



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **307473**

(13) B I

(51) Int Cl<sup>7</sup> C 12 N 9/74, A 61 K 38/48

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	19924453	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1992.11.18	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1992.11.18	(30) Prioritet	1991.11.19, DE, 4137996
(41) Alm. tilgj.	1993.05.20		
(45) Meddelt dato	2000.04.10		

(71) Patenthaver	Centeon Pharma GmbH, Emil-von-Behring-Str. 76, D-35041 Marburg, DE
(72) Oppfinner	Hermann Karges, Marburg, DE Horst Naumann, Marburg, DE
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

---

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av et pasteurisert trombinkonsentrat**

(56) **Anførte publikasjoner** EP 378798  
Mann et al., Jour. Biol. Chem., vol. 246, no. 19, 1971, side 6106-6114, "Multiple Active Forms of Thrombin"

(57) **Sammendrag** Det er beskrevet en fremgangsmåte som på enkel måte tillater fremstilling av et virussikkert trombinkonsentrat fra pasteuriserte konsentrater av protrombinkomplekset, og anvendelse av dette som legemiddel.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte som på enkel måte tillater fremstilling av et virussikkert trombinpreparat fra en pasteurisert oppløsning av et protrombin-kompleks.

5

For utvinning av trombin er det beskrevet flere fremgangsmåter som går ut fra et delvis rensset protrombin og deretter omdanner dette ved tilsats av vevs-tromboplastin og Ca-ioner til trombin.

10

Også fremgangsmåter for omdanning av et urensset protrombin-konsentrat til trombin ved høye saltkonsentrasjoner er kjent. Denne omdanningen foregår bare når alle faktorer av protrombinkomplekset er til stede i tilstrekkelig mengde i blanding. Et ved hjelp av et anionbytter rensset protrombinkompleks kan aktiveres med salt når autoprotrombin C (F X) tilsettes. Også nærværet av F VII er vesentlig.

15

På grunn av faren for å overføre sykdomsfremkallere av viralt opphav (f.eks. hepatitt, AIDS, BSE) med proteiner av menneskelig eller animalsk opphav, er ved fremstillingen av konsentratet som inneholder slike proteiner, inaktiveringsforholdsregler for patogener påkrevde.

20

For fremstillingen av trombin er en rekke fremgangsmåter kjente, som inneholder et inaktiveringstrinn for patogener, eksempelvis ved tørr oppvarming.

25

Det er også kjent fremgangsmåter for virusinaktivering i vandige trombinoppløsninger (DE 3809991).

30

EP 0378798, tilsvarende DE 3843126, beskriver en fremgangsmåte hvorved protrombinkomplekset bindes til en anionbytter og aktiveres med Ca-ioner, vevstromboplasmin og aktivert F Xa.

35

Alle fremgangsmåter som for aktivering av protrombinkomplekset benytter vevstromboplastin har den ulempen at denne deretter ikke kan fjernes og utgjør en kilde for forurensning av produktet.

5

Aktiveringer med høye konsentrasjoner av salter, som kompleksbinder Ca-ioner, som natrium-citrat, har den fordel at protrombinkomplekset ikke kontamineres ytterligere med vevsproteiner. Riktignok kan et ved hjelp av DEAE-veksler renset protrombinkonsentrat ikke aktiveres til trombin når man ikke tilsetter aktivert F X eller vevstromboplastin. Det ville også være fordelaktig å gjennomføre virusinaktiveringen allerede i protrombinkomplekset, for at det sammenlignet med et protrombin labile enzymet trombin ikke må utsettes for den grove fremgangsmåten med virusinaktivering og taper nativitet ved strukturomvandlinger.

10

15

Det er nå overraskende funnet at et ved hjelp av anionbytter renset og pasteurisert protrombinkompleks kan aktiveres til trombin ved tilsats av et oppløselig salt med et anion som med kalsium dannet et tungt oppløselig salt eller et oppløselig kompleks, i en konsentrasjon på minst 0,5 mol/l, når blandingen inneholder en katalytisk mengde trombin (tabell 1, spalte b). Uten salttilsatsen bevirker den samme trombinmengden bare en utilstrekkelig aktivering av protrombinet (tabell 2, spalte c). Videre er aktiveringen temperaturavhengig.

20

25

Gjenstand for oppfinnelsen er følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av et renset og virussikkert trombinpreparat, kjennetegnet ved at en oppløsning av et ved hjelp av en anionbytter renset og en virusinaktivering underkastet protrombinkompleks tilsettes et oppløselig salt med et anion som med kalsium danner et tungt oppløselig salt eller et oppløselig kompleks, i en konsentrasjon på fra 0,5 mol/l og opp til metning, og oppløsningen behandles med en konsentra-

30

35

sjon av trombin på fra >0 til 200, fortrinnsvis 10 til 50, enheter pr. ml.

5 Den nødvendige mengden trombin kan være dannet under rensefremgangsmåten. Ellers tilsettes trombinet.

Protrombinkomplekset kan være utvunnet fra animalsk plasma.

10 Fortrinnsvis anvendes et ved hjelp av DEAE-ionebytter rensset protrombinkompleks, som f.eks. er pasteurisert i henhold til EP 0137428.

15 Istedenfor en pasteurisering kan virusene imidlertid også inaktiveres på en hvilken som helst annen måte.

Som kalsiumbindende anion anvendes fortrinnsvis sulfat-, citrat-, fosfat- eller oksalatanion, spesielt citratanion. Det tilsvarende saltet, fortrinnsvis et alkali- eller ammoniumsalt, anvendes i en konsentrasjon på 0,5 mol/l til 20 den aktuelle metningsgrensen.

Ytterligere foretrukne utførelsesformer er kjennetegnet ved at protrombinkomplekset anvendes fra animalsk plasma eller at det behandles ved 0°C til 50°C, fortrinnsvis ved 28°C, med 25 trombin i 2-100 timer, fortrinnsvis 5-20 timer.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan det på enkel måte fremstilles es nativt, høyrent og virussikkert trombinkon- 30 sentrat, som kan anvendes som haemostyptikum eller i et "plaster" (Gewebekleber) på basis av fibrinogen.

### Eksempler

#### **Eksempel 1**

35 16 ml pasteurisert human-protrombinkonsentrat med 65 E F II/ml ble blandet med 20 E/ml humantrombin og 4 g (25 % vekt/volum) trinatriumcitrat og inkubert etter innløsning av

saltet ved 28°C. Etter forskjellige tidspunkter ble den oppnådde trombinaktiviteten bestemt (tabell 1, spalte b), ved avslutningen av aktiveringen ble citratet utdialysert og trombinet ble lyofilisert etter stabilisering og innstilling av den ønskede aktiviteten.

### Tabell 1

Aktivering av anionbytter-renset protrombinkompleks med mettet citratopløsning avhengig av temperaturen.

10

Trombinaktivitet (IE/ml) for blandingene

Tid (timer)	a) ved 4°C	b) ved 28°C	c) ved 37°C
0	15	20	20
1	n.b.	61	63
3	13	350	1084
5	n.b.	1695	3351
10	18	5858	5141
20	21	8492	7393
25	14	8978	6991
45	94	8109	7575
70	6800	n.b.*	n.b.
96	7700	n.b.	n.b.

25

Høyeste trombin-

aktivitet pr. 1 IE F II

138

117

\*n.b. = ikke bestemt

### Eksempel 2

18 ml pasteurisert human-protrombinkonsentrat med 65 E F II/ml ble blandet med 20 E/ml human-trombin og 4,5 g trinatriumcitrat og etter innløsning av saltet inkubert ved 37°C. Den oppnådde trombinaktiviteten ble bestemt etter forskjellige tider (tabell 1, spalte c).

35

**Eksempel 3**

8 ml pasteurisert human-protrombinkonsentrat med 70 E F II/ml og inkubert ved 37°C uten tilsats av et salt med kalsiumbindende anion. De etter forskjellige tider oppnådde trombinaktivitetene er angitt i tabell 2, spalte c.

**Eksempel 4**

10 ml pasteurisert human-protrombinkonsentrat med 80 E F II/ml ble uten tilsats av trombin blandet med 2,5 g trinatriumcitrat og etter innløsning av saltet inkubert ved 28°C. Etter forskjellige tider ble det tatt prøver og trombinaktiviteten bestemt (tabell 2, spalte b).

**Tabell 2**

Aktivering av protrombinkompleks rensset på anionbyttere avhengig av species for protrombinet, av trombintilsats og tilsats av et salt med Ca-bindende anion.

Trombinaktivitet (IE/ml) for blandingene

Tid (timer)	a) bov. prothr. 28°C, citr.	b) citr., <u>uten</u> trombin, 28°C	c) trombin, uten citr., 37°C
0	11	< 0,1	20
2	224	n.b.*	36
4	767	< 0,1	52
6	2833	n.b.	93
11	4718	< 0,1	222
25	5870	< 0,1	846
45	5921	< 0,1	1090
70	n.b.	< 0,1	1409
101	n.b.	n.b.	1511
<hr/>			
Høyeste trombinaktivitet pr. 1 IE F II	118		22
n.b.* = ikke bestemt			

**Eksempel 5**

20 ml pasteurisert protrombinkonsentrat fra okseplasma med 50 E F II/ml ble blandet med 10 E/ml oksetrombin og 5 g trinatriumcitrat og inkubert ved 28°C. Etter forskjellige tider ble den oppnådde trombinaktiviteten bestemt (tabell 2, spalte a).

**Eksempel 6**

500 ml virus-inaktivert human-protrombinkonsentrat med 75 E F II/ml ble blandet med 15 E/ml trombin og 125 g trinatriumcitrat. Etter innløsning av saltet ved romtemperatur ble oppløsningen inkubert ved 4°C. Etter forskjellige tider ble det tatt prøver og trombinaktiviteten bestemt (tabell 1, spalte a).

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av et rensset og virussikkert trombinpreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at en oppløsning av et ved hjelp av en anionbytter rensset og en virusinaktivering underkastet protrombinkompleks tilsettes et oppløselig salt med et anion som med kalsium danner et tungt oppløselig salt eller et oppløselig kompleks, i en konsentra-  
10 sjon på fra 0,5 mol/l og opp til metning, og oppløsningen behandles med en konsentrasjon av trombin på fra >0 til 200, fortrinnsvis 10 til 50, enheter pr. ml.

2.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes protrombinkompleks fra animalsk plasma.

3.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes protrombinkompleks fra menneskelig plasma.

4.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det behandles med trombin ved 0°C til 50°C, fortrinnsvis ved 28°C.

5.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et ved hjelp av en DEAE-ionebytterrenset protrombinkompleks.

6.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kalsiumbindende anionet er sulfat-, citrat-, fosfat- eller oksalatanion.



7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert  
ved at den aktuelle mengden trombin oppnås under  
5 rensingen og/eller virusinaktiveringen av protrombinkom-  
plekset.

10

15

20

25

30

35