

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 406 778 B

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 629/96
(22) Anmeldetag: 09.04.1996
(42) Beginn der Patentdauer: 15.01.2000
(45) Ausgabetag: 25.09.2000

(51) Int. Cl.⁷: **C12P 21/00**
C12N 1/08, 7/04, 15/00, A61K 39/12

(56) Entgegenhaltungen:
DE 3505728A1 JP 4-131085A AT 389889B
DE 4403798A1

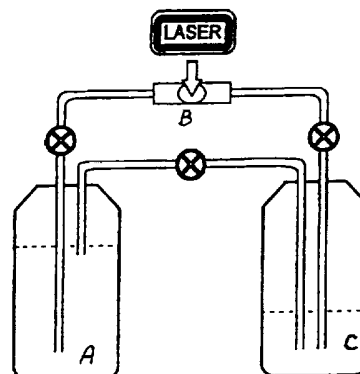
(73) Patentinhaber:
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:
DORNER FRIEDRICH
WIEN (AT).
BARRETT NOEL
KLOSTERNEUBURG/WEIDLING,
NIEDERÖSTERREICH (AT).
EIBL JOHANN DR.
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR DESINTEGRATION VON NUCLEINSÄUREN UND HERSTELLUNG VON QUALITÄTSGESICHERTEN BIOLOGISCHEN PRODUKTEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Desintegration einer beliebigen, biologisch aktiven Nucleinsäure in einem biologischen Material, wobei ein biologisch aktives Material ein- oder mehrfach einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure in diesem biologischen Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität des biologischen Materials erhalten bleibt.

FIG. 1



AT 406 778 B

Die vorliegende Erfindung betrifft die Desintegration biologisch aktiver Nucleinsäuren in einem biologisch aktiven Material durch Einwirkung eines Laserstrahles auf das - gegebenenfalls mit einer photodynamischen Substanz behandelte - biologische Material, was ein nicht-infektiöses biologisches Produkt ergibt, bei welchem im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure desintegriert ist, während die biologische Integrität und Aktivität des biologischen Materials, wie Antigenität, Immunogenität, Protektivität oder enzymatischen Charakteristika, erhalten bleiben. Die Erfindung betrifft auch die Herstellung biologischer Mittel, wie Vakzine, gentechnisch erzeugter Proteinprodukte, monoklonaler Antikörper oder Blutfaktoren, bei welchen im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure desintegriert ist.

Die Verwendung kontinuierlicher Zelllinien (continuous cell lines, CCL) für die Herstellung therapeutischer biologischer Produkte und die Probleme kontaminierender Nucleinsäuren in biologischen Produkten, sowie die Inaktivierung von kontaminierenden Rest-Zellen-DNA in solchen biologischen Mitteln wurden besprochen. Während bestimmte Produkte, wie rekombinante Proteine, Vakzine oder monoklonale Antikörper, unter Verwendung von Vertebraten-Zellen wirksam hergestellt werden, sind bestimmte andere Proteinprodukte von gewöhnlich verwendeten Zellen aufgrund der niedrigen Produktionsrate der Proteine in diesen Zellen nicht leicht erhältlich. Andere Säugerzellen, die leicht kultivierbar sind, sind von den Aufsichtsbehörden für die Herstellung gentechnisch erzeugter Proteine und ihre Verwendung für therapeutische und prophylaktische Zwecke bei Menschen oder Tieren nicht zugelassen.

Es wurde vorgeschlagen, daