



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 749 T2** 2006.11.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 782 616 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 749.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA95/00541**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 931 863.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/009376**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.03.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/74 (2006.01)**
A61K 38/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
309583 21.09.1994 US

(73) Patentinhaber:
**Haemacure Biotech Inc., Pointe-Claire, Quebec,
CA**

(74) Vertreter:
Neubauer Liebl, 85051 Ingolstadt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**PROBA, Zbigniew, Laval, Quebec H7V 2H2, CA;
BRODNIWICZ, Teresa, Laval, Quebec H7V 2H2,
CA; DUPUIS, Nicolas, Longueuil, Quebec J4J 2J3,
CA; BUI-KHAC, Trung, Montreal, Quebec H3S 1N5,
CA**

(54) Bezeichnung: **HERSTELLUNG VON THROMBIN THERAPEUTISCHER QUALITÄTSSTUFE**

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 eingelegt, 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

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft die Herstellung eines eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisenden Thrombinprodukts für die klinische (einschließlich veterinäre) Verwendung. Das Thrombin ist gekennzeichnet durch eine hohe virale Sicherheit, eine hohe spezifische Aktivität, Lagerungsbeständigkeit und niedrige Pyrogenität. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von Thrombinprodukten, die effizient, wirtschaftlich und gut geeignet für die kommerzielle Herstellung sind.

[0002] Thrombin ist weit verbreitet in klinischen Anwendungen als Gerinnungsfaktor für fest blutende Wunden durch Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Es ist eine gewöhnliche Komponente septischer Verbände und wird in Verbindung mit Fibrinogen und anderen Gerinnungsproteinen in zwei Komponenten-Hämostatiksystemen, wie z. B. Fibrinklebern, Adhesiven und Versiegeln, verwendet. Sowohl menschliches als auch bovines Plasma sind als Quelle des Thrombins für die klinische Anwendung am Menschen bekannt. Hauptsächlich aufgrund der Schwierigkeit der Reinigung des Thrombins von nicht autologem menschlichen Plasma mit beträchtlicher Entfernung oder Inaktivierung von irgendwelchen Viren, die in dem anfänglichen Plasma vorhanden sein können, werden eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisende Thrombinprodukte für die menschliche Verwendung, die im allgemeinen im Handel erhältlich sind, aus bovinem Plasma gewonnen, das ein niedriges, inhärentes Potential zum Beherbergen von Viren aufweist, die für Menschen schädlich sind, ungeachtet des wohl bekannten immungenetischen Potentials des bovinen Thrombins im Menschen, das beträchtliche klinische Bedenken verursacht.

[0003] Zur klinischen Anwendung wird das Thrombin typischerweise vom Blutplasma als ein Proteinkomplex mit Prothrombin gewonnen, üblicherweise gefolgt von einer Umwandlung des Proenzym zu Thrombin durch Reaktion mit Thromboplastin in Anwesenheit von Kalziumionen. Das rohe Thrombinprodukt wird dann einer Bearbeitung unterzogen, um das Thrombin von verunreinigenden Blutproteinen zu separieren und um irgendwelche ggf. vorhandenen Giftstoffe oder Krankheitserreger zu inaktivieren oder zu entfernen. Idealerweise ist das erhaltene Produkt ein eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisendes Thrombin (Thrombin entsprechend den USFDA-Standards für die menschliche Anwendung), das eine hohe spezifische Aktivität, gute Lagerungsbeständigkeit, niedrige Pyrogenität aufweist, und das im Wesentlichen virusfrei ist.

[0004] Dieses Ideal wird kaum, falls überhaupt, erreicht. In Reinigungsverfahren, die üblicherweise

zum Erhalt eines eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisenden Thrombins verwendet werden, wird die Gewinnung von hochreinem Thrombin üblicherweise erreicht auf Kosten von bedeutenden Mengen des aktiven Thrombins durch Verlust oder Inaktivierung des Thrombins in dem Ausgangsmaterial während der Reinigung. In weniger reinen Produkten erhöht die Anwesenheit von fremdartigen Plasmaproteinen (seien es bovine oder nicht autologe menschliche Proteine) das Risiko von möglichen schweren immunologischen Reaktionen des Patienten und beeinträchtigt typischerweise die Eigenschaften des Produkts in der entgegengesetzten Richtung. Insbesondere ermöglichen die gegenwärtigen Reinigungsprozesse im wesentlichen nur eine sehr limitierte Menge der Plasmareinigung bezogen auf die viralen Verunreinigungen mit einem nicht zu akzeptierenden Verlust von Thrombinaktivität. Außerdem eignen sich viele Thrombinreinigungsverfahren, die als relativ effektiv im Labormaßstab beschrieben werden, um therapeutisch attraktive Thrombinprodukte bereitzustellen, nicht für eine wirtschaftliche, großindustrielle Herstellung. Deshalb weisen Thrombinprodukte, die für die menschliche, klinische Anwendung vorgeschlagen worden sind, verschiedenartig ein bedeutendes toxisches Risiko auf, sind nicht beständig hoch wirksam und/oder erfordern schwierige bzw. komplexe Herstellungsverfahren, die nicht adaptierbar sind für die großindustrielle Herstellung. Zusätzlich fehlt es den bekannten Reinigungsverfahren oder den dadurch hergestellten Produkten an Vielseitigkeit: z. B. können die Produkte aus praktischen Gründen im Wesentlichen nicht für die veterinäre Praxis verwendet werden und die Verfahren sind zu komplex oder ineffektiv zur Verwendung in einem klinischen Einsatz für autologe Plasmareinigung.

2. Diskussion des Standes der Technik

[0005] Thrombin wird gewöhnlicherweise vom rohen Thrombinprodukt mittels Chromatographie gereinigt, wobei als Separationsmedia verschiedene Ionenaustauschpolymere, im Wesentlichen aktivierte Polysaccharide, wie z. B. Agarose, Dextran oder Cellulose, verwendet werden. Um ein Thrombinprodukt zu erhalten, das eine adäquate, hohe spezifische Aktivität ausgehend von rohem Thrombin als Ausgangsmaterial aufweist, wird typischerweise eine mehrstufige Chromatographie eingesetzt, die alternierend Anionen- und Cationenaustauschmedia verwendet, z. B. DEAE (Diethylaminoethyl) Sepharose® als Anionenaustauschmedium und CM- oder S-Sepharose® als Cationenaustauschmedium (siehe z. B. US Patent 5,149,540 von Kunihiro et al., ausgegeben am 22. September 1992 oder US Patent 4,965,203 von Silbering et al., ausgegeben am 23. Oktober 1990). Diese mehrfachen Chromatographieschritte sind zeitaufwendig, erhöhen die Kosten des Verfahrens und sind oftmals nicht anwendbar für die großindustrielle Herstellung von eine therapeutische Quali-

tätsstufe aufweisendem Thrombin.

[0006] Es ist ebenfalls bekannt, dass das Thrombin im Laufe des Reinigungsprozederes behandelt werden kann, um Lipoid enthaltende Virionen mit einer Solvent-Detergent (SD) (- Lösungsmittel-Reinigungsmittel -) Zusammensetzung zu inaktivieren, die ein nicht ionisches Reinigungsmittel und ein organisches Lösungsmittel aufweist, das in der Lage ist, die viralen Lipide zu zerreißen bzw. abzuspalten und das Virus zu inaktivieren, ohne das Thrombin zu denaturieren. Obwohl solche gereinigten Thrombinprodukte manchmal als „virusfrei“ bezeichnet werden (siehe z. B. EP 0 443 724 A1, offengelegt am 28. August 1991), sind sie es oft nicht. Da die SD-Behandlung des Thrombin enthaltenden Materials im wesentlichen wirksam ist, um umhüllte Virionen zu inaktivieren, werden nicht-umhüllte Virionen, wie z. B. Parvoviren nicht inaktiviert durch dieses Verfahren, und irgendwelche solcher Virionen, die in dem Ausgangsmaterial vorhanden sind, werden durch den Reinigungsprozess hindurchgetragen und bleiben in dem Thrombin-Endprodukt aktiv und stellen somit ein klinisches Risiko dar. Obwohl dieses Problem erkannt worden ist, ist es schwierig, dieses zu lösen, da andere Standardverfahren zur viralen Inaktivierung, wie z. B. Flitze- oder UV-Behandlung ebenso das Thrombin inaktivieren, mit einem unakzeptierbaren Verlust an aktivem Thrombin für kommerzielle Anwendungen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Das erfindungsgemäße Verfahren stellt dementsprechend mit gutem Ertrag ein lagerungsbeständiges, eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisendes, Thrombinkonzentrat von hoher spezifischer Aktivität und niedriger Pyrogenizität zur Verfügung, das im Wesentlichen gereinigt ist, was die Virionen anbetrifft. Der Reinigungsprozess umfasst die Schritte von 1.) Inkubation von rohem Thrombin-Ausgangsmaterial mit einer Virizid-Zusammensetzung, um Lipoid-enthaltende, umhüllte Virionen zu inaktivieren; 2.) Sequentielle Ionenaustauschchromatographie des inkubierten Materials mittels eines einzigen Kationenaustauschmediums, das erhöhte Konzentrationen von Salzlösung und eines Sulfalkyl-aktivierten Polysaccharid-Mediums, wie z. B. Agarose, Dextran oder Zellulose, verwendet, das eine hohe selektive Affinität für Thrombin aufweist, wobei ein Endeluat gewonnen wird, das eine hochreine Salzlösung des Thrombins bezüglich Verunreinigungen wie anderer Blutproteine, Toxine, Lipoid enthaltender, umhüllter Virionen und Virizidrückstand aufweist. 3.) Austausch des Phosphatchromatographiepuffers des Endeluats für einen physiologisch kompatiblen Formulierungspuffer, um eine Formulierungslösung des hochreinen Thrombins bereitzustellen; 4.) Filtration der Thrombin-Formulierungslösung über einen viralen Filter, um die nicht Lipoid enthaltenden Virionen zu entfer-

nen; und 5.) Optionale Trockenhitzebehandlung des gefilterten und gefriergetrockneten Thrombins, um die Inaktivierung von irgendwelchen möglicherweise verbliebenen Virionen (Infektiösen viralen Materialien) sicherzustellen. Wässrige, salzhaltige Formulierungspuffer mit einem PH-Wert von ungefähr 7,2 bis 7,4, die ein Zitronensäuresalz und 1.) Bovines Albumin für bovines Thrombin, das für Veterinär Anwendungen vorgesehen ist, oder 2.) Menschliches Albumin für bovines und menschliches Thrombin, das für menschliche Anwendungen vorgesehen ist, werden beispielhaft verwendet. Die Formulierungslösungen der Erfindung (die im Detail unten näher beschrieben werden) tragen weitgehend dazu bei, unter anderem, die Thrombin-Enzymaktivität während der Nach-Chromatographiebehandlung und während der Lagerung zu stabilisieren; Die verwendete Formulierung stabilisiert ebenso das Thrombin gegen Aktivitätsverlust während der antiviralen trockenen Hitzebehandlung gemäß Schritt (5).

[0008] Das Produkt ist ein lagerungsbeständiges, eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisendes Thrombin von hoher vitaler Sicherheit und spezifischer Aktivität für im Wesentlichen klinische Anwendung, einschließlich veterinäre Anwendung. Die hohe spezifische Aktivität, gepaart mit guten Produkterträgen reflektiert die Wirksamkeit des Verfahrens zum Reinigen von Rohthrombin bezüglich verunreinigender Proteine oder fremder und möglicherweise toxischer Ausgangsmaterialkomponenten, Virizidrückständen und Virionen ohne wesentlichen Verlust oder Inaktivierung des Ausgangsthrombins. Virizidrückstände von weniger als ungefähr 15 ppm sind typischerweise zu erreichen. Die Produktstabilität gegen bedeutenden Aktivitätsverlust für wenigstens eine einjährige Lagerung bei ungefähr 4° Celsius wurde erreicht. Das Verfahren ist für Thrombin von jeder nützlichen Quelle anwendbar, insbesondere für menschliche und bovine, und ist im wesentlichen nützlich für die industrielle Herstellung von eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisendem Thrombin. Für Anwendungen, in denen im wesentlichen eine vollständige vitale Sicherheit des Produktes nicht erforderlich ist, oder wo die vitale Sicherheit im übrigen als ein Problem betrachtet wird, kann die vitale Filtration und Hitzebehandlung (Schritte 4 und 5) weglassen werden.

[0009] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur industriellen Herstellung einer lagerungsbeständigen, eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisenden Thrombinzusammensetzung, die im wesentlichen frei von Viren ist, zur Verfügung, das die folgenden Schritte aufweist:

- a) das Erhalten von rohem Prothrombin aus Plasma,
- b) das Umwandeln von Prothrombin in Thrombin, um rohes Thrombin zu erhalten,
- c) das Inkubieren von rohem Thrombin mit einem

Virizid für Lipoid enthaltende Viren in einer ausreichenden Menge, um diese Viren, falls diese vorhanden sind, zu deaktivieren,

d) das Reinigen des inkubierten Materials mittels sequentieller Ionenaustauschchromatographie, die ein singuläres sulfalkyl-aktiviertes Polysaccharid-Kationenaustauschmedium verwendet, das eine hohe Selektivität für Thrombin aufweist, und das Anheben der Konzentrationen einer wässrigen Salzlösung als Elutionsmittel,

e) das Zurückgewinnen des Thrombinpeakeluates der Chromatographie und das Austauschen der Salzlösung des Eluates für einen physiologisch kompatiblen stabilisierenden Formulierungspuffer zum Stabilisieren des zurückgewonnenen Thrombins und das Zurückgewinnen einer Formulierungspufferlösung des Thrombins, wobei Formulierungspufferlösung eine wässrige Lösung aus Citratsalz, Natriumchlorid, Tris-HCl und Serumalbumin bei einem pH-Wert von ungefähr 7,3 aufweist, in Mengen, die ausreichend sind, das Thrombin gegen wesentlichen Aktivitätsverlust während der Hitzebehandlung zu stabilisieren,

f) das Filtern der Thrombin-Formulierungspufferlösung über eine Hohlfaser-Kupferammonium-Zellulosemembran, um die in der Formulierungspufferlösung vorhandenen Virionen herauszufiltern, und das Wiedergewinnen einer im wesentlichen virionenfremen Formulierungspufferlösung des Thrombins, und

g) das Unterziehen der gefriergetrockneten Thrombin-Formulierungspufferlösung einer Hitzebehandlung bei 100°C für 1 bis 2 h, um irgendwelche verbliebenen Virionen zu deaktivieren, ohne das zurückgewonnene Thrombin zu denaturieren, wobei sowohl umhüllte als auch nicht umhüllte Viren deaktiviert werden.

[0010] In einer Ausführungsform besteht die wässrige Salzlösung in Schritt d) aus einer wässrigen Pufferlösung, die KH_2PO_4 und das Natrium- oder Kaliumsalz von HPO_4^{2-} und einen pH-Wert von ungefähr 6,5 aufweist.

[0011] In einer Ausführungsform bestehen die ansteigenden Konzentrationen einer wässrigen Salzlösung in Schritt d) aus ansteigenden Konzentrationen von 0,025M, 0,35M und 0,4M Puffer für bovines Thrombin und ansteigenden Konzentrationen von ungefähr 0,025M, 0,15M, 0,20 und 0,25M Puffer für menschliches Thrombin.

[0012] In einer Ausführungsform wird das einzige bzw. singuläre sulfalkyl-aktivierte Polysaccharid-Kationenaustauschmedium aus der Gruppe ausgewählt, die aus einer sulfalkyl-aktivierten Polyagarose, einem sulfalkyl-aktivierten Polydextran und einem nicht komprimierbaren Verbundmedium von sulfalkyl-akti-

viertem Dextran und Kieselerde- bzw. Siliziumdioxidpartikeln besteht.

[0013] In einer Ausführungsform ist das Kationenaustauschmedium ein im wesentlichen nicht komprimierbares Verbundmedium von sulfoalkyl-aktiviertem Dextran und Siliziumdioxidpartikeln.

[0014] In einer Ausführungsform ist das Kationenaustauschmedium ein im wesentlichen nicht komprimierbares Verbundmedium von sulfopropyl-aktiviertem Dextran und Siliziumdioxidpartikeln.

[0015] In einer Ausführungsform ist die physiologisch kompatible, stabilisierende Formulierungspufferlösung zusammengesetzt aus einer wässrigen Lösung von ungefähr 0,25 % Natriumcitrat, 0,45 % Natriumchlorid, 0,25 % Tris-HCl, allesamt w/v (weight by volume = Gewicht pro Volumen), Serumalbumin in einer Menge, die ungefähr dem 20-fachen der Gesamtproteinmenge in dem Thrombinpeakeluat entspricht und die vor der Gefrier Trocknung angepasst wird auf 2% w/v, und die einen pH-Wert von ungefähr 7,3 aufweist.

[0016] In einer Ausführungsform ist das Serumalbumin ein menschliches Serumalbumin, wenn das Thrombin für menschliche Anwendungen vorgesehen ist und das Serumalbumin ist ein bovines Serumalbumin, wenn das Thrombin für veterinäre Anwendungen vorgesehen ist.

[0017] In einer Ausführungsform wird Schritt d) bei 12 °C durchgeführt.

[0018] in einer Ausführungsform ist das rohe Thrombin bovines Thrombin, und hat das Thrombinprodukt eine spezifische Aktivität von wenigstens ungefähr 2000 NIH-Einheiten/mg natives bzw. natürliches Protein und einem Virizid-Rückstand von weniger als ungefähr 15 ppm.

[0019] In einer Ausführungsform ist das rohe Thrombin menschliches Thrombin, und weist das Thrombinprodukt eine spezifische Aktivität von wenigstens ungefähr 1000 NIH-Einheiten/mg natives bzw. natürliches Protein und einen Virizid-Rückstand von weniger als ungefähr 15 ppm auf.

Beschreibung der Erfindung

[0020] In einer beispielhaften Ausführungsform der Erfindung für menschliche, klinische Anwendungen, wird ein rohes, menschliches Thrombinpräparat zuerst mit einem lipoid-spaltenden bzw. zerstörenden Virizid inkubiert, um die lipoidhaltenden Virionen zu inaktivieren. Das behandelte Präparat wird dann sequentiell gereinigt mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Sulfopropyl Sphero-dex[®] als das alleinige Adsorptionsmedium und an-

steigenden Konzentrationen der Salzlösungen in jedem Durchgang, um ein Endeluat zu erhalten, das eine konzentrierte Lösung des Thrombins aufweist, das im Wesentlichen gereinigt ist, was die aktiven, Lipoid enthaltenden Virionen, verunreinigende Proteine und Virizidrückstände betrifft. Zu der gesammelten Thrombinpeaklösung wird stabilisierendes Albumin hinzugefügt und wird dann der Chromatographiepuffer mittels Diafiltration ausgetauscht gegen eine Formulierungspufferlösung. Die resultierende Thrombin-Formulierungslösung, die die Formulierungspufferkomponenten, Albumin, Wasser und gereinigtes Thrombin aufweist, wird dann gefiltert, um die nicht Lipotide enthaltenden Virionen zu entfernen. Das viral gereinigte Thrombin wird dann auf die geforderte Konzentration im Formulierungspuffer verdünnt, die Endkonzentration des stabilisierenden Albumins auf 2 % angepasst und die Lösung wird dann steril gefiltert, gefriergetrocknet und bei ungefähr 4° Celsius gelagert. Um ein virionfreies Produkt sicherzustellen, wird das viralgefilterte, gefriergetrocknete Thrombin einer Trockenhitzebehandlung bei ungefähr 100° Celsius unterzogen, um irgendwelche verbliebenen aktiven Viren zu inaktivieren.

Rothrombinpräparat

[0021] Jedes geeignete Thrombin enthaltende Präparat kann als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, einschließlich im Handel erhältlicher Präparate bzw. Präparationen. Die vorliegende Erfindung macht die sichere Verwendung von menschlichem Plasma als Quelle von Thrombin praktikabel, und für menschliche klinische Anwendung wird daher menschliches Plasma dementsprechend im allgemeinen bevorzugt, da dieses das Risiko von allergischen Reaktionen beim Empfänger reduziert. Bovines Plasma ist im Wesentlichen bevorzugt als Ausgangsmaterial für Thrombinprodukte entsprechend der Erfindung für veterinären Gebrauch. Wie dies in Fachkreisen bekannt ist, kann rohes Thrombin aus angesäuertem frischem Plasma, Cryosupernatant, Supernatant nach der Salzausfällung oder jeglicher anderen Plasmafraktion, die dieses Protein erhält, erhalten werden. Ein beispielhaftes Verfahren zur Herstellung eines Rothrombin-Ausgangsmaterials wie es für die vorliegende Erfindung nützlich ist, ist in Ann. pharmaceutique française 48 (Teil 3): 129-1, 1990 beschrieben. Das beschriebene Verfahren umfasst im Wesentlichen die Verdünnung des Ausgangsplasmas oder der Ausgangsplasmafraktion mit destilliertem Wasser, um die Salzkonzentration auf unter 10% der ursprünglichen frischen Plasmakonzentration zu reduzieren, wobei der pH-Wert der verdünnten Lösung auf ungefähr 5,3 eingestellt wird; Zentrifugieren der Lösung, um eine rohes Prothrombin enthaltende Ausfällung zu erhalten; Auflösen der Ausfällung in einer NaCl-Lösung mit Anpassung des pH-Wertes auf ungefähr 7,0; und Zugabe von Kalziumionen zu der resultierenden Lö-

sung beim Inkubieren für wenigstens 2 Stunden bei Raumtemperatur, um Prothrombin in Thrombin umzuwandeln. Die Thrombinlösung wird dann zentrifugiert, um ein Supernatant zur Verfügung zu stellen, das rohes Thrombin enthält, das für die Verwendung als Ausgangsmaterial für die Erfindung geeignet ist; das Supernatant wird dann gemischt mit Virizid, wie zuvor beschrieben, und die Ausfällung verworfen. In einer bevorzugten Ausgestaltung, insbesondere geeignet für die industrielle Herstellung von Thrombin, wird der zuvor beschriebene Prozess verbessert entsprechend der vorliegenden Erfindung durch Verwendung von Diafiltration, insbesondere Diafiltration, die eine ungefähr 0,015M NaCl-Lösung anstelle von Wasser als Nachfüllpuffer bzw. Ergänzungspuffer verwendet, um die Salzkonzentration des Ausgangsplasmas zu reduzieren, während ungefähr das Originalvolumen des Materials beibehalten wird; die Diafiltration kann entweder eine Konstantvolumen-Ultrafiltration mit kontinuierlicher Zugabe von frischem Puffer oder wiederholte Ultrafiltration mit Zugabe von frischem Puffer nach jedem Konzentrationszyklus sein. Dies reduziert wirksam die Salzkonzentration des Ausgangsplasmas auf die gewünschte Größe, wobei der sehr große Anstieg des Volumens des zu zentrifugierenden Materials, um eine rohe Prothrombinausfällung, die von der Verdünnung entsprechend dem Stand der Technik herrührt, zu erhalten, vermieden wird.

Virizid

[0022] Jedes geeignete Virizid zur Inaktivierung von Lipoid enthaltenden Viren, wie diese in Fachkreisen bekannt sind, kann verwendet werden; Zusammensetzungen, die ein nicht-ionisches Reinigungsmittel bzw. Detergent wie z. B. ein Tween® oder Span®-Serien Polyoxyethylenesorbitan-Detergent und/oder ein organisches Lösungsmittel aufweisen, wie z. B. ein Di- oder Trialkylphosphat, welches die viralen Lipotide abspaltet und die Lipoid enthaltenden Virionen inaktiviert, ohne bedeutende Denaturierung des Thrombins, werden gegenwärtig empfohlen. Solche Virizidzusammensetzungen werden hierin im Wesentlichen als „Solvent-Detergent“ oder SD-Zusammensetzungen bezeichnet. SD-Zusammensetzungen, die ein Di- oder Trialkylphosphat optional in Kombination mit einem nicht-ionischen Detergent als Nassmittel und/oder Alkohol oder Ether aufweisen, die mit dem verunreinigten Protein inkubiert werden, wie dies im US Patent 4,540,573, ausgegeben am 10. September 1985 für Neurath, et al, beschrieben ist, sind beispielhaft. Entsprechend dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, wird die ausgewählte Solvent/Detergent bzw. Lösungsmittel/Reinigungsmittel-Zusammensetzung mit dem rohen Thrombin-Ausgangsmaterial vor der Chromatographie inkubiert, wobei während der Chromatographie (unten) von Virizidrückständen und Verunreinigungen, insbesondere andere Gerinnungsfaktoren, die in dem Ausgangsmaterial

enthalten sind, entfernt werden. Eine bevorzugte nicht-denaturierende SD-Zusammensetzung zur Verwendung entsprechend der Erfindung basiert auf einem C₂-C₁₀-Tri-Alkylphosphat, wie z. B. Tri-n-Butylphosphat und Polyoxylalkylene-Derivative eines Sorbit/Fettsäureteilesters, wie z. B. Tween 80® (Polyoxyethylenesorbit Monooleat) bei einem physiologischen pH-Wert.

Ionenaustauschreinigung

[0023] Entsprechend der Erfindung wird das Virizid behandelte Rohthrombin-Ausgangsmaterial mittels sequentieller Säulenchromatographie unter Verwendung eines einzigen Adsorptionsmediums mit ansteigenden Pufferkonzentrationen in jedem Durchgang gereinigt. Nützliche Chromatographieparameter sind in Fachkreisen wohlbekannt; ein verbessertes Verfahren entsprechend der vorliegenden Erfindung umfasst die Durchführung der chromatographischen Separierung bei einer Temperatur von ungefähr 12° Celsius, statt in konventioneller Weise bei Raumtemperatur (ungefähr 20° Celsius), was die Erträge bedeutend erhöht. Die chromatographische Reinigung des Thrombins vom Rohthrombin-Ausgangsmaterial inkubiert mit Virizid wird hierin in Begrifflichkeiten der Säulenchromatographie beschrieben; es kann jedoch jede andere physikalische Anordnung verwendet werden, wie z. B. Patronen zum Kontaktieren des Adsorptionsmediums mit dem Thrombinpräparat. Mittels der erfindungsgemäßen Verfahrensführung stellt der Ionenaustauschreinigungsprozess ein Thrombinprodukt mit hoher spezifischer Aktivität und gutem Ertrag zur Verfügung, der die hocheffiziente und -effektive Reinigung des Rohthrombins bezüglich fremder Materialien in dem Rohpräparat, insbesondere andere Blutproteine oder bakterielle Toxine und Virizidrückstände widerspiegelt.

A. Adsorptionsmedien

[0024] Jegliche Kationen-Adsorptionsmedien, die für die Trennung des Thrombins von dem rohen, virizidbehandelten Ausgangsmaterial geeignet sind, um ein therapeutisches bzw. eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisendes Produkt zur Verfügung zu stellen, kann verwendet werden, insbesondere Medien, die hochselektiv bezüglich des Thrombins sind, wie z. B. Sepharose® oder SP-Sephadex®, die im Handel erhältlich sind von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, die insbesondere für die industrielle Herstellung bevorzugt ist, wird Sulfopropyl-Sphero-dex®-Gel (erhältlich von Sepracor Inc., Marlborough, MA, USA) als Ionenaustauschmedium verwendet. Dieses Medium ist ein nicht-komprimierbares, verbundstabiles Gel, das Siliziumdioxidpartikel aufweist, die vollständig von dem sulfopropyl-aktiviertem Dextran bedeckt sind, das sowohl eine hohe Kapazität für die Thrombin-Adsorption als auch aus-

gezeichnete Flusseigenschaften aufweist, die eine schnelle und wirksame Reinigung ermöglichen. Ebenso kann das Medium nach der Verwendung schnell und einfach erneuert werden durch Waschen mit z. B. Natriumhydroxidlösung für sowohl Hygienisierung als auch Entfernung von Proteinen oder anderer Materialien von der Säule. Im allgemeinen werden nicht-stabile Gele, wie z. B. SP-Sephadex und vergleichbare Gele nicht empfohlen für die großtechnische Reinigung von Thrombin entsprechend der vorliegenden Erfindung, da herausgefunden wurde, dass bedeutend reduzierte Fließraten während der Thrombinreinigung entsprechend der Erfindung durch Komprimierung der Säule aufgrund der Flexibilität dieser Medien bewirkt werden. Falls die Chromatographie-Trennung bei 12° Celsius durchgeführt wird, weist das Endchromatographieeluat eine Zusammensetzung des bovines Thrombins auf, das eine spezifische Aktivität von wenigstens 2000 NIH-Einheiten pro mg natives bzw. natürliches Protein (d. h. ausschließlich irgendeines zugefügten Proteins wie z. B. stabilisierendes Serumalbumin, siehe unten), aufweist, bei einem Ertrag von wenigstens 70% bis zu ungefähr 90% bovines Thrombin (ungefähr 265 000 NIH-Einheiten bovines Thrombin bis zu ungefähr 340 000 Einheiten, ausgehend von 6 Gramm von im Handel erhältlichen Rohthrombin einer spezifischen Aktivität 100 NIH/mg), oder einer humanen Thrombinzusammensetzung, die eine spezifische Aktivität von wenigstens ungefähr 1000 NIH-Einheiten pro mg natives bzw. natürliches Protein (d. h. ausschließlich irgendeines zugefügten Proteins, wie z. B. stabilisierendes Serum Albumin, siehe unten) bei einem Ertrag von wenigstens ungefähr 70% bis zu ungefähr 90% menschlichem Thrombin (wenigstens ungefähr 150 000 NIH-Einheiten menschliches Thrombin bis zu ungefähr 180 000 Einheiten, ausgehend von 5 l von Plasma Supernatant nach der Salzausfällung. Wenn die Chromatographietrennung bei 20° Celsius durchgeführt wird, beträgt die spezifische Aktivität des menschlichen Thrombins wenigstens ungefähr 400 NIH-Einheiten pro mg natives bzw. natürliches Protein. Der Prozentverlust der Aktivität während der S/D-Behandlung und Batch-to-Batch-Variationen ist in dem angegebenen Bereich der Einheiten eingeschlossen).

B. Chromatographiepuffer

[0025] Der Chromatographiepuffer kann eine wässrige Phosphatlösung aufweisen, die KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (für bovines Thrombin) und KH₂PO₄/K₂HPO₄ (für menschliches Thrombin) aufweisen. Die Komponenten der individuellen Pufferlösungen werden angemischt mit (vorzugsweise destilliertem) Wasser in im wesentlichen äquimolaren Anteilen und dann werden monobasische und dibasische Phosphatlösungen in Anteilen gemischt, die eine Endpufferlösung zur Verfügung stellen, die einen pH-Wert von im wesentlichen 6,5 aufweist. Die

Säule wird zuerst abgeglichen mit einer niedrigen Konzentration des Phosphatpuffers (ungefähr 0,025M), und gewaschen mit ansteigenden Konzentrationen desselben Puffers bis alles UV-absorbierende Material herausgelöst ist.

[0026] Das Endeluat (Thrombinpeaklösung) wird wiedergewonnen und wie zuvor beschrieben viral behandelt, um virale Sicherheit entsprechend der beabsichtigten Anwendung zu erzielen. Für bovines Thrombin wird die Säule bevorzugt mit drei ansteigenden Konzentrationen des Puffers (ungefähr 0,025M, 0,35M und 0,4M) gewaschen; das dritte Waschen mit 0,4M-Puffer ergibt bzw. löst die Thrombinpeaklösung heraus. Virizidrückstände und verunreinigende Proteine werden während der ersten zwei Waschvorgänge entfernt. Für menschliches Thrombin wird die Säule bevorzugt mit vier ansteigenden Konzentrationen von Puffer gewaschen (ungefähr 0,025M, 0,15M, 0,20M und 0,25M). Der vierte Waschvorgang mit 0,25M-Puffer ergibt bzw. löst die Thrombinpeaklösung heraus. Virizidrückstände und verunreinigende Proteine werden während der ersten drei Waschvorgänge entfernt.

[0027] Alternativ kann die Chromatographie auch mit einem linearen Gradienten der ansteigenden Konzentration der Natriumchloridlösung durchgeführt werden. Die Reinigung des menschlichen Thrombins wurde erreicht durch Verwendung einer Säule, die mit 80mM Natriumchlorid abgeglichen ist und mit einem linearen Gradienten der Natriumchloridlösung von ansteigenden Molaritäten (80 bis 150 mM) gewaschen wurde. Das Thrombin wird herausgelöst bzw. eluiert in einer 400 mM Natriumchloridlösung. Dieses Experiment wurde bei 20° Celsius durchgeführt und die spezifische Aktivität war vergleichbar (500 NIH) mit derjenigen, bei der gleichen Temperatur unter Verwendung des ansteigenden Phosphatpuffergradienten (> 400 (NIH)). Deshalb ist der Puffer oder die Salzlösung, die während der chromatographischen Reinigung verwendet wird, nicht kritisch, vorausgesetzt, dass sie geeignet ist für die Thrombinreinigung bezüglich ionischer Wirkungskraft und pH-Wert. Deshalb kann der Fachmann leicht Äquivalente zu den oben verwendeten Puffern und Salzlösungen finden, um eine ähnliche Reinigung zu erzielen.

C. Pufferaustausch

[0028] Die wiedergewonnene Thrombinpeaklösung von oben wird diafiltriert oder anders behandelt entsprechend bekannter Methoden zum Austausch der Chromatographie-Pufferlösung für die Formulierungspufferlösung. Jegliche Formulierungspufferlösung, in der das Thrombin löslich ist und die die Thrombinlösung gegen die nachfolgend beschriebenen Verfahrensschritte für die beabsichtigte Anwendung stabilisiert, kann verwendet werden, insbeson-

dere Lösungen von Tris-HCl (ungefähr 0,20 bis 0,30 w/w% der Gesamtzusammensetzung) in wässriger Saline (ungefähr 0,40 bis ungefähr 0,50 w/w% Natriumchlorid der Gesamtzusammensetzung). Insbesondere werden gute Ergebnisse entsprechend der vorliegenden Erfindung zur Stabilisierung des Thrombins gegen nachchromatographische virizidale Behandlung und Lagerungsdegeneration erzielt, z. B. durch Verwendung einer Formulierungspufferlösung, die eine wässrige Lösung von ungefähr 0,25% Natriumcitrat, 0,45% Natriumchlorid, 0,25% Tris-HCl (allesamt w/v%); pH-Wert 7,3.

[0029] Für beste Ergebnisse wird bovines oder menschliches Serumalbumin (entsprechend der beabsichtigten Verwendung) der Thrombinpeaklösung zugeführt, bevor der Chromatographiepuffer mit der Formulierungspufferlösung ausgetauscht wird, und zwar in Mengen von ungefähr 20Mal dem Gesamtlösungsprotein (d. h. „nativen oder natürlichen Protein“) auf einer Gewichtsprozentbasis. Die Endkonzentration des Albumins wird um 2% (w/v) erhöht, nachdem die Thrombinlösung auf die gewünschte Konzentration am Ende des Verfahrens unmittelbar vor dem Befüllen verdünnt wird. Um die Puffer auszutauschen wird die wiedergewonnene Thrombinpeaklösung vorzugsweise diafiltriert, unter Verwendung von z. B. einer Menge des Formulierungspuffers der ungefähr gleich 8mal dem Volumen der Thrombinpeaklösung entspricht und einer 30.000 Molekulargewicht-cut-off-Membran oder anderer herkömmlicher Membrane, die Thrombin (Molekulargewicht 36.000, je nach Quelle leicht variierend) und Albumin (Molekulargewicht 66.000, je nach Quelle leicht variierend) zurückhalten, jedoch keine kleineren Proteine. Während verbesserte Ergebnisse durch Zugabe des Albumins (oder weniger bevorzugt zur Zeit irgendwelches andere stabilisierende Protein) zu jeder Zeit vor der Lagerung erhalten werden können, ist es bevorzugt, dass das Albumin in die Formulierungslösung eingebracht wird, bevor diese für die Chromatographiepufferlösung ausgetauscht wird, da das Albumin zur Stabilisierung des Thrombins während aller nachchromatographischen Schritte beiträgt. Wie zuvor beschrieben, ist es höchst bevorzugt, dass das Albumin zu der Thrombinpeaklösung vor dem Pufferaustauschschritt zugeführt wird. Geeignetes Serumalbumin zur Verwendung in der Praxis entsprechend der Erfindung ist im wesentlichen im Handel erhältlich, z. B. umfasst ein nützliches menschliches Serumalbumin Plasbumin-257 (Miles Canada Inc., Etobicoke, Ontario, Canada), das eine USP 25%-Albuminlösung aufweist, die zusätzlich zwei Stabilisierungskomponenten aufweist: 0,02M Acetyltryptophan und 0,02M Natriumcaprylat, ohne Konservierungsmittel, hergestellt aus gesiedetem, menschlichen Venenplasma unter Verwendung des Cohn-Kaltethanolfraktionierungsverfahrens und einer Hitzebehandlung bei 60° Celsius für 10 Stunden gegen die Möglichkeit der Übertragung des Hepatitisvirus. In einem bevor-

zugten Schritt entsprechend der vorliegenden Anmeldung wird ungefähr 10 ml der Albuminlösung zuerst zu ungefähr 500 ml Thrombinpeaklösung zugegeben, gefolgt von einer Diafiltration der albumin-modifizierten Peaklösung mit ungefähr 8mal der Menge bzw. dem Volumen des Formulierungspuffers für den Pufferaustausch. Durch diesen Schritt werden wenigstens ungefähr 99% gewöhnlich mehr als ungefähr 99,99% der niedermolekulargewichtigen Verunreinigungen durch den Formulierungspuffer ausgetauscht, die alle Proteine drinnen lassen, die größer sind als die Molekulargewicht-Cut-Off-Kapazität der Diafiltrationsmembran. Vorzugsweise wird menschliches Serumalbumin für sowohl menschliches als auch bovines Thrombin verwendet, das für menschliche Anwendungen vorgesehen ist und bovines Serum Albumin wird verwendet für bovines Thrombin, das für veterinäre Anwendungen vorgesehen ist.

[0030] Abhängig von der beabsichtigten Verwendung kann das gereinigte Thrombinprodukt im Formulierungspuffer von oben verwendet werden wie es ist nach der Endformulierung, der sterilen Filtration und der Gefriertrocknung, insbesondere als gereinigtes bovines Thrombin für veterinäre Anwendung. Für menschliche Anwendungen wird das Produkt vorzugsweise einer weiteren viralen Reinigung unterzogen, wie folgt:

D. Virale Filtration

[0031] Um das Thrombin bezüglich der nicht-lipoid enthaltenden Viren weiter zu reinigen, wird das wiedergewonnene Thrombin im Formulierungspuffer, vorzugsweise inklusive Serumalbumin oder anderem stabilisierendem Protein, über einer Hohlfasermembran gefiltert, wie z. B. einer BMM mikroporösen Membran (Bemberg Microporous Membrane Development, Asahi Chemical Industries), die eine Kupferammonium regenerierte Cellulosefaser umfasst, die eine Porengröße von ungefähr 15 nm des Typs, hergestellt durch Asahi Chemical Industries, Tokyo, Japan und verkauft unter der Marke Planova BMM aufweist. Diese Technik entfernt im wesentlichen die nicht-lipoid enthaltenden Virionen, die nicht mittels der SD-Behandlung des Verfahrens inaktiviert werden können. Der Filter ist insbesondere geeignet zur Thrombinreinigung, da er eine hohe Konzentration des Thrombins bei einem niedrigen Volumen der Lösung bewerkstelligen kann: z. B. ausgehend von 5 Litern humanem Plasma wurde ein Volumen von ungefähr 125 ml der erhaltenen gereinigten Thrombinlösung (600-800 NIH/ml) gefiltert unter Verwendung eines 0,01 µm, 15nm Planova BMM-Filters. Unter diesen Bedingungen betrug die getestete Rate der Entfernung von kleinen Polioviren mehr als 7 Log's.

E. Trockenes Erhitzen

[0032] Während die beschriebene SD-Behandlung

typischerweise zwischen 4 und 6 Log's der Lipoid enthaltenden, umhüllten Viren und die 15 nm virale Filtration zwischen 4 und 8 Log's von sämtlichen die SD-Behandlung überlebenden, kleinen Viren entfernt, können, um die virale Sicherheit sicherzustellen, die in Ampullen gefriergetrockneten Thrombinpräparate zusätzlich einer trockenen Hitzebehandlung bei ungefähr 100° Celsius für ungefähr 1 bis 2 Stunden unterzogen werden. Ein niedriger Feuchtegehalt des Produkts während der Behandlung ist wichtig, um eine unnötige Deaktivierung des Thrombins zu vermeiden.

BEISPIELE

Beispiel I. Mit Lösungsmittel-Reinigungsmittel behandelte bovine Thrombinproduktion.

[0033] 6 g des handelsüblichen bovines Rohthrombins (erhalten von GenTrac, Inc. Middleton, WI, USA), das eine spezifische Aktivität von 100 NIH aufweist, wurde in 75 ml eines wässrigen Puffers, enthaltend 1 % Tris-HCl und 1,62% Natriumcitrat (alle w/v%), pH-Wert 7,0 aufgelöst. 75 ml der wässrigen Lösungsmittel-Reinigungsmittel-Lösung wurde zugegeben (1 % Tris-HCl, 1,62% Natriumcitrat, 2% Tween 80®, 0,6% Tri-n Butylphosphat (TnBP), allesamt w/v%; pH-Wert 7,0) und die Mischung wurde für 6 Stunden bei 25° Celsius gerührt.

[0034] Die Mischung wurde direkt einer Sulfopropyl-Spherodexsäule (2,5 cm × 13 cm, Pharmacia) zugeführt, abgeglichen mit 0,025M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in wässriger Lösung (hergestellt wie zuvor beschrieben), bei einem pH-Wert von 6,5. Die Säule wurde gewaschen mit 3 ansteigenden Konzentrationen dieses Puffers (0,025M, 0,35M und 0,4M allesamt bei einem pH-Wert von 6,5) bis alles UV absorbierende Material herausgelöst war. Das herausgelöste Material mit den 0,025M und 0,35M Puffern enthielt SD-Mischungskomponenten und verunreinigende Proteine und wurde verworfen. Die dritte Elution mit dem 0,4M-Puffer enthielt gereinigtes, mit Lösungsmittel-Reinigungsmittel antiviral behandeltes bovines Thrombin einer spezifischen Aktivität von größer als 2.000 NIH-Einheiten pro mg Protein, mit einem 70 bis 90%igem Ertrag. Die Reinigung wurde durchgeführt bei 12° Celsius. Bovines Serumalbumin wurde der gesammelten Thrombinpeaklösung zugeführt in einer Menge gleich 20mal dem Gesamtprotein, und die resultierende Lösung wurde einer 8fachen Volumen-Diafiltration unter Verwendung einer 30.000 Molekulargewicht-Cut-Off-Membran (Amicon YM 30 Membran, Amicon Division, W.R. Grace & Co.-Conn., Beverly, Massachusetts, USA) unterzogen, mit einem Austausch des Chromatographiepuffers mit dem folgenden Formulierungspuffer: 0,25% Natriumcitrat, 0,45% Natriumchlorid, 0,25% Tris-HCl (Trishydroxymethyl) (Aminomethan Hydrochlorid) (alle Mengen in w/v%), in einer wässrigen Lösung bei einem pH-Wert

von 7,3. Nach der Diafiltration wurde die Thrombinlösung auf eine Konzentration von 220 NIH/ml mit demselben Formulierungspuffer verdünnt, wurde der bovine Serumalbumin-Anteil auf 2% erhöht und wurde die Lösung steril gefiltert, in Ampullen gefüllt und gefriergetrocknet. Die Ampullen wurden bei 4° Celsius gelagert. Vor der Zugabe des Serumalbumins war die thrombinspezifische Aktivität größer als 2.000 NIH/mg Protein. Der SD-Rückstand, der in 1 ml Wasser vorhanden war, betrug: Tween 80 < 15ppm; TnBP < 15 ppm. Jede der Ampullen war gefüllt mit 220 NIH-Einheiten des bovinen Thrombins. Beschleunigte Stabilitätsstudien bei 37° Celsius für 2 Monate (entsprechend 6 Monaten bei 4° Celsius) zeigten keinen bedeutenden Verlust der Thrombinaktivität.

Beispiel II. Doppelt antiviral behandeltes menschliches Thrombin

[0035] Fünf Liter einer menschlichen Plasmafraktion, das übrig geblieben ist nach einer Salzausfällung des Coagulationsproteins, wie es in der Herstellung des Fibrinversieglers verwendet wird, wurde entsprechend dem in Ann. Pharmaceutique Française, op.cit., Supra., beschrieben ist, verarbeitet, unter Verwendung eines Diafiltrationsschrittes, wie oben beschrieben, anstelle des berichteten Verdünnungsvorgangs. Die Ausgangsplasmafraktion wurde diafiltriert mit 0,015M Natriumchlorid-wässriger Lösungskonzentration zu ungefähr 10% der Originalkonzentration in frischem Plasma und der pH-Wert wurde angepasst auf 5,3 mit 2%iger Essigsäure und die Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Material wurde dann für 20 Minuten bei 4.200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und die resultierende Ausfällung in 250 ml von 0,9%igem Natriumchlorid pro Liter Plasma aufgelöst mit einer Anpassung des pH-Wertes auf 7,0 mit 2%igem Natriumcarbonat. Prothrombin wurde durch Zugabe von Kalziumchlorid zu Thrombin umgewandelt, um eine Endkonzentration von 21 mM zu erhalten, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Std. zentrifugieren bei 4.200 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten. 200.000-250.000 NIH-Einheiten des Rohthrombins wurden aus 5 l der Ausgangsplasmafraktion erhalten.

[0036] Die Proteinkonzentration des Rohthrombinpräparats wurde auf ungefähr 10-15 mg/ml angepasst und die Lösung wurde der Lösungsmittel-Reinigungsmittel-Antiviralbehandlung unterworfen durch Zugabe eines gleichen Volumens der folgenden SD-Zusammensetzung: Wässrige Lösung von 1 % Tris-HCl, 1,62% Natriumcitrat, 2% Tween 80® (Sigma Chemical Co.) und 0,6% Tri-n-Butylphosphat (allesamt w/v%) unter Rühren für 6 Stunden bei 25° Celsius.

[0037] Nach der Inkubation wurde das Rohthrombinmaterial direkt einer Sulfopropyl-Spherodex-Säule

(5 cm × 13 cm, Pharmacia) zugeführt und abgeglichen mit einem 0,025M Phosphatpuffer wie in Beispiel 1. Die Säule wurde gewaschen mit 4 ansteigenden Konzentrationen Phosphatpuffer (unten) bis alles UV-absorbierende Material herausgelöst war.

[0038] Das herausgelöste Material mit den ersten drei Puffern (0,025M, 0,15M, und 0,20M) enthielt SD-Mischungskomponenten und verunreinigende Proteine und wurde verworfen. Die vierte Elution mit 0,25 M-Puffer enthielt gereinigtes SDantiviral behandeltes menschliches Thrombin der spezifischen Aktivität von 1.200 NIH-Einheiten pro mg Protein, erhalten mit 90% Ertrag. Die Chromatographie wurde bei 12° Celsius durchgeführt. Zu der gesammelten Thrombinpeaklösung wurde eine Lösung des menschlichen Serumalbumins, das für menschliche Verwendung (Plasbumin-25)® genehmigt ist, in einer Menge gleich 20mal (bezogen auf das Gewicht) des Gesamtproteins zugeführt, das in der Thrombinpeaklösung vorhanden ist, und die Lösung wurde einer achtmaligen Volumendiafiltration unterzogen unter Verwendung einer 30.000 Molekulargewicht-Cut-Off-Membran und des folgenden sterilen Formulierungspuffers: 0,25% Natriumcitrat, 0,45% Natriumchlorid, 0,25% Tris-HCl (allesamt w/v%) in wässriger Lösung, pH-Wert 7,3.

[0039] Die Thrombinlösung wurde dann antiviral gefiltert unter Verwendung eines 0,01 qm (Filterbereich), 15 nm (Porengröße) Planova BMM Filters (Asahi Chemical Co., oben) und einem Druck von 10 psi. Das gefilterte Thrombin wurde mit dem selben sterilen Formulierungspuffer auf die erforderliche Konzentration (in diesem Fall 220 NIH/ml) verdünnt, die menschliche Albuminkonzentration wurde auf 2% erhöht, die Lösung wurde steril gefiltert, in Ampullen gefüllt, gefriergetrocknet und bei 4° Celsius gelagert. Die Ampullen waren gefüllt mit 200 NIH-Einheiten des menschlichen Thrombins und beschleunigte Stabilitätsstudien wurden bei 37° Celsius für 2 Monate durchgeführt, was 6 Monaten bei 4° Celsius entspricht. Keine bedeutsamen Verluste der Thrombinaktivität wurden beobachtet (gemessen mittels Standard-Gerinnungsverfahren). Daher wurde die spezifische Aktivität des Produkts während der Lagerung beibehalten.

Beispiel III. Dreifach antiviral behandeltes menschliches Thrombin

[0040] Die Ampullen, die gefriergetrocknetes menschliches Thrombin enthalten, wurden einer Erhitzung bei 100° Celsius für 1 bis 2 Stunden unterzogen. Kein Verlust der Thrombinaktivität wurde beobachtet.

[0041] Die in den Beispielen I, II und III beispielhaft dargelegten Verfahren sind großtechnisch für die kommerzielle Produktion verwendbar.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur industriellen Herstellung einer lagerungsbeständigen, eine therapeutische Qualitätsstufe aufweisenden Thrombinzusammensetzung, die im wesentlichen frei von Viren ist, umfassend die folgenden Schritte:

- a) das Erhalten von rohem Prothrombin aus Plasma,
- b) das Umwandeln von Prothrombin in Thrombin, um rohes Thrombin zu erhalten,
- c) das Inkubieren von rohem Thrombin mit einem Virizid für Lipoid enthaltende Viren in einer ausreichenden Menge, um diese Viren, falls diese vorhanden sind, zu deaktivieren,
- d) das Reinigen des inkubierten Materials mittels sequentieller Ionenaustauschchromatographie, die ein singuläres sulfalkyl-aktiviertes Polysaccharid-Kationenaustauschmedium verwendet, das eine hohe Selektivität für Thrombin aufweist, und das Anheben der Konzentrationen einer wässrigen Salzlösung als Elutionsmittel,
- e) das Zurückgewinnen des Thrombinpeakeluates der Chromatographie und das Austauschen der Salzlösung des Eluates für einen physiologisch kompatiblen stabilisierenden Formulierungspuffer zum Stabilisieren des zurückgewonnenen Thrombins und das Zurückgewinnen einer Formulierungspufferlösung des Thrombins, wobei die Formulierungspufferlösung eine wässrige Lösung aus Citratsalz, Natriumchlorid, Tris-HCl und Serumalbumin bei einem pH-Wert von ungefähr 7,3 aufweist, in Mengen, die ausreichend sind, das Thrombin gegen wesentlichen Aktivitätsverlust während der Hitzebehandlung zu stabilisieren,
- f) das Filtern der Thrombin-Formulierungspufferlösung über eine Hohlfaser-Kupferammonium-Zellulosemembran, um die in der Formulierungspufferlösung vorhandenen Virionen herauszufiltern, und das Wiedergewinnen einer im wesentlichen virionenfreien Formulierungspufferlösung des Thrombins, und
- g) das Unterziehen der gefriergetrockneten Thrombin-Formulierungspufferlösung einer Hitzebehandlung bei 100°C für 1 bis 2 h, um irgendwelche verbliebenen Virionen zu deaktivieren, ohne das zurückgewonnene Thrombin zu denaturieren, wobei sowohl umhüllte als auch nicht umhüllte Viren deaktiviert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die wässrige Salzlösung in Schritt d) aus einer wässrigen Pufferlösung besteht, die KH_2PO_4 und das Natrium- oder Kaliumsalz von HPO_4^- und einen pH-Wert von ungefähr 6,5 aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die ansteigenden Konzentrationen einer wässrigen Salzlösung in Schritt d) aus ansteigenden Konzentrationen von ungefähr 0,025 M, 0,35 M und 0,4 M Puffer für bovines Thrombin und ansteigenden Konzentrationen von ungefähr 0,025 M, 0,15 M, 0,20 und 0,25 M

Puffer für menschliches Thrombin bestehen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem das singuläre sulfalkyl-aktivierte Polysaccharid-Kationenaustauschmedium aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer sulfalkyl-aktivierten Polyagarose, einem sulfalkyl-aktivierten Polydextran und einem nicht komprimierbaren Verbundmedium von sulfalkyl-aktiviertem Dextran und Kieselerde- bzw. Siliziumdioxidpartikeln besteht.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Kationenaustauschmedium ein im wesentlichen nicht komprimierbares Verbundmedium von sulfoalkylaktiviertem Dextran und Siliziumdioxidpartikeln ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Kationenaustauschmedium ein im wesentlichen nicht komprimierbares Verbundmedium von sulfopropylaktiviertem Dextran und Siliziumdioxidpartikeln ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die physiologisch kompatible, stabilisierende Formulierungspufferlösung zusammengesetzt ist aus einer wässrigen Lösung von ungefähr 0,25 % Natriumcitrat, 0,45 % Natriumchlorid, 0,25 % Tris-HCl, allesamt w/v (Gewicht pro Volumen), Serumalbumin in einer Menge, die ungefähr dem 20-fachen der Gesamtproteinmenge in dem Thrombinpeakeluat entspricht und die vor der Gefrier Trocknung angepasst wird auf 2 % w/v, und die einen pH-Wert von ungefähr 7,3 aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem das Serumalbumin ein menschliches Serumalbumin ist, wenn das Thrombin für menschliche Anwendungen vorgesehen ist und bei dem das Serumalbumin ein bovines Serumalbumin ist, wenn das Thrombin für veterinäre Anwendungen vorgesehen ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem Schritt d) bei 12 °C durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem das rohe Thrombin bovines Thrombin ist, und bei dem das Thrombinprodukt eine spezifische Aktivität von wenigstens ungefähr 2000 NIH-Einheiten/mg natives bzw. natürliches Protein und einem Virizid-Rückstand von weniger als ungefähr 15 ppm aufweist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem das rohe Thrombin menschliches Thrombin ist, und bei dem das Thrombinprodukt eine spezifische Aktivität von wenigstens ungefähr 1000 NIH-Einheiten/mg natives bzw. natürliches Protein und einen Virizid-Rückstand von weniger als ungefähr 15 ppm aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen