



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **305036**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 N 9/74, C 07 K 1/36, 1/18

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19922809	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	16.07.1992	søknadsnummer	
(24) Løpedag	16.07.1992	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	19.01.1993	(30) Prioritet	18.07.1991, FR, 9109075
(45) Meddelt dato	22.03.1999		

(73) Patenthaver	Association pour l'Essor de la Transfusion Sanguine dans la Region du Nord, 21, rue Camille Guérin, F-59000 Lille, FR
(72) Oppfinner	Catherine Michalski; Lille, FR
(74) Fullmektig	Dominique Dernis, Marquette lez Lille, FR J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av humant trombinkonsentrat for terapeutisk anvendelse**

(56) Anførte publikasjoner EP A 302754, EP A 443724, EP A 302754, WO A 83/03760

(57) Sammendrag Fremgangsmåte for fremstilling av et humant trombinkonsentrat fra PPSB fraksjonen i plasma som ikke involverer tilsetning av faktorer av animalsk opprinnelse for å indusere aktivering av protrombinet til å danne trombin, og som inkluderer et trinn med inaktivering av virus ved anvendelse av løsningsmiddel-detergent, og rensing ved kationbytterkromatografi. Valg av et beskyttende medium sikrer sluttproduktets høye spesifikke aktivitet.

Trombinkonsentratet som oppnås har terapeutisk anvendelse, enten alene for å tjene som et lokalt hemostatisk middel eller i kombinasjon med et fibrinogenkonsentrat til å danne biologisk lim.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et humant trombinkonsentrat for terapeutisk anvendelse med høy spesifikk aktivitet og som er rensset i industriell skala fra en fraksjon av humant plasma.

5

Trombin er en serin-protease som er dannet i blodstrømmen gjennom aktivering av dets inaktive forløper protrombin. Det spiller en fundamental rolle i koagulasjonsprosessen: det spalter fibrogenet til fibrinmonomerer og, gjennom

10 proteolytisk spalting, aktiverer det faktor XIII som stabiliserer fibrinnettverket.

Det spiller også en viktig rolle i forbindelse med andre fysiologiske prosesser: det initierer sekresjons- og plate-

15 aggregerings-reaksjonene og forenkler på denne måten dannelsen av den såkalte hvite propp. Det aktiverer også proteinene i komplementsystemet. Det har en mitogen virkning på fibroblastene som akselererer helbredelsen av ødelagte blodkar.

20

Som et resultat av disse forskjellige egenskaper har trombin terapeutiske anvendelser som et lokalt hemostatisk middel.

På det nåværende tidspunkt blir det i forbindelse med slike kliniske anvendelser benyttet trombin fra dyr som hest eller

25 kveg. Disse preparatene er ikke alltid fullstendig rensset og deres anvendelse kan føre til immunologiske reaksjoner som skyldes overbelastning av heterologe proteiner. Anvendelsen av bovint trombin gir ytterligere risikoen med overføring av infeksjonssykdommer som nylig er diagnostisert og som det
30 fremdeles er vanskelig å kontrollere, som spongiform bovin encefalitt.

Som for en rekke enzymer gir rensing av trombin problemer vedrørende opprettholdelse av total enzymaktivitet. Nativ α -

35 trombin er i virkeligheten generelt ustabil og gjennom autolyse eller begrenset proteolyse gir det derivater, β - og γ -trombiner, som har mistet en vesentlig del av deres koagulerende aktivitet på fibrinogen.

Kjente renseteknikker gjelder særlig for bovint trombin: de inkluderer kromatografi på ionebytterharpikser som DEAE-cellulose (Yin et al. J. Biol. Chem., 1968, 243, 112), eventuelt sammen med filtrering på Sephadex-G 100 (Baughman et al. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5252-5259). Visse metoder kan anvendes for å separere β - og γ -formene på en fosforcellulosekolonne (Rosenberg et al., J. Biol. Chem. 1970, 245, 5049) og gjennom en forening av flere typer ionebytter-kromatografi (Batt et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 4857).

10

Nye harpikser er også anvendt som sulfoetyl eller sulfopropyl Sephadex (Lundblad- Biochemistry, 1971, 10, 2501) såvel som affinitetskromatografi på bærere som heparin-sefarose (Nordeman et al. Thromb. Res., 1977, 11, 799-888) og p-amino-benzamidin-agarose (Hixson et al. Arch. Biochem. Biophys., 1973, 154, 501).

To publikasjoner beskriver rensingen av humant trombin, en på benzamidin-spherox (Lorne et al. Rev. Fr. Transf. Hemobiol., 1989, 32, 391-403), men produktet utviser bare liten aktivitet (11 til 20 NIH U/ml), og den andre på nye polystyrener (Fischer et al. J. Chromatography, 1986, 363, 95-100), men dette produkt inneholder bovin Faktor V (se i det etterfølgende).

25

For å oppnå trombin er det nødvendig at man ikke bare har tilgjengelig en kilde for dets forløper, protrombin, men også, avhengig av den valgte aktiveringsmåte, en tilstrekkelig konsentrasjon av de andre koagulasjonsfaktorene som er involvert i aktiveringsprosessen. Forskjellige metoder er blitt beskrevet som åpner for aktiveringen av protrombin til å gi trombin. Fenton et al. (Biochim. Biophys. Acta, 1971, 229, 26-32 og J. Biol. Chem., 1977, 252, 3587-3598) beskriver fremstillingen av trombin fra Cohns fraksjon III ekstrahert på harpiks, gjennom tilsetningen av kalsiumklorid og vevs-tromboplastin ekstrahert fra menneskehjerne. Reaksjonen kan akselereres ved tilsetning av faktor V av bovin opprinnelse (Bernamon-Djiane-Coagulation, 1968, 1, 259).

35

Spesifikke aktivatorer som er ekstrahert fra slangegifter kan også anvendes (Bosh et al. Thromb. Res., 1980, 20, 281).

Disse forskjellige metoder har imidlertid store ulemper når
5 man ønsker å fremstille svært store volumer av human trombin
for terapeutisk anvendelse. Tromboplastin fra menneskehjerne
er f.eks. vanskelig å oppnå og representerer en begrensende
faktor når det blir aktuelt å behandle flere hundre liter
plasma. Det er vanskelig å gjøre aktiveringen med slangegift
10 forenelig med bruk i mennesker, med mindre der er til-
gjengelig et system med høy yteevne som gjør det mulig å
fjerne giften. Anvendelsen av bovin faktor V har vist seg
særlig farlig fordi restmengdene som injiseres inn i pasient-
ene kan gi alvorlige immunologiske reaksjoner.

15 I forbindelse med den foreliggende oppfinnelse er det derfor
utviklet en fremgangsmåte som gir fremstilling av rensset,
konsentrert humant trombin som ikke inkluderer tilsetning av
heterologt materiale og som i tillegg har gjennomgått en
20 behandling for inaktivering av virus. Fremgangsmåten er
enkel og forenelig med anvendelse i forbindelse med store
volumer i industriell skala.

Det opprinnelige material er PPSB-fraksjonen i humant plasma
25 (PPSB : prokonvertin eller F VII, protrombin, Stuart faktor
eller Faktor X og antihemofil faktor B eller Faktor IX) (PPSB
kalles også PCC : protrombin kompleks konsentrat); og alle de
molekyler som er nødvendige for å aktivere protrombinet er
således tilstede i den innledende blanding : faktorene VII,
30 IX, X, fosfolipider og kofaktorer V og VIII.

Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er kjennetegnet ved
seks påfølgende trinn:

a) adsorpsjon av PPSB fraksjonen fra en kryopresipi-
35 teringssupernatant på en dekstrangel podet med DEAE og
vasking av den nevnte fraksjon med 0,20 til 0,23 M
natriumklorid i citratbuffer, etterfulgt av eluering av
PPSB ved en økning av natriumkloridkonsentrasjonen til
0,5 M,

- b) aktivering av protrombin til trombin ved rekalsifisering av nevnte eluerte PPSB ved tilsetning av CaCl_2 til en sluttkonsentrasjon på 5-10 mM og ved å underkaste den oppnådde blanding for en innledende inkubasjonsperiode på omtrent 2 timer ved omtrent 37°C og deretter en andre inkubasjonsperiode på omtrent 16 timer ved omtrent 24°C ,
- c) viral inaktivering av den rekalsifiserte PPSB med løsningsmiddeldetergent,
- d) kromatografisk separasjon av PPSB på en sterk kation-byttergel i nærvær av natriumglukonat for å oppnå et trombinkonsentrat etter vasking og eluering ved økning av natriumklorid- og glukonatkonsentrasjonen,
- e) stabilisering av det eluerte trombin ved tilsetning av en blanding som omfatter albumin, sakkarose og CaCl_2 ,
- f) konsentrering og fordeling av det rensede trombin til volumdelere som er tilpasset deres påfølgende terapeutiske anvendelse og frysetørking derav.

Trinn a) Den kryopresipiterte plasmasupernatant adsorberes på DEAE-Sephadex og vaskes i en citratbuffer-oppløsning ved pH 7 inneholdende fra 0,20 M til 0,23 M, foretrukket 0,23 M natriumklorid som gjør det mulig å fjerne fibrinogenet og de spor av inhibitorer som vil nedsette den påfølgende trombin aktiveringsreaksjon. PPSB elueres deretter ved å øke natriumkloridkonsentrasjonen til 0,50 M.

Trinn b) Aktivering av protrombinet til å danne trombin initieres ved tilsetningen av kalsiumklorid i en slutt-konsentrasjon på mellom 5 og 10 mM, og foretrukket 7 mM. (Det er observert at et overskudd av CaCl_2 inhiberte aktiveringsreaksjonen). Dette trinn inkluderer en første inkubasjonsperiode av kort varighet etterfulgt av en annen og lengre periode ved en lavere temperatur.

Blandingen inkuberes deretter først ved 37°C i 2 timer. Denne behandling alene muliggjør dannelsen av 300 til 350 NIH U trombin pr ml PPSB (NIH U: enheter definert av the National Institute of Health - USA). Lengre inkubasjon ved denne temperatur ble ikke funnet til å forbedre resultatet.

Inkubasjonen fortsettes deretter ved 24°C i minst 16 timer, noe som gjorde det mulig å oppnå 700 til 1000 NIH U trombin pr. ml PPSB.

- 5 Trinn c) Den således rekalsifiserte blanding underkastes som sådan en behandling for inaktivering av virus ved anvendelse av løsningsmiddeldetergent og mere spesielt ved tilsetning av 0,3 % TnBp/1 % Tween, og inkubasjonen fortsettes ved 24°C i minst 6 timer og generelt over natten. Det skal bemerkes at
- 10 det er viktig at denne behandling gjennomføres etter at trombinet er aktivert fordi, dersom den gjennomføres på PPSB før tilsetningen av kalsium, vil faktorer som fosfolipider som er nødvendige for aktiveringsreaksjonen, elimineres.
- 15 Trinn d) Trombinet renses deretter i et enkelt trinn med ionebytterkromatografi og mere spesielt på en sterk kationbytter. Foretrukket anvendes en rigid gel som er dannet ved hjelp av en agarosematriks podet med $\text{CH}_2\text{-SO}_3$ grupper, f.eks. S-Sepharose FF (Pharmacia). Kromatografi ble
- 20 gjennomført i et medium som inneholdt 40 mM natriumglukonat og 0,01 M natriumklorid, ved en pH på 6,5. Natriumglukonat har en svært fordelaktig beskyttende virkning på trombinets biologiske aktivitet.
- 25 Etter at trombinet var adsorbert på kolonnen, vaskes denne i et medium omfattende 150 mM natriumglukonat og 0,04 M NaCl ved en pH på 6,5.

Betingelsene i forbindelse med trombineluering justeres for å

30 oppnå en snever kromatografisk topp, og mere spesielt ved å øke natriumkloridkonsentrasjonen til 0,2 M og natriumglukonatkonsentrasjonen til 150 mM.

Anvendelse av et natriumglukonatbasemedium har ytterligere

35 den fordel at man unngår dialysetrinnet som er vesentlig i forbindelse med anvendelsen av de konvensjonelle fosfatbufferopløsninger.

Trinn e) Etter at trombinet er eluert fra kromatografi-kolonnen, tilsettes en blanding av stabilisatorer som inkluderer 2 g/l albumin, 5 g/l sakkarose og 60 mM CaCl_2 til trombinet i løsning i glukonatbufferen, idet disse
5 stabilisatorene spiller en spesielt viktig rolle i det etterfølgende trinn.

Trinn f) Trombinpreparatet konsentreres deretter, foretrukket ved ultrafiltrering og prøvemengder i de
10 volumdeler som egner seg for den etterfølgende terapeutiske anvendelse taes ut og frysetrøkes.

Tilstedeværelsen av albumin som en stabilisator viste seg å være essensiell under konsentrasjonstrinnet.

15 Det ble funnet at sakkarose, fremfor alle de andre sukkere og aminosyrer som ble testet, hadde en svært viktig stabiliserende virkning på konsentratet i flytende tilstand under fordelingstrinnet som kan ta lang tid når oppløsningen
20 fordeles i volumdeler fra 1 til 5 ml.

Tilstedeværelsen av CaCl_2 og sakkarose viste seg å være uunnværlig for stabiliserende formål under frysetørkingen.

25 Fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse omfatter en rekke trekk som klart skiller den fra andre beskrevne fremgangsmåter (mere spesielt Lorne et al. og Fischer et al., nevnt i det foregående) og som gir sluttproduktet de betydelige fordeler med renhet og svært høy
30 spesifikk aktivitet.

Som en oppsummering, er disse trekk som følger:

- anvendelsen av en forvasket PPSB fraksjon hvorfra fibrinogenet og inhibitorene er fjernet,
- 35 - valg av rekalsifikeringsbetingelser: kalsiumkloridkonsentrasjon og to påfølgende inkubasjonstemperaturer,
- inaktivering av virus ved anvendelse av løsningsmiddel-detergent gjennomført mellom trombinaktiverings- og rense-trinnene og ikke på PPSB, som ville synes ønskelig i

forbindelse med sikkerhet vedrørende håndtering, men som på dette trinn denaturerer fosfolipidene som er nødvendige for trombinaktiveringsreaksjonen,

- kromatografi på en sterk kationbyttergel og anvendelse, i dette trinn, av et spesifikt beskyttende medium som inneholder natriumglukonat,
- valget av en blanding av stabilisatorer for sluttproduktet som beskytter dets aktivitet under de tre siste operasjoner: konsentrering, fordeling og frysetørking.

10

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er følgelig å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av et humant trombinkonsentrat for terapeutisk anvendelse som omfatter rensing, ved hjelp av kromatografi, av en PPSB fraksjon av plasma som først er rekalsifisert ved tilsetning av CaCl_2 inkluderende, mere spesielt, behandling av den opprinnelige PPSB fraksjonen for å fjerne fibrinogenet og trombin-aktiveringsinhibitorer ved vasking med natriumklorid, etterfulgt av rensing ved hjelp av kromatografi på en sterk kationbyttergel i nærvær av natriumglukonat.

20

I henhold til et annet trekk med oppfinnelsen inkluderer fremgangsmåten behandling for inaktivering av virus ved anvendelse av løsningsmiddel-detergent og som gjennomføres etter rekalsifisering av den vaskede PPSB fraksjon og før rensing av det aktiverte trombin ved hjelp av kromatografi.

25

I henhold til et annet trekk ved oppfinnelsen, inkluderer fremgangsmåten tilsetning, til oppløsningen av trombin som er eluert fra kromatografikolonnen, av en blanding av stabilisator inkluderende albumin, sakkarose og kalsiumklorid.

30

Et usedvanlig trekk med fremgangsmåten er dens virkningsfullhet med svært store mengder av utgangsmaterial og som således tillater produksjon, i en enkel batch, av opp til 16 millioner NIH U trombin (som representerer 150 ganger mere enn med en annen kjent prosess som beskrevet i EPA 0 378 798) og uten interferering med rensingen av andre blodavledede

35

produkter av stor økonomisk viktighet (som blodkoagulasjonsfaktorer, albumin, immunoglobuliner ...).

Ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse
5 tilveiebringes et trombinkonsentrat som er kjennetegnet ved en koagulerende aktivitet på minst lik 500 NIH U/ml og en spesifikk aktivitet på minst lik 1000 NIH U/mg proteiner.

Dets høye konsentrasjon og dets spesifikke aktivitet gjør
10 konsentratet fremstilt i henhold til oppfinnelsen forskjellig fra et annet produkt som er fremstilt i henhold til en annen fremgangsmåte (Lorne et al., nevnt i det foregående) og som bare oppnår en aktivitet på 11 til 20 NIH U/ml.

15 Dessuten er dette frysetørkede konsentrat usedvanlig stabilt og den koagulerende aktivitet forblir konstant i minst ett år.

Trombinkonsentratet fremstilt i henhold til den foreliggende
20 oppfinnelse er således perfekt tilpasset for terapeutisk anvendelse i mennesker. Det kan anvendes som sådan som et lokalt hemostatisk middel. Det kan også anvendes til å danne biologisk lim ("biological glue") ved tilsetning til et fibrinogenkonsentrat inkluderende små mengder faktor XIII og
25 fibronektin, som beskrevet av søkeren i patentsøknad EP-0 305 243. Prosessen med dannelsen av biologisk lim reproducerer siste koagulasjonstrinn, dvs. dannelsen av fibrinnettverket. Trombin spalter fibrinogenmolekylet til fibrinmonomerer. Det aktiverer faktor XIII i nærvær av kalsiumioner og denne
30 faktor vil i sin aktiverte form stabilisere det oppløselige fibrin i en fast og ikke-sprø uoppløselig klump. Produktets hemostatiske styrke gjør det således mulig å begrense blødning under og etter operasjoner og forsterke lokal hemostase hos pasienter med en medfødt eller ervervet
35 utilstrekkelig koagulasjon (særlig pasienter som behandles med antikoagulerende midler).

I de etterfølgende eksempler er den foreliggende oppfinnelse illustrert nærmere.

Eksempel 1

a) Fremstilling av PPSB fraksjonen.

Det opprinnelige material var en plasmakryopresipitat-super-
5 natant som var oppnådd ved tining og sentrifugering ved 0 til
3°C.

1000 til 1500 liter supernatant ble adsorbert på DEAE-
Sephadex A50 i nærvær av fysiologisk serum, i en mengdeandel
10 på 1,5 g harpiks pr liter supernatant. Etter vasking med
0,23 M natriumklorid i en 0,01 M citratbufferoppløsning ved
pH 7 ble PPSB eluert med 0,50 M natriumklorid i den samme
bufferoppløsning og konsentrert til 40 g proteiner/l og 2,5 g
lysin/l ble tilsatt dertil, med etterfølgende justering til
15 en osmolaritet på omtrent 290 mOsm/l ved en pH på 7,0.

Det således fremstilte PPSB inneholdt, i tillegg til protrom-
binet i en konsentrasjon på omtrent 50 U/ml, koagulasjons-
faktorer X, IX og VII i konsentrasjoner på henholdsvis
20 omtrent 45 U/ml, 45 U/ml og 5 U/ml. Det inneholdt også 5 til
6 U/ml faktorer Vc og VIIIC, såvel som fosfolipider hvis
nærvær ble vist ved trombingenereringstiden (eller TGT 50).

Vasking med natriumklorid gjorde det mulig å fjerne fibrino-
25 genet såvel som visse inhibitorer som, når de er tilstede i
PPSB, nedsetter rekalsifiseringsreaksjonen.

b) Rekalsifiseringsbetingelser.

9 til 11 liter PPSB som var nylaget eller nettopp tint ble
30 filtrert under sterile forhold og 7 ml CaCl_2 pr liter PPSB
ble deretter tilsatt i et begerglass eller i en tank av
rustfritt stål på 30 liter og plassert i et vannbad ved 37°C
i 2 timer. Etter dette første trinn ble det oppnådd omtrent
300 NIH U trombin/ml.

35

Temperaturen ble deretter nedsatt til 24°C og blandingen ble
holdt ved denne temperatur i ytterligere 16 timer. Det
trombinutbyttet som ble oppnådd på slutten av behandlingen
var fra 700 til 1000 NIH enheter/ml av PPSB.

Den spesifikke aktiviteten for trombinet representerte på dette trinn fra 20 til 40 NIH U/mg proteiner.

c) Virus-inaktivering.

- 5 Inaktivering av ethvert kontaminerende virus ble gjennomført ved tilsetning av 0,3 % TnBP og 1 % Tween 80 (sluttkonsentrasjoner) ved en temperatur på 24°C i minst 6 timer. I praksis fikk blandingen stå over natten i TnBP/Tween 80 mediumet. Det ble ikke observert tap av trombinaktivitet i løpet av dette trinn. Den spesifikke aktiviteten av trombinet på slutten av TnBP/Tween 80 behandlingen representerte fra 20 til 40 NIH U/mg proteiner. Blandingen ble deretter dypfryst ved -30°C i poser av plast i prøvemengder på 1 til 3 liter.

15 d) Trombinrensing.

- Formålet med dette trinn var å separere trombinet fra reaksjonsblandingen som inneholdt TnBP/Tween 80, de aktiverte koagulasjonsfaktorene og ethvert annet protein i PPSB som til dels ville kunne nedbrytes ved hjelp av serin-proteasene. Det ble gjennomført kromatografi på en sterk kationbyttergel, S-Sepharose FF (Pharmacia) som er en stiv gel dannet ved hjelp av en agarosematriks podet med $\text{CH}_2\text{-SO}_3$ grupper.

- Trombinet som er ustabilt ble beskyttet under kromatografi ved anvendelse av natriumglukonat ved en pH på 6,5 og under følgende betingelser: etter tining ble 10 til 12 liter PPSB/trombin/løsningsmiddel-detergentrester justert til en pH på 6,5 og deretter injisert på en kolonne på omtrent 16 liter S-Sepharose FF ekvilibrert med et medium som inneholdt 40 mM natriumglukonat og 0,01 M NaCl ved en pH på 6,5. Størstedelen av proteinene i PPSB såvel som TnBP og Tween 80 ble ikke tilbakeholdt i kolonnen. Gelen ble deretter underkastet vasking med et medium omfattende 150 mM natriumglukonat og 0,04 M NaCl ved en pH på 6,5. Trombinet ble deretter eluert ved tilsetning av 0,20 M natriumklorid til det samme medium.

Etter at det var eluert fra kolonnen ble trombinet høstet i nærvær av de etterfølgende stabilisatorer: 2 g/l albumin, 5 g/l sakkarose og 60 mM kalsiumklorid. Produktet ble

deretter konsentrert ved ultrafiltrering, justert til en albuminkonsentrasjon på 5 g/l og til en pH på 6,3 - 6,5.

Totalutbyttet i disse to trinn, kromatografi og konsentrering, var i størrelsesorden 90 %.

Etter sterilfiltrering ble produktet fordelt i volumdeler på 5 ml, 2 ml, 1 ml eller 0,5 ml, avhengig av produktets påfølgende tilsiktede anvendelse i form av biologisk lim, og frysetørket. Tilstedeværelsen av stabilisatorene var nødvendig for å opprettholde enzymaktiviteten av trombinet under disse behandlinger, som vist i tabellene I og II.

TABELL I: Stabilitet for eluat under fordeling

15

TROMBIN NIH U/ml				
	To	To+ 3H30	To+ 5H30	Residual-aktivitet

Ubehandlet eluat	429	371	391	91 %
60 mM CaCl ₂ sakkarose 5 g/l	425	384	374	88 %
60 mM CaCl ₂ sakkarose 5 g/l	387	384	380	98 %
albumin 5 g/l				

25

TABELL: Stabilitet for preparat i flytende form

30

Trombin i NIH U/ml			
	To	To+ 2 uker	

CaCl ₂ sakkarosealbumin	549	535	97 %
CaCl ₂ sakkaroseglycin	557	389	70 %
CaCl ₂ albuminglycin	621	518	83 %
kun CaCl ₂	534	503	94 %

40

Eksempel 2: Produktets egenskap

Trombinkonsentratet var i frysetørket form. Etter rekondisjonering i destillert vann ble det evaluert i henhold til de følgende metoder:

45

a) Koagulerende aktivitet.

Aktiviteten for det native α -trombinet ble målt ved dets fibrinogen-koagulerende aktivitet. Den ble uttrykt i NIH (National Institute of Health) enheter i forhold til en
5 standard referanse: NIH trombin, batch J.

Etter rekondisjonering i destillert vann ble 5 fortynninger fra 1/300 til 1/900 fremstilt i en Owren Koller bufferoppløsning (L'Hémostase: méthode d'exploration et diagnostic
10 pratique. Ed. L'Expansion scientifique K.J. CAEN - H.J. LARRIEU. M. SAMAMA.) inneholdende 0,5 % polyetylenglykol 6000. Koagulasjonstiden ble målt ved anvendelse av et KC 10 Amelung apparat (BAXTER). 200 μ l av fortynningen (standard eller prøve som skal testes) ble plassert i en serie av
15 kopper. Etter 1 minutt ved 37°C ble 200 μ l 1 g/l fibrinogen tilsatt og stoppeklokken ble startet. Standardkurven ble plottet på bilogaritmisk papir. Tidene som ble oppnådd for prøvene som ble testet ble notert og deres NIH U/ml verdi ble utledet fra kurven.

20

b) Amidolytisk aktivitet.

Den amidolytiske aktivitet for trombinet ble bestemt på STAGO kromotrombinsubstratet i overensstemmelse med produsentens instruksjoner. Det ble uttrykt i nkat/ml. Forholdet mellom
25 nanokataler og NIH enheter var 1 NIH U = 2 nkat.

Aktiviteten som ble funnet på det kromogene substrat tilsvarende aktiviteten av det native α -trombin såvel som den for dets proteolysederivater, β - og γ -trombiner.

30

c) Proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved anvendelse av Biuret-metoden.

35 d) Elektroforese på polyakrylamidgel.

Elektroforese ble gjennomført på Pharmacia PHAST SYSTEM med Phast-gel 10/15 i SDS medium.

e) Egenskapene til det biologiske lim som var dannet ved koagulering av konsentratet av fibrinogen, Faktor XIII og fibronektin i nærvær av trombin (European patent 0 305 243).

5 Egenskapene til de biologiske lim som var dannet i nærvær av trombin ble evaluert ved anvendelse av de følgende parametere: geldannelsestakt (i sekunder), adhesiv styrke på mus (g/cm^2). Halv-desplasementtiden (i sekunder) og total desplasement (i radianer) ble målt ved anvendelse av et
10 reometer.

Trombinkonsentratets egenskaper.

De egenskapene som ble målt ved anvendelse av de metoder som er beskrevet i det foregående er vist i den etterfølgende
15 tabell.

TABELL III: Egenskaper hos humane trombinkonsentrater.

	Batch Nr.	06510010	06510020	06510031	06510032
20	Rekondisjoneringsvolum (ml)	5,2	2,2	1,2	5,2
25	Koagulerende trombin i NIH U/ml	610	540	564	522
	Amidolytisk trombin i NIH U/ml	688	587	764	739
30	Proteinkons. g/l	8	7	7	6,5
	pH	6,25	6,27	6,30	6,41
35	Kalsiumkons. i mmol/l	55	56	60	75
	Osmolaritet i mOsm/l	594	539	554	570
40	Sakkarose i g/l	2,25	4,8	5,1	4,3
	Albumin i g/l	6,6	6,4	6,2	6,0
45	Geldannelsestid (i sekunder)	6	6	5	7
	Halv-desplasementtid (i sekunder)	0,77	0,57	0,81	0,58
50	Total desplasement (i radianer)	0,60	0,36	0,60	0,34
55	Adhesiv styrke i g/cm^2	130	160	137	142

Koagulerende aktivitet i konsentratet var i størrelsesorden 550 NIH U/ml.

Amidolytisk aktivitet var i samme størrelsesorden, fra 600 -
5 700 NIH U/ml, som viser fraværet av en stor andel av omdannede former, β - og γ -trombinner.

Produktets renhet ble evaluert ved hjelp av elektroforese på polyakrylamidgel. I et SDS-medium ble det i tillegg til
10 båndet som tilsvare albuminet med en molekylvekt på 67.000, observert et enkelt hovedbånd som tilsvare α -trombin med en molekylvekt på 36.000. Etter reduksjon med β -merkapttoetanol, fremkom det et bånd som tilsvare den tunge kjeden i α -trombinet, med en mindre molekylvekt. Den lette kjeden på
15 omtrent 4000 dalton hadde beveget seg ut av platen.

Produktets stabilitet etter rekondisjonering ble testet (tabell IV). Trombinet var stabilt i minst 24 timer i flytende form. Det var også stabilt i dypfryst tilstand
20 (tabell V), såvel som i frysetørket tilstand (tabell VI). Denne stabilitet ble sikret ved glukonat - sakkarose - kalsiumklorid - albuminmediumet med en pH på 6,5.

TABELL IV: Trombinets stabilitet etter rekondisjonering.

25

Koagulerende aktivitet (i NIH U/ml)			

30	(batch nr.)	06510010 5 ml	06510020 2 ml

	To	569	595
35	To + 3 H	590	614
	To + 6 H	596	619
	To + 24 H	539	545
40	-----		

TABELL V: Trombinets stabilitet i dypfryst tilstand.

Koagulerende aktivitet (i NIH U/ml)			
(batch nr.)	06510020	06510031	06510032
To	610	598	595
To + 1 mnd.	611	628	582

15 TABELL VI: Trombinets stabilitet i frysetørket tilstand ved +4°C

Batch	Koagulerende aktivitet	Geldannelsestid	Halv-des-plasement-tid	Total displ.	Adhesiv styrke
06510010	(NIH U/ml)	(s)	50 (s)	(rad)	(g/cm ²)
To	610	6	0,77	0,60	130
To + 1 mnd.	619	6	0,63	0,44	/
To + 2 mnd.	609	7	0,62	0,39	155
To + 3 mnd.	573	5	0,56	0,29	135
To + 12 mnd.	584	5	0,56	0,30	143

Stabiliteten for det frysetørkede trombin ble også målt i en "akselerert aldrings" test (tabell VII).

TABELL VII: Trombinets stabilitet i frysetørket tilstand (5 ml) ved 45°C.

	Koagulerende aktivitet	Geldannel- sestid	Halv-des- plasement- tid	Total despl.	Adhesiv styrke	
5	Batch 06510010	(NIH U/ml)	(s)	50 (s)	(rad)	(g/cm ²)
	To	610	6	0,77	0,60	130
10	To + 3 uker	508	6	0,65	0,43	151
	To + 6 uker	520	8	0,83	0,70	152
15	To + 10 uker	580	3	0,45	0,20	180
	To + 3 mnd.	555	5	0,71	0,44	-

20

De reologiske egenskaper for det biologiske lim oppnådd i nærvær av humant trombin eller bovint trombin ble sammenlignet ved anvendelse av vanlige testprosedyrer.

25 Undersøkelsen ble gjennomført med det samme fibrinogen-konsentrat som var blandet med et bovint eller humant trombin (06510010). Prosedyrene som ble anvendt i hver test var sterkt identiske. Utstyret var et CARRIMED CSL 100 reometer med styrt påkjenning.

30

a) Bruk i forbindelse med krymping

Måling av geldannelsestid

Halv-desplasementttidene t1 og t2 (tid som kreves for å oppnå 50 % av total desplasement) var:

35 t2 (bovint trombin) : 1,8 sek.

t1 (humant trombin) : 0,77 sek.

Ingen signifikant forskjell.

Elastisitetsstudie

De to produktene ble funnet til å ha identisk momentan-
elastisitet.

5 b) Bruk i forbindelse med oscillasjon.

En bruddgrense på omtrent 2.500 N/m^2 ble funnet for de to
produktene.

Lagringsmodulene G' for de to lim utviklet seg likt over tid.

Lagringsmodulen G' som en funksjon av frekvens var sammen-
10 lignbar for de to produktene.

Alle resultatene bekrefter de observasjoner som ble gjort ved
anvendelse av produktet når det gjelder karakteren av
klumpen, eksudasjon- og geldannelses-tiden.

15

Alle resultatene førte til den konklusjon at de reologiske og
de mekaniske egenskaper for limet som ble oppnådd i nærvær av
humant trombin var identisk med dem som ble oppnådd i nærvær
av bovint trombin som nå er bestanddelen i vanlig anvendte
20 biologiske lim.

Eksempel 3. Opptrapping av prosessen

Prosesen som beskrevet i eksempel 1 ble anvendt med flere
batcher på 10 - 15 liter PPSB med den virkningsgrad som er
25 vist i tabell VIII.

Utbyttet fra det ytterligere kromatografi-konsentrasjons-
trinnet er mellom 89 og 100 %.

30 Prosesen som et hele tillater således produksjon av vel
standardiserte batcher som inneholdt mere enn 10 millioner
NIH enheter trombin.

TABELL VIII, Koagulerende aktivitet for trombin etter rekalsifiseringstrinn og inaktivering av virus.

5	Batch Nr.	Utgangsvolum (ml) PPSB	Total mengde trombin dannet (NIH U) pr batch
	-----	-----	-----
	96510040	10.000	9.276.660
	96510050	10.570	9.163.440
	96510060	16.310	10.519.950
10	96510070	15.300	11.979.900
	96510080	14.400	14.976.000
	96520300	8.155	7.298.725
	96520400	13.250	16.761.250
	96520500	13.255	10.894.790
15	-----	-----	-----

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et humant trombin-
- 20 konsentrat for terapeutisk anvendelse med høy spesifikk aktivitet fra en human plasmafraksjon,
- k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter de seks følgende fortløpende trinn:
- a) adsorpsjon av PPSB fraksjonen fra en kryopresipi-
- 25 teringssupernatant på en dekstrangel podet med DEAE og vasking av den nevnte fraksjon med 0,20 til 0,23 M natriumklorid i citratbuffer, etterfulgt av eluering av PPSB ved en økning av natriumkloridkonsentrasjonen til 0,5 M,
- 30 b) aktivering av protrombin til trombin ved rekalsifisering av nevnte eluerte PPSB ved tilsetning av CaCl_2 til en sluttkonsentrasjon på 5-10 mM og ved å underkaste den oppnådde blanding for en innledende inkubasjonsperiode på omtrent 2 timer ved omtrent 37°C og deretter en andre
- 35 inkubasjonsperiode på omtrent 16 timer ved omtrent 24°C,
- c) viral inaktivering av den rekalsifiserte PPSB med løsningsmiddeldetergent,
- d) kromatografisk separasjon av PPSB på en sterk kation-
- 40 byttergel i nærvær av natriumglukonat for å oppnå et trombinkonsentrat etter vasking og eluering ved økning av natriumklorid- og glukonatkonsentrasjonen,

- e) stabilisering av det eluerte trombin ved tilsetning av en blanding som omfatter albumin, sakkarose og CaCl_2 ,
- f) konsentrering og fordeling av det rensede trombin til volumdelere som er tilpasset deres påfølgende terapeutiske
5 anvendelse og frysetørking derav.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den kromatografiske
separasjon i trinn d) gjennomføres på en gel av agarose som
10 er podet med $\text{CH}_2\text{-SO}_3$ grupper, i et medium som inneholder 40 mM
natriumglukonat pH 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 at trombinet elueres fra
15 kromatografigelen ved økning av natriumkloridkonsentrasjonen
til 0,2 M og natriumglukonatkonsentrasjonen til 150 mM.

4. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1
til 3,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den stabiliserende
blanding i trinn e) omfatter 2 g/l albumin, 5 g/l sakkarose
og 60 mM CaCl_2 .