



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 31 684 T2 2006.06.22

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 027 371 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 31 684.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA98/01008

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 951 133.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/023111

(86) PCT-Anmeldetag: 29.10.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 14.05.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.08.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 21.09.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 22.06.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07K 1/14 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 9/74 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

960660 30.10.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Haemacure Corp., Montreal, Quebec, CA

(72) Erfinder:

BUI-KHAC, Trung, Montreal, CA

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von hochvirusfreiem Thrombin zur Bereitung von Fibrinkleber aus menschlichem Plasma-Pool

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft die Herstellung von hoch virensicherem Thrombinkonzentrat aus vereinigtem menschlichem Plasma. Im Besonderen umfasst dieses Verfahren eine Lösemittel/Detergens-Behandlung, eine Nanofiltration und eine Hitzebehandlung.

**[0002]** Die biologischen Klebstoffe sind adhärente Proteinkonzentrate, die aus Fibrin bestehen, welches aus Fibrinogen erzeugt wird, das durch Thrombin und Faktor XIII in Gegenwart von Calciumionen aktiviert wurde. Die Adhäsionskraft von Blutgerinneln aufgrund ihres Netzwerks aus polymerisiertem Fibrin ist seit langem bekannt. Fibrin wurde seit Beginn dieses Jahrhunderts als ein Adhäsionsmittel verwendet und durch Bergel: Über Wirkungen des Fibrins (Dtschr. Med. Wochenschr. 1909; 3: 633–665) entdeckt, der es als einen physiologischen Klebstoff erkannte und ihm darüber hinaus heilende Eigenschaften zuschrieb. Dieser Entdeckung folgte direkt danach Grey: Fibrin as a hemostatic in cerebral surgery (Surg. Gynecol. Obstet. 1915; 21: 452), der Fibrin-Tampons, um Hirn- und Leberblutungen zu stoppen, und auch bei Hirnoperationen verwendete. Es dauerte jedoch bis 1944, als Cronkite: Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting (JAMA 1944; 124: 976–978) und dann R.T. Tidrick und E.D. Warner: Fibrin fixation of skin transplants (Surgery 1944; 15: 90–95) Fibrinogen zusammen mit Thrombin verwendeten, um Hauttransplantate zu befestigen. Die niedrige Konzentration dieser Produkte ermöglichte jedoch weder eine gute Qualität der Adhäsion noch eine andauernde Wirkung. Seit 1946 wurden dank der wichtigen wissenschaftlichen Forschung durch E.J. Cohn et al.: Preparation and properties of serum plasma proteins. A system for the separation into fractions of the proteins and lipoprotein components of biological tissues and fluids (J. Am. Chem. Soc. 1946; 68: 459–475) über die Fraktionierung von Plasmaproteinen insbesondere Gerinnungsproteine verwendet, und einige Jahre später wurden der Mechanismus der Gerinnung und die wichtigsten Gerinnungsproteine, insbesondere Faktor XIII, aufgeklärt. Matras: Topographical anatomy of the total osteotomy of the midface (J. Maxillofac. Surg. 1975; 3(4): 260–262) war der Erste, der die adhärenten Eigenschaften von Fibrin in Form von hoch konzentriertem Fibrinogen verwendete. Seit dieser Zeit haben die biologischen Klebstoffe die synthetischen Klebstoffe endgültig ersetzt und werden immer mehr in der menschlichen klinischen Praxis verwendet.

**[0003]** Die biologischen Klebstoffe bringen einen neuen Ansatz in Operationen und in das Nähen ein. Chirurgen haben lange Zeit nach einem wirksamen, leicht zu verwendenden und vor allem gut tolerierten Adhäsionsmittel gesucht, das zusätzlich zum oder als Ersatz für das Nähen verwendet werden kann.

Heutzutage sind Operationsnähte von großer Bedeutung. Es ergeben sich jedoch zahlreiche Probleme wie z. B. Unverträglichkeit oder Toxizität. Blut stellte aufgrund seiner Gerinnungseigenschaften für Chirurgen immer ein ideales Modell für einen biologischen Klebstoff dar, aber die Verwendung von biologischen Klebstoffen, die aus menschlichen Quellen hergestellt werden, wirft das Problem der Übertragung von Viren auf. Gefährdungen durch Virenübertragungen sind in hohem Maße von den Reinigungsverfahren der Plasmakonzentrate abhängig. Für die klinische Verwendung am Menschen müssen die biologischen Klebstoffe mit strengen Behandlungen zur Inaktivierung von Viren hergestellt werden, ohne die Qualität der Produkte zu beeinflussen. Die Forschung ist immer noch im Gange, um ein Adhäsionsmittel zu entwickeln, das die folgenden Eigenschaften in sich vereinigt:

- hohe Virensicherheit
- ausreichende Adhäsionsfähigkeit
- gute Elastizität
- gute Haftung auf benachbarten Geweben
- Abwesenheit von Toxizität
- Abwesenheit von Wirkungen auf den Stoffwechsel
- gute Verträglichkeit

**[0004]** Die US-Patente Nr. 5,290,918 und Nr. 5,395,923, die an Haemacure Biotech Corp. erteilt wurden, beschreiben Verfahren zur Herstellung und zur Verwendung eines Konzentrats aus Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin für therapeutische Zwecke.

**[0005]** Aufgrund seiner Gerinnungseigenschaften stellt das Konzentrat, das reich an Fibrinogen und an Faktor XIII ist, den Klinikern ein wertvolles und wirksames Werkzeug für Operationen bereit, bei denen hämostatische Eigenschaften in hohem Maße benötigt werden. Die Gebiete der klinischen Anwendung können sein: Neurochirurgie, kardiovaskuläre Chirurgie, plastische Chirurgie (Hauttransplantate), ORL-Chirurgie, Stomatologie, orthopädische Chirurgie, allgemeine Chirurgie und Traumatologie.

**[0006]** Das Hauptprotein in diesem Konzentrat ist Fibrinogen, das durch eine enzymatische Reaktion in Gegenwart von Thrombin und Calciumionen die Fibrinpeptide A und B liefert, was die Bildung von Fibrin-Monomeren erlaubt. Diese Monomere polymerisieren rasch und werden zu löslichem Fibrin. Dann bildet der Fibrin stabilisierende Faktor (Faktor XIII) unter der Vermittlung von Calciumionen kovalente Bindungen mit dem gelösten Fibrin, die es in einem sauren Medium oder in Gegenwart von Harnstoff stabil und unlöslich machen.

**[0007]** Das so gebildete Fibrin ist irreversibel und stabil und spielt seine Rolle als Gerinnungsmittel. Es widersteht der Fibrinolyse aufgrund seiner hohen

Konzentration, Plasminogen freiem Fibrinogen und behält seine Form als Ergebnis der Abwesenheit von Exsudation. Das Konzentrat weist die folgenden Eigenschaften auf: exzellente Stabilität, nachdem es in wässriger Lösung wieder aufgelöst wurde, Solubilisation bei Zimmertemperatur in wenigen Minuten, gute Elastizität und schließlich gute Adhäsion.

**[0008]** Diese Eigenschaften hängen nur von dem Verfahren der Reinigung aus dem Plasma ab. Dies ist ein einfaches, schnelles Verfahren, das leicht an eine industrielle Herstellung angepasst werden kann. Alle biologischen und biochemischen Eigenschaften des Konzentrats bleiben erhalten und das Produkt erfüllt die klinischen Anforderungen.

**[0009]** Trotz verfügbarer virologischer Tests wart die Verwendung von aus Blut stammenden Produkten immer Übertragungsprobleme mit Viren auf. Der sicherste Weg, um sichere aus Blut stammende Produkte bereitzustellen, besteht darin, die Viren systematisch zu inaktivieren, von denen man annimmt, dass sie vorhanden sind, dies erfolgt unter der Verwendung von geeigneten Verfahren ohne die biochemischen Eigenschaften der Plasmaprodukte zu verschlechtern. Derzeit sind zahlreiche Verfahren zur Inaktivierung von Viren bekannt, die auf der Natur der Viren und der Art der Proteine, die isoliert werden sollen, basieren, was durch die steigende Menge an wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die sich darauf beziehen, widergespiegelt wird.

**[0010]** Die am häufigsten verwendeten Plasmaprodukte sind Albumin, Immunglobuline und Konzentrate der Gerinnungsfaktoren. Gellis et al.: Chemical, clinical and immunological studies on products of human plasma fractionation: inactivation of virus of homologous serum albumin by means of heat (J. Clin. Invest. 1948; 27: 239–244) waren die Ersten, die ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren durch das Erhitzen eines Albuminpräparats bei 60 °C über 10 Stunden verwendeten. Dieses Verfahren wird seitdem wegen seiner bestätigten Wirksamkeit für die Verminderung von Risiken der Virenübertragung derzeit verwendet. Das gleiche Verfahren wurde auf die Herstellung von Immunglobulin G (IgG) mit der gleichen Wirksamkeit angewendet. Diese Wirksamkeit kann mit dem Verfahren der Reinigung dieser Blutprodukte in Beziehung gebracht werden, insbesondere mit der Verwendung eines vollständigen Fraktionierungsverfahrens, wie es durch Cohn (op. cit.) oder durch Kistler und Nitschmann: Lange scale production of human plasma fractions (Vox Sanguinis 1962; 7: 414–424) beschrieben wurde.

**[0011]** Die Verwendung von Ethanol in zahlreichen Schritten bei der Fraktionierung von Albumin und IgGs ermöglicht eine Neuverteilung der Menge an Viren in unterschiedliche Fraktionen. Ethanol ist als desinfizierendes Mittel gegen pathogene Agenzen

wie z. B. Viren bekannt, wie durch Hénin et al.: Inactivation and partition of human immunodeficiency virus during Kistler and Nitschmann fractionation of human blood plasma (Vox Sanguinis 1988; 54: 78–83) und Morgenthaler: Effect of ethanol on virus. Virus inactivation in plasma products (Current Studies in Hematology and Blood Transfusion, Basel, Karger 1989; 56: 109–121) erwähnt wurde.

