

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1890/2002** (51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **A61K 38/00** (2006.01)  
(22) Anmeldetag: **18.12.2002**  
(43) Veröffentlicht am: **15.06.2006**

(73) Patentanmelder:

**BIO-PRODUCTS & BIO-ENGINEERING  
AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1010 WIEN (AT)**

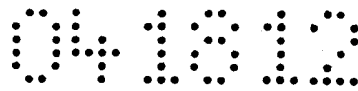
(54) **STABILE THERAPEUTISCHE PROTEINE**

(57) Aus virussicheren, pharmazeutischen Wirkstoffzubereitungen hergestellte, lagerfähige Arzneimittel, die ein oder mehrere aus Plasma oder gentechnologisch gewonnene, intakte, therapeutische Proteine als aktive pharmazeutische Substanz bzw. Substanzen enthalten, wobei in den Wirkstoffzubereitungen weder freie, noch an ihre Substrate gebundene, aktive Enzyme, insbesondere Proteasen, vorhanden sind, die gegen das bzw. die vorhandenen therapeutischen Proteine wirken.

**AT 501 088 A2 2006-06-15**

### Zusammenfassung

Aus virussicheren, pharmazeutischen Wirkstoffzubereitungen hergestellte, lagerfähige Arzneimittel, die ein oder mehrere aus Plasma oder gentechnologisch gewonnene, intakte, therapeutische Proteine als aktive pharmazeutische Substanz bzw. Substanzen enthalten, wobei in den Wirkstoffzubereitungen weder freie, noch an ihre Substrate gebundene, aktive Enzyme, insbesondere Proteasen, vorhanden sind, die gegen das bzw. die vorhandenen therapeutischen Proteine wirken.

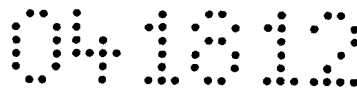


## STABILE THERAPEUTISCHE PROTEINE

### Einleitung

Therapeutische Proteine sind seit über 100 Jahren in medizinischer Verwendung und nehmen weiter an medizinischem Interesse und Bedeutung zu. Vergleiche mit anderen, aktiven pharmazeutischen Substanzen ergeben, dass therapeutische Proteine als Eiweißstoffe eine wesentlich geringere Stabilität und einen höheren Grad an Verunreinigungen aufweisen. Auch weisen therapeutische Proteine im Vergleich zu anderen pharmazeutischen Wirksubstanzen eine relativ hohe Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen chemischen und physikalischen Faktoren auf, insbesondere gegen Enzyme wie Proteasen, die Peptidbindungen spalten. Es sind daher alle Maßnahmen, die bei der Gewinnung, Reinigung und Lagerung intakter therapeutischer Proteine zur Erhaltung ihrer Integrität und Stabilität beitragen, von großer ökonomischer Bedeutung.

Veränderungen therapeutischer Proteine - und das trifft auf alle Proteine zu - können durch intramolekulare Umlagerung oder durch chemische Umsetzungen, wie Spaltung oder Bildung kovalenter Bindungen, erfolgen. Ein Enzym, das ein therapeutisches Protein als sein Substrat erkennt, kann dasselbe weitgehend verändern und soweit es sich um eine Protease handelt, zu ein oder mehreren Spaltungen in der Peptidkette des Proteins führen. Bereits in den Ausgangsmaterialien zur Herstellung von sowohl natürlichen als auch gentechnologisch gewonnenen therapeutischen Proteinen können solche Enzyme wie auch ihre Vorstufen, die als Proenzyme, oder im Fall von Proteasen, auch als Zymogene bezeichnet werden, enthalten sein. Enzyme, die auf Proteine einwirken, sind in den meisten Fällen selbst Proteine und können sowohl frei als auch bereits an ihre Substrate gebunden vorliegen. Ebenso können Zymogene als Substrate vorliegen oder bereits mit ihren spezifischen Enzymen, die sie in Proteasen überführen, verbunden sein.



Enzymatische Einwirkungen auf therapeutische Proteine während ihrer Herstellung und Lagerung, beginnend vom Ausgangsprodukt bis zum Endprodukt, können zu hohen Verlusten und labilen Endprodukten führen (Anderson et al. 1986; Eaton et al. 1986; Brummel et al. 1999).

Bereits in vielen Ausgangsmaterialien sind Enzyme vorhanden, die auf therapeutische Proteine einwirken, ebenso deren Proenzyme und Pro-Kofaktoren, die während des Reinigungsvorganges durch Aktivierung zur weiteren Bildung von solchen Enzymen führen. Pro-Kofaktoren sind ebenfalls Proteine, die durch Einwirkung von Proteasen zu Kofaktoren abgebaut werden, selbst aber keine Enzyme sind. Kofaktoren steigern spezifisch bestimmte Proteaseaktivitäten um ein Vielfaches.

Solche Enzyme, Proenzyme, Kofaktoren oder Prokofaktoren können selbst als therapeutische Proteine zur Anwendung gelangen, vorausgesetzt, dass durch Inaktivierungs- bzw. Abreinigungsvorgänge virale Krankheitserreger, wie sie im Blut oder gentechnologisch gewonnenen Biomassen vorkommen können, im Zuge der Herstellung der pharmazeutisch aktiven Substanz inaktiviert bzw. abgereichert wurden.

Die Blutgerinnungskaskade ist eines der bestbekanntesten Enzymsysteme. Sie wird durch einen Enzymkofaktor, den lipidhaltigen Tissue Faktor, der die Enzymaktivität des Gerinnungsfaktors VIIa um ein Vielfaches erhöht, ausgelöst. Der Tissue Faktor kommt normalerweise nur in Zellen vor und kann dadurch mit dem Gerinnungsfaktor VIIa nicht in Wechselwirkung treten. Durch pathologische oder traumatische Ereignisse kann der Tissue Faktor an die Oberfläche von Tissue-Faktor-hältigen Zellen gelangen, bzw. aus diesen Zellen austreten. Mit den im Blut immer vorhandenen geringen Mengen Faktor VIIa kann dann die Enzymkaskade ausgelöst werden. Der Endpunkt dieser Gerinnungskaskade ist das Enzym Thrombin, das so über den extrinsic und common Pathway entsteht und Fibrinogen in Fibrin überführt. Fibrinogen, das auch als therapeutisches Protein verwendet werden kann, wird von Thrombin in Fibrinmonomer und Fibrinopeptide gespalten. Fibrinmonomer polymerisiert zu Fibrinsträngen und schließlich zu einem Netzwerk, das im Wundbett zu einem Wundverschluss und damit zur Beendigung einer Blutung

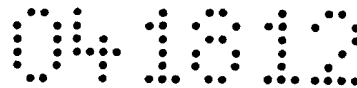


führen kann. Fibrinogen ist weder Enzym noch besitzt es Kofaktoreneigenschaften (Lawson et al. 1994; Hemker 2002; Mann et al. 2002).

Thrombin wirkt aber nicht nur auf Fibrinogen enzymatisch ein, sondern führt auch unter anderem das Proenzym Gerinnungsfaktor XIII in das Enzym Gerinnungsfaktor XIIIa über. Dieses bewirkt als Transglutaminase durch Quervernetzungen der Fibrinstränge im dreidimensionalen Fibringerüst eine erhöhte biomechanische Stabilität des gebildeten Fibrinnetzwerkes und ebenso einen Schutz vor enzymatischem Abbau. Im durch die Thrombineinwirkung geronnenen Blut, bzw. Plasma, kommt es zu weiteren wichtigen enzymatischen Vorgängen, insbesondere der Thrombinbildung aus dem Proenzym Prothrombin, dem Gerinnungsfaktor II. Dadurch kommt es zu einer starken Erhöhung der Thrombinkonzentration im geronnenen Blut, die nicht nur die komplette Umwandlung des Gerinnungsfaktors XIII in XIIIa, sondern auch die Aktivierung des Proenzym TAFI zum Enzym TAFIa verursacht. Dieses Enzym spaltet von Fibrin ein kurzes Peptid ab, das Rezeptoren für einen fibrinolytischen Enzymkomplex enthält und so der Resistenz von Fibrin gegenüber fibrinolytischen Einflüssen dient. Für diese Vorgänge ist eine relativ hohe Konzentration von Thrombin im bereits geronnenen Blut erforderlich, die durch Aktivierung des im geronnenen Blut vorhandenen Prothrombins generiert werden kann (Siebenlist et al. 2001).

Die stark erhöhte Bildung von Thrombin im Blutgerinnsel selbst kommt nicht mehr über den extrinsic Tenasepathway zustande, sondern über den intrinsic Tenase- und den common Pathway. Schon geringe Mengen Thrombin führen in Anwesenheit von Faktor VIII und Faktor IXa und gerinnungsaktivem Phospholipid zur Bildung des intrinsic Tenasekomplexes, der ebenso wie der extrinsic Tenasekomplex, aber 50fach stärker, die Aktivierung durch proteolytische Spaltung des Gerinnungsfaktors X in Xa bedingt, der dann zur Thrombinbildung durch Aktivierung von Prothrombin führt (Mutch et al. 2001).

Bei physiologischen wie auch bei pathophysiologischen Gerinnungsvorgängen bewirken bestimmte zelluläre Phospholipidstrukturen in und an Zellen, insbesondere in Blutplättchen, eine zusätzliche, starke Beschleunigung bestimmter enzymatischer



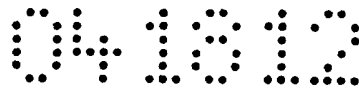
Vorgänge in der Gerinnungskaskade, zusätzlich zu den aktivitätserhöhenden, hochmolekularen Kofaktoren.

### Stand der Technik

Schon bei den bisherigen Methoden zur Gewinnung therapeutischer Proteine wurden Reinigungsbedingungen angewandt, die Enzymwirkungen auf die zu gewinnenden Proteine zu minimieren suchten, indem zum Beispiel der Reinigungsvorgang bei möglichst niederen Temperaturen und/oder durch Zusatz von Inhibitoren durchgeführt wurde (Kunicki et al. 1987 und 1992; Johnson et al. 1994 und 1996; Rotblat et al. 1985). Trotzdem erwies sich diese Vorgangsweise insbesondere bei Proteinen, die einer leichten enzymatischen Spaltung unterliegen, als nicht ausreichend. Ebenso wurden die Abreinigung solcher Enzyme, ihrer Proenzyme, Kofaktoren und Prokofaktoren während des Reinigungsverfahrens nicht ausreichend quantitativ verfolgt und somit auch die Nachbildung solcher Enzyme während des gesamten Herstellungsverfahrens nicht genügend berücksichtigt. Viele der bisher gewonnenen therapeutischen Proteine waren aus diesem Grund nur in unzureichender Ausbeute mit veränderter und verminderter biologischer Wirksamkeit sowie mit hoher Labilität, insbesondere bei der erforderlichen Lagerung des fertigen Arzneimittels, gekennzeichnet.

Die bei der Reinigung bisher verwendeten Enzyminhibitoren wiesen eine zu geringe Avidität und/oder Konzentration auf. Dadurch konnten Enzyme, die bereits an ihr Substrat gebunden waren, nur unzureichend neutralisiert werden. Weiters wurde auch nicht darauf geachtet, die Konzentration von Enzyminhibitoren während des Reinigungsvorganges möglichst konstant zu halten.

### Problemstellung



Gentechnologisch gewonnene, therapeutische Proteine können bereits bei ihrer Expression und Ausschleusung aus Zellen proteolytische Enzyme gebunden haben bzw. solche, die im Kulturmedium vorhanden sind, binden. Ähnliches trifft auch auf therapeutische Plasmaproteine zu. Bei der Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung von Plasma können vor allem proteolytische Enzyme gebildet werden, die Plasmaproteine als ihr Substrat erkennen. Dadurch kommt es zunächst zur Bildung von Protease-Substratkomplexen und in weiterer Folge zur enzymatischen Spaltung des Substrats.

Nach einer solchen Komplexbildung mit einem therapeutischen Protein als hochmolekularem Substrat sind Proteasen durch Inhibitoren nicht oder nur mehr geringfügig hemmbar. Durch diese Vorgänge können therapeutische Proteine bereits bei ihrer Herstellung und insbesondere bei der Lagerung weitgehend in ihrer Qualität verändert oder zerstört werden. Die Verminderung der Qualität therapeutischer Proteine liegt insbesondere in der Verminderung ihrer Bioverfügbarkeit, die sich durch eine verminderte *in vivo* Recovery und Reduktion der Halbwertszeit manifestiert. Es kommt bereits während der Herstellung von therapeutischen Proteinen zu Schwierigkeiten, sehr oft zur homomeren und heteromeren Aggregatbildung, die sich bis zur sichtbaren Partikelbildung unlöslicher Aggregate auswirkt, zu Erhöhungen der Viskosität, Verlangsamung der erforderlichen Filtrationsschritte, Ausbeutenverminderung und unbefriedigender Stabilität bei Lagerung der intermediären Fertigprodukte.

### Aufgabenstellung

Die Aufgabestellung ergibt sich aus der unbefriedigenden Ausbeute an therapeutischen Proteinen bei den erforderlichen Reinigungsprozessen und ebenso aus der Qualitätsminderung dieser Proteine aufgrund einer Veränderung ihrer molekularen Struktur. Es ist daher erforderlich, Herstellungsverfahren zur Anwendung zu bringen, die eine Aufarbeitung des Ausgangsmaterials erlauben, ohne dass es zu enzymbedingten Veränderungen der therapeutischen Proteine während des erforderlichen Reinigungsprozesses, inklusive der Virusentfernung kommt.

Somit ist es erforderlich, dass bei der Herstellung und Lagerung therapeutischer Proteine diese durch entsprechende Abreinigung und/oder Zusatz von Enzyminhibitoren von allen direkten Einwirkungen von Enzymen, die sie als Substrate erkennen, sowie von indirekten Einwirkungen durch Proenzyme, Kofaktoren und Prokofaktoren geschützt sind.

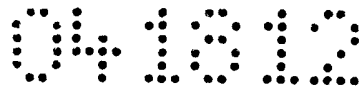
### Aufgabenlösung

Die Lösung der Aufgabenstellung wird durch konsequent eingehaltene Herstellungs- und Zwischenlagerungsbedingungen erreicht, bei denen die Einwirkung eines oder mehrerer Enzyme auf ein oder mehrere therapeutische Proteine weitestgehend unterbunden wird, ebenso wie die Bildung solcher Enzyme aus ihren entsprechenden Proenzymen.

Zur Festlegung dieser Bedingungen werden die Mindestmengen eines oder mehrerer im Ausgangsmaterial enthaltener Enzyme bestimmt, die zu einer noch nachweisbaren Veränderung des oder der therapeutischen Proteine führen. Nach Abschätzung der voraussichtlichen Herstellungsdauer zur Gewinnung der aktiven pharmazeutischen Substanz wird die geringste Menge einer oder mehrerer Enzymaktivitäten bestimmt, die während dieses Zeitraums bereits zu einer Veränderung des oder der therapeutischen Proteine führt. Durch Einhaltung einer festzulegenden Temperatur, Ionenkonzentration zugesetzter, anorganischer und organischer Verbindungen, Einstellung von Redoxpotenzialen und Zusatz geeigneter Enzyminhibitoren wird während der Herstellung und Lagerzeit eine komplette Sistierung der Enzymaktivität, bzw. Enzymaktivitäten aufrecht erhalten. Wenn die Lagertemperatur der Endprodukte und der daraus hergestellten Arzneimittel die Herstellungstemperatur überschreitet, oder andere Faktoren noch vorhandene Enzymaktivitäten ansteigen lassen, werden bei der Formulierung des Arzneimittels noch die erforderlichen Enzyminhibitoren zugesetzt, um einen entsprechenden Schutz der therapeutischen Proteine gegen eine Enzymeinwirkung zu erreichen.

Noch vorhandene Restaktivitäten von Enzymen werden während des gesamten Herstellungsvorganges in Proben von allen Zwischenprodukten durch Zusatz





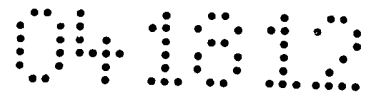
stabiler, empfindlicher, niedermolekularer Substrate für die einzeln zu verfolgenden Enzyme gemessen. Wenn in einer bestimmten Zwischenstufe die Enzymaktivität die festgelegten Mindestgrenzen übersteigt, wird umgehend die Konzentration des oder der verwendeten Inhibitoren erhöht.

Erfindungsgemäß wird die Kontrolle einer bestimmten Enzymaktivität so durchgeführt, dass ein empfindliches, niedermolekulares Substrat für die zu bestimmende Protease ausgewählt wird und während des jeweiligen Herstellungsprozesses in einer Parallelprobe die Spaltung des Substrats pro mg und/oder Aktivitätseinheit des therapeutischen Proteins während der gesamten Prozessdauer unter denselben Bedingungen wie denen der Hauptmenge erfolgt und gemessen wird.

Die Enzymaktivität während eines gesamten Herstellungsprozesses wird durch die Menge des gespaltenen, niedermolekularen Substrats bestimmt und darf einen empirisch festgelegten Grenzwert nicht überschreiten. Das entsprechend gewählte, niedermolekulare Substrat ist vorzugsweise ein chromogenes Substrat und soll in der Parallelprobe, die nach jedem Produktionsschritt gezogen werden kann, in einer 200  $\mu\text{M}$  Konzentration, d.h. in großem Überschuss zu den zu erwartenden Enzymkonzentrationen vorliegen.

Die Erfindung betrifft somit aus virussicheren, pharmazeutischen Wirkstoffzubereitungen hergestellte, lagerfähige Arzneimittel, die ein oder mehrere aus Plasma oder gentechnologisch gewonnene, intakte, therapeutische Proteine als aktive pharmazeutische Substanz bzw. Substanzen enthalten, wobei in den Wirkstoffzubereitungen weder freie, noch an ihre Substrate gebundene, aktive Enzyme, insbesondere Proteasen, vorhanden sind, die gegen das bzw. die vorhandenen therapeutischen Proteine wirken.

Vorteilhaft enthalten die Wirkstoffzubereitungen auch keine aktiven Proteasen oder Proteasekaskaden, die die Zymogene der oben bezeichneten Enzyme aktivieren.



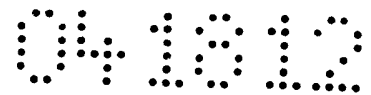
Bevorzugt sind auch keine hochmolekularen Kofaktoren oder Pro-Kofaktoren in den Wirkstoffzubereitungen enthalten, die direkt oder indirekt die Einwirkung von Enzymen auf die darin enthaltenen therapeutische Proteine fördern.

Die Erfindung betrifft auch Wirkstoffzubereitungen, die einen oder mehrere atoxische, virussichere, hochmolekulare, vorzugsweise allogene Proteaseinhibitoren enthalten und die die Aktivierung von Zymogenen durch Proteasen oder durch Proteasekaskaden und ebenso die proteolytische Wirkung der aus den Zymogenen gebildeten, gegen das in den Wirkstoffzubereitungen vorhandene, therapeutische Protein, bzw. die therapeutischen Proteine wirkenden Proteasen hemmen.

Erfindungsgemäß sind auch therapeutische Proteine zur Herstellung von erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen, die ein oder mehrere atoxische, virussichere, hochmolekulare Enzyminhibitoren in einer Endkonzentration enthalten, die die Wirkung der therapeutischen Proteine nicht beeinflusst.

Die Erfindung betrifft ferner Reinigungsverfahren zur Gewinnung therapeutischer Proteine aus Blut oder Biomassen, um auf diese Proteine einwirkende Enzyme, insbesondere Proteasen, zu entfernen und deren enzymatische Wirkung während aller Stufen im Reinigungsprozess sowie bei der Lagerung von Ausgangsmaterialien, Zwischen- und Endprodukten dadurch so nieder als möglich zu halten, als eine Temperatur von 10° C nicht überschritten wird, enzymaktivierende Ionen durch Komplexbildung unwirksam gemacht und/oder enzymhemmende, anorganische und organische Ionen und Zwitterionen zugesetzt und/oder Redoxpotenziale mit atoxischen Reduktions- oder Oxydationsmitteln so eingestellt werden, dass am Ende des Herstellungsprozesses mindestens 60%, vorzugsweise 95%, der therapeutischen Proteine funktionell voll erhalten sind, wobei die zugesetzten Hilfsmaterialien wieder entfernt werden.

Erfindungsgemäße können auch zusätzlich atoxische, chaotrope Substanzen eingesetzt werden, die eine Enzym-Substratbindung dissoziieren bzw. eine solche Bindung nicht zustande kommen lassen und dadurch die Trennung von an therapeutische Proteine gebundenen Enzymen, insbesondere Proteasen,



verbessern, und die chaotropen Substanzen nach dem Trennverfahren wieder entfernt werden.

Zur Virusinaktivierung von therapeutischen Proteinen, die frei von aktiven, gegen therapeutische Proteine wirkenden Enzymen sind, können viruzide Chemikalien bei Zimmertemperatur oder erhöhten Temperaturen zugesetzt und diese nach Beendigung des Virusinaktivierungsverfahrens wieder von den therapeutischen Proteinen abgetrennt werden.

Eine weitere Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass enzymfreie Lösungen von therapeutischen Proteinen durch Nanofiltration bei Temperaturen zwischen 20° und 40° C unter Verwendung von Nanofiltern mit einer Porenweite von 75 nm und 35 nm sowie vorzugsweise einer zusätzlichen Nanofiltration durch Filter mit Porenweiten von 20 nm und/oder 15 nm virusabgereichert werden.

Zur Reinigung und zur Entfernung von Viren können durch Einhaltung einer Minimalkonzentration von erforderlichenfalls virussicheren, hochmolekularen, vorzugsweise allogeenen Enzyminhibitoren auch noch Restaktivitäten von Enzymen in allen Zwischenprodukten bei ihrer Herstellung und Lagerung gehemmt werden, und die hochmolekularen Inhibitoren nachfolgend soweit entfernt werden, dass die Wirkung der therapeutischen Proteine bei ihrer Anwendung nicht beeinträchtigt wird.

Die Erfindung betrifft auch ein virussicheres Fibrinogen als aktive pharmazeutische Substanz in Arzneimitteln, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es mit weniger als 4% Fibrinmonomerkomplexe bezogen auf das Gesamtprotein (Fibrinogen und Fibrinogenmonomerkomplexe) und weniger als 1  $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen aufweist.

Erfindungsgemäß ist ferner in flüssigem Zustand lagerfähiges, Fibrinogen-hältiges Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine Thrombinaktivität von weniger als 1  $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen enthält.

Die Erfindung betrifft ferner eine virussichere Faktor-VIII-Zubereitung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie keine nachweisbare Thrombinaktivität und einen Antithrombingehalt von weniger als 10 arbiträren Antithrombineinheiten pro Einheit Faktor VIII aufweist.

Erfindungsgemäß ist auch ein Arzneimittel, welches plasmatischen Faktor VIII enthält, wobei der Faktor VIII zu maximal 20% in aktivierter Form (FVIIIa) vorliegt.

Die Erfindung betrifft auch Methoden, Reagenzien oder zusammengesetzte Reagenzien, die mit Hilfe einer Langzeitinkubation zwischen 10 und 1000 Stunden, vorzugsweise 30 bis 100 Stunden, unter Einhaltung ihrer vorgegebenen Enzyme in piko- und femtomolaren Konzentrationen in Anwesenheit ihrer natürlichen Substrate bei Temperaturen zwischen 0° C und 45° C nachweisbar und bestimmbar machen.

Enzymatische Umsatzprodukte, die durch Enzyme in mikro- bis femtomolaren Konzentrationen verursacht werden, in erfindungsgemäß hergestellten therapeutischen Proteinen können durch Massenspektrometrie, HPLC, Gelfiltration und chromatographische, elektrophoretische oder immunologische Methoden nachgewiesen oder bestimmt werden.

Der analytische Nachweis und die Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten kann mit Hilfe von chromogenen oder fluorogenen Substraten durch Zusatz chaotroper Agenzien verbessert werden.

Die Enzymaktivitäten können an Proben zur In-Prozess-Kontrolle bestimmt werden.

Die Enzymaktivitäten können bestimmt werden, um eine optimale Stabilität von Endprodukten durch eine entsprechende Formulierung und optimale Lagerbedingungen zu erreichen.

Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung werden an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele:

## 1. Ultrasensitive Bestimmung von Thrombin:

Durch entsprechende Langzeitinkubation eines Enzyms mit einem geeigneten Substrat bei seinem Temperaturoptimum und optimalem pH-Wert kann eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit der Bestimmung der Enzymaktivität erreicht werden. Bei einer Langzeitinkubation ist es erforderlich, sowohl das Enzym als auch das Substrat zu stabilisieren. Dies wird dadurch erreicht, dass die Bestimmung der Thrombinaktivität in einer Lösung durchgeführt wird, die 1% Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von zwischen 6000 bis 8000 enthält. Die Inkubationszeit kann mit 15 Stunden festgelegt und es können Proben aus einem Thrombinansatz nach 3 Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten, 1 1/2 Stunden, 5 Stunden und 15 Stunden entnommen werden. Je nach verwendetem Substrat kann die Thrombinbestimmung noch im Bereich von Mikroeinheiten ( $\mu\text{E}$ ) bis Nanoeinheiten (nE) vorgenommen werden.

Um die Thrombinaktivität während der Zwischenlagerung von Intermediärprodukten bzw. Fertigarzneimitteln, die thrombinempfindliche, therapeutische Proteine enthalten, zu messen, kann die Inkubationszeit auch wesentlich verlängert und die Temperatur entsprechend der erforderlichen Lagertemperatur verändert werden. Diese Methode ist auch geeignet, akzelerierte Stabilitätsuntersuchungen durchzuführen und die Eignung von bestimmten Thrombininhibitoren zu untersuchen. Ein entsprechender Versuchsansatz kann wie folgt durchgeführt werden:

Aus einer zu untersuchenden Probe wird eine geometrischen Verdünnungsreihe mit einem 50 mM Trispuffer pH 8,3 hergestellt, der noch 1% PEG (Molekulargewicht 6000 bis 8000) und NaCl in einer 100 mM Konzentration enthält. Dieser Puffer wird auch zur Herstellung einer 400  $\mu\text{M}$  Lösung von dem chromogenen Substrat S-2238 verwendet, und es werden 500  $\mu\text{L}$  der S-2238-Lösung zu jeder der Probeverdünnungen zugesetzt. Als Kontrolle werden 500  $\mu\text{L}$  der S-2238-Lösung, der 500  $\mu\text{L}$  Trispuffer zugesetzt wurden, verwendet. Diese Ansätze können bei den gewünschten Temperaturen ( $0^\circ\text{C}$  bis  $45^\circ\text{C}$ ) bis zu mehreren Wochen inkubiert werden. Gespaltenes Substrat S-2238 wird

photometrisch gemessen. Von den abgelesenen Extinktionswerten wird der Extinktionswert der Kontrolle abgezogen und der Differenzwert mit Hilfe einer Standardkurve zur Berechnung der Enzymaktivität verwendet.

## 2. Bestimmung der Integrität von Fibrinogen durch Quantifizierung des Fibrinopeptids A:

Intaktes, reines Fibrinogen enthält weniger als 1 o/oo freies Fibrinopeptid A. Fibrinogen wird durch die Protease Thrombin proteolytisch in Fibrinopeptid A und Fibrinopeptid B, die je ein Molekulargewicht von etwa 1500 besitzen, und das Fibrinmonomer mit einem Molekulargewicht von etwa 330000 gespalten. Fibrinmonomere werden von Fibrinopeptiden mit 75%igem Äthanol bei Raumtemperatur abgetrennt. Das dabei ausgefällte Fibrinogen und Fibrinmonomer wird durch Zentrifugation von den sich im Überstand befindlichen Fibrinopeptiden abgetrennt und der Überstand zur vollkommenen Entfernung von Fibrinogen und Fibrinmonomer mit einer Bentonitsuspension in 75%igem Äthanol versetzt. Bentonit wird durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand quantitativ in einen Verdampfungskolben übergeführt, das Bentonitsediment mit 75%igem Äthanol aufgeschwemmt, zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in den Verdampfungskolben gebracht. Die Lösung wird im Verdampfungskolben im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand in einer gemessenen Menge Puffer aufgenommen und der Gehalt an Fibrinopeptid A mit Hilfe eines Elisa-Testkits bestimmt. Die in diesem Testkit beschriebene Abtrennung von Fibrin und Fibrinmonomeren durch Bentonit hat sich als nicht ausreichend erwiesen (Novitec®, HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg).

Bei einer kompletten Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin bilden sich aus einer Million ng Fibrinogen etwa 5000 ng Fibrinopeptid A. Wenn nur 1% des vorliegenden Fibrinogens gespalten wird, werden dementsprechend nur 50 ng Fibrinopeptid A gebildet. Mit Hilfe eines entsprechend empfindlichen Elisa-Tests ist es möglich, noch 1 ng Fibrinopeptid A pro mL zu bestimmen, sodass dadurch eine Möglichkeit besteht, die Fibrinogenspaltung durch Thrombin über die gesamte Herstellungs- und Lagerperiode des therapeutischen Proteins Fibrinogen hinreichend genau zu bestimmen.

Zur Durchführung der Bestimmung werden 500  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden fibrinogenhaltigen Lösung, die einen genau bestimmten Fibrinogengehalt, der über 1 mg Fibrinogen pro mL liegen muss, mit 1500  $\mu\text{L}$  absolutem Alkohol vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten, und 3 Minuten zwischen 3000 und 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. 1 mL des Überstandes wird mit 2 mL einer alkoholischen Bentonitsuspension versetzt, die aus 1 mL der im Kit vorhandenen Bentonitsuspension mit 3 mL absolutem Alkohol erhalten wurde. Dieses Gemisch wird nach wiederholtem, starken Schütteln nach 10 Minuten zentrifugiert. 1 mL des Überstandes wird in einem Vakuumverdampfer getrocknet und der Trockenrückstand in 250  $\mu\text{L}$  Trispuffer pH 7,0 gelöst. 100  $\mu\text{L}$  dieser Lösung werden für den Elisa-Test eingesetzt und der Gehalt an Fibrinopeptid A in ng an einer vorher erstellten Standardkurve ermittelt. Die Standardkurve wird wie folgt erhalten:

Fibrinopeptid A (Sigma) wird mit Trispuffer gelöst und durch entsprechende Verdünnungen Fibrinopeptid-A-Lösungen von 1, 2, 5, 10 und 20 ng Fibrinopeptid A pro mL erhalten. Je 100  $\mu\text{L}$  dieser Verdünnungen werden in dem Elisa-Test eingesetzt.

Dieser Test wird als kompetitives Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) durchgeführt. 100  $\mu\text{L}$  der von Proteinen befreiten, Fibrinopeptid-A-hältigen Proben werden eine Stunde mit 100  $\mu\text{L}$  eines anti-Fibrinopeptid-A-Antikörpers bei Raumtemperatur in Mikrotiterplatten gehalten, deren Wells mit einem anti-IGg-Antikörper vorbehandelt sind. Zu jedem der Wells werden 100  $\mu\text{L}$  Fibrinopeptid-A-Biotin-Konjugat zugesetzt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Wells der Mikrotiterplatten wird zu jedem der Wells 100  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Peroxydase-Konjugat zugesetzt und nach 30-minütigem Stehen bei Raumtemperatur die Wells der Mikrotiterplatten einer weiteren Waschung unterzogen. Zu jedem der Wells wird Enzymsubstrat TMB zugesetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Darnach wird die Farbentwicklung mit 100  $\mu\text{L}$  1M Salzsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die abgelesenen Extinktionen sind umgekehrt proportional zur Fibrinopeptid-A-

Konzentration der Proben, deren Gehalt an Fibrinopeptid A mit Hilfe einer Referenzkurve bestimmt wird.

### 3. Herstellung von thrombinfreiem Fibrinogen:

Etwa 650 g Kryopräzipitatpaste, die aus 100 L menschlichem Blutplasma gewonnen wurden, werden in 10 L einer 0,1%igen Natriumzitratlösung bei einer Temperatur von 2° bis 4° C unter Einhaltung eines pH-Wertes von zwischen 7,0 und 7,5 unter Rühren während einer Stunde gelöst. Die Lösung des Kryopräzipitats erfolgt nicht vollständig. Nach Entnahme einer Probe wird das Gesamtgewicht der Lösung bestimmt und die gesamte Lösung eingefroren und bei -20° C gelagert.

In der entnommenen Probe wird der Gehalt an Fibrinogen und Fibrinopeptid A bestimmt. Ebenso wird die Thrombinaktivität mit Hilfe von chromogenem Substrat S-2238 bei 4° C und bei 37° C gemessen. Der Fibrinogengehalt wird nephelometrisch und der Fibrinopeptid-A-Gehalt mit Hilfe einer Elisa-Methode quantitativ bestimmt.

Nach dem Auftauen der Hauptmenge wird, falls die Thrombinbestimmung bei 37° C eine Thrombinaktivität von mehr als 10 µE Thrombin/mL Fibrinogen ergeben hat, eine berechnete Menge rekombinantes r-Hirudin (Lepirudin) zugesetzt, die sich aus einer in einem Vorversuch gemessenen Menge r-Hirudin ergibt, die erforderlich ist, um die Thrombinaktivität auf oder unter 10 µE Thrombin/mg Fibrinogen zu bringen. Die aufgetaute Kryopräzipitatlösung wird bei einer Temperatur, die 5° C nicht übersteigt, mit 150 g Glyzin pro kg Kryopräzipitatlösung versetzt und 30 Minuten gerührt. Das dabei ausgefällte Fibrinogen wird nach 12- bis 24-stündiger Lagerung zwischen 2° C bis 4° C durch Zentrifugation in einer Sharples-Zentrifuge abgetrennt. Die Durchflusszeit wird so eingestellt, dass ein klarer, präzipitatreier Überstand erhalten wird. Der Überstand kann zur weiteren Verarbeitung eingefroren und bei -20° C gelagert werden. In einer Probe des Überstandes werden noch vorhandenes Fibrinogen, Fibrinopeptid A, Thrombinaktivität und Hemmung der Thrombinaktivität bestimmt.



Das durch die Glyzinfällung und Zentrifugation gewonnene Sediment wird in einem 0,1%igem Zitratpuffer von pH 7,0 bis 7,5 gelöst, der Fibrinogengehalt nephelometrisch bestimmt und durch Zusatz von weiterem Zitratpuffer auf eine gewünschte Fibrinogenkonzentration von zwischen 1% und 2% eingestellt. Die Lösung in Zitratpuffer wird bei einer Temperatur von 2° C bis 4° C vorgenommen, ebenso die nachfolgende Zentrifugation des gelösten Glyzinniederschlags bei 10000 bis 15000 Umdrehungen pro Minute und einer Zentrifugationsdauer von mindestens 10 Minuten. Das durch die Zentrifugation erhaltene Sediment wird verworfen und der Überstand mit 1/10 der ursprünglich zugesetzten Menge r-Hirudin versetzt und durch Zusatz von festem Glyzin auf eine Glyzinkonzentration von 15% eingestellt. Der pH-Wert der Suspension soll pH 6,5 nicht unterschreiten und nicht über pH 7,5 liegen. Erforderliche Korrekturen des pH-Werts werden mit einer 1%igen Zitronensäurelösung oder einer 0,1%igen Natronlauge durchgeführt. Die Fällung wird nach 12- bis 24stündigem Stehen bei 2° C bis 4° C zentrifugiert und das erhaltene Fibrinogensediment in 0,1%iger Zitratlösung bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 gelöst. Falls die Lösung mehr als 1 $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen enthält, wird weiteres r-Hirudin zugesetzt, um die Thrombinaktivität unter 1 $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen zu bringen. Die Umfällung des Fibrinogens mit Glyzin und der allenfalls erforderliche Zusatz von r-Hirudin kann auch mehrfach wiederholt werden, um eine genügende Reinigung des Fibrinogens zu erzielen.

Ein genügend gereinigtes Fibrinogen liegt dann vor, wenn mindestens 95% des vorhandenen Proteins durch Thrombinzusatz gerinnen, der Fibrinogenpeak in der Gelfiltration mit Superose 6HR 10/30, Amersham, mindestens 94% beträgt und bei Auftragen von 10 $\mu$ g Fibrinogen in der SDS-Gelelektrophorese ein bandenreines Produkt vorliegt. Weiters darf bei der Verwendung eines reduzierenden Puffers kein Fibrinogenband auftreten, und es müssen drei Bande der entsprechenden Fibrinogenketten auferscheinen.

Die so erhaltene Fibrinogenlösung kann von überschüssigem Fällungsmittel durch Diafiltration gegen 0,1%iges Zitrat befreit werden, ebenso von Trinitrobutylphosphat und Tween-80 nach erfolgter Virusinaktivierung. Da die Diafiltration sowie die Virusinaktivierung mit Solvent/Detergent und eine allenfalls

nachfolgende Nanofiltration bei Raumtemperatur durchgeführt werden, ist es allenfalls erforderlich, noch weitere Mengen r-Hirudin zuzusetzen, um die Thrombinaktivität während dieser Herstellungsstufen nicht über 1  $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen ansteigen zu lassen.

Die virusinaktivierte und virusabgereicherte Fibrinogenlösung kann bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren oder gefriergetrocknet gelagert werden. Nach Auftauen bzw. Rekonstitution des gefriergetrockneten Fibrinogens in einem geeigneten Lösungsmittel kann die Formulierung, Sterilfiltration, Portionierung und Verfüllung in Endverbrauchereinheiten vorgenommen werden. Das so hergestellte Fertigarzneimittel kann sowohl in flüssigem oder gefrorenem als auch gefriergetrocknetem Zustand gelagert werden.

Die Integrität des so gewonnenen und zu einem fertigen Arzneimittel verarbeiteten Fibrinogens wird durch die während der gesamten Herstellung und Lagerung gebildete Menge Fibrinopeptid A bestimmt. Die Gesamtmenge des Fibrinopeptids A, bezogen auf die Gesamtausgangsmenge Fibrinogen, darf nicht mehr als 10%, und soll vorzugsweise 5%, betragen.

#### 4. Herstellung von Faktor-VIIIa-freiem Faktor-VIII-Konzentrat:

Eine tiefgefrorene Probe des tiefgefroren gelagerten Überstands der 15%igen Glyzinfällung des gelösten Kryopräzipitats wird nach dem Auftauen mit Hilfe des Faktor VIII Chromogen Kits, DADE Behring, auf die vorhandene, gesamte Aktivität an Faktor VIII untersucht, die sich aus dem vorhandenen Faktor VIII und VIIIa zusammensetzt. Die Bestimmung wird mit und ohne Zugabe des im Kit vorhandenen Thrombins durchgeführt. Die Differenz, die sich aus beiden Bestimmungen ergibt, wird als die Menge Faktor VIII bewertet, die sich durch Thrombin in Faktor VIIIa überführen lässt.

In der Probe wird auch die Menge des vorhandenen Thrombininhibitors in arbiträren Inhibitoreinheiten bestimmt. Falls in der untersuchten Probe weniger als 10 arbiträre Inhibitoreinheiten pro E Faktor VIII vorhanden sind, wird der Inhibitorgehalt durch Zugabe von r-Hirudin entsprechend erhöht.

5 mL der Probe werden durch Ultrafiltration mit Hilfe eines 30 K- oder 50 K-Dalton-Filters durch Waschen mit einem 25 mM Phosphatpuffer, der 0,1% Zitrat enthält, von pH 7,3 von Glyzin weitgehend befreit und das Retentat auf Faktor-VIII-Spaltprodukte untersucht. Durch elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem 5%igen Acrylamidgel und in einem 10%igen Trenngel werden die geblotteten Proteinbande mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die schwere Kette des Faktors VIII auf allenfalls vorhandene Spaltprodukte untersucht.

Die eingefrorene Hauptmenge des Glyzinüberstandes aus Beispiel 3 wird unter Rühren bei 2° C bis 4° C pro kg Überstand mit 350 g  $\beta$ -Alanin versetzt. Der Niederschlag, der die Hauptmenge des Faktors VIII enthält, wird nach 12 bis 24 Stunden Stehen bei 2° C bis 4° C durch Zentrifugation bei einer Umdrehungszahl von zwischen 10000 und 15000 Umdrehungen pro Minute gewonnen, wobei die Durchlaufgeschwindigkeit so gewählt wird, dass ein klarer Überstand resultiert. Das Faktor-VIII-hältige Sediment wird in einer Menge 0,1%igem Zitratpuffer von pH 7,5 gelöst, sodass pro mL ein Faktor-VIII-Gehalt von zwischen 50 und 500 E resultiert. Der gesamte Vorgang wird bei einer Temperatur von zwischen 2° C bis 4° C durchgeführt. Nach Messung der Thrombin-Inhibitormenge wird, falls erforderlich, durch Zugabe von r-Hirudin das Verhältnis von Faktor VIII zu Inhibitor auf 10 arbiträre Thrombininhibitoreinheiten pro 1 E Faktor VIII eingestellt. Die Lösung wird dann bei Raumtemperatur durch Diafiltration gegen eine 0,1%ige Zitratlösung mit einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 von Glyzin und  $\beta$ -Alanin weitgehend befreit, wobei sie vor der Diafiltration durch ein oder zwei Umfällungen mit  $\beta$ -Alanin in Bezug auf Faktor VIII weiter gereinigt werden kann. Weitere Reinigungsschritte können bei Zimmertemperatur durch Chromatographie mit Hilfe von schwachen Anionenaustauschern durchgeführt werden. Ebenso kann die Virusinaktivierung mit Solvent/Detergent und eine nachfolgende, mehrstufige Nanofiltration zwischen 25° C und 30° C erfolgen.

Eine Erhöhung der Faktor-VIII-Konzentration wird, falls erwünscht, durch Diafiltration erreicht. Das erhaltene Faktor-VIII-Konzentrat kann tiefgefroren oder nach Gefriertrocknung zwischengelagert werden. Die aufgetaute, gefrorene

Lösung, bzw. das rekonstituierte, gefriergetrocknete Pulver wird formuliert, sterilfiltriert, portioniert abgefüllt und in den abgefüllten Fläschchen einer weiteren Gefrierdrying unterzogen. Mindestens 80% der vorhandenen Faktor-VIII-Aktivität müssen als intakter Faktor VIII vorliegen, bis zu 20% der Aktivität können durch Faktor VIIIa bedingt sein. In einer Lösung, die 100 E Faktor VIII enthält, darf keine Thrombinaktivität vorhanden sein, wobei eine Bestimmungsmethode verwendet wird, bei der noch 30  $\mu$ E Thrombin pro mL bestimmbar sind.

#### 5. Bestimmung der Enzym-Inhibitorkonzentration.

##### Antithrombinbestimmung:

Das Prinzip der Bestimmung ist die Messung einer Inhibitormenge, die 1000 $\mu$ E Thrombin in 1 mL Puffervolumen in Anwesenheit einer 200  $\mu$ M Konzentration von chromogenem Substrat S-2238 bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden und 37° C um 50% reduziert.

Zur Bestimmung der Antithrombinmenge werden Verdünnungen des Inhibitors in 1%igem PEG zu einer entsprechenden Thrombin-Substratmischung zugefügt und mit Trispuffer auf 1 mL aufgefüllt. Die Kinetik der noch vorhandenen Thrombinaktivität wird mindestens zu vier Zeitpunkten innerhalb des 24-Stundenintervalls bei einer Temperatur von 37° C gemessen. Aus einer vorher erstellten Eichkurve wird jene Menge Inhibitor bestimmt, die 50% der Aktivität von 1000  $\mu$ E Thrombin hemmt. Diese Inhibitormenge wird arbiträr als 1 Antithrombineinheit festgelegt.

Das verwendete r-Hirudin von Hoechst Marion Roussel wurde als Fertigarzneimittel unter dem Handelsnamen Refludan verwendet und auf seinen Gehalt an arbiträren Inhibitoreinheiten untersucht.

Unter Verwendung eines Trispuffers von pH 8,3 und den Zusätzen wie in Beispiel 1 angegeben wird eine geometrische Verdünnungsreihe des r-Hirudins hergestellt, die r-Hirudin in Konzentrationen von 1 bis 16 ng pro mL enthält.

500  $\mu\text{L}$  jeder dieser Hirudinlösungen wird mit 250  $\mu\text{L}$  einer 800  $\mu\text{M}$  Lösung von chromogenem Substrat S-2238 und 250  $\mu\text{L}$  einer Thrombinlösung mit 4 mE Thrombin versetzt und 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Eine Kontrolle, die nur Thrombin in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{E}$  in einer 200  $\mu\text{M}$  chromogenen Substratlösung S-2238 enthält, wird ebenfalls 24 Stunden lang bei 37° C inkubiert. Als weitere Kontrolle dient ein 24-stündiger Inkubationsansatz von 200  $\mu\text{M}$  S-2238.

Nach 24-stündiger Inkubation wird die Extinktion der einzelnen Ansätze bei 405 nm gemessen und von den gemessenen Extinktionen der Extinktionswert der Kontrolle, die nur chromogenes Substrat enthält, abgezogen. Der Extinktionswert der Thrombinlösung, die nur 1000  $\mu\text{E}$  Thrombin pro mL enthält, von der der Leerwert abgezogen wurde, wird als 100% der vorhandenen Thrombinaktivität angesetzt und jene Menge Hirudin ermittelt, die 50% dieser Thrombinaktivität inhibiert.

### Literatur

Andersson LO, Forsman N, Huang K, Larsen K, Lundin A, Pavlu B, Sandberg H, Sewerin K, Smart J. Isolation and characterization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:2979-2983.

Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An Integrated Study of Fibrinogen during Blood Coagulation. *J Biol Chem* 1999; 274:22862-22870.

Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic Processing of Human Factor VIII. Correlation of Specific Cleavages by Thrombin, Factor Xa, and Activated Protein C with Activation and Inactivation of Factor VIII Coagulant Activity. *Biochemistry* 1986; 25:505-512.

Hemker HC. Thrombin Generation in a Reconstituted System: A Comment. *Thromb Haemost* 2002; 87:551-552.

Johnson AJ, Fulton AJ. Antihemophilic Factor Stabilization. United States Patents 1994 and 1996; Patent Numbers 5,278,289 and 5,484,890.

Kunicki TJ, Montgomery RR. Method for Maintaining Intact, Non-Degraded Factor VIII/Von-Willebrand Factor During Blood Processing. United States Patents 1987 and 1992; Patent Numbers 4,710,381 and 5,149,787.

Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A Model for the Tissue Factor Pathway to Thrombin. *J Biol Chem* 1994; 269:23357-23366.

Mann KG, Butenas S. Thrombin Generation in a Reconstituted System: A Reply. *Thromb Haemost* 2002; 87:552-554.

Mutch NJ, Robbie LA, Booth NA. Human Thrombi Contain an Abundance of Active Thrombin. *Thromb Haemost* 2001; 86:1028-1034.

Rotblat F, O'Brien DP, O'Brien FJ, Goodall AH, Tuddenham EGD. Purification of Human Factor VIII:C and Its Characterization by Western Blotting Using Monoclonal Antibodies. *Biochemistry* 1985; 24:4294-4300.

Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (Factor XIII) Mediated Crosslinking of Fibrinogen and Fibrin. *Thromb Haemost* 2001; 86:1221-1228.

## Patentansprüche

1. Aus virussicheren, pharmazeutischen Wirkstoffzubereitungen hergestellte, lagerfähige Arzneimittel, die ein oder mehrere aus Plasma oder gentechnologisch gewonnene, intakte, therapeutische Proteine als aktive pharmazeutische Substanz bzw. Substanzen enthalten, wobei in den Wirkstoffzubereitungen weder freie, noch an ihre Substrate gebundene, aktive Enzyme, insbesondere Proteasen, vorhanden sind, die gegen das bzw. die vorhandenen therapeutischen Proteine wirken.
2. Wie Anspruch 1, indem die Wirkstoffzubereitungen auch keine aktiven Proteasen oder Proteasekaskaden enthalten, die die Zymogene der in Anspruch 1 bezeichneten Enzyme aktivieren.
3. Wie Ansprüche 1 und 2, indem auch keine hochmolekularen Kofaktoren oder Pro-Kofaktoren in den Wirkstoffzubereitungen enthalten sind, die direkt oder indirekt die Einwirkung von Enzymen auf die darin enthaltenen therapeutische Proteine fördern.
4. Wirkstoffzubereitungen wie in Ansprüchen 1 bis 3, die einen oder mehrere atoxische, virussichere, hochmolekulare, vorzugsweise allogene Proteaseinhibitoren enthalten und die die Aktivierung von Zymogenen durch Proteasen oder durch Proteasekaskaden und ebenso die proteolytische Wirkung der aus den Zymogenen gebildeten, gegen das in den Wirkstoffzubereitungen vorhandene, therapeutische Protein, bzw. die therapeutischen Proteine wirkenden Proteasen hemmen.
5. Therapeutische Proteine zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen nach Ansprüchen 1 bis 4, die ein oder mehrere atoxische, virussichere, hochmolekulare Enzyminhibitoren in einer Endkonzentration enthalten, die die Wirkung der therapeutischen Proteine nicht beeinflusst.

6. Reinigungsverfahren zur Gewinnung therapeutischer Proteine aus Blut oder Biomassen, um auf diese Proteine einwirkende Enzyme, insbesondere Proteasen, zu entfernen und deren enzymatische Wirkung während aller Stufen im Reinigungsprozess sowie bei der Lagerung von Ausgangsmaterialien, Zwischen- und Endprodukten dadurch so nieder als möglich zu halten, als eine Temperatur von 10° C nicht überschritten wird, enzymaktivierende Ionen durch Komplexbildung unwirksam gemacht und/oder enzymhemmende, anorganische und organische Ionen und Zwitterionen zugesetzt und/oder Redoxpotenziale mit atoxischen Reduktions- oder Oxydationsmitteln so eingestellt werden, dass am Ende des Herstellungsprozesses mindestens 60%, vorzugsweise 95%, der therapeutischen Proteine funktionell voll erhalten sind, wobei die zugesetzten Hilfsmaterialien wieder entfernt werden.
7. Wie Anspruch 5, indem zusätzlich atoxische, chaotrope Substanzen eingesetzt werden, die eine Enzym-Substratbindung dissoziieren bzw. eine solche Bindung nicht zustande kommen lassen und dadurch die Trennung von an therapeutische Proteine gebundenen Enzymen, insbesondere Proteasen, verbessern, und die chaotropen Substanzen nach dem Trennverfahren wieder entfernt werden.
8. Verfahren zur Virusinaktivierung von therapeutischen Proteinen nach Ansprüchen 5 bis 7, die frei von aktiven, gegen therapeutische Proteine wirkenden Enzymen sind, wobei zur Virusinaktivierung viruzide Chemikalien bei Zimmertemperatur oder erhöhten Temperaturen zugesetzt und diese nach Beendigung des Virusinaktivierungsverfahrens wieder von den therapeutischen Proteinen abgetrennt werden.
9. Ein Verfahren nach Ansprüchen 5 bis 8, wodurch enzymfreie Lösungen von therapeutischen Proteinen durch Nanofiltration bei Temperaturen zwischen 20° und 40° C unter Verwendung von Nanofiltern mit einer Porenweite von 75 nm und 35 nm sowie vorzugsweise einer zusätzlichen Nanofiltration durch Filter mit Porenweiten von 20 nm und/oder 15 nm virusabgereichert werden.
10. Verfahren zur Reinigung und zur Entfernung von Viren nach Ansprüchen 8 und 9, indem durch Einhaltung einer Minimalkonzentration von erforderlichenfalls



virussicheren, hochmolekularen, vorzugsweise allogenen Enzyminhibitoren auch noch Restaktivitäten von Enzymen in allen Zwischenprodukten bei ihrer Herstellung und Lagerung gehemmt werden, und die hochmolekularen Inhibitoren nachfolgend soweit entfernt werden, dass die Wirkung der therapeutischen Proteine bei ihrer Anwendung nicht beeinträchtigt wird.

11. Virussicheres Fibrinogen als aktive pharmazeutische Substanz in Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, dass es mit weniger als 4% Fibrinmonomerkomplexe bezogen auf das Gesamtprotein (Fibrinogen und Fibrinogenmonomerkomplexe) und weniger als 1  $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen aufweist.
12. In flüssigem Zustand lagerfähiges, Fibrinogen-hältiges Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Thrombinaktivität von weniger als 1  $\mu$ E Thrombin pro mg Fibrinogen enthält.
13. Virussichere Faktor-VIII-Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie keine nachweisbare Thrombinaktivität und einen Antithrombingehalt von weniger als 10 arbiträren Antithrombineinheiten pro Einheit Faktor VIII aufweist.
14. Arzneimittel, welches plasmatischen Faktor VIII enthält, dadurch gekennzeichnet, dass der Faktor VIII zu maximal 20% in aktivierter Form (FVIIIa) vorliegt.
15. Methoden, Reagenzien oder zusammengesetzte Reagenzien, die mit Hilfe einer Langzeitinkubation zwischen 10 und 1000 Stunden, vorzugsweise 30 bis 100 Stunden, unter Einhaltung ihrer vorgegebenen Enzyme in piko- und femtomolaren Konzentrationen in Anwesenheit ihrer natürlichen Substrate bei Temperaturen zwischen 0° C und 45° C nachweisbar und bestimmbar machen.
16. Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung enzymatischer Umsatzprodukte in nach den Methoden in Ansprüchen 1 bis 10 hergestellten therapeutischen Proteinen durch Massenspektrometrie, HPLC, Gelfiltration und chromatographische, elektrophoretische oder immunologische Methoden, die durch Enzyme in mikro- bis femtomolaren Konzentrationen verursacht werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der analytische Nachweis und die Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten mit Hilfe von chromogenen oder fluorogenen Substraten durch Zusatz chaotroper Agenzien verbessert wird.

18. Bestimmung von Enzymaktivitäten nach den Ansprüchen 11, 13 und 15 an Proben zur In-Prozess-Kontrolle.

19. Bestimmung von Enzymaktivitäten nach den Ansprüchen 11, 13 und 15, um eine optimale Stabilität von Endprodukten durch eine entsprechende Formulierung und optimale Lagerbedingungen zu erreichen.