relativ små mengder av partikler i produktene. Imidlertid er det innlysende at hver farmasøytisk produsent sikter etter å redusere mengden av partikler så mye som mulig i produktene, spesielt de synlige partikler.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Det har overraskende blitt funnet at en kombinasjon av et sakkarid, så som sukrose, og citrat fordelaktig kan bli brukt for å felle ut urenheter, innbefattende virus og proteiner

andre enn AT-III, ved opprenskningen av AT-III hvor opprenskningen omfatter de trinn som er angitt i krav 1. Denne fremgangsmåte innbefatter flere fordeler:

- Utfellingstrinnet i henhold til oppfinnelsen sikrer høy viral inaktivering, høy renhet og minimal AT-III-deaktivering.
- 5 • Den oppnådde AT-III-oppløsning kan bli direkte underkastet frysetørking uten ytterligere tilsetning av stabiliserende forbindelser. Således virker kombinasjonen av citrat og sakkarid det doble formål som utfellende midler og stabiliserende midler under pasteurisering.
- 10 • Det er ikke behov for å fjerne den farmasøytiske akseptable kombinasjon av sakkarid og citrat under ytterligere opprenskning av AT-III. Isteden er de utfellende midler også anvendelige som stabilisatorer av et frysetørket preparat av AT-III.

Følgelig i et første aspekt fremskaffer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å rense antitrombin-III omfattende trinnene å:

- 15 (a) tilsette til en oppløsning omfattende antitrombin-III, et sakkarid og citrat, i en mengde som er tilstrekkelig for urenheter i nevnte oppløsning å felle ut mens antitrombin-III i hovedsak forblir i oppløsning;
- (b) tillate urenheter å felle ut; og
- (c) fjerne de utfelte urenheter, for derved å oppnå en oppløsning omfattende rensed
20 antitrombin-III.

I foreliggende sammenheng er uttrykket "urenheter" ment å bety uønskede substanser, innbefattende substanser som blir brukt under opprenskning av AT-III (se eksempel 1, nedenfor). Urenheter innbefatter for eksempel histidin-rike glykoproteiner, hemopeksin, lipoproteiner, gammaglobuliner, Triton-X-100, tri-n-butyl-fosfat, virus, og prioner.

- 25 AT-III for anvendelsen i fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen kan bli oppnådd ved enhver egnet prosess og kan være av pattedyr, for eksempel bovin, porsin eller, fortrinnsvis human opprinnelse. AT-III-materialet kan også bli oppnådd ved genetisk manipulering, så som ved rekombinante DNA-teknikker eller fra transgene dyr, for eksempel fra melken til sauer som danner AT-III i melken.

Uavhengig av opprinnelse kan AT-III-materialet være av enhver isoform, for eksempel α -AT-III eller β -AT-III, eller ethvert derivat av AT-III. Forskjellen mellom α -AT-III eller β -AT-III er beskrevet for eksempel av Brennan et al. (FEBS Letters 219(2), 431-436, 1987). Uttrykket "derivat av AT-III" refererer for eksempel to polypeptider som bærer modifikasjoner lik substitusjoner, små delesjoner, innsetninger eller inversjoner, hvilke polypeptider ikke desto mindre har i hovedsak de biologiske aktiviteter til AT-III.

Nevnte sakkarid er fortrinnsvis et disakkarid så som sukrose eller trehalose, eller et monosakkarid så som glukose, sorbitol, mannitol, glykonsyre, eller maltose. Sukrose er foretrukket på grunn av dets fordelaktige biotilgjengelighet i legemet.

For utfelling av urenheter kan konsentrasjonen av sakkarid ligge i området fra omkring 10 % (vekt/volum) til omkring 30 % (vekt/volum). Fortrinnsvis er sakkaridkonsentrasjonen fra omkring 15 % og 25 % (vekt/volum), mest foretrukket fra omkring 20 % (vekt/volum).

Kilden for citrat kan være sitronsyre eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for eksempel alkalimetallcitrater og jordalkalinmetallcitrater. Eksempler på alkalimetallcitrater er natrium og kaliumcitrat, mens eksempler på jordalkalinmetallcitrater er magnesium og kalsiumcitrat. Av biotilgjengelighetsgrunner, lave kostnader og lett håndtering er natriumcitrat foretrukket.

For utfelling av urenheter kan konsentrasjonen av citrat ligge i området fra 0,1 til 3 M. Foretrukket er citratkonsentrasjonen fra 0,5 og 1,5 M, mest foretrukket mellom 1 M og 1,25 M.

Under utfelling av urenheter kan pH ligge i området fra 6 til 9. Foretrukket er pH mellom 7 og 8, og mest foretrukket nøytral (omkring 7,5). Utfellingen blir passende utført ved en temperatur mellom +10 °C og +40 °C, fortrinnsvis ved romtemperatur, så som mellom +15 °C og +25 °C.

Foretrukket blir citrat og sakkarid tilsatt kontinuerlig til oppløsningen under omrøring i løpet av omtrent 30 minutter. Denne fremgangsmåte gir opphav til en konsentrasjonsgradient av sakkarid og citrat. Siden urenheter kan ha en tendens til å felle ut ved forskjellige konsentrasjoner av de utfellende midler, vil en slik gradient optimalisere utfelling av urenheter. En sakte tilsetning av utfellingsmidlene vil også

minimalisere risikoen for høye lokalkonsentrasjoner av citrat og sakkarid og derved risikoen for utfelling av AT-III.

Ved produksjon i storskala, blir oppløsningen fortrinnsvis omrørt i omtrent ytterligere 15 minutter etter at sluttkonsentrasjonene av sakkarid og citrat har blitt nådd.

5 De utfelte urenheter blir fjernet, passende ved filtrering eller sentrifugering av oppløsningen. Et typisk filtreringstrinn vil omfatte prefiltrering gjennom et 1-20 µm filter, fulgt av steril filtrering gjennom et 0,2 µm filter. Dersom valget er sentrifugering, vil fagpersonen være i stand til å bestemme passende betingelser ved hjelp av en vanlig lærebok angående proteinopprensning. Filtratet eller supernatantvæsken omfattende
10 antitrombin-III blir så gjenvunnet i en form som er egnet for videre behandling.

I et ytterligere aspekt omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for opprensning av AT-III, hvor utfellingstrinnet som beskrevet ovenfor, blir fulgt av pasteurisering av den oppnådde oppløsning omfattende rensed antitrombin-III, ved nærvær av et sakkarid, spesielt sukrose, og citrat som stabiliserende midler. I en spesielt foretrukket form av
15 oppfinnelsen, vil de allerede tilsatte mengder av sakkarid og citrat være tilstrekkelige som stabiliserende midler under pasteurisering, og følgelig må ingen ytterligere stabiliserende midler bli tilsatt.

I enda et ytterligere aspekt omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for opprensning av AT-III som beskrevet ovenfor, og som i tillegg omfatter frysetørrking av antitrombin-
20 III i nærvær av et sakkarid, spesielt sukrose, og citrat som stabilisatorer. De samme midler som tidligere benyttet for utfelling og stabilisering under pasteurisering kan passende bli brukt også som stabilisatorer under frysetørrking.

Det vil bli forstått av fagpersonen at ytterligere opprensningstrinner, etterfølgende pasteuriseringstrinn, kan være ønskelige for å oppnå AT-III i en form som er egnet for
25 bruk eller for frysetørrking. Slike trinn kan for eksempel innbefatte, i enhver ønsket rekkefølge:

- Affinitetskromatografi på et egnet medium så som Heparin-Sepharose® for å fjerne inaktivert AT-III;
 - Ultrafiltrering for å konsentrere og avsalte AT-III;
 - Filtrering for ytterligere fjerning av virus.
- 30

Fagpersonen vil være i stand til å utføre nødvendige ytterligere opprenskningstrinn ved metoder som er velkjent innen faget. Et eksempel på AT-III-opprensking er gitt i eksempel 1, nedenfor.

5 Dersom et flytende medisinsk preparat fremstilles inneholdende AT-III renses ifølge oppfinnelsen blir før administrering det flytende preparat passende videre behandlet ved å tørke AT-III i nærvær av stabilisatorer. En passende tørkemethode er frysetørking. Andre passende tørkemetoder innbefatter for eksempel vakuumkonsentrering.

En slik frysetørket AT-III-sammensetning har øket stabilitet (forlenget lagringsstabilitet) sammenlignet med kjente AT-III-sammensetninger. Nevnte sammensetning omfatter (i) antitrombin-III; og (ii) sukrose og citrat som stabiliserende midler. Det vil bli forstått av fagpersonen at sammensetningen eventuelt kan omfatte ytterligere farmasøytisk akseptable eksipienter og/eller bærermidler, så som salter, for eksempel natriumklorid; aminosyrer, for eksempel lysin, alanin, glysin eller histidin; surfaktanter, for eksempel polysorbat 80, også kjent under varemerke Tween-80®; og andre eksipienter så som polyetylenglykol (PEG 4000) eller glukonsyre.

For fremstilling av en frysetørket AT-III-sammensetning, blir en ønsket mengde av stabilisatorene oppløst eller fortrinnsvis diafiltrert i en vandig oppløsning av AT-III som har en passende konsentrasjon (fra 50 til 1.000 IU/ml, eller fra 5 til 200 mg/ml). pH av oppløsningen bør bli justert til fra mellom 6 og 9, fortrinnsvis fra mellom 7 og 8. Oppløsningen blir så sterilt filtrert, fylt på flasker, så som tubulære glassflasker, og frysetørket.

Den relative mengde sukrose i sammensetningen er fortrinnsvis fra 0,5 til 2,5, mer foretrukket fra 1,0 til 1,5, deler per vektandel antitrombin-III. Den relative mengde citrat, fortrinnsvis natriumcitrat, er fortrinnsvis fra 1 til 4, mer foretrukket fra 2,5 til 3,0, vektdeler per del antitrombin-III.

En slik AT-III-sammensetning er videre stabil uten tilsetning av plasma-avledede proteiner, så som albumin. Fraværet av ytterligere plasma-avledede proteiner øker renheten og viral sikkerhet i sammensetningen.

Når en slik farmasøytisk sammensetning blir brukt til å behandle pasienter som lider av tromboemboliske sykdommer, kan det frysetørkede preparat bli oppløst i en fysiologisk isotonsaltoppløsning eller i sterilt vann, for eksempel til en konsentrasjon på fra 0,5 til 20 % (vekt/volum) av AT-III. Oppløsningen kan bli administrert intravenøst for å

oppnå en systemisk effekt. Det er imidlertid også mulig å administrere oppløsningen for å oppnå en lokal effekt, for eksempel i løpet av ballonkirurgi av kransarteriene.

Som nevnt ovenfor er ett mer eller mindre kjent problem med flytende farmasøytiske preparater dannelsen av synlige partikler (omtrent 2-75 µm) som opptrer etter å ha fylt produktet på flasker, og spesielt etter rekonstituering av frysetørkede produkter. Således er et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse å oppnå et rekonstituert produkt som i hovedsak er fritt for slike synlige partikler.

Oppfinneren av foreliggende søknad har nå overraskende funnet at det å tilsette et ikke-ionisk overflateaktivt middel til det rekonstituerte produkt i en mengde på fra minst 0,01 % (vekt/vekt), gir et rekonstituert AT-III-produkt som er i hovedsak fritt for synlige og uønskede partikler over en tidsperiode på så lenge som opp til 3 måneder. Det ikke-ioniske overflateaktive middel er fortrinnsvis valgt fra blokk ko-polymerer så som poloksamerer, eller polyoksyetylensorbitan fettsyre-estere, fortrinnsvis polysorbat 80 (polyoksyetylen 20 sorbitan monooleat) som også er kjent under varemerket Tween 80®, som rekonstitusjonsmedium. Enhver type polyoksyetylensorbitan-fettsyre-ester kan bli brukt som rekonstitusjonsmedium, så lenge som det er farmasøytisk og farmakologisk akseptabelt. Ytterligere eksempler på slike polyoksyetylensorbitan-fettsyre-estere som er egnet er polysorbat 20 (polyoksyetylen 20 sorbitanmonolaurat), også kjent under varemerket Tween 20®; polysorbat 21 (polyoksyetylen(4)sorbitanmonolaurat, også kjent under varemerket Tween 21®; polysorbat 40 (polyoksyetylen 20 sorbitanmonopalmitat), også kjent under varemerket Tween 40®; polysorbat 60 (polyoksyetylen 20 sorbitan monostearat), også kjent under varmerket Tween 60®; polysorbat 61 (polyoksyetylen (4) sorbitanmonostearat), også kjent under varemerket Tween 61®; polysorbat 65 (polyoksyetylen 20 sorbitantristearat), også kjent under varemerket Tween 65®; polysorbat 81 (polyoksyetylen (5) sorbitanmonooleat), også kjent under varemerket Tween 81®; polysorbat 85 (polyoksyetylen 20 sorbitantrioleat), også kjent under varemerket Tween 85®; og polysorbat 120 (polyoksyetylen 20 sorbitanmonoistearat), også kjent under varemerket Crillet 6®. Slike polyoksyetylensorbitan-fettsyre-estere er beskrevet i *Handbook of pharmaceutical excipients, tredje utgave, s. 416-419, utgitt av Arthur H Kibble*.

Enda en annen type egnede surfaktanter er sorbitanfettsyre-estere. Enhver type sorbitanfettsyre-estere kan bli brukt som rekonstitusjonsmedium, så lenge de er farmasøytisk og farmakologisk akseptable. Passende sorbitanfettsyre-estere som er anvendelige som rekonstitusjonsmedium er beskrevet i *Handbook of pharmaceutical excipients, tredje utgave, s. 511-514, utgitt av Arthur H Kibble*.

Eksperimentelle metoder

Biologisk aktivitet (IU/ml) av AT-III ble bestemt som heparinkofaktor-aktivitet ved å overvåkes spaltningen av det kromogene substrat H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2 HCl (Chromogenix, Sverige) med trombin ved tilstedeværelse av heparin og AT-III. Se Frantzen
5 Handeland et al. (*Scand. J. Haematol.* 31, 427-436, 1983) og van Voorhuizen et al. (*Throm. Haemostas.* 52(3), 350-353, 1984).

Total proteinkonsentrasjon ble bestemt med absorpsjonsmålinger ved 280 nm (A_{280}). Konsentrasjon (mg/ml) for AT-III-oppløsninger ble regnet ut ved å bruke den ekstinksjonskoeffisient på 6,4 IU/mg AT-III.

10 Spesifikk aktivitet av AT-III ble definert som forholdet mellom heparinkofaktor-aktivitet regnet ut som IU/ml og A_{280} .

Dimer- og polymerinnhold av AT-III ble bestemt med høy effekt væskekromatografi (HPLC) gelfiltrering på en TSK G 3000 SW-kolonne (Toyo Soda) med 10 μ M partikler og en pre-kolonne (Toyo Soda).

15 Mengden av forurensende proteiner ble bestemt med kryssset immuno-elektroforese mot anti-totalt humant serum ved å bruke standardbetingelser.

For å bestemme hvorvidt det rekonstituerte flytende farmasøytiske produkt er i hovedsak fritt for synlige partikler, passerer en prøve en detektor, hvor en laserkilde sender ut lys og en fotosensor påviser hvorvidt en partikkel passerer. Prinsippet blir kalt
20 "lysblokkeringsprinsippet". Den forsterkede impuls fra fotosensoren blir samlet opp av partikkeltelleren (Hiac Royco) og deretter omdannet til partikkelstørrelse og mengde.

Eksempler

Eksempel 1: Fremstilling av frysetørket AT-III fra humant plasma

Trinn 1. *Utfelling av plasma.* Humant plasma kryopresipiteres og sentrifugat 1
25 blir dannet ved å felle ut det resulterende eluat med 8 % etanol ved pH 7,2 og gjenvinne eluatet som beskrevet av Cohn et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 72, 465, 1950).

Trinn 2. *Affinitetskromatografi.* Sentrifugat 1 behandles gjennom Heparin-Sepharose® (HS) gel ekvilibret med 0,001 M Na_2PO_3 , 0,15 M NaCl, ved nøytral pH.

HS-gelen binder omtrent 10-15 IU AT-III per ml. Gelen vaskes med 0,4 M NaCl, 0,01 M Na₂PO₃, pH 7,8 og AT-III blir så eluert med 2 M NaCl, 0,01 M Na₂PO₃, pH 7,8.

Trinn 3. *Ultra-filtrering.* AT-III-eluatet konsentreres og avsaltes ved ultra-filtrering med 0,05 M Na₂PO₃, pH 7,5.

5 Trinn 4. *S/D-behandling.* AT-III-filtratet blir virus-inaktivert ved behandling med 1 % (vekt/vekt) Triton X-100 og 0,3 % (vekt/vekt) tri-n-butyl-fosfat (TNBP) i henhold til oppløsningsmiddel/detergent (S/D)-teknologien utviklet ved New York Blood Center (se europeisk patentsøknad nr. EP-A-0239859). Oppløsningsmidlet og detergenten blir delvis fjernet ved ekstraksjon med 5 % (vekt/vekt) soyabønneolje.

10 Trinn 5. *Utfelling.* En utfellingsbuffer inneholdende 40 % sukrose, 2,2 M natriumcitrat, 0,05 M Na₂PO₃, pH 7,5 tilsettes ved romtemperatur til oppløsningen, kontinuerlig i løpet av 30 minutter, til en sluttkonsentrasjon på 20 % (vekt/volum) sukrose og 1,1 M natriumcitrat. Oppløsningen omrøres i ytterligere 15 minutter og presipitatet fjernes ved dekantering og den oppsamlede supernatant filtreres med
15 følgende filtrer tilknyttet i serier: 20-2 µm (Pall) + 0,45/0,22 µm (Sartorius). Dette trinn er tiltenkt å fjerne virus; uønskede proteiner; og gjenværende oppløsningsmidler og detergentforbindelser (se WO 94/26287).

Trinn 6. *Pasteurisering.* For å inaktivere virus blir AT-III-preparatet pasteurisert i 10 timer ved 60 °C. Pasteurisering utføres under nitrogenstrykk og kontinuerlig
20 omrøring. Under pasteurisering virker 20 % (vekt/volum) sukrose og 1,1 M natriumcitrat til å stabilisere AT-III mot termisk inaktivering.

Trinn 7. *Affinitetskromatografi.* Filtratet fortynnes 1/11 med vann. Affinitetskromatografien på Heparin-Sepharose blir gjentatt for å avskille AT-III som ble inaktivert under pasteuriseringen. Heparin-Sepharose-kromatografi utføres som
25 beskrevet i trinn 2.

Trinn 8. *Ultrafiltrering.* AT-III-eluatet konsentreres og avsaltes ved ultrafiltrering med 0,12 M NaCl, 0,001 M Na₂PO₃, pH 7,4.

Trinn 9. *Virusfiltrering.* Virusfiltrering utføres ved å tilsette NaCl til en konsentrasjon på 1 M i AT-III-oppløsningen før filtrering gjennom Viresolve™/70
30 (Millipore), ved å bruke "dead end"-teknikk som beskrevet i WO 96/00237.

Trinn 10. *Ultrafiltrering og frysetørring.* Den rensede oppløsning konsentreres og avsaltes ved ultrafiltrering med 0,22 mol/kg natriumcitrat, 0,07 mol/kg sukrose, 1,5 mmol/kg sitronsyre, pH 7,0, fylles på flasker og frysetørkes. Den fremstilte frysetørkede sammensetning inneholder 2,8 mg natriumcitrat og 1,3 mg sukrose per mg AT-III.

- 5 Den totale gjenvinning av AT-III fra plasma er omtrent 60 %. Mer enn 95 % av protein-innholdet av det resulterende frysetørkede AT-III-konsentrat er AT-III. Videre inneholder AT-III-proteinet som er til stede mer enn 95 % aktivt AT-III, dvs. mindre enn 5 % inaktivert AT-III. AT-III-konsentratet er videre virus-sikkert grunnet trinn 4, 6 og 9, som er rettet mot å fjerne og/eller inaktivere virus. I tillegg fremskaffer trinn 1, 2, 10 5 og 7 samme grad av inaktivering eller fjerning av virus.

Eksempel 2: Virusinaktivering i utfellingstrinnet

Den virus-fjernende effekt av utfellingstrinnet ble bestemt ved et virus-studium. Studien ble utført på parvovirus, som er av de vanskeligste virus å fjerne grunnet sin lille størrelse (20-25 nm).

- 15 En oppløsning av AT-III ble forurensset med parvovirus og utfellingstrinnet i henhold til eksempel 1, trinn 5, ble utført. Oppløsningen ble analysert med hensyn til parvovirus-innhold før og etter utfellingstrinnet i henhold til eksempel 1. Resultatene indikerte at utfellingstrinnet reduserer innholdet av parvovirus med minst en faktor på 10^2 .

Eksempel 3: Opprenskning og utbytte i utfellingstrinnet

- 20 En oppløsning av AT-III inneholdende urenheter ble oppdelt i to aliquoter. En ble utsatt for ioneutbyttekromatografi (CM-Sepharose®, Amersham Pharmacia Biotech) og en til utfellingstrinnet i henhold til eksempel 1, trinn 5. Før og etter opprenskningstrinnet ble aliquotene analysert med hensyn til heparinkofaktor-aktivitet og AT-III-konsentrasjon. Resultatene, vist i tabell 1, indikerer at begge metoder hadde en opprensende effekt på 25 AT-III-oppløsningen. Utbyttet, bestemt som gjenværende heparinkofaktor-aktivitet, var noe høyere med utfellingstrinnet.

Tabell I

Prøve	Spesifikk aktivitet IU/(ml x A ₂₈₀)	Utbytte (% IU)
Startmateriale	7	100
Etter CM-gel	11	85
Etter utfelling	11	90

Eksempel 4: Effekt av forskjellige utfellingsmidler

5 Egenskapen hos forskjellige salter til å felle ut urenheter i en AT-III-oppløsning ble bestemt. Til en AT-III-oppløsning, oppnådd i henhold til eksempel 1, trinn 4, ble forskjellige salter tilsatt ved nøytral pH og ved romtemperatur (+23 °C). Presipitatet (om noe) ble fjernet og den spesifikke aktivitet av supernatantoppløsningen ble bestemt.

10 ”Opprenskning” ble regnet ut ved å bruke proteinkonsentrasjonen oppnådd med 1,25 M natriumcitrat og 20 % sukrose (”A_{280inv}”) som en standard. ”Opprenskningsfaktoren” ble oppnådd ved å bestemme A₂₈₀ for hver prøve før og etter tilsetning av salt (henholdsvis ”A_{280ref}” og ”A_{280sample}”), og ved å bruke formelen $A_{280ref(sample)} - A_{280sample} \times 100 / A_{280ref(inv)} - A_{280inv}$.

Følgelig indikerer en opprenskningsfaktor null at det ikke var noen utfelling av urenheter. Opprenskningsfaktorene oppnådd med forskjellige salter er gitt i tabell II.

15 Gjenvinning ble bestemt som prosent gjenværende aktivitet (%IU). Gjenvinningen var over 90 % for alle prøver. Resultatene indikerer således at en effektiv opprenskning og høy gjenvinning blir oppnådd ved å bruke natriumcitrat og sukrose.

Tabell II

Utfellingsmiddel	Opprenskningsfaktor
1,25 M natriumcitrat og 20 % sukrose	100
1,25 M natriumcitrat	75
1,25 M natriumklorid	0
2 M natriumklorid	0
4 M natriumklorid	0
1,25 M natriumsulfat	48
1,25 M ammoniumsulfat	0
2 M ammoniumsulfat	67
1,25 M natriumacetat	0
1,25 M bariumklorid	0
1,25 M kaliumfosfat	30

Eksempel 5: Stabilitet av frysetørket AT-III

5 Forskjellige stabiliseringsmidler ble undersøkt for effekt på stabilitet av AT-III under lagring ved +25 °C eller +37 °C, i 3 eller 12 måneder. Resultatene, vist i tabeller III til VI, indikerer at natriumcitrat og sukrose i kombinasjon har fordelaktige effekter på stabiliteten av AT-III.

En gunstig kombinasjon av natriumcitrat og sukrose, som stabilisatorer for frysetørket AT-III, er 2,8 deler natriumcitrat og 1,2 deler sukrose, per del AT-III basert på vekt.

Tabell III

3 måneders lagring ved +25 °C

Stabilisator	mg stabilisator/IU AT-III	Gjenværende aktivitet (%)	Monomer (%)	Dimer (%)	Polymer (%)
albumin	0,20	96	97,0	1,7	1,2
glysin	0,20	98	99,4	0,6	0,0
lysin	0,20	101	99,2	0,6	0,2
citrat	0,44	100	98,8	1,2	0,0
	0,88	99	99,0	1,0	0,0
sorbitol +citrat	0,20	100	99,3	0,7	0,0
	0,44				
trehalose +citrat	0,20	100	99,2	0,8	0,0
	0,44				
sukrose +citrat	0,20	99	99,2	0,8	0,0
	0,44				

Tabell IV

5 3 måneders lagring ved +37 °C

Stabilisator	mg stabilisator/IU AT-III	Gjenværende aktivitet (%)	Monomer (%)	Dimer (%)	Polymer (%)
alanin	0,20	94	98,6	1,3	0,2
albumin	0,20	93	96,1	2,8	1,1
glysin	0,20	95	99,0	1,0	0,0
lysin	0,20	101	99,0	0,7	0,3
citrat	0,04	93	98,0	1,3	0,7
	0,44	99	98,6	1,4	0,0
	0,88	98	99,2	0,8	0,0
sorbitol +citrat	0,20	100	99,2	0,8	0,0
	0,44				
trehalose +citrat	0,20	100	99,1	0,9	0,0
	0,44				
sukrose +citrat	0,20	99	99,2	0,8	0,0
	0,44				

Tabell V

12 måneders lagring ved +25 °C

Stabilisator	mg stabilisator/IU AT-III	Gjenværende aktivitet (%)	Monomer (%)	Dimer (%)	Polymer (%)
albumin	0,20	94	94,8	3,8	1,4
glysin	0,20	96	99,1	0,9	0,0
lysin	0,20	99	98,0	1,5	0,5
citrat	0,44	102	98,6	1,4	0,0
	0,88	98	98,8	1,2	0,0
sorbitol +citrat	0,20	100	98,9	1,1	0,0
	0,44				
trehalose +citrat	0,20	100	98,7	1,3	0,0
	0,44				
sukrose +citrat	0,20	99	98,8	1,2	0,0
	0,44				

Tabell VI

5 12 måneders lagring ved +37 °C

Stabilisator	mg stabilisator/IU AT-III	Gjenværende aktivitet (%)	Monomer (%)	Dimer (%)	Polymer (%)
albumin	0,20	91	91,7	6,6	1,7
glysin	0,20	94	98,5	1,5	0,0
lysin	0,20	98	98,7	0,6	0,7
citrat	0,44	99	96,9	2,8	0,4
	0,88	96	98,1	1,9	0,0
sorbitol +citrat	0,20	97	98,9	1,1	0,0
	0,44				
trehalose +citrat	0,20	100	98,8	1,2	0,0
	0,44				
sukrose +citrat	0,20	97	98,9	1,1	0,0
	0,44				

Eksempel 6: Fremstilling av en frysetørket sammensetning av AT-III

2,8 % (vekt/volum) natriumcitrat og 1,2 % (vekt/volum) sukrose ble tilsatt til 1 % (vekt/volum) vandig oppløsning av AT-III. pH ble justert til 7,0 og oppløsning ble sterilt filtrert (Millipore), fylt på flasker og frysetørket.

5 **Eksempel 7: Sammenligning mellom en formulering i henhold til oppfinnelsen og en AT-III-formulering omfattende albumin**

Antitrombin-III ble rensset i henhold til eksempel 1. To formuleringer ble fremstilt som følger:

Formulering A:

10 125 IU/ml antitrombin; 0,4 mg natriumcitrat/IU antitrombin; 1 µg sitronsyre/IU antitrombin; 0,2 mg sukrose/IU antitrombin; pH 7,0.

Formulering B:

125 IU/ml antitrombin; 0,2 mg natriumklorid/IU antitrombin; 0,2 mg albumin/IU antitrombin; 1 µg natriumfosfat/IU antitrombin; 4 µg acetyltryptofan/IU antitrombin; 3
15 µg natriumkaprylat/IU antitrombin; pH 7,0.

Prøver ble steriltfiltrert og fylt på tubulære glassflasker under aseptiske betingelser og frysetørket. Flaskene ble forsegle under vakuum og analysert kort etterpå.

Resultatene, vist i tabeller VII og VIII, indikerer at formulering A, rensset i henhold til oppfinnelsen hadde en gunstig effekt på AT-III stabilitet sammenlignet med
20 formulering B.

Tabell VII

Formulering A

Prøve nr.	IU/flaske	Gjenværende vann %	Aktivitet, % heparinkofaktor	Aggregat, % monomer	Spesifikk aktivitet, IU/mg protein
1	500	4,4	92	99	6,5
2	500	4,3	99	99	7,0
3	500	3,1	98	99	6,6
4	1.000	3,1	98	99	6,6
5	1.500	4,9	97	99	6,8

Tabell VIII

5 Formulering B

Prøve nr.	IU/flaske	Gjenværende vann %	Aktivitet, % heparinkofaktor	Aggregat, % monomer	Spesifikk aktivitet, IU/mg protein
1	500	0,7	n.d.	97	3,1
2	500	0,7	n.d.	98	3,2
3	500	0,7	n.d.	97	3,0
4	1.000	0,6	n.d.	98	3,1
5	1.000	0,2	94	n.d.	n.d.
6	1.000	0,2	96	n.d.	n.d.
7	1.000	0,2	96	n.d.	n.d.
8	1.500	0,3	n.d.	98	3,2
9	1.500	0,1	94	n.d.	n.d.
10	1.500	0,2	94	n.d.	n.d.
11	1.500	0,2	94	n.d.	n.d.
12	1.500	0,3	92	n.d.	n.d.
13	1.500	0,2	98	n.d.	n.d.

n.d. = ikke bestemt

Eksempel 8: Sammenligning av forskjellige rekonstitusjonsmediers egenskap å inhibere dannelsen av partikler, etter rekonstituering av AT-III-formulering A i eksempel 7, renset i henhold til oppfinnelsen

5 Frysetørkede flasker av antitrombin (500 IU), i henhold til formulering A fra eksempel 7, ble rekonstituert til 50 IU/ml med de følgende rekonstitusjonsmedier (alle medier var sterilfiltrert (Millipore) før bruk):

- a) Vann for injeksjon
- b) 0,15M natriumklorid
- c) 0,025M natriumfosfat pH 7,4
- 10 d) 0,01 % polysorbat 80 (Tween 80®)
- e) 0,15M lysin pH 7,4
- f) 0,15M glysin
- g) 0,15M alanin

15 Flaskene var i stand til å stå ved 22 °C i 24 timer og ble så visuelt inspisert med hensyn til dannelsen av partikler. Det eneste rekonstitusjonsmedium hvor ingen partikler kunne bli påvist var 0,01 % polysorbat 80 (Tween 80®), i alle andre var det en lik mengde partikkeldannelse.

20 Eksempel 9: Sammenligning av forskjellige konsentrasjoner av polysorbat 80 (Tween 80®) til å inhibere dannelsen av partikler, etter rekonstitusjon av AT-III formulering A i eksempel 7, renset i henhold til oppfinnelsen

Frysetørkede flasker av antitrombin (500 IU), i henhold til formulering A fra eksempel 7, ble rekonstituert til 50 IU/ml med de følgende forskjellige konsentrasjoner av polysorbat 80 (Tween 80®) (alle medier var sterilfiltrert (Millipore) før bruk):

- a) 0,0100 % (vekt/vekt) polysorbat 80 (Tween 80®)
- 25 b) 0,0050 % (vekt/vekt) polysorbat 80 (Tween 80®)
- c) 0,0010 % (vekt/vekt) polysorbat 80 (Tween 80®)
- d) 0,0001 % (vekt/vekt) polysorbat 80 (Tween 80®)
- e) Vann for injeksjon

30 Flaskene var i stand til å stå ved 22 °C og ble visuelt inspisert med hensyn til dannelsen av partikler etter 0 time, 2 timer, 16 timer, 42 timer, 5 dager, 11 dager, 1 måned, 2 måneder og 3 måneder

Prøve	0 t	2 t	16 t	42 t	5 dager	11 dager	1 måned	2 måneder	3 måneder
0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,005%	-	-	-	-	-	-	+	+	+
0,001%	-	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
0,0001%	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0%	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- Ingen partikler kunne bli påvist

+ Enkelte partikler kunne bli påvist

++ Partikler kunne bli påvist

5 +++ En mengde partikler kunne bli påvist

Det eneste rekonstitusjonsmedium hvor ingen partikler kunne bli påvist etter 3 måneder var 0,01 % polysorbat 80 (Tween 80®), i alle andre, kunne noen eller en mengde partikler bli påvist.

Eksempel 10: Sammenligning av 0,01 % polysorbat 80 (Tween 80®) og vanns

10 egenskap til å inhibere dannelsen av partikler, etter rekonstitusjon av AT-III formulering A fra eksempel 7, renset i henhold til oppfinnelsen

Frysetørkede flasker av antitrombin (500 IU), i henhold til formulering A fra eksempel 7 ble rekonstituert til 50 IU/ml med 0,01 % polysorbat 80 (Tween 80®) og vann for injeksjon (alle medier var steril filtrert (Millipore) før bruk). Flaskene ble lagret ved 22 °C i 24 timer og så ble partiklene talt opp og størrelse definert, ved å bruke en partikkelteller (Hiac Royco):

Partikkelstørrelse [μm]	Rekon. med vann, [partikler/ml]	Rekon. med 0,01 % Tween 80®, [partikler/ml]
2	1.2013	1.264
5	3.956	253
10	1.029	37
15	376	6
20	180	1
25	94	0
30	55	0
35	33	0
40	18	0
45	10	0
50	5	0
55	3	0
60	2	0
65	1	0
70	1	0
75	1	0

Som vist i tabellen ovenfor, ble visuelle partikler (over 20 μm), som er det hovedinhibitoriske mål, fullstendig hemmet når produktet renses i henhold til oppfinnelsen blir rekonstituert med 0,01 % (vekt/vekt) polysorbat 80 (Tween 80®).

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved rensing av antitrombin-III,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene å:
 - (a) tilsette til en oppløsning omfattende antitrombin-III, et sakkarid samt citrat, i en
5 mengde som er tilstrekkelig for urenheter å felle ut mens antitrombin-III i hovedsak forblir i oppløsning;
 - (b) tillate urenheter å felle ut; og
 - (c) fjerne utfelte urenheter, for derved å oppnå en oppløsning omfattende rensset antitrombin-III.
- 10 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridet er valgt fra gruppen omfattende monosakkarider og disakkarider.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridet er et monosakkarid.
- 15 4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av sakkarid er fra 10 til 30%.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av sakkarid er fra 15 til 25%.
6. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridet er sukrose.
7. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av citrat er fra 0,1 til 3 M.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av citrat er fra 0,5 til 1,5 M.
- 25 9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kilden for citrat er natriumcitrat.

10. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 9,
karakterisert ved at fremgangsmåten blir fulgt av et pasteuriseringstrinn av
den fremstilte oppløsning omfattende renset antitrombin-III i nærvær av nevnte sakkarid
og citrat som stabiliseringsmidler.
- 5 11. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 10,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter et frysetørkingstrinn.
12. Fremgangsmåte ifølge krav 11,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter et rekonstitueringstrinn hvor
rekonstitusjonsmediet er et ikke-ionisk overflateaktivt middel i en konsentrasjon på
10 minst fra 0,01% (vekt/vekt).
13. Fremgangsmåte ifølge krav 12,
karakterisert ved at rekonstitusjonsmediet er en polyoksyetylenorbitan-
fettsyre-ester.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
15 karakterisert ved at rekonstitusjonsmediet er valgt fra enhver av polysorbat
20, polysorbat 21, polysorbat 40, polysorbat 60, polysorbat 61, polysorbat 65,
polysorbat 80, polysorbat 81, polysorbat 85 og polysorbat 120.
15. Fremgangsmåte ifølge krav 14,
karakterisert ved at rekonstitusjonsmediet er polysorbat 80.
- 20 16. Fremgangsmåte ifølge krav 12,
karakterisert ved at rekonstitusjonsmediet er en sorbitanfettsyre-ester.