**[0012]** Die Pasteurisierung von Albumin und IgGs tauchte zur Beginn der 50er Jahre auf. Dieses Verfahren zielte jedoch auf die Inaktivierung von Hepatitis-Viren (Hepatitis B und Non A-Non B). Curran et al.: Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusion (N. Engl. J. Med. 1984; 310: 69–75) werten den Aspekt der Virenübertragung des HIV-Typs durch Transfusion oder durch die Verwendung von anderen Blut-Derivaten, insbesondere von Gerinnungsfaktoren, auf. Seitdem fokussierten sich die Verfahren zur Inaktivierung von Viren auf HIV. Die Verwendung von Albumin oder von IgGs führte zu keiner Übertragung von HIV, dieses Fehlen der Virenübertragung wurde dem Pasteurisierungsschritt zugeschrieben (Mitra et al.: Elimination of infectious retroviruses during preparation of immunoglobulins (Transfusion 1986; 26: 394–397)). Gerinnungsfaktoren wie z. B. Faktor VIII und IX werden von hämophilen Patienten häufig benutzt. Heimburger et al.: a) Faktor VIII – Konzentrat-hepatitissicher: Fortschritte in der Behandlung der Hämophilie A (Die gelben Hefte 1980; 20: 165–174) und b) A Factor VIII concentrate, high purified and heated in Solution (1. Internationale Hämophilie-Konferenz, Bonn; 3.–7. Oktober 1980, Zusammenfassung Nr. 110 und Nr. 117) haben auf diese Produkte das gleiche Pasteurisierungsverfahren, das für Albumin beschrieben wurde, zur Inaktivierung von Viren während der Herstellung von Faktor VIII in Gegenwart von Glycin und Saccharose angewandt, um eine Proteindenaturierung durch die Hitzedenaturierung bei 60 °C über 10 Stunden zu vermeiden. Ihre Untersuchungen zeigten die Wirksamkeit der Inaktivierung von HIV, Hepatitis B und Hepatitis Non A-Non B. Hilfenhaus et al.: a) Safety of human blood products: Inactivation of retroviruses by heat treatment at 60 °C (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1985; 178: 580–584), b) Inactivation of the AIDS-causing retrovirus and other human viruses in antihemophilic plasma protein preparations by pasteurization (Vox Sanguinis 1986; 50: 208–211), c) Pasteurization as an efficient method to inactivate blood borne viruses in F. VIII concentrates (Drug. Res. 1986; 22: 621–625) bestätigten, dass die Pasteurisierung ein wirksames Verfahren zur Inaktivierung von Viren wie z. B. HIV im Verlauf der Herstellung eines Konzentrates von Faktor VIII darstellt. Tabor et al.: Inactivation of hepatitis B virus by heat in antithrombin III stabilized with citrates (Thromb. Res. 1982; 22: 233–238) inaktivierten das Hepatitis B-Virus durch Erhitzung von Antithrombin III in Gegenwart von Citrat als stabilisierendem Mittel. Hollinger et al.: Reduction in risk

of hepatitis transmission by heat treatment of a human factor VIII concentrate (J. Infect. Dis. 1984; 150: 250–262) erhitzten ein Konzentrat von Faktor VIII in gefriergetrocknetem Zustand zur Verminderung des Risikos der Übertragung von HIV und Hepatitis. Piszkiewicz et al.: a) Heat inactivation of human immunodeficiency virus in lyophilized anti-inhibitor coagulant complex (Autoplex) (Thromb. Res. 1986; 44: 701–707), b) Heat inactivation of human immunodeficiency virus in lyophilized factor VIII and factor IX concentrates (Thromb. Res. 1987; 47: 235–241) zeigten, dass die Hitzebehandlung von gefriergetrockneten Konzentraten von Gerinnungsfaktoren keine signifikante Auswirkung auf die Aktivität dieser Faktoren hatte. Diese Autoren hoben hervor, dass es nicht offensichtlich war, dass eine Produktion von Neuantigenen aufgrund der Hitzebehandlung gefunden wurde. Untersuchungen über die Virenaktivierung durch Hitzebehandlung wurden durch Piszkiewicz et al.: Virus inactivation by heat treatment of lyophilized coagulation factor concentrates. Virus inactivation in plasma products (Current Studies in Hematology and Blood Transfusion. Basel, Karger 1989; 56: 44–54) bei Präparaten von „anti-hämophilen Faktoren“ (Hemofil® T, Hemofil® CT) durchgeführt, wobei die Letzteren 72 Stunden bei 60 °C erhitzt wurden, sowie während der Herstellung von Antikoagulans-Inhibitor-Komplexen (Autoplex® T) und Faktor IX-Komplex (Proplex® SX-T und Proplex® T), wobei die Letzteren 144 Stunden bei 60 °C erhitzt wurden. Es gibt keinen Bericht über eine Serokonversion von HIV aufgrund der Verwendung von irgendeinem der fünf hitzebehandelten Gerinnungsprodukte. Von Hemofil® T-Konzentrat, das aus Plasma hergestellt wurde, welches auf HBsAg und anti-HBc hin durchmustert wurde, wurde herausgefunden, dass es NANBH bei einer Untersuchung an Menschenaffen nicht überträgt. Die Verwendung des gleichen Produkts, das aus Plasma hergestellt wurde, welches nur auf HBsAg hin durchmustert wurde, führte jedoch bei Patienten zu NANBH (Colombo et al.: Transmission of non-A, non B hepatitis by heat treated factor VIII concentrate (Lancet 1985; ii: 1–4)). Hemofil® T wird derzeit aus Plasma hergestellt, das für HBsAg nicht reaktiv ist und normale ALT-Spiegel aufweist.

[0013] Viren sowie Proteine sind stabiler und resisternt gegenüber Hitze, wenn sie sich in trockenem Zustand befinden (gefriergetrocknet). Die Temperatur und die Dauer der Erhitzung, um ihre Denaturierung zu minimieren, scheinen in Abhängigkeit von der Natur der Proteine zu variieren. Die Wirksamkeit der Virenaktivierung wurde jedoch niemals als perfekt berichtet: die Übertragung von NANBH wurde durch Colombo et al. (op. cit) angezeigt. Die Übertragung von HIV wurde durch White et al. (HTLV-III seroconversion associated with heat-treated factor VIII concentrate (Lancet 1986; i: 611–612)) und Van den Berg et al. (Seroconversion to HTLV-III in hemophiliac given heat-treated factor VIII concentrate (Lancet

1986; i: 803–803)) berichtet. Aus diesen Gründen erhitzten Winkelman et al. (A new therapeutic factor VIII concentrate of high specific activity and high yield (Thromb. Haemost. 1985; 54: 19–22)) ein Konzentrat von Faktor VIII (Typ 8Y), Faktor IX (Typ 9A), Faktor VII, Faktor XI und Thrombin 72 Stunden bei 80°C. Untersuchungen, die an 29 Patienten durchgeführt wurden, welche diese hitzebehandelten Produkte erhalten hatten, haben gezeigt, dass keine Serokonversion von HIV von HB stattfand und dass eine signifikante Verminderung des Auftretens einer Übertragung von NANBH stattfand.

[0014] Es wurden andere Verfahren zur Inaktivierung von Viren entwickelt, die Lichtquellen (UV, Röntgenstahlen und Laser) verwenden, um die infektiösen Agenzen im Plasma zu bestrahlen. Die folgenden werden als Referenzen zitiert: Oliphant et al.: Homologous serum jaundice: experimental inactivation of etiologic agent in serum by ultraviolet radiation (Publ. Health Rep. 1946; 61: 598–600), Wolf et al.: Ultraviolett irradiation of human plasma to control homologous serum jaundice (JAMA 1947; 135: 476–477), Blanchard et al.: Methods of protection against homologous serum hepatitis. II. The inactivation of hepatitis virus serum with ultraviolett rays (JAMA 1948; 138–341), Murray et al.: Effect of ultraviolet radiation on the infectivity of icterogenic plasma (JAMA 1955; 157: 8–14), Gurzadyan et al.: Mechanism of high power picosecond laser UV irradiation of viruses and bacterial plasmids (Photochem. Photobiol. 1981; 3: 835–838), Redfield et al.: Psoralen inactivation of influenza and herpes simplex virus and of viral infected cells (Infect. Immun. 1981; 32: 1216–1226), Heindrich et al.: Clinical evaluation of the hepatitis safety of beta-propiolactone-ultraviolet treated factor IX concentrate (PPBS) (Throm. Res. 1982; 28: 75), Kitchen et al.: Effect of gamma irradiation of the human immunodeficiency virus and human coagulation proteins (Vox Sang. 1989; 56: 233–229).

[0015] Seit mehr als zehn Jahren ist eines der derzeit am meisten verwendeten Verfahren zu Inaktivierung von Viren in Produkten, die aus Blut stammen, ein Verfahren, das die Verwendung eines Lösemittels und eines Detergents kombiniert. Dieses Verfahren wurde durch Neurath und Horowitz entwickelt (US-Patent Nr. 4,540,573, erteilt im Sept. 1985, Nr. 4,613,501, Nr. 4,764,369, erteilt im Aug. 1988; Nr. 4,820,805, erteilt im April 1989; Nr. 4,841,023, erteilt im Juni 1989 und Nr. 5,541,294, erteilt im Juli 1996). Das Gemisch oder das Lösemittel/Detergent (Tri-(n-butyl)-phosphat/Detergent) inaktiviert typischerweise Viren mit einer Hülle wie z. B. HIV, HTLV-1, HBV und EBV.

[0016] Das Lösemittel/Detergent-Verfahren reicht jedoch nicht aus, um sichere Plasmaprodukte bereitzustellen, weil die Möglichkeit besteht, dass Viren ohne Hülle wie z. B. Parvoviren und Polioviren anwe-

send sind, welche gegenüber Lösemittel/Detergents unempfindlich sind. Vor kurzem wurde ein anderes Verfahren zur Eliminierung von Viren ohne Hülle eingeführt, auf die das Lösemittel/Detergents keine Wirkung hat. Bei dem Verfahren handelt es sich um eine Nanofiltration. Nanofilter bestehen aus mikroporösen Fasern und sind unter dem Namen Planova BMM (Asahi Chemical Industries, Tokio, Japan) kommerziell erhältlich. Die Porosität dieser Filter variiert von etwa 15 bis 35 nm. Diese Filter können bestimmte Arten an Viren zurückhalten, die eine Größe von mehr als etwa 25 nm aufweisen. Diese Filter sind zur Eliminierung von Viren wirksam, wie z. B. von HIV-1 (80–100 nm), HBB (42 nm), HCV (<80 nm), Hepatitis-Delta-Virus (35 nm), Rinder-Diarrhoe-Virus (60–70 nm), Sindbis-Virus (60–70 nm), Reovius Typ 3 (60–80 nm), Poliovirus Sabin Typ 1 (25–30 nm), menschliches Parvovirus (20–25 nm); Sekiguchi et al.: Possibility of hepatitis B virus (HBV) removal from human plasma using regenerated cellulose hollow fiber (BMM) (Membrane 1989; 14: 253–261), Hamamoto et al.: A novel method for removal of human immunodeficiency virus: filtration with porous polymeric membranes (Vox Sang. 1989; 56: 230–236), Tsurumi et al.: Structure of cuprammonium regenerated cellulose hollow fiber (BMM hollow fiber) for virus removal (Polym. J. 1990; 22: 751–758), Ishikawa et al.: Novel determination method of size of virus in solution using cuprammonium regenerated cellulose membrane (BMM) (Membrane 1991; 16: 101–111), Tomokyo et al.: Studies on virus elimination and inactivation effect of highly purified F-VIII concentrate (The clinical report, 1991; 25: 271–275), Manabe: Virus removal and inactivation in process validation (Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects (Murakami, H., Shirahata, S., Tachibana, H., Hrsg., 1992, 15–30), Burnouf-Radosewich et al.: Nanofiltration, a new specific virus elimination method applied to high-purity factor IX and factor VI concentrates (Vox Sanguinis 1994; 67(2): 132–138)).

**[0017]** Rubinstein et al: Combined solvent-detergent and 100 °C (boiling) sterilizing dry-heat treatment of Factor VIII concentrates to assure sterility (Vox Sanguinis 1991; 60: 60) verwendeten die doppelte Virenaktivierung eines Faktor VIII-Konzentrats durch dessen Behandlung mit Lösemittel/Detergents und Erhitzung des Endprodukts auf 100°C über 30 Minuten. Nach diesen Autoren erlaubt die Hitzebehandlung des Endprodukts die Inaktivierung von Non A-Non B-Hepatitisviren, die nicht von einer Lipidhülle umgeben sind. Die Hitzebehandlung des Endprodukts ist ebenfalls eine Vorsichtsmaßnahme im Falle einer zufälligen viralen Verunreinigung während der Behandlung oder aufgrund der Geräteausstattung (Vox Sang. 1991; 60: 60).

**[0018]** Vor kurzem führten Proba et al. (USP 5,506,127) die dreifache Virenaktivierung im Verlauf der Herstellung von Thrombin ein: (1) Lösemittel/Detergents-Behandlung, (2) Nanofiltration und (3) Hitzebehandlung des gefriergetrockneten Produkts bei 100°C über eine Stunde (USP 5,506,127, erteilt an Haemacure Biotech Inc.).

**[0019]** Die dreifache Virenaktivierung verleiht eine erhöhte Sicherheit bei der Verwendung von aus Blut stammenden Produkten, insbesondere von Gerinnungsfaktoren oder von biologischen Klebstoffen.

**[0020]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird nun ein Verfahren zur Herstellung von Thrombin bereitgestellt, das eine hohe Ausbeute, ein Qualitätsprodukt und Virensicherheit kombiniert.

**[0021]** Demgemäß stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung im Großmaßstab einer bei Lagerung stabilen und für therapeutische Zwecke geeigneten Thrombin-Zusammensetzung bereit, die im Wesentlichen frei von aktiven Viren ist, umfassend die Schritte:

- a) Gewinnen des aus Schritt a) nach dem Verfahren des Anspruchs 1 erhaltenen Überstandes;
- b) Diafiltration des Überstandes gegen eine Austausch-Lösung mit niedrigem Salzgehalt oder ohne Salz;
- c) Verdünnen des diafiltrierten Überstandes, bis eine Prothrombin-Lösung von etwa 100 mOs-mol/kg Gewicht oder weniger erhalten wird;
- d) Präzipitation von Prothrombin durch Zugabe einer sauren Lösung, bis ein pH-Wert von etwa 5,2 erreicht ist;
- e) Auflösen des Präzipitats aus Schritt d) in einer Lösung mit beinahe neutralem pH-Wert;
- f) Umwandeln des Prothrombins aus Schritt e) zu Thrombin in Gegenwart einer Verdünnungslösung von Calciumchlorid, um eine Konzentration an Calciumchlorid von etwa 20 bis etwa 32 mM zu erreichen;
- g) Inkubation des Thrombins mit einer viriziden Lösemittel/Detergents-Lösung in einer Menge, die ausreicht, um Lipid-enthaltende Viren zu inaktivieren.
- h) Reinigung des inkubierten Materials durch sequentielle Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung eines einzelnen sulfalkyl-aktivierten Polysaccharid-Kationenaustauscher-Mediums, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus sulfalkyl-aktivierter Polyagarose, sulfalkyl-aktiviertem Polydextran und einem nicht verdichtbaren Verbundmedium aus sulfalkyl-aktiviertem Dextrans und Silicapartikeln mit einer hohen Selektivität für Thrombin, wobei als Elutionsmittel mindestens drei und ansteigende Konzentrationen einer wässrigen Pufferlösung verwendet werden; und
- i) Gewinnen des Thrombinpeak-Eluats von der Chromatographie aus h) und Austausch des Puffers des Eluats mit einer physiologisch verträglichen, stabilisierenden Pufferformulierung zur Sta-

bilisierung des gewonnenen Thrombins und Gewinnen einer Formulierungspufferlösung von Thrombin.

**[0022]** Die Ansprüche 1 und 2 stellen den entsprechenden Prozess bereit.

**[0023]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst Schritt b) den Austausch von einer Wasser-Lösung in einem Volumen, das zum etwa vierfachen Volumen des Überstandes äquivalent ist.

**[0024]** In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Verdünnungslösung in Schritt f) 40 mM Calciumchlorid, das in einem Volumen hinzugefügt wird, welches zu etwa dem vierfachen Volumen des solubilisierten Präzipitats aus Schritt e) äquivalent ist.

**[0025]** Das Kationenaustauscher-Medium ist das nicht verdichtbare Verbundmedium aus sulfoalkyl-aktiviertem Dextran und Silicapräzipitaten.

**[0026]** Das sulfoalkyl-aktivierte Dextran ist bevorzugt sulfopropyl-aktiviertes Dextran und Silicapräzipitat. Die ansteigenden Pufferkonzentrationen bestehen im Wesentlichen aus etwa 0,08 M, 0,15 M und 0,4 M NaCl-Puffer für menschliches Thrombin.

**[0027]** In einer noch bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren weiterhin die Filtration der Thrombin-Formulierungspufferlösung über eine Hohlfaser-Cuprammonium-Cellulose-Membran, um Virionen herauszufiltern, die in der Formulierungspufferlösung vorhanden sind, und die Gewinnung einer im Wesentlichen Virionen-freien Formulierungspufferlösung von Thrombin.

**[0028]** Die Hohlfaser-Cuprammonium-Cellulose-Membran besitzt bevorzugt eine Porosität von etwa 15 nm.

**[0029]** In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform umfasst weiterhin das Verfahren die Gefriertrocknung und das trockene Erhitzen der Thrombin-Formulierungspufferlösung nach der Filtration, um alle verbliebenen Virionen ohne Denaturierung des Thrombins zu inaktivieren.

**[0030]** Die Behandlung mit trockener Hitze wird bevorzugt durch die Erhitzung des gefriergetrockneten Produkts für etwa 1 bis etwa 2 Stunden bei etwa 100 °C erreicht.

**[0031]** Die Formulierungspufferlösung kann eine wässrige Lösung aus Citralsalz, Natriumchlorid, Tris-HCl und Serumalbumin bei einem pH-Wert von etwa 7,3 umfassen, und zwar in Mengen, die ausreichen, um das Thrombin gegenüber einem wesentlichen Aktivitätsverlust während der Hitzebehandlung zu stabilisieren.

**[0032]** In einer spezifischen Ausführungsform umfasst die Formulierungspufferlösung eine wässrige Lösung von etwa 0,25 % Natriumcitrat, 0,45 % Natriumchlorid, 0,25 Tris-HCl, alle Angaben in Gew./Vol.-%; Serumalbumin in einer Menge, die etwa dem 20-fachen des Gesamtproteins im Thrombinpeak-Eluat entspricht und das vor der Gefriertrocknung auf 2 % Gew./Vol. eingestellt wurde; und die einen pH-Wert von etwa 7,3 aufweist.

**[0033]** Der Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass alle industriellen Erfordernisse hinsichtlich der Kostengünstigkeit und der Virensicherheit erfüllt sind.

**[0034]** Die Erfindung wird hierin nachstehend mit Bezug auf die folgenden spezifischen Beispiele und Zeichnungen beschrieben, deren Zweck es ist, die Erfindung zu erläutern und nicht ihren Rahmen einzuschränken.

**[0035]** Die Figuren zeigen:

**[0036]** **Fig. 1** erläutert die Schritte der Herstellung eines Konzentrats aus Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin, ausgehend von einem menschlichen Plasmapool.

**[0037]** **Fig. 2** zeigt ein Verfahren zur Herstellung von Thrombin, das von einem Plasmaüberstand ausgeht, der im Verlauf der Isolierung eines Konzentrats aus Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin gemäß der vorliegenden Erfindung anfällt.

#### Vergleichendes Beispiel 1

**[0038]** Herstellung eines Konzentrats, das reich an Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin ist:

#### Erste Fraktionierung

**[0039]** Das vereinigte Plasma wird bei einer Temperatur gehalten, die zwischen etwa 16 und etwa 37°C liegt. Amino-6-hexansäure wird unter Röhren zugegeben, bis eine minimale Konzentration von 50 mM erreicht ist. Das Gemisch wird mindestens 15 Minuten bei 35 bis 37°C inkubiert. Dann wird das Gemisch auf 0°C ± 2°C abgekühlt. Es wird einbasisches Natrium- oder Kaliumphosphat (USP 5,290,918, erteilt an Haemacure Biotech Inc.) oder Natrium- oder Kaliumacetat (USP 5,395,923, erteilt an Haemacure Biotech Inc.) zugegeben, bis eine Endkonzentration von 1 M erreicht wird. Das Gemisch wird etwa 0,5 bis 1 Stunde bei etwa 0 bis 4°C ± 2°C gerührt. Die saure Präzipitation mit den Phosphaten kann auch bei Zimmertemperatur (etwa 20°C) durchgeführt werden.

#### Zentrifugation:

**[0040]** Das Gemisch wird filtriert oder 20 Minuten

bei 4°C mit 4.200 UpM (Beckman J6-MC, Rotortyp 4.2) zentrifugiert. Der Überstand wird zur Herstellung von Thrombin gewonnen und das Präzipitat wird in ein anderes Becherglas überführt. Der Überstand kann sofort zur Weiterverarbeitung verwendet werden oder bei einer Temperatur unter –30°C, bevorzugt bei –80°C, für viele Monate oder bei 2 bis 4°C für etwa 24 Stunden konserviert werden.

#### Solubilisierung:

**[0041]** Das erhaltene Präzipitat, das reich an Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin ist, wird in einem Puffer solubilisiert, der 1 % Tris und 1,6 % Natriumcitrat, pH-Wert:  $6,0 \pm 0,1$  (ein pH-Wert von 7,3 kann ebenfalls verwendet werden) enthält. Das Präzipitat wird bei Zimmertemperatur unter Röhren solubilisiert. Der vorstehend beschriebene Puffer wird je nach Bedarf zugegeben, um eine Proteinkonzentration von etwa 20–22 mg/ml zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt wird L-Histidin in einem Anteil von 0,2–0,3 g pro Gramm Protein zugegeben. Die Proteinlösung wird anschließend 20 Minuten bei etwa 4°C mit 10.000 UpM zentrifugiert (Beckman J2-MI, Rotortyp JA-10). Die Lipidschicht, die auf der Oberfläche der Proteinlösung schwimmt, wird entfernt. Die Proteinlösung wird vorsichtig in ein Becherglas überführt und durch einen 0,2 Mikron-Kapsel-Filter (Gelman SuporCap, Produkt-Nr. 12991 oder 12992) filtriert.

#### Lösemittel/Detergens-Behandlung

**[0042]** Die so filtrierte Proteinlösung wird einer Behandlung zur Virenaktivierung unterworfen, dies erfolgt durch Vermischung mit dem gleichen Volumen einer Lösung, die 1 % Tris, 1,6 % Natriumcitrat, 2 % Tween-80® (Polyoxyethylensorbitanmonooleat) und 0,6 % Tris-n-butyl-phosphat (TnBP), pH-Wert:  $6,8 \pm 0,1$  enthält. Dies bringt die Endkonzentration auf etwa 10 mg/ml Protein, 1 % Tween-80® und 0,3 % TnBP, der abschließende pH-Wert liegt bei etwa  $7,0 \pm 0,2$ . Die Lösung wird bei  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  unter ständigem Röhren über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden inkubiert.

#### Entfernung der Viren durch Nanofiltration:

**[0043]** Nach der Behandlung zur Inaktivierung der Viren wird das Tween-80® in dem Protein dann auf eine Endkonzentration von 2 % bis 4 % eingestellt, dies erfolgt mit einem Puffer, der 1 % Tris, 1,6 % Natriumcitrat, 6 % Tween-80®, pH-Wert:  $7,0 \pm 0,1$  enthält. Dann wird das Gemisch durch 0,2- und 0,1-Mikron-Kaskaden-Kapselfilter (Gelman CritiCap 0,2 μ, Produkt-Nr. 12995 oder 12996; Criticap 0,1 μ, Produkt-Nr. 12997 oder 12999) filtriert und die filtrierte Lösung wird durch den 35 nm-Planova BMM-Filter durchgeleitet. Die Zugabe von Tween-80® ist notwendig, um die Filtration von Molekülen mit hohem Molekulargewicht wie z. B. Fibrinogen zu erleichtern, und

um seine Ausbeute zu optimieren. Bei Abwesenheit von Tween-80® wird der Filter aufgrund der Beladung mit Protein rasch blockiert.

#### Zweite Fraktionierung:

**[0044]** Eine Menge an 50 mM Amino-6-hexansäure wird dem Filtrat unter Röhren zugegeben und das Gemisch wird etwa 1 Stunde bei  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann auf  $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Eine Menge an einbasischem Natrium- oder Kaliumphosphat (USP Nr. 5,290,918, erteilt an Haemacure Biotech Inc.) oder an Natrium- oder Kaliumacetat (USP Nr. 5,395,923, erteilt am Haemacure Biotech Inc.), die zu einem Mol pro Liter des Gemisches äquivalent ist, wird zugegeben, und das Präzipitat erscheint sofort. Das Röhren wird eine Stunde bei  $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  fortgesetzt.

#### Zentrifugation:

**[0045]** Das Gemisch wird filtriert oder 20 Minuten bei 4°C mit 4.200 UpM (Beckman J6-MC, Rotortyp 4.2) zentrifugiert. Das Lösemittel, das Detergens und die verunreinigenden Proteine werden durch die Zentrifugation entfernt. Das Präzipitat wird zurück gewonnen und dann in ein Becherglas überführt.

#### Waschungen:

**[0046]** Das Präzipitat wird mehrere Male (mindestens zweimal) mit 0,1 % Tris-Puffer, pH-Wert  $7,0 \pm 0,1$  gewaschen. Je nachdem, welches Salz bei dem vorangegangen Präzipitationsschritt verwendet wurde, können der pH-Wert und die Konzentration der Tris-Lösung von 4,5–5,0 bis 9,5–10,5 (Konzentration von 0,1 bis 0,5 %) variieren, um die Lösung zu neutralisieren. Das Präzipitat wird nach jedem Waschungsschritt durch Zentrifugation abgetrennt. Der Tris-Puffer wird auf  $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt und die Waschschritte werden bei  $0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Auch die Verarbeitung bei Zimmertemperatur liefert gute Ergebnisse. Die Anzahl an Waschschritten kann durch Durchführung einer einfachen Dialyse oder einer Diafiltration vermindert werden, nachdem das Präzipitat in den abschließenden Puffer überführt wurde, dies erfolgt unter Verwendung einer Wasser-Lösung, die auf den pH-Wert 7,3 basisch eingestellt wurde.

#### Solubilisierung:

**[0047]** Das gewaschene Präzipitat wird in einem abschließenden Puffer aufgelöst, der 0,5 % Tris, 0,1 % NaCl und 0,5 % Natriumcitrat, pH-Wert  $6,8 \pm 0,1$  (pH-Wert 7,3 kann ebenfalls verwendet werden) enthält. Das Volumen des Puffers beträgt etwa 2 bis 3 ml/g abgewogenes Präzipitat. Die Solubilisierung des Präzipitats kann durch Erwärmen bei  $37^{\circ}\text{C}$  beschleunigt werden. Nach der vollständigen Solubilisierung

wird eine Menge an L-Histidin zugegeben, die 0,2–0,3 g pro Liter Ausgangsplasma entspricht. Dann wird die Proteinlösung filtriert oder 20 Minuten bei etwa 4°C mit 10.000 UpM (Beckman J2-MI, Rotortyp JA-10) zentrifugiert.

**[0048]** Fig. 1 zeigt die abschließenden Schritte der Herstellung eines Konzentrats, das reich an Fibrinectin, Faktor XIII und Fibronectin ist.

#### Einstellen der Proteinkonzentration:

**[0049]** Die endgültige Proteinkonzentration wird auf etwa 30–40 mg/ml mit dem gleichen Puffer eingestellt. Die Proteinkonzentration wird über die O.D. bei 280 nm gemessen.

#### Formulierung:

**[0050]** Die Endkonzentration an L-Histidin wird auf 0,2–0,4 g, bevorzugt auf 0,4 g pro Gramm Protein eingestellt; sie wird durch Messung der O.D. gemäß der folgenden Formel bestimmt:

$$[0,4 \text{ g (L-Histidin)} \times \text{Proteinkonzentration in mg/ml} \\ (\text{O.D.}) \times \text{Volumen}] - [\text{zugefügtes L-Histidin von } 0,2 - \\ 0,3 \text{ g/l Plasma}]$$

**[0051]** Eine Menge an Saccharose, die 0,5 g/g Protein entspricht, das durch die O.D. gemessen wurde, wird dem Gemisch zugegeben.

**[0052]** Eine Menge an menschlichem Albumin (25 % in Lösung, genehmigt für die Verwendung am Menschen, Plasbumin 25® von Miles Inc. Pharmaceutical Division, IN 46515, USA), die 0,2 ml/g Protein entspricht, das durch die O.D. gemessen wurde, wird dem Gemisch zugegeben.

**[0053]** Die Menge an Tween-80® wird auf 17–20 µg/ml Protein, das durch die O.D. gemessen wurde, mit einem Puffer eingestellt, der 0,5 % Tris, 0,1 % NaCl, 0,5 % Natriumcitrat und 10 % Tween-80®, pH-Wert: 6,8 ± 0,1 enthält. Das Tween-80® muss durch eine Messung der O.D. bei 620 nm gemäß dem Verfahren des New York Blood Center vor der Einstellung verifiziert werden.

#### Sterilfiltration:

**[0054]** Die endgültige Proteinlösung wird durch einen 0,2-Mikron-Kapselfilter (Gelman, CritiCap 0,2 µ, Produkt-Nr. 12995 oder 12996) filtriert.

#### Aseptische Abfüllung:

**[0055]** Die Proteinlösung wird in 10 ml-Gefäße in einer Menge von 60 ± 5 mg gerinnungsfähigem Fibrinogen pro Gefäß abgefüllt.

#### Gefriertrocknung:

**[0056]** Fläschchen, die 60 ± 5 mg gerinnungsfähiges Fibrinogen enthalten, werden 68–72 Stunden einer Gefriertrocknung unterworfen. Die Temperatur wird fortlaufend von –40°C auf 22°C ± 2°C erhöht (die Steigung des Anstiegs beträgt 0,02°C pro Minute). Dieser Gefriertrocknungsschritt verleiht dem Produkt eine Restfeuchtigkeit, die unter 1 % liegt, was eine Denaturierung des Produkts im Verlauf der weiteren Hitzebehandlung vermeidet.

#### Trockenes Erhitzen:

**[0057]** Nach dem Gefriertrocknungszyklus werden die Gefäße unter Vakuum mit Stopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen versiegelt. Dann werden die Gefäße einer dritten Virusaktivierung durch trockenes Erhitzen bei etwa 100°C ± 1 °C für 1 bis 2 Stunden gemäß dem Verfahren unterworfen, das in dem USP 5,506,127, erteilt im April 1996, offenbart wurde.

#### Virensicherheit:

**[0058]** Die Virensicherheit wurde ausgetestet. Kleine Viren ohne Hülle wie z. B. Parvoviren, Polioviren und das Hepatitis A-Virus werden während der Hitzebehandlung inaktiviert. Das zu erwartende Hauptproblem bei der Gewinnung bestand darin, die größte mögliche Menge an Fibrinogen nach der Nanofiltration zu erhalten. Diese Schwierigkeit wurde durch exaktes Einstellen der Konzentration an Tween-80® vermieden, um den Durchtritt von Fibrinogen durch den Nanofilter zu begünstigen. Viren ohne Hülle wie z. B. das Reovirus 3 und SV40 wurden durch die Nanofiltration entfernt. Daher wurde durch jeden Schritt der Virusaktivierung dessen Zweck erreicht: die Entfernung oder die Inaktivierung von Viren bei jedem geeigneten Schritt, was ein virensicheres Produkt lieferte. Dies bedeutet, dass die Kombination von drei Schritten die Inaktivierung oder das Einfangen von Viren durch mindestens einen von ihnen sichert; anderenfalls können Viren, die gegenüber einem oder zwei Schritten resistent sind, in dem Endprodukt zurück behalten werden.

#### Ausbeute:

**[0059]** Die Gesamtausbeute an Fibrinogen, Fibronectin und Faktor XIII entspricht derjenigen, die in den USP 5,290,918 und 5,395,923 berichtet wurde, was bedeutet, dass die Virensicherheit gesichert ist, während die Aktivität der Proteine erhalten bleibt.

#### Beispiel 1: Herstellung von Thrombin

#### Verminderung des Salzgehaltes durch Diafiltration:

**[0060]** Der Plasmaüberstand, der nach der ersten

Zentrifugation einer sauren oder einer aussalzenden Präzipitation des Plasmas (wie in dem Vergleichenden Beispiel 1) erhalten wird, enthält eine beträchtliche Menge an Salzen. Die Osmolarität des Plasmas liegt dann etwa zwischen 2.200 bis 2.500 mOsm/kg. Diese hohe Salzmenge sollte vor der Isolierung des in dem Überstand vorliegenden Prothrombins entfernt werden. Die Isolierung von Prothrombin kann nur durchgeführt werden, wenn das Plasmamedium eine niedrige Ionenstärke besitzt, insbesondere dann, wenn eine saure Präzipitation verwendet wurde. Die Entfernung des Salzes erfolgt durch das klassische Diafiltrations-Verfahren. Der Überstand wird in das Reservoir eines Diafiltrationssystems (Amicon System, Modell DC10L mit Spiralkartusche) überführt. Die Diafiltration erfolgt gegen reines Wasser. Ein Volumen an Plasmaüberstand wird gegen durchschnittlich etwa vier Volumina reinem Wasser ausgetauscht, bis die Osmolarität des Plasmas unter etwa 50 bis 100 mOsm/kg liegt.

#### Gewinnung von Prothrombin:

**[0061]** Das diafiltrierte Plasma wird mit reinem Wasser fünfach verdünnt. Der pH-Wert des verdünnten Plasmas liegt zwischen etwa 7,4–7,8. Der pH-Wert wird auf  $5,2 \pm 0,1$  durch tropfenweise Zugabe einer Essigsäurelösung (2 bis 5 %; Allary et al.: Isolement par chromatographie d'aftinité, sur support de silice, de la thrombin humaine en vue de son utilisation dans le préparations de colle biologique (Ann. pharmaceutiques francaises 1990; 48(3): 129–135) erniedrigt. Prothrombin präzipitiert während der Veränderung des pH-Wertes (bei etwa 5,5–6,0) und wird bei einem pH-Wert zwischen 5,1 bis 5,3 vollständig präzipitiert. Prothrombin wird bei pH-Werten über 6,0 und durch Erhöhung der Salzkonzentration rasch wieder solubilisiert. Das Plasma wird ohne Rühren eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und dann 20 Minuten bei 20°C mit 4.200 UpM (Beckman J6MC, Rotor JS 4.2) zentrifugiert. Das Präzipitat wird gewonnen und in einer 2 %igen Tris-HCl-Pufferlösung bei einem pH-Wert von  $7,5 \pm 0,1$  (Volumen: 120–150 ml pro Liter Plasmaüberstand) solubilisiert. Die Menge an Prothrombin wird durch chronometrische Dosierung (Fibromètre Stago ST4, Frankreich) bestimmt. Die gewonnene Menge an Prothrombin beträgt etwa 90 % in Bezug auf den Plasmaüberstand und das Ausgangsplasma, das etwa 750 bis 850 Einheiten Prothrombin pro Liter Plasma liefert.

#### Umwandlung des Prothrombins in Thrombin:

**[0062]** Vier Volumina 40 mM CaCl<sub>2</sub> werden einem Volumen Prothrombin-Lösung unter Rühren innerhalb einiger Minuten rasch zugegeben. Das Gemisch wird bei Zimmertemperatur etwa 1 Stunde oder länger inkubiert und 30 Minuten bei 20°C mit 4.200 UpM (Beckman-Zentrifuge J6MC, Rotor JS 4.2) zentrifugiert. Der das Thrombin enthaltende Überstand wird

gewonnen und durch 0,2-Mikron-Filter (Gelman SuporCap, Produkt-Nr. 12991 oder 12992) filtriert. Die Aktivität des Roh-Thrombins, das nach der Umwandlung des Prothrombins erhalten wird, beträgt etwa 110 bis 120 NIH-Einheiten/ml. Die spezifische Aktivität beträgt etwa 25 bis 30 NIH-Einheiten/mg Protein oder 80 bis 100 NIH-Einheiten Thrombin pro Einheit Prothrombin. Die Gesamtausbeute an Thrombin liegt etwa bei 60.000–80.000 NIH-Einheiten pro Liter Plasmaüberstand, d. h. zweimal soviel wie die Ausbeute, die bei dem Verfahren gemessen wurde, das in dem USP 5,506,127 beschrieben wurde.

**[0063]** Die Thrombin-Aktivität wurde durch Messung der Gerinnungszeit mit einem Fibrometer (Fibromètre Stago ST4, Frankreich) bestimmt und in NIH-Einheiten ausgedrückt. Die Standardkurve wurde mit Thrombozyme (Stago reagents, Thrombozyme, Ref.-Nr. 00332) erstellt; dessen Aktivität wurde mit einem NIH-Standard, Charge J (Titer 310 NIH) bestimmt. Als Fibrinogenquelle zur Bestimmung der Thrombin-Aktivität wurde der Pool an Plasma verwendet.

#### Inaktivierung der Viren durch Lösemittel/Detergents:

**[0064]** **Fig. 2** zeigt die Schritte der Virenaktivierung, die mit der Thrombin-Lösung durchgeführt wurden, dies erfolgte durch schrittweises Behandeln der Letzteren mit einem Lösemittel/Detergents-Verfahren, Reinigung des Thrombins über Chromatographie, Viren-Filtration, Formulierung, Gefriertrocknung und Inaktivierung der Viren durch Hitze bei 100°C. Die Thrombin-Lösung wird bei  $24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  in einen doppelwandigen Tank überführt, der mit einem wärmeregulierten flüssigen Umwälzsystem ausgestattet ist. Eine Lösung, die 11 % Tween-80® und 3,3 % Tri-n-butylphosphat (TnBP) enthält, die in 0,5 % Tris, pH-Wert  $7,0 \pm 0,1$  hergestellt wurde, wird der Thrombin-Lösung unter schwacher Bewegung zugegeben. Das Volumen an Lösemittel/Detergents beträgt ein Zehntel des Volumens der Thrombin-Lösung. Nach einer Stunde Rühren wird das Gemisch in einen zweiten Tank überführt, der dem ersten ähnlich ist, und das Bewegen wird über einen zusätzlichen Zeitraum von etwa 5 Stunden fortgeführt. Die Thrombin-Aktivität, die nach der Virenaktivierung gemessen wurde, zeigt, dass kein signifikanter Verlust an Aktivität während der Behandlung mit Lösemittel/Detergents (0 bis 5 %) stattgefunden hat. Es ist erwähnenswert, dass, wenn eine Menge an festem CaCl<sub>2</sub> zugegeben wurde, die in etwa der Menge an flüssigem CaCl<sub>2</sub> äquivalent war, um Prothrombin in Thrombin umzuwandeln, die Ausbeute um 20 % im Falle des Pulvers vermindert war und ein Aktivitätsverlust von etwa 10 bis 15 % im Verlauf der Behandlung mit Lösemittel/Detergents stattfand. Die Gesamtdifferenz zwischen der Zugabe von CaCl<sub>2</sub> als Pulver gegenüber der Zugabe von CaCl<sub>2</sub> als Lösung entspricht einem Verlust von etwa 30 % an Thrombin-Aktivität bei

dem ersten Verfahren.

#### Reinigung von Thrombin durch Chromatographie:

**[0065]** Das Thrombin wird durch einen einzigen Kationenaustausch-Chromatographie-Schritt weiter gereinigt. Die Reinigung von Proteinen über die Chromatographie ist wohlbekannt und in Einzelheiten in vielen Referenzen beschrieben. Die Verwendung von unterschiedlichen Matrizen oder Trägern ist abhängig von dem Ziel der Reinigung und der Natur der Proteine. Im vorliegenden Fall ist der Träger ein festes Agarosegel, das eine aufgeproppte Sulfopropyl (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>)-Einheit umfasst. Dieses Gel mit dem Namen SP Sepharose Fast Flow™ (Pharmacia, Code-Nr. 17-0729-01) ist ein starker Kationenaustauscher mit ausgezeichneten Durchflusseigenschaften und einer hohen Kapazität für Proteine aller pI-Werte. Die Ionenaustausch-Gruppe ist Sulfopropyl, das geladen bleibt und eine gleichmäßig hohe Kapazität über den gesamten Arbeitbereich zwischen den pH-Werten 4–13 beibehält. Die Proteinlösung, die Roh-Thrombin enthält, wird durch die SP-Sepharose enthaltende Säule durchgeleitet. Thrombin und verunreinigende Proteine werden an der Säule adsorbiert. Eine ausgiebige Waschung des Gels mit einer Lösung von 0,08 M NaCl ist nötig, bevor die an dem Gel zurückgehaltenen Proteine eluiert werden können. Die Elution von Thrombin wird durch einen diskontinuierlichen NaCl-Gradienten bewirkt. Zuerst wird eine 0,15 M NaCl-Lösung durch die Säule geleitet, um verunreinigende Proteine zu entfernen. Das Thrombin wird mit 0,4 M NaCl vollständig abgelöst und gewonnen. Dann werden alle adsorbierten Verunreinigungen durch Waschung mit einer 2 M NaCl-Lösung aus dem Gel entfernt. Die Reinigung von Thrombin durch Chromatographie erlaubt auch die Entfernung des Lösemittel/Detergens, das bei dem vorangegangenen Schritt zur Vireninaktivierung verwendet wurde. Die gereinigte Thrombin-Lösung wird durch Zugabe von menschlichem Albumin (25 %ige menschliche Albuminlösung, USP Plasmin-25, Miles Inc. Pharmaceutical Division, IN 46515, USA) stabilisiert. Die Menge an Albumin, die zugegeben werden muss, wird nach der folgenden Formel berechnet: 20 × [c] Thrombin (gemessen/O.D.) × Thrombin-Volumen (nach Chromatographie) × 100 ml/25 × 1000 Thrombin in Lösung nach der chromatographischen Reinigung ist sehr instabil. Der Aktivitätsverlust kann bedeutend sein, wenn das Thrombin nicht rasch bei niedriger Temperatur konserviert wird oder wenn andere Schritte wie z. B. eine Diafiltration und eine Konzentrierung ohne eine Stabilisierung durchgeführt werden. Die Verwendung eines Stabilisators wie z. B. Albumin ist wesentlich, um die Thrombin-Aktivität in Verlauf eines Pufferaustausches für eine abschließende Formulierung (Amicon System CH2PRS oder TCF 10, je nach Volumen) zu schützen. Die endgültige Formulierung erfolgt in einem Puffer, der 0,25 % Tris – 0,25 % Natriumcitrat –

0,45 % NaCl, pH-Wert 7,30 ± 0,1 enthält. Es werden etwa sechs Volumina Formulierungspuffer gegen ein Volumen Thrombin-Lösung ausgetauscht. Die Thrombin-Lösung kann vor der Diafiltration um ein Mehrfaches konzentriert werden, um das Volumen, das ausgetauscht werden soll, zu vermindern, und um die Dauer der Diafiltration zu reduzieren.

#### Viren-Filtration:

**[0066]** Gemäß den Lehren aus USP 5,506,127, erteilt am 9. April 1996, wird die diafiltrierte Thrombin-Lösung anschließend durch eine Hohlfaser-Membran wie z. B. eine Planova-BMM-Mikroporen-Membran (Bemberg Mikroporen-Membran, BMM Development, Asahi Chemical Industries, Tokio, Japan) filtriert, die eine Cuprammonium-regenerierte Cellulosefaser enthält, welche eine Porengröße von etwa 15 nm aufweist. Dieses Verfahren erlaubt im Wesentlichen die Entfernung von Viren ohne Lipidhülle, die durch das L/D („S/D“, solvent/detergent)-Verfahren des Prozesses nicht inaktiviert werden können.

#### Aseptische Abfüllung:

**[0067]** Die Thrombinlösung nach der Nanofiltration wird auf etwa 250 NIH-Einheiten/ml verdünnt und in 5 ml-Glasfläschchen aliquotiert.

#### Gefriertrocknung:

**[0068]** Die Fläschchen, die etwa 1 ml Thrombin-Lösung enthalten, werden 66 bis 72 Stunden gefriertrocknet. Die Temperatur steigt fortschreitend von -40 bis 22 ± 2°C mit einer Steigerungsrate von etwa 0,02°C pro Minute an. Durch diesen Schritt wird ein Gehalt an Restfeuchte unter 1 % erreicht.

#### Trockenes Erhitzen:

**[0069]** Nach dem Gefriertrocknungszyklus werden die Gefäße unter Vakuum mit Stopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen versiegelt. Dann werden die Gefäße der dritten Vireninaktivierung durch etwa 1 bis 2 Stunden trockenes Erhitzen bei etwa 100°C ± 1 °C unterworfen.

#### Schlussfolgerung:

**[0070]** Beginnend mit den Verfahren, die in USP 5,290,918, USP 5,395,923 und USP 5,506,127 gelehrt wurden, die alle an Haemacure Biotech Inc. erteilt wurden, hat die vorliegende Erfindung gezeigt, dass diese Verfahren verbessert werden können, um die Ausbeute an Thrombin zu steigern, das einen hohen Grad an Sicherheit besitzt.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von Thrombin, umfassend die Schritte:

- a) Präzipitation der Proteine aus Gesamtplasma durch Zugabe eines ersten Salzes in einer ausreichenden Menge, um einen Aussalzeffekt zu erreichen, und einem pH-Wert von 7,5 bis 8,5 bei einer Temperatur zwischen 0°C und 4°C, oder durch Zugabe eines zweiten Salzes in ausreichender Menge, um eine saure Präzipitation bei einem pH-Wert von 4,5 bis 5,5 bei einer Temperatur zwischen 4°C bis 20°C zu erreichen, wobei Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin präzipitiert werden; wobei die Präzipitation bei einer Konzentration von mindestens 50mM Amino-6-hexansäure ausgeführt wird, und Gewinnung des Überstandes, welcher Prothrombin enthält;
- b) Diafiltrieren des Überstandes, bis eine Prothrombin-Lösung mit einer Osmolarität von 100 mOsmol/kg Gewicht oder weniger erhalten wird;
- c) Verdünnen der Prothrombin-Lösung mit Wasser, welches in einem Verhältnis von 4 Volumenanteilen zu 1 Volumenanteil Prothrombin-Lösung zugefügt wird;
- d) Präzipitation von Prothrombin durch Zugabe einer sauren Lösung, bis ein pH-Wert von 5,2 erreicht ist;
- e) Auflösen des Präzipitats aus Schritt d) in einer Lösung mit beinahe neutralem pH-Wert; und
- f) Umwandeln des Prothrombins aus Schritt e) zu Thrombin in Gegenwart von Calciumchlorid, um eine Konzentration von Calciumchlorid von 20 bis 32mM zu erreichen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, das ferner die folgenden Schritte umfasst:

- g) Inkubation des Thrombins mit einer viriziden Lösungsmittel/Detergens-Lösung in einer Menge, die ausreicht, um Lipid-enthaltende Viren zu inaktivieren;
- h) Aufreinigen des inkubierten Thrombins durch sequentielle Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung eines einzelnen sulfalkyl-aktivierten Polysaccharid-Kationenaustauscher-Mediums, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus sulfalkyl-aktiverter Polyagarose, sulfalkyl-aktiviertem Polydextran und nicht-verdichtbarem Verbundmedium aus sulfalkyl-aktiviertem Dextran und Silicapartikeln mit einer hohen Selektivität für Thrombin, wobei als Elutionsmittel mindestens drei und ansteigende Konzentrationen einer wässrigen Salzlösung verwendet werden; und
- i) Gewinnen eines Thrombinpeak-Eluats von der Chromatographie aus h) und Austausch des Salzes des Eluats mit einer physiologisch verträglichen, stabilisierenden Pufferformulierung zur Stabilisierung des gewonnenen Thrombins und Gewinnen einer Formulierungspufferlösung von Thrombin.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Diafiltrierungs-Schritt b) den Austausch von Wasser in einem Volumen umfasst, welches äquivalent zum

vierfachen Volumen des Überstands ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, wobei in Schritt f) Calciumchlorid als 40mM Lösung in einem Verhältnis von 4 Volumenanteilen zu 1 Volumenanteil des gelösten Präzipitats aus Schritt e) hinzugefügt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 2, 3 oder 4, wobei das Kationenaustauscher-Medium ein nicht-verdichtbares Verbundmedium aus sulfoalkyl-aktiviertem Dextran und Silicapartikeln ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Kationenaustauscher-Medium ein nicht-verdichtbares Verbundmedium aus sulfopropyl-aktiviertem Dextran und Silicapartikeln ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2, 3, 4, 5 und 6, ferner umfassend Schritt j) Filtern der Formulierungspufferlösung von Thrombin durch eine Hohlfaser-Cuprammonium-Cellulose-Membran, um Virionen, die in der Formulierungspufferlösung von Thrombin vorhanden sind, herauszufiltern und eine im wesentlichen virionen-freie Formulierungspufferlösung von Thrombin zu erhalten.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Hohlfaser-Cuprammonium-Cellulose-Membran eine Porosität von ungefähr 15 nm hat.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, ferner umfassend die folgenden Schritte:

- k) Lyophilisieren der Thrombin-Lösung, die in Schritt j) erhalten wurde; und
- l) trockenes Erhitzen der lyophilisierten Thrombin-Formulierung, um alle verbliebenen Virionen ohne Denaturierung des Thrombins zu inaktivieren.

10. Verfahren nach Anspruch 2, 3, 4, 5 oder 6, welches ferner einen abschließenden Lyophilisierungsschritt der Formulierungspufferlösung von Thrombin zur Trockene umfasst und die Behandlung der letzteren mit Hitze, um ein im wesentlichen virionen-freies und nicht-denaturiertes Thrombin zu erhalten.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Schritt des trockenen Erhitzens durch Erhitzen des lyophilisierten Produkts für 1 bis 2 Stunden bei etwa 100°C erreicht wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, wobei die Formulierungspufferlösung von Thrombin eine wässrige Lösung aus Citratsalz, Natriumchlorid, Tris-HCl und Serum-albumin bei einem pH-Wert von 7,3 umfasst, in einer Menge, die ausreicht, um das Thrombin gegenüber einem wesentlichen Aktivitätsverlust während der Hitzebehandlung zu stabilisieren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Formulierungspufferlösung von Thrombin eine wässrige Lösung aus 0,25% Natriumcitrat, 0,45% Natriumchlorid, 0,25% Tris-HCl, jeweils als Gew./Vol.%; Serum-albumin in einer Menge, die dem 20-fachen des Gesamtproteins im Thrombinpeak-Eluat entspricht, und das vor dem Lyophilisieren auf 2 Gew./Vol.% eingestellt wird, umfasst, und mit einem pH-Wert von 7,3.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 13, wobei die mindestens drei und ansteigenden Salzkonzentrationen einer wässrigen Salzlösung im wesentlichen aus 0,08M, 0,15M und 0,4M Natriumchlorid-Puffer für menschliches Thrombin bestehen.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 14, wobei der Inkubationsschritt g) in Gegenwart eines viriziden Lösungsmittels/Detergens-Lösung, die frei von Natriumcitrat ist, durchgeführt wird.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

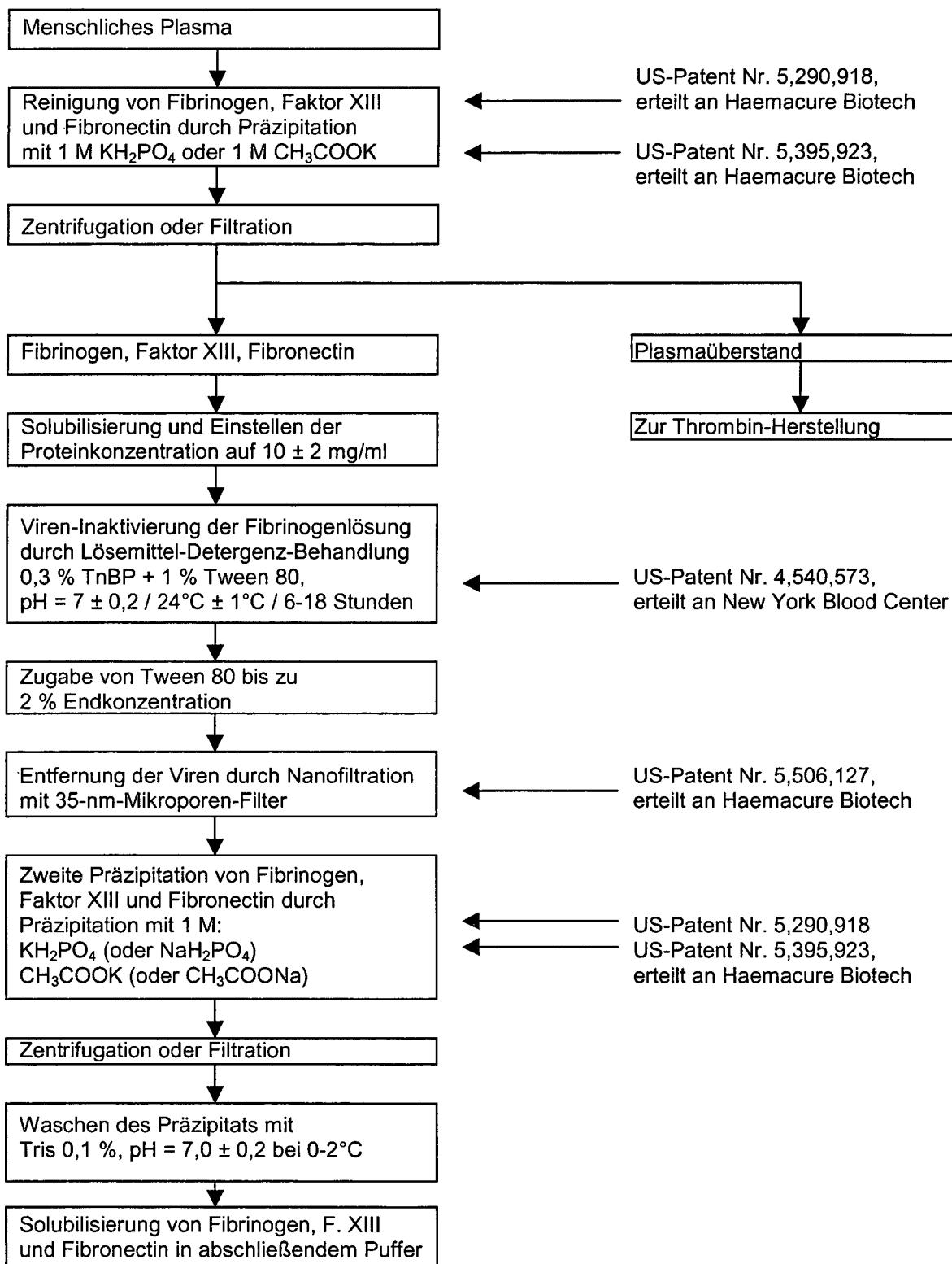


Fig. 1 A

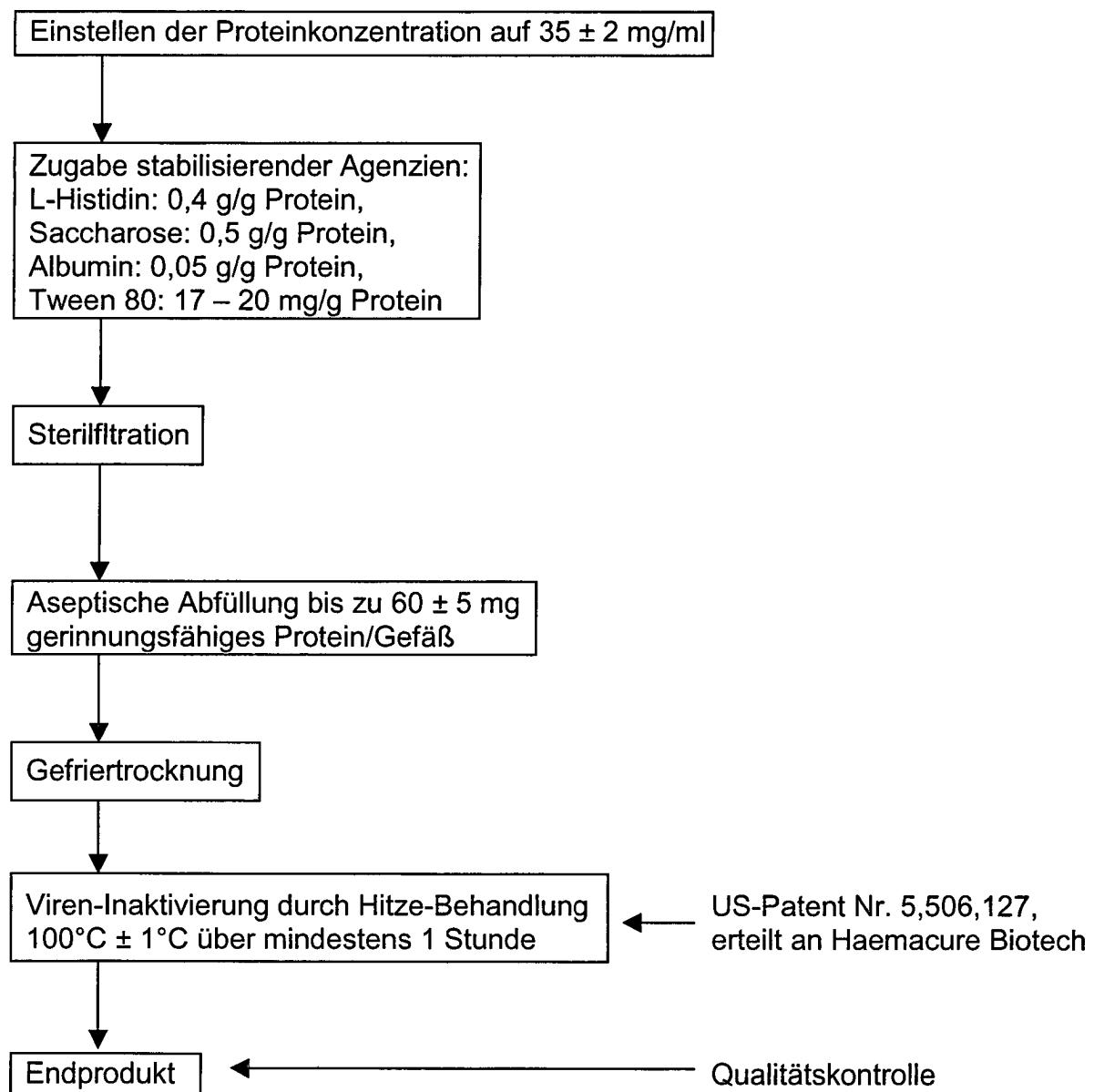


Fig. 1 B

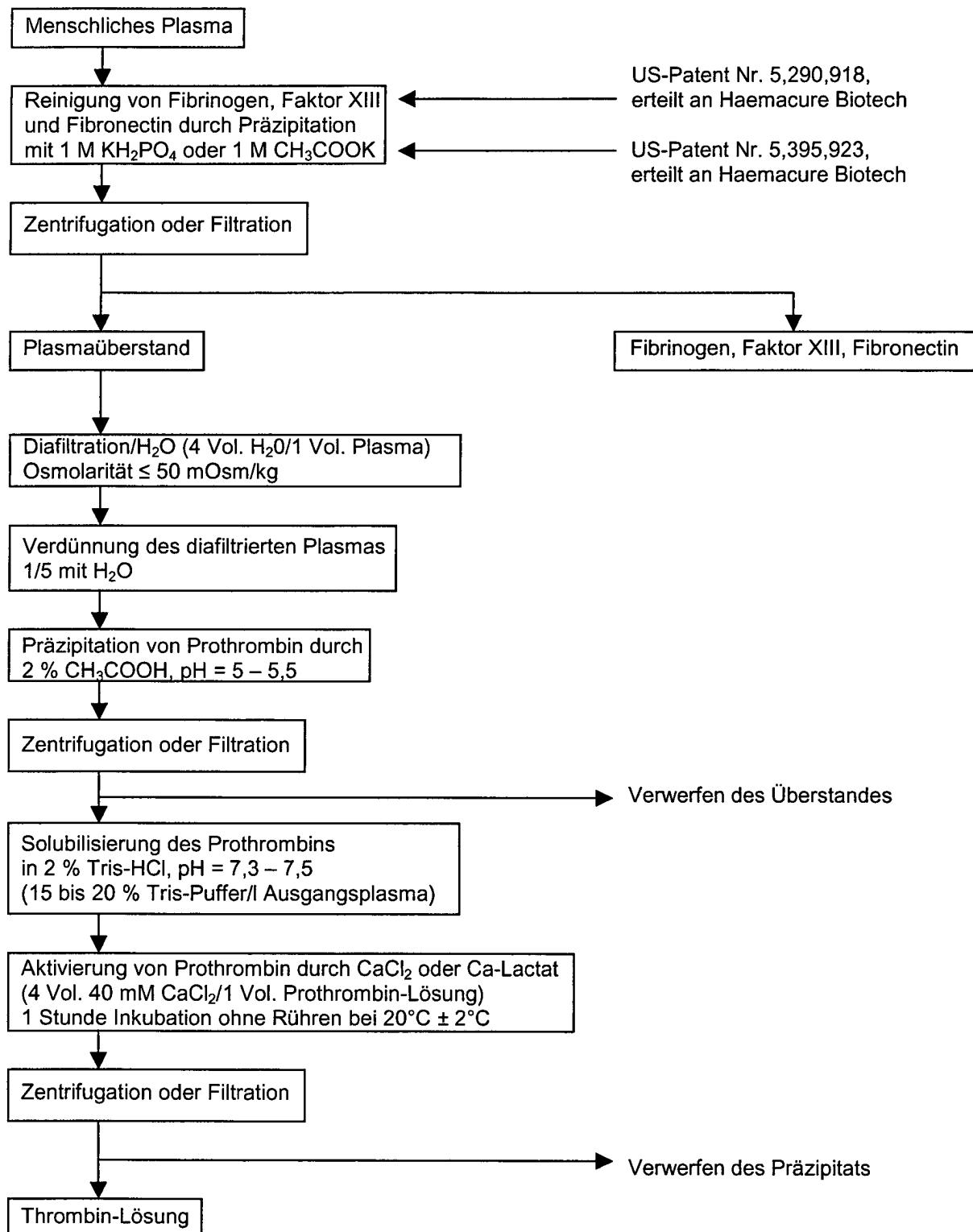


Fig. 2 A

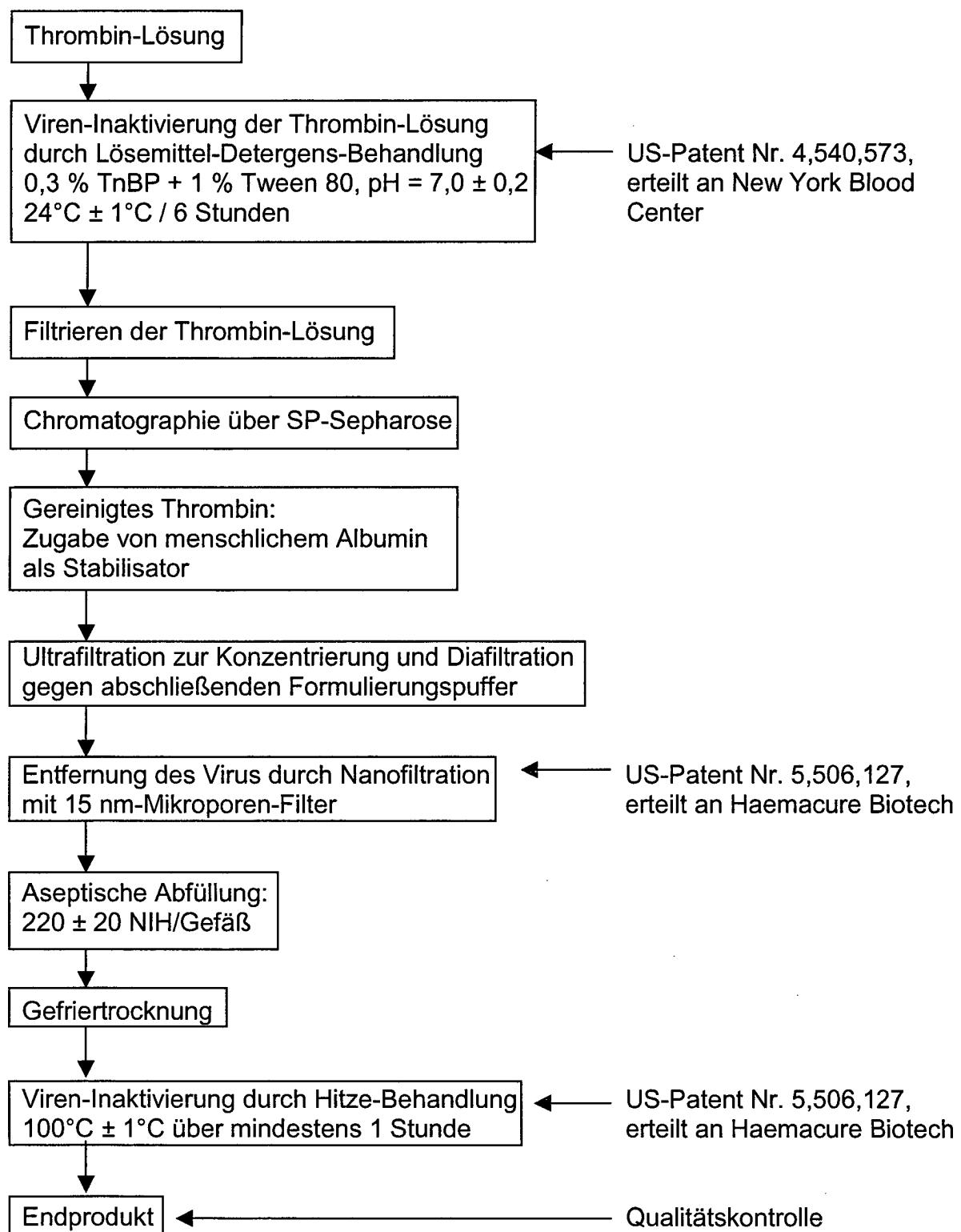


Fig. 2 B