

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98121328.6

[43]公开日 2000年4月12日

[11]公开号 CN 1249952A

[22]申请日 1998.10.7 [21]申请号 98121328.6

[71]申请人 上海市血液中心

地址 200051 上海市伊犁路2号

[72]发明人 许亚勇 黄宇闻 张钦辉
钱开诚 高峰 谢如锋

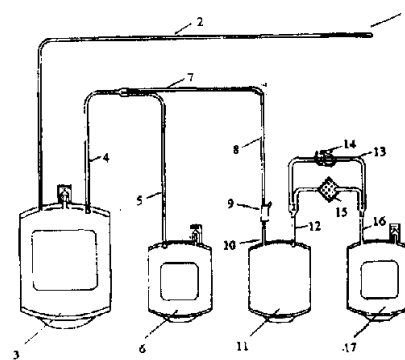
[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书1页 说明书5页 附图页数3页

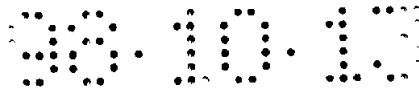
[54]发明名称 血浆病毒灭活的方法及其装置

[57]摘要

本发明涉及一种血浆病毒的灭活方法及其实施该方法的装置,包括从全血中分离得血浆后,添加光敏剂;以30,000—45,000Lx的荧光强度照射20—80分钟;过滤去除白细胞和光敏剂,这样得到了灭活了病毒的血浆。该血浆的整个制备过程在一次性使用、密闭的血液成分采集、分离、去白细胞、吸附光敏剂系统内进行,不需要无菌操作环境;操作方便,安全可靠,易推广应用。

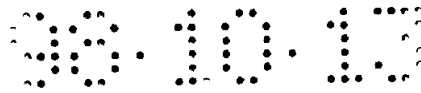


ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

- 1.一种血浆病毒的灭活方法，其特征在于它包括：从全血中分离得血浆后，以光敏剂在血浆中的最终浓度达 0.25-1.5 微摩尔/升的量添加光敏剂；以 30,000-45,000Lx 的荧光强度照射 20-80 分钟；过滤去除白细胞和光敏剂，这样得到了灭活了病毒的血浆。
- 2.根据权利要求 1 所述的灭活方法，其特征在于所述的光敏剂选自亚甲蓝、甲基紫、甲苯胺蓝、局部泌腺 540 和补骨脂素。
- 3.根据权利要求 1 所述的灭活方法，其特征在于所添加的光敏剂在血浆中的最终浓度为 1.0 微摩尔/升。
- 4.一种用于灭活血浆病毒的装置，其特征在于它包括采血针(1)，采血袋(3)，导管(2)、(4)、(5)、(7)、(8)、(10)、(12)、(13)和(16)，第一转移袋(6)，易折导通式光敏剂添加组件(9)，荧光照射袋(11)，去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件(15)和血浆储存袋(17)。
- 5.根据权利要求 4 所述的装置，其特征在于所述的易折导通式光敏剂添加组件(9)包括易折导通式导管接头(20)，光敏剂加液管(21)，储液管(22)和易折封闭头(23)。
- 6.根据权利要求 4 或 5 所述的装置，其特征在于该装置进一步包括血小板保存袋 19，它通过导管 18 与所述的装置相连。



说明书

血浆病毒灭活的方法及其装置

5 本发明涉及临床输注用血浆病毒灭活的方法及实施该方法的装置，特别涉及一种采用光化学方法和过滤、吸附物理方法相结合的血浆病毒的灭活方法及实施该方法的装置。

本发明提及的血浆是一种血液成分，它由供血者捐献的全血中分离或用血液单采技术从捐献者体内分离而得，是临床输血治疗一主要的血液成分。用于临床
10 输注的血浆含有大量不稳定的蛋白、凝血因子，它们往往在制备血浆过程中因环境温度过高而丧失功能。常规制备血浆必须在一定的环境温度下进行，并在血液采集或单采后 6 小时内完成，置于 $-20\sim-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存。

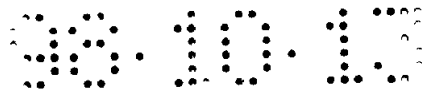
光化学灭活病毒的研究始于 30 年代，自 80 年代起人们在血浆中加入光敏物质-亚甲蓝，发现其吸收光能后对血浆中的脂包膜和一些非脂包膜病毒具有杀灭作用。
15 亚甲蓝灭活病毒的机理是：亚甲蓝与病毒核酸的 G-C 碱基对具有较大的亲和性，当亚甲蓝吸收光能后，可激发产生单态分子氧，这种分子氧的能量形态可破坏病毒的核酸尤其是鸟嘌呤核，从而导致病毒基因的破坏。近年来，因输注未经病毒灭活的血浆或血浆制品导致的病毒性传染疾病严重威胁着人们的健康，已经采用的血浆病毒灭活技术如巴斯德法、有机溶剂/表面活性剂法，均因其仅适用于
20 制备血浆制品等大批量样品的处理，而使临床输注的血浆病毒灭活仍处于实验室摸索阶段。

目前国外已有一些厂商针对临床输注血浆的病毒灭活提出了一些实施方案，如美国专利 U.S. Pat. No. 5,639,376A，但他们存在以下问题：

1. 用于去除白细胞、吸附光敏剂的输血过滤器件没有与血液采集、分离系统
25 组成一体，这在实际操作时血浆易被污染，它对保持被处理血浆中有效成份不受损伤带来诸多不利因素。

2. 光化学法灭活血浆病毒方法中，所采用的光敏剂剂量虽对人体无毒副作用，但输入人体内不易被排泄，超过一定积累量，仍可能会产生毒副作用。光敏剂的添加量决定病毒灭活的效果，以往的灭活技术忽视了它的添加方式，以及灭
30 活病毒后将其即时排除。

3. 给予光敏剂激发态能量的光源可以是全色光，但不同波段不同光强的光源对血浆中蛋白、凝血因子的损伤不一。采用荧光照射可最有效地降低对血浆中有



效成分损伤。

5 目前临床使用的没有光敏剂添加组件和荧光照射塑料袋的四联袋采血密闭系统可进行各种血液成分的制备，其血液成分之一的血浆病毒灭活必须在这一系统中附设光敏剂添加组件和荧光照射塑料袋。由该四联袋系统分离的血浆包括单采血浆仍包含约 1.0×10^7 的白细胞，这些白细胞携带了大量细胞内病毒，光化学法对其灭活效果较差。另外，光化学法添加的光敏剂浓度虽对人体无毒副作用，但若大量输入人体超出一定的积累量，亦有可能产生毒副作用。目前虽无明确证据，但其长期滞留于人体的潜在危害不可忽视。

10 在临床上很需要没有污染、有效成分不受破坏、已灭活病毒并已去除光敏剂和白血细胞的血浆进行输注，以最大限度地降低由于输注血浆对人体造成病毒性疾病的传播。一种理想的、且实际可操作的光化学法灭活临床输注用血浆病毒的流程，应在一密闭的系统内完成。这样的系统既可避免灭活病毒操作繁复时间太长影响有效成分失去功能，又可防止操作时可能引起的二次污染以达到既能灭活细胞内、细胞外病毒，又能保证临床输注安全的目的。

15 本发明的一个目的是提供既可灭活血浆中游离病毒又能去除血浆中存在的细胞内病毒，集血液采集、血浆分离、去除白细胞、吸附光敏剂为一体的血浆病毒灭活方法。

本发明的再一个目的是提供实施上述方法的装置。

本发明的目的是通过下列构思来实现的：

20 一种血浆病毒的灭活方法，其特征在于它包括：从全血中分离得血浆后，以光敏剂在血浆中的最终浓度达 0.25-1.5 微摩尔/升的量添加光敏剂；以 30,000-45,000Lx 的荧光强度照射 20-80 分钟；过滤去除白细胞和光敏剂，这样得到了灭活了病毒的血浆。

25 其中所述的光敏剂选自亚甲蓝、甲基紫、甲苯胺蓝、局部泌腺 540(Merocanine 540, Sigma Chemical Company 生产)、补骨脂素(Psoralen, Sigma Chemical Company 生产)。

一种用于灭活血浆病毒的装置，包括光敏剂添加组件，袋体，去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件，导管，袋体与光敏剂添加组件、去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件组成一密闭系统。

30 其中所述的光敏剂添加组件包括易折导通式导管接头、光敏剂加液管和储液管。

所述的袋体包括采血袋、转移袋、荧光照射袋和血浆储存袋。

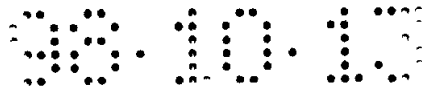


图 1 是灭活血浆病毒的方法流程图。

图 2 是实施所述灭活血浆病毒方法的装置的示意图。

图 3 是易折导通式光敏剂添加组件的示意图。

图 4 是本发明装置的较佳实施方案。

5 图 5 是温控平行振摇式荧光照射仪控制示意图。

下面结合附图对本发明作进一步阐述。

参见附图 2，一种实施灭活血浆病毒方法的装置，包括采血针 1，采血袋 3，
10 导管 2、4、5、7、8、10、12、13 和 16，第一转移袋 6，易折导通式光敏剂添加组件 9，荧光照射袋 11，去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15 和血浆储存袋 17。

采血袋 3 的容积可为常规大小，一般是 200 毫升，第一转移袋 6、荧光照射袋 11 和血浆储存袋 17 的容积大小也可由本技术领域人员根据血浆的容量作出常规的选择，较好的是 200 毫升。所述袋子的材料可为医药上可接受的聚合物材料，如聚氯乙烯等，导管材料可为聚氯乙烯等。

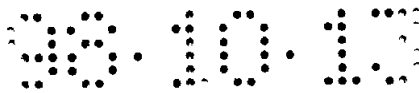
15 去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15 包括至少一个进口和一个出口的塑料外壳，用作滤除白细胞的滤芯材料可以是聚丙烯、聚酯不织布，无钙玻璃纤维、醋酸纤维或它们与天然棉纤维的混合物和对光敏剂亚甲蓝及其产物有强吸附作用的活性碳纤维。通过改变这些滤芯材料表面特征，与血浆的接触截面积或滤芯的填充量，调节自重流动速率，实现白细胞去除率大于 99.9%。

20 进一步的是，过滤部件中还含有活性碳纤维，它对光敏剂及其产物有强的吸附作用，在去除白细胞的同时将 85 % 以上的光敏剂吸附，使其对人体的影响降到最低限度。

参见图 3，所述的易折导通式光敏剂添加组件 9 包括易折导通式导管接头 20，光敏剂加液管 21，储液管 22 和易折封闭头 23。用于光敏剂添加组件的材料可为医用高分子塑料避光材料，如含有色母的聚氯乙烯或医用 PBS。

25 其中储液管 22 的容积可为 3-5 毫升，可由含有棕色色母的聚氯乙烯制成，易折封闭头 23 可由硬性聚氯乙烯注塑制成，这样只需用手一折，封闭头 23 即被打开，从而使导管 8 与组件 9、组件 9 与导管 10 得以沟通。

参见图 4，在本发明的较佳技术方案中，所述的灭活病毒装置可进一步包括
30 导管 18 和血小板保存袋 19。在离心后，采血袋 3 中放置的全血被分离成血浆和血小板，所述的血浆经导管 4 和 7 进入荧光照射袋 11，所述的血小板经导管 7 和 18 进入血小板保存袋 19 供临床上的使用。



5 将用采血针 1 收集的全血放在采血袋 3 中，离心分离后获得的血浆经导管 4 和 5 放在第一转移袋 6 中，折断易折导通式导管接头 20 中的易折封闭头 23，使血浆经导管 7、8 与易折导通式光敏剂添加组件 9 内的光敏剂混合，其中这样选择光敏剂的量，使光敏剂在血浆中的最终浓度为 0.25-1.5 微摩尔/升，然后血浆和光敏剂混合经导管 10 进入荧光照射塑料袋 11，高频热合导管 10。将含有血浆的荧光照射塑料袋 11、去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15、血浆储存袋 17 等组件，置于温控平行振摇式荧光照射仪中，根据图 5 所示的温控平行振摇式荧光照射仪控制示意图的工作方式，在 4-18 ℃ 下于光强度为 30, 000-45, 000Lx 下照射 20-80 分钟来灭活病毒，然后在去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15 以自重流动工作方式、过滤速度为 10-35 毫升/分钟来去除由白细胞携带的病毒并吸附光敏剂，再经导管 16 流入储存袋 17，在冷冻保存前用排气夹 14 排去空气，高频热合导管 16，将血浆储存袋 17 保存在 -20~-40 ℃ 环境下供临床输注或制备血浆制品用。

15 实施例 1

10 ℃ 的环境温度下，在全血经离心后，分离得到 123 毫升血浆。分离后得到的血小板经导管 7 到导管 18 进入血小板保存袋 19。血浆经导管 4、7、8、折断易折导通式导管接头 20 中的易折封闭头 23 与易折导通式光敏剂添加组件 9 内的 0.123 微摩尔亚甲蓝(泰兴市制药厂生产)混合，然后血浆和光敏剂混合物经导管 10 进入荧光照射袋 11。将含有血浆的荧光照射塑料袋 11、去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15、血浆储存袋 17 等组件，置于温控平行振摇式荧光照射仪中，在 4 ℃ 下于光强度为 38, 000Lx 下照射 30 分钟来灭活病毒，然后在过滤、吸附截面积为 12 厘米²的去白细胞吸附光敏剂输血过滤器件 15 中以自重流动工作方式、过滤速度为 25-35 毫升/分钟来去除由白细胞携带的病毒并吸附亚甲蓝，再经导管 16 流入储存袋 17。用 VSV、Sindbis 指示病毒测量血浆 logTCID₅₀ 的变化，结果如下表 1 所示。在冷冻保存前用排气夹 14 排去空气，将血浆储存袋 17 保存在 -20~-40 ℃ 环境下供临床输注或制备血浆制品用，血小板保存袋 19 置于 22 ℃ 环境备用。

30 根据实施例 1 所述的方法，除了荧光照射的时间 30 分钟被照射时间 5 分钟、10 分钟和 15 分钟替代外其它基本根据实施例 1 所述的方法得到了血浆制品，用 VSV, Sindbis 指示病毒测定荧光照射时间不同对灭活血浆病毒效果的影响，结果如下表 1 所示。

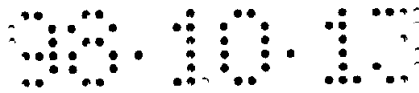


表 1

亚甲蓝 + 荧光照射不同时间含 VSV, Sindbis 病毒血浆 log TCID50 的变化

病毒	滴度	100ml 血浆稀释	光照时间(分钟)				
			0(含 MB)	5	10	15	30
VSV	8.5	6.38	4.83	1.5	1.5	0.5	0.5
Sindbis	8.5	6.33	4.5	2.33	1.25	0.5	0.5

5 按照实施例 1 所述的方法, 分别对下表 2 所列出的血浆进行灭活病毒处理, 结果如下表 2 所示.

表 2 亚甲蓝/荧光照射煤火血浆病毒实施例结果

序 号	血浆 体积 (mL)	亚甲 蓝去 除率 (%)	剩余 白细 胞 ($\times 10^4$)	血浆蛋白回收率				凝血因子回收率					
				IgG	IgM	IgA	Fg	II	VII	VIII	IX	PLG	AT-III
1	123	≥ 85.0	≤ 1.0	87.30	92.77	100.	81.70	77.78	84.71	86.67	100.	98.59	75.86
2	117	≥ 85.0	≤ 1.0	83.56	100.	79.67	82.74	82.02	100.	71.21	81.25	75.32	90.12
3	109	≥ 85.0	≤ 1.0	100.	81.21	100.	87.82	78.65	100.	100.	71.21	98.21	98.65
4	132	≥ 80.0	≤ 1.0	95.81	100.	95.12	100.	94.25	100.	95.81	100.	86.57	94.12
5	105	≥ 90.0	≤ 1.0	90.91	99.00	100.	92.58	98.84	76.90	90.91	91.30	67.02	100
6	116	≥ 85.0	≤ 1.0	98.08	88.68	94.79	73.99	78.65	87.38	98.08	73.13	85.53	90.28
7	106	≥ 85.0	≤ 1.0	100.	100.	100.	100.	100.	91.96	100.	90.74	73.17	95.45
8	103	≥ 90.0	≤ 1.0	88.69	96.84	84.27	82.74	86.42	91.67	88.69	89.83	91.84	100.
9	121	≥ 85.0	≤ 1.0	91.67	100.	100.	100.	82.72	89.32	91.67	100.	100.	100.
10	107	≥ 85.0	≤ 1.0	100.	90.00	100.	72.67	100.	71.43	100.	100.	76.19	93.65

10 本发明采用光化学, 并结合物理方法, 制备经病毒灭活、去白细胞的新鲜冰冻血浆, 可灭活细胞内、细胞外的病毒, 整个制备过程在一次性使用、密闭的血液成分采集、分离、去白细胞、吸附光敏剂系统内进行, 不需要无菌操作环境; 病毒滴度下降 $6\log TCID_{50}$ 以上, 剩余白细胞数小于 1.0×10^4 , 光敏剂的去除率大于 85%, 凝血因子回收率大于 80%; 操作方便, 安全可靠, 易推广应用。所述经灭活病毒的血浆在常规的冰冻保存条件下能保存 2 年, 大大方便了临床上的使用。

说明书附图

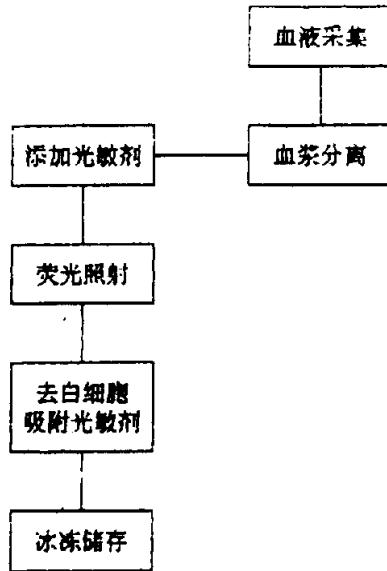


图 1

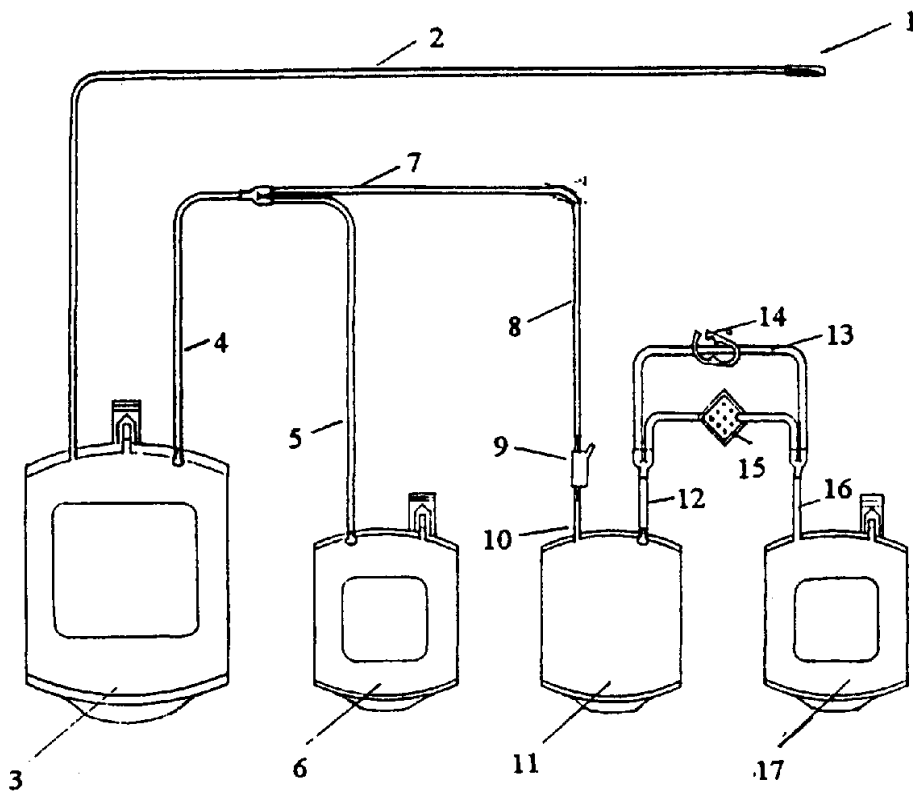


图 2

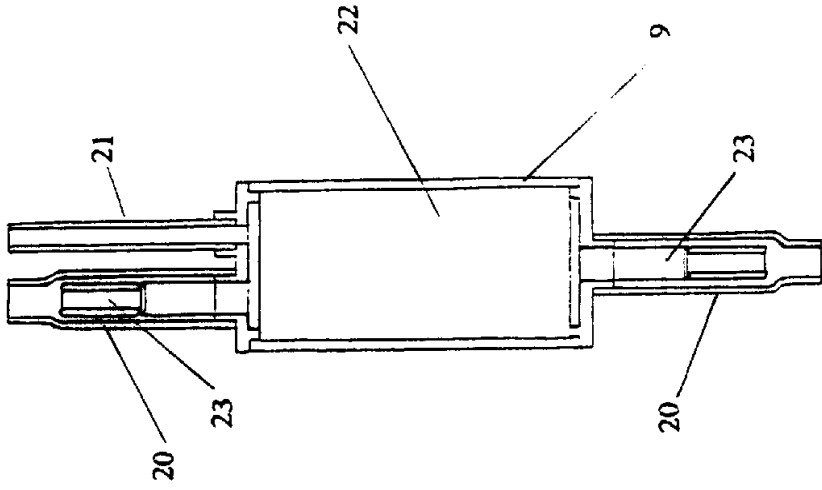


图 3

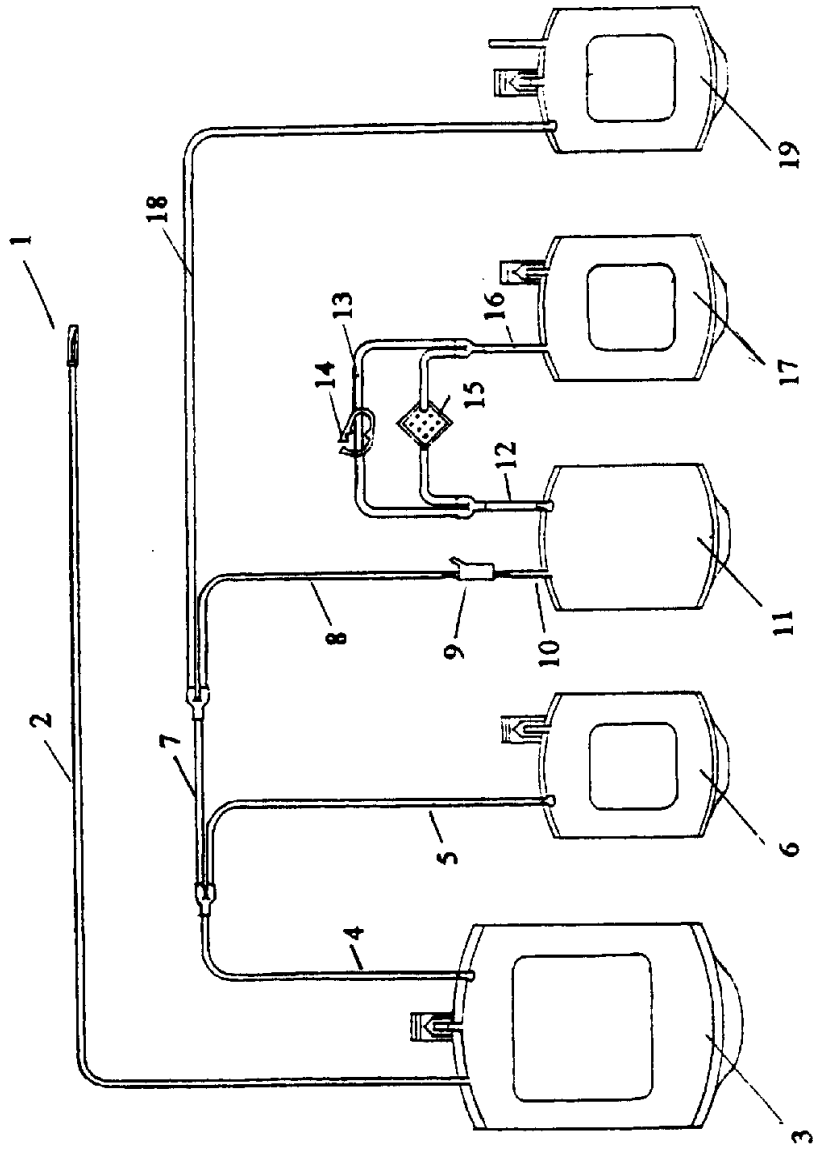


图 4

99.10.10

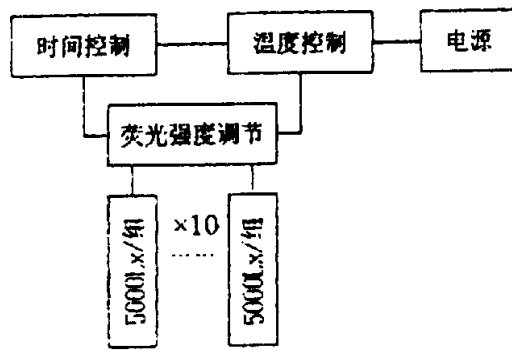


图 5