

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 545 A9

(21) A kérelem ügyszám: P/P 00458
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 27.
(30) Elsőbbségi adatok:
1237/91 1991. 06. 20. AT

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/14

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 648414 országkódja: AU
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1992. 06. 17.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(72) Feltalálók:

dr. Eibl, Johann, Bécs (AT)
dr. Elsinger, Friedrich, Bécs (AT)
dr. Linnau, Yendra, Bécs (AT)
dr. Wöber, Günther, Oberwaltersdorf (AT)

(73) Szabadalmas:

IMMUNO AG., Bécs (AT)

(74) Képvisező:

Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó Szabadalmi
és Védjegy Iroda, Budapest

(54) **Vérkészítmény, eljárás az előállítására és eljárás inaktíváló kezelés
vírusinaktíváló kapacitásának a meghatározására**

Az átmeneti oltalom az 1–5. igénypontokra vonatkozik.

A találmány vírusinaktivált vércélesztőre, az e készítmény előállítására szolgáló eljárásra, valamint egy inaktiváló kezelés vírusinaktiváló kapacitásának a meghatározására szolgáló eljárásra vonatkozik.

Vércélesztők alatt olyan emberi vagy állati vér-, illetve plazmaeredetű termékeket értünk, amelyeket terápiás, profilaktikus vagy diagnosztikus alkalmazásra szánunk. Az ilyen termékek enzimeket, proenzimeket, beleértve az alvadási faktorokat, továbbá enzim-kofaktorokat, enzim inhibitorokat, immunglobulinokat, albumint, plazminogént, fibrinogént, fibronektint vagy plazmát tartalmazhatnak.

A vércélesztők alkalmazása fertőzési kockázatot rejt magában, a véradó plazmájában esetleg jelenlévő fertőző anyagok, így a hepatitis vagy AIDS vírus miatt. Még ha kizárólag olyan plazma kerül is feldolgozásra, amelynek a vizsgálata azt mutatta, hogy ezen fertőző anyagoktól mentes, a vizsgálati módszerek korlátozott érzékenysége miatt nem lehet kizárni a betegknél a fertőzési veszélyt. A vércélesztők előállítása során arra kényszerülnek, hogy az esetleg jelenlévő fertőző anyagokat különböző műveletekkel inaktiválják.

A vércélesztőkben lévő kórokozók inaktiválásával bőséges szakirodalom foglalkozik.

A különböző eljárások az alábbi módszereket tartalmazzák:

vércélesztők hevítése vizes oldatban, adott esetben virucid anyagok hozzáadásával,

vércélesztők hevítése vizes oldatban, stabilizátorok jelenlétében,

vércélesztők kezelése szerves oldószerekkel és/vagy detergensszel,

vércélesztők hevítése száraz vagy nedves állapotban,

vércélesztők kombinált kezelése szerves oldószerek/detergens használatával és a vércélesztők hevítése száraz állapotban.

Az összes inaktiváló eljárással arra törekednek, hogy a készítmények potenciális fertőzőképességét megszüntessék biológiai aktivitásuk messzemenő megtartása mellett. Ezt a célt eddig azonban csak albumin készítmények esetén lehetett elérni, mégpedig úgy, hogy a vizes albuminoldatokat 10 órán át 60 °C hőmérsékleten hevítették, minthogy az albumin lényegesen stabilabb hőbehatással szemben, mint az összes többi vér-protein.

A technika mai állását illetően például az alábbi szakirodalmi adatokat ismertetjük.

A DE 2 916 711 számon közzétett szabadalmi bejelentés eljárást ír le véralvadási faktorokat tartalmazó készítmények vizes oldatban való kezelésére 30–100 °C hőmérséklet alkalmazásával, amikor is a véralvadási faktorok oldatához egy aminosavat vagy egy mono- vagy oligoszacharidot vagy cukoralkoholt kevernek.

Az EP 0 053 338 számú közrebocsátási irat IX és X faktort tartalmazó készítményekben a hepatitis vírus inaktiválására ismert eljárást, amely szerint a vércélesztő vizes oldatát kalcium-ionok és adott esetben

egy aminosav és/vagy egy szacharid vagy cukoralkohol jelenlétében melegítik egészen 100 °C hőmérsékletig.

5 Az EP 0 035 204 számú közrebocsátási iratban olyan vizes protein-oldatok inaktiválására szolgáló eljárás szerepel, amelyek VIII faktort, fibronektint, globulint, fibrinogént és más proteineket tartalmazhatnak, ahol a készítményhez egy polioit kevernek és a keveréket 60–75 °C hőmérsékletre hevítik fel.

10 Az EP 0 052 827 számú közrebocsátási irat hepatitis vírusok inaktiválására szolgáló eljárást ír le II és VII faktort tartalmazó vizes oldatban, kelátképző anyag és adott esetben egy aminosav és/vagy egy szacharid vagy cukoralkohol jelenlétében.

15 Az US 4 379 085 számú szabadalmi leírás eljárást ír le plazmaproteinek, így C₁-inhibitor vagy IX faktor hőinaktiválására vizes oldatban, kalcium-citrát vagy ammónium-citrát jelenlétében.

20 Az EP 0 077 870 számú közrebocsátási irat inaktiváló eljárást ír le, ebben egy VIII faktort tartalmazó vizes oldatot aminosavakkal, monoszacharidokkal, oligoszacharidokkal, cukoralkoholokkal és 3–10 szénatomos szénhidrogén- vagy hidroxiszénhidrogénkarbonsavakkal 50–80 °C hőmérsékletre hevítik.

25 A WO 83/04 371 számon nyilvánosságra hozott nemzetközi szabadalmi bejelentés hepatitis vírusok inaktiválására szolgáló eljárást ismert, ahol a vírust tartalmazó készítményt 4–40 °C hőmérsékleten halogénezett szénhidrogénnel, különösen kloroformmal kezelik.

30 Az EP 0 015 055 számú szabadalmi leírás eljárást ír le vércélesztő kezelésére, ahol a terméket vízmentes állapotban mikrohullám besugárzásnak vetik alá a jelenlévő mikroorganizmusok inaktiválása céljából.

35 A XII. Nemzetközi Vértranszfúziós Kongresszusra készített értekezésben [„MIR” Kiadó, Moszkva (1969), Kivonatok, 473–475. oldal] Rosenberg és munkatársai leírtak egy eljárást albumin-tartalmú készítmények és fibrinogén inaktiválására száraz állapotban, 10 órán át 60 °C-on végzett kezeléssel.

40 Az EP 0 094 611 számú közrebocsátási irat VIII faktort tartalmazó készítmény kezelésére – a jelenlévő hepatitis vírusok inaktiválására – szolgáló eljárást ismert, ahol a készítményt száraz állapotban – például liofilizáltan – legalább 60 °C hőmérsékleten kezelik.

45 A WO 82/03 871 számon nyilvánosságra hozott nemzetközi szabadalmi bejelentés véralvadási enzimeket tartalmazó készítmények kezelésére szolgáló eljárást ír le, a készítményeket száraz állapotban hevítik a jelenlévő fertőző vírusok inaktiválása céljából, a száraz állapotot úgy határozták meg, hogy az 5 tömeg%-nál kevesebb vizet jelent.

50 Kitént, hogy a liofilizált VIII faktor koncentrátum száraz hővel 10 órán át 60 °C-on végzett kezelésének ugyan van bizonyos vírusinaktiváló hatása, azonban ezeknek a száraz hővel kezelt termékeknek a beadásával hepatitis és AIDS vírust is át lehet vinni [Eur. J. Epidemiol., 3., 103/118. (1987)]. Annak érdekében, hogy a száraz hővel végzett kezelés hatásfokát emeljék, a WO 88/08 710 számon nyilvánosságra hozott

nemzetközi bejelentésben a hőkezelések sorozatát javasolják.

Az EP 0 378 208 számú közrebocsátási iratban a protein-tartalmú készítményeknél ugyancsak száraz hővel végzett kezeléssel kombinált trialkil-foszfátos kezelést írnak elő.

Az EP 0 159 311 számú közrebocsátási irat szerint a vérkészítményeket szilárd, nedves állapotban kezelik. A készítmény víz-, metanol- vagy etanol-tartalmát 0,05 (5 tömeg%) fölé és 0,70 (70 tömeg%) alá állítják be, majd zárt edényben 50–121 °C hőmérsékleten hevítik.

Az EP 0 050 061 számú szabadalmi leírás biológiai készítmények és gyógyszerek nem denaturáló amfifil (detergens) 0,25–10 tömeg% mennyiségével való kezelését ismerteti. Az alábbiakban a %-ban megadott detergens koncentráció tömeg%-ot jelent. Az EP 0 031 740 számú szabadalmi leírás azonban bemutatja, hogy vírusinaktiválás céljából az egyedül egy detergenssel végzett kezelés viszonylag hatástalan. A hatékony kezeléshez ez a szabadalmi leírás egy detergensből és egy di- vagy trialkil-foszfátból álló keveréket javasol. Itt a detergens koncentrációja 1% és az oldószeré 0,1% volt.

A szakirodalomban [American Journal of Hematology, 35., 142. (1990.)] is szerepel egy szerves oldószer/detergens és hő kombinációjával végzett kezelés, amely szerint a vérkészítményt száraz állapotban hevítik.

Ma azt a vírusinaktiváló eljárást nevezik hatékonynak, amikor egy vérkészítmény mintához nagy dózisban tesztvírust adnak (például véralvadási faktor készítményben körülbelül 10^5 maximális lehetséges titernek megfelelően) és az illető eljárás alkalmazásával való kezelés után a mintában már nem lehet vírust kimutatni, minthogy a vírus titer a kimutathatósági határ alá csökkent.

Az inaktiválás mértékéül az úgynevezett redukciós faktor szolgál, amelyet egy teszt-vírus egyszeri hozzáadása után a kezdeti és végső vírustiter hányadosának útes alapú logaritmusából számítanak ki. Az Európai Közösség bizottságának EC III/8115/89–EN jel irányelveiből ezenkívül ismeretes az úgynevezett összredukciós faktor. Ezt a faktort az egyes egymást követő inaktiváló eljárások redukciós faktorainak az összegéből számítják ki.

A modern orvoslásban fennáll annak a szükségessége, hogy számos vérkészítményt hosszú ideig – sok esetben tartós kezelésként – nagy mennyiségben, megelőzésre is alkalmazzanak. Ez szükségszerűen a fertőző partikulák felhalmozódásához vezet, ezáltal lényegesen megnő a fertőződés kockázata még a már vírusinaktivált készítmények adása esetén is.

A redukciós faktorokat a teljes plazmapool vírus fertőzőitességét tekintve az úgynevezett „worst case situation” eshetőséggel kell összevetni. A szakirodalomból [Allgemeine Medizin, 65., 429–433. (1989.)] ismert, hogy vizsgált és HIV negatívnak talált plazma feldolgozása esetén a plazma-származékoknak 10^5 ID/ml (infektív egységek/ml) HIV tartalma lehet. Feltételezve, hogy egy betegnek élete folyamán összesen körül-

belül 100 liter VIII faktor készítményt adnak be, a plazma-származékokat olyan vírusinaktiváló eljárásnak kell alávetni, amely legalább 10^{10} vírustiter redukciót biztosít, hogy a beteg AIDS vírussal való megfertőzése elkerülhető legyen.

A találmány azt a feladatot tűzi ki célul, hogy olyan vírusbiztos vérkészítményt – kivéve az albumint – bocsásson rendelkezésre, amelytől el lehet várnivaló, hogy a fertőző anyagok átvitele még nagy mennyiség vérkészítmény adása esetén is ki van zárva és amely mégis nagy biológiai aktivitással rendelkezik.

A találmány egyik foganatosítási módja szerint ezt a feladatot fertőző anyagok ellen inaktivált olyan készítménnyel – kivéve az albumint – oldjuk meg, amelynek az összvírus-redukciós faktora legalább 40 és biológiai aktivitása, a fertőző anyagok inaktiválásának megvalósítása előtti aktivitásra vonatkoztatva, legalább 50%-os, amelyet olyan inaktiváló kezeléssel kapunk, amelynek a során

a) a vérkészítményt legalább 2%, előnyösen legalább 5% detergenst tartalmazó vizes oldattal kezeljük, majd szilárd állapotban hevítjük vagy

b) a vérkészítményt szilárd állapotban hevítjük, majd legalább 2%, előnyösen legalább 5% detergenst tartalmazó vizes oldattal kezeljük.

A találmány előnyösen olyan, a fertőző anyagokkal szemben inaktivált vérkészítményre vonatkozik, ahol a vérkészítményt több, mint 10 tömeg% detergenst tartalmazó vizes oldattal kezeljük és szilárd állapotban hevítjük.

A találmány szerinti eljárás egy másik foganatosítási módja szerint a fertőző anyagok ellen inaktivált vérkészítményt – kivéve az albumint –, amelynek az összvírus-redukciós faktora legalább 40 és biológiai aktivitása a fertőző anyagok inaktiválása előtti aktivitásra vonatkoztatva legalább 50%-os, úgy állítjuk elő, hogy a vérkészítményt két vagy több eltérő inaktiváló kezelésnek vetjük alá, ahol legalább az egyik eljárás a vérkészítmény szilárd és nedves, 5–70 tömeg% víztartalmú állapotban történő hőkezeléséből áll. Ennél a kiviteli formánál előnyösen legalább egy módszer egy vizes detergens-oldattal való kezeléséből áll.

A biológiai aktivitást mint enzimatikus aktivitást (például véralvadási enzimek és kofaktorok esetén) vagy mint aviditást (immunglobulinok esetén) vagy mint antigén aktivitást – esetleg aktivitás-marker, illetve antigén-marker alkalmazása révén – határozzuk meg.

A találmány szerinti vérkészítményeket a hagyományos vérkészítményekből úgy állíthatjuk elő, hogy az inaktiválást annyi ideig végezzük, amennyi elégséges ahhoz, hogy elérjük a legalább 40-es összvírus-redukciós faktort. Az időtartamot a vérkészítmény egy mintáján kísérletileg határozhatjuk meg oly módon, hogy a kezelés alatt meghatározott mennyiségű teszt-vírust adunk ismételtelen a mintához és minden kezeléshez csak akkor fogunk hozzá, ha a vírustiter egy meghatározott értékre – előnyösen a kimutathatósági határ alá – csökkent. Az összvírus-redukciós faktor az egyes redukciós faktorok összegéből adódik.

Ha tehát a vírusinaktiválást célzó kezelés folyamán teszt-vírust adunk meghatározott időközönként egy biológiai termékhez, a kezdeti és végső vírustiter meghatározása után a vírustiter arányok tízes alapú logaritmusát az időközök számával megszorozhatjuk és a redukciós faktorokat összeadhatjuk összvírus-redukciós faktorrá. Ez a számítás feltételezi, hogy az utolsó teszt-vírus hozzáadása után a vírustiter redukció nem nagyobb, mint az előző titer redukció volt, ez így is volt.

Teszt-vírusként felhasználható például az AIDS vírus vagy a Sindbis vírus (a hepatitis vírusok modell-virusa).

A találmány alapja az a felismerés, hogy a Tween-el vagy egy technika állása szerinti detergensekkel, 10% alatti detergens-koncentrációval végzett kezelés nem vezet megfelelő eredményre, ha a vérkészítményt további vírusinaktiváló módszerrel nem kezeljük. Ez annak tudható be, hogy a proteinek védőhatást gyakorolnak a vírusokra az inaktiváló szerekkel, így a detergenssekkel szemben. Ezt a védőhatást azonban magasabb Tween vagy detergens koncentrációval ki lehet küszöbölni anélkül, hogy a proteinek biológiai aktivitása lényegesen károsodna. Egy ilyen eljárás lehetővé teszi, hogy elkerüljük további anyagok, például oldószerek adagolását, amelyeknek a toxikus hatása ismert.

Előnyösnek bizonyult, ha a Tween-nel vagy detergensekkel való kezelést 10 tömeg%-nál magasabb és 25 tömeg%-nál alacsonyabb koncentrációval hajtjuk végre, 1–30 perc időtartam alatt, különösen 5,5–8 pH-értéken, 0 °C és 56 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 15 °C és 37 °C között és adott esetben 7–20 mS vezetőképesség mellett.

A találmány szerinti inaktivált vérkészítmények előállításának egy előnyös fogantatósi módja abban áll, hogy a vizes detergens oldattal végzett kezelés előtt vagy után a vérkészítményt forró gőzzel kezeljük, ahol a vérkészítmény víz-, metanol- vagy etanol-tartalmát 0,05 (5 tömeg%) és 0,70 (70 tömeg%) közötti, előnyösen 0,40 (40 tömeg%) értékre állítjuk be szilárd állapotban, és zárt tartályban 50–121 °C hőmérséklettartományban kezeljük.

A találmány egy, legalább egy inaktiváló eljárásból álló inaktiváló kezelés vírusinaktiváló kapacitásának a meghatározására szolgáló eljárásra is vonatkozik a redukciós faktor teszt vírus segítségével történő meghatározásával, amely abban áll, hogy a legalább egy inaktiváló eljárás során a teszt vírust ismételtelen beadagoljuk, és a legalább egy inaktiváló eljárás egyes redukciós faktorait kívánt esetben összegezzük további inaktiváló eljárások redukciós faktoraiival, hogy megkapjuk a összvírus-redukciós faktort.

A találmányt az alábbi példákkal részletesen szemléltetjük.

1. példa

Humán plazmából koagulációs VIII faktort tartalmazó krioprecipitátum-oldatot állítottunk elő az AT 391 808 számú szabadalmi leírás szerint. Az oldat Tween 80 koncentrációját 8 tömeg%-ra állítottuk be és

HIV-1 vírus szuszpenziót adtunk hozzá hétszer 2-perces időközönként. Az össz inkubációs idő 14 percig tartott 25 °C-on, ezután a vírust centrifugáltuk és titerét meghatároztuk. A Tween hozzáadása nélküli minta kontroll értéke $10^{5,1}$ volt. A Tween-nel végzett kezelés után a vírus titer a $10^{0,5}$ kimutathatósági határ alá csökkent és a negatív reverz transzkriptáz teszt alapján 0-nak minősült. Ez $7 \times 5,1 = 35,7$ vírus redukciós faktornak felel meg.

A Tween-mentesített oldathoz újból HIV-1 vírus szuszpenziót kevertünk, liofilizáltuk és az EP 0 159 311 számú közrebocsátási iratban leírt módon 10 órán át 60 °C-on hevítettük 8% víztartalom mellett. A vírus titer $10^{6,2}$ értékről 0-ra csökkent.

Tehát a két inaktiváló lépés 41,9-es össz-vírus-redukciós faktort eredményezett. Ezzel bemutattuk, hogy egy VIII faktor készítménynek, amelyet a fenti feltételek mellett detergensekkel és hővel kezeltünk, össz-vírus-redukciós faktora 41,9 és vírus-biztosnak tekinthető.

A VIII faktor maradék aktivitásának a meghatározását a trombolasztin képződési vizsgálat (2-lépcsős vizsgálat) segítségével végeztük el. A VIII faktor maradék aktivitását a hevített minta VIII faktor aktivitásának és a Tween kezelés előtti kiindulási anyag VIII faktor aktivitásának a hányadosából számítottuk ki, értéke 80% volt.

2. példa

Emberi plazmából a Vox Sanguinis [33., 37/50. (1977.)] című folyóiratban leírt módszer szerint II, IX és X alvadási faktort tartalmazó készítményt (parciális protrombin komplex, PPK) állítottunk elő DEAE-Sephadex-re való adszorbeálással, az ioncserélő mosásával és a komplex eluálásával.

A PPK-t 22% Tween 80-at tartalmazó oldatban összekevertük HIV-1 vírussal és 25 °C-on inkubáltuk. A vírus szuszpenziót 20 másodperces időközönként 15-ször adagoltuk. A Tween-t nem tartalmazó kontroll vírustiter $10^{5,7}$ volt. A Tween kezelés utáni végső vírustiter a $10^{0,5}$ kimutathatósági határ alá esett. Az ebből számított összvírus-redukciós faktor legalább $15 \times 5,2 = 78$. Tehát egy PPK készítménynél, amelynél a fenti Tween kezelést alkalmaztuk, az össz-vírus-redukciós faktor 78-at tett ki, és ezt a készítményt vírusbiztosnak tekintjük.

Az alvadási faktorok aktivitását a IX faktor példáján határoztuk meg oly módon, hogy a vizsgálandó mintát egy IX faktor hiányos plazmához adtuk hozzá, és meghatároztuk az aktivált parciális trombolasztin időt (1-lépcsős vizsgálat), amelyet a Tween kezelés alig befolyásolt. A kezelt minta aktivitásának és a kezeltetlen PPK IX faktor aktivitásának az aránya körülbelül 100% volt.

3. példa

A 2. példa szerinti PPK készítményt modell-vírus jelenlétében (Sindbis, illetve vezikuláris stomatitis vírus = VSV) 12% dimetil-oktil-amin-N-oxiddal inkubáltuk 25 °C-on. A vírus szuszpenziót 5-perces időközönként 10-szer adagoltuk. Detergensekkel végzett keze-

lés után a vírus titer mindig a $10^{0.5}$ kimutathatósági határ alatt volt. A kontroll értékek detergens adagolás nélkül az alábbiak voltak: $10^{6.4}$, illetve $10^{6.1}$. Az ebből számított összvírus-redukciós faktor legalább $10 \times 4,9 = 49$, illetve $10 \times 4,6 = 46$.

A biológiai aktivitást a detergens kezelés alig károsította és körülbelül 100% volt.

4. példa

Plazmát Cohn szerint frakcionáltunk és a fibrinogént tartalmazó Cohn I frakciót modell-vírusokkal (Sindbis, illetve VSV) kevertük össze. Liofilizálás után a 8% vizet tartalmazó koncentrátumot az EP 0 159 311 számú közrebocsátási iratban leírt eljárás szerint 10 órán át 60°C -on, majd 3 órán át 80°C -on hevítettük. A vírustiter $10^{5.5}$ -ről, illetve 10^6 -ról a liofilizálás révén $10^{4.9}$ -re illetve $10^{5.5}$ -re csökkent, majd a 60°C -on végzett kezelés után a $10^{0.5}$ kimutathatósági határ alá csökkent.

A 80°C -on végzett második kezelés inaktíváló kapacitását párhuzamos mintákban határoztuk meg: a liofilizálás a vírustitert $10^{5.5}$ -ről, illetve $10^{6.0}$ -ról újból $10^{4.9}$ -re, illetve $10^{5.5}$ -re csökkentette, és az ezt követő 80°C -os kezelés hatására a kimutathatósági határ alá csökkent.

A redukciós faktor a kétszeri redukció logaritmusából számítva 5, illetve 5,5 mínusz 0,6, illetve 0,5, mivel a fibrinogén készítményt a kétlépcsős kezelés folyamán csak egyszer liofilizáltuk. Tehát a redukciós faktor 9,4, illetve 10,5 volt.

A port ezután 5% oktil-glükózidot tartalmazó közegben feloldottuk, és az oldathoz 5-perces időközönként 9-szer adtunk Sindbis vírust, illetve VSV-t. Inkubálás után (összesen 45 perc 25°C -on) meghatároztuk a vírustitert. A detergensevel végzett kezelés a vírustitert a $10^{0.5}$ kimutathatósági határ alá csökkentette. A detergens hozzáadása nélküli készítmény kontroll értéke $10^{6.9}$ illetve $10^{6.0}$ volt. Az ebből kiszámított vírus redukciós faktor tehát legalább 57,6, illetve 49,5 volt. Így az összvírus-redukciós faktor legalább 67,0, illetve 60,0 volt. Tehát egy fibrinogén készítmény esetén, amelynél a fenti feltételek mellett hőkezelést és detergensevel végzett kezelést alkalmaztunk, az összvírus-redukciós faktor legalább 60,0 és a készítmény vírusbiztosnak tekinthető.

A fibrinogén biológiai aktivitását az oktilglükózidot tartalmazó frakció 8% etilalkohollal kicsapott csapadékában határoztuk meg a fibrin- α -láncok hálósodásának vizsgálatával [Seelich, T., Redl, H.: „Theoretische Grundlagen des Fibrinklebers”, a „Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber” c. kiadványban, szerkesztette: Schimpf, K., Schattauer Verlag, Stuttgart–New York, 199–208. oldal (1980.)] és trombelasztográfiával [Harter, H. értekezése a „Thrombosis and Bleeding Disorders” c. kiadványban, szerkesztették: Bang, N. U. és munkatársai, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Acad. Press New York, London, 70–76. oldal (1971.)], minden esetben a XIII alvadási faktor hozzáadásával.

A Cohn I frakció biológiai aktivitására vonatkoztatva a kezelt fibrinogén biológiai aktivitása 87%-os volt

hálósodási vizsgálattal és 56%-ot mértünk trombelasztográfiával.

5. példa

Megfelelően választott plazmát Cohn szerint frakcionáltunk. A Cohn III frakcióhoz, amely tetanusz toxoid elleni gamma-globulint tartalmazott, 15% Triton X-100 jelenlétében HIV-1, illetve Sindbis vírust adtunk és 25°C -on inkubáltuk. A vírusadagolást 1 perces időközönként végeztük 30-szor. Az összesen 30 perces inkubációs idő után a vírustiter a $10^{2.5}$, illetve $10^{1.5}$ kimutathatósági határ alatt volt. A detergens nélküli kontroll minta titere $10^{5.7}$, illetve $10^{7.5}$ volt. Az ebből számított összvírus-redukciós faktor legalább $30 \times 3,2 = 96$, illetve $30 \times 6 = 180$. Egy gamma-globulin készítmény összvírus-redukciós faktora, ha azt a fenti detergens kezelésnek vetjük alá, legalább 96 és vírusbiztosnak tekinthető.

A biológiai aktivitást aviditási vizsgálattal határoztuk meg. Tetanusz toxoidot mikrotitráló lemezre adszorbeáltunk, zselatinnal fedtük és mostuk. A vizsgálandó gamma-globulin hígításait rávittük az előkészített lemezre és a nem adszorbeálódott immunglobulint kimostuk. A tetanusz toxoidhoz kötött gamma-globulin meghatározását úgy végeztük, hogy az immunglobulin F_c részéhez egy anti-humán IgG-peroxidáz konjugátumot adszorbeáltunk, ezt követően a peroxidáz színreakciót ad a diamino-benzidinnel és H_2O_2 -dal és ennek a reakciónak az extinkcióját mértük.

A gamma-globulin aviditását a tetanusz toxoidhoz a detergens kezelés alig befolyásolta. Nem észleltünk jelentős különbséget a kezelés előtt és után mért aviditás között.

6. példa

C_1 -észteráz inhibitor (amelyet a Vogelaar, E. F. és munkatársai által leírt módon állítottunk elő, Vox Sang., 26., 118–127., (1973.), „Contributions to the Optimal Use of Human Blood”) tartalmazó oldat 0,95 ml-éhez hozzáadtunk 20 mg Triton X-100-at és az oldatot 25°C -on inkubáltuk. A vírusinaktíváló kapacitás meghatározása céljából az oldathoz 5-perces időközönként VSV vírust (10 μl) adtunk. Ötször ismételt vírusadagolás után a vírustiter a $10^{0.5}$ kimutathatósági határ alá csökkent. A detergens adagolás nélküli kontroll minta titere $10^{7.5}$ volt. Az ebből számított vírus redukciós faktor legalább $5 \times 7 = 35$.

A C_1 -észteráz inhibitor DEAE-Sephadex-re adszorbeáltuk és 8,89 g/liter nátrium-kloridot tartalmazó oldattal addig mostuk, amíg detergensmentes nem lett. Az inhibitor deszorpcióját 59 g/liter nátrium-kloridot tartalmazó oldattal végeztük, majd az inhibitor-oldatot 1,0 g/liter nátrium-citrátot és 0,4 g/liter nátrium-kloridot tartalmazó oldattal (pH = 6,8) szemben dializáltuk. Ehhez az oldathoz liofilizálás előtt újra VSV vírust adtunk. A készítményt száraz állapotban 24 órán át 72°C -on hevítettük. A liofilizálás folyamán és az ezt követő hőkezelés alatt a vírustiter $10^{7.2}$ -ről a $10^{0.5}$ kimutathatósági határ alá csökkent. A vírus redukciós faktor tehát legalább 6,7.

A detergenssel és hővel való kezelés vírus redukciós faktorából számított összvírus-redukciós faktor legalább 41,7. Az inhibitor biológiai aktivitását a VSV vírusok inaktiválása alig károsította és körülbelül 100% volt.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fertőző anyagok ellen inaktivált vérkészítmény – kivéve az albumint –, amely vérkészítmény össz-vírus-redukciós faktora legalább 40, biológiai aktivitása a fertőző anyagok inaktiválásának a megvalósítása előtti aktivitására vonatkoztatva legalább 50%-os, amelyet egy olyan inaktiváló kezeléssel állítunk elő, amelynek a során
 - a) a vérkészítményt legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük és ezt követően szilárd állapotban hevítjük vagy
 - b) a vérkészítményt szilárd állapotban hevítjük és ezt követően legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük.
2. Egy 1. igénypont szerinti vérkészítmény, ahol az említett vizes oldat legalább 5% detergenst tartalmaz.
3. Egy 1. vagy 2. igénypont szerinti vérkészítmény, ahol a vérkészítményt 10%-nál több detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük és szilárd állapotban hevítjük.
4. Fertőző anyagok ellen inaktivált vérkészítmény, kivéve az albumint, a vérkészítmény összvírus-redukciós faktora legalább 40 és biológiai aktivitása a fertőző anyagok inaktiválásának a megvalósítása előtti aktivitására vonatkoztatva legalább 50%-os és amelyet egy olyan inaktiváló kezeléssel állítunk elő, ahol
 - a) a vérkészítményt legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük és ezt követően szilárd állapotban hevítjük vagy
 - b) a vérkészítményt szilárd állapotban hevítjük és ezt követően legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük,
 - a) a hevítést forró gőzzel végezzük és a szilárd állapotú vérkészítmény víz-, metanol- vagy etanol-tartalmát több, mint 0,05 (5 tömeg%) és kevesebb, mint 0,70 (70 tömeg%) értékre állítjuk be és zárt tartályban 50–121 °C hőmérséklettartományban kezeljük.
5. Egy 4. igénypont szerinti vérkészítmény, ahol legalább az egyik inaktiváló módszer a vérkészítmény vizes detergens-oldattal való kezeléséből áll.
6. Eljárás vérkészítmény, kivéve az albumint, előállítására. a vérkészítmény összvírus-redukciós faktora legalább 40 és biológiai aktivitása a fertőző anyagok inaktiválásának a megvalósítása előtti aktivitására vonatkoztatva legalább 50%-os és amelyet egy olyan inaktiváló kezeléssel állítunk elő, ahol
 - a) a vérkészítményt legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük és ezt követően szilárd állapotban hevítjük vagy
 - b) a vérkészítményt szilárd állapotban hevítjük és ezt követően legalább 2% detergenst tartalmazó vizes oldatban kezeljük,
 - a) a hevítést forró gőzzel végezzük és a szilárd állapotú vérkészítmény víz-, metanol- vagy etanol-tartalmát több, mint 0,05 (5 tömeg%) és kevesebb, mint 0,70 (70 tömeg%) értékre állítjuk be és zárt tartályban 50–121 °C hőmérséklettartományban kezeljük.
7. A 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a víz-, metanol- vagy etanol-tartalom kevesebb, mint 0,40 (40 tömeg%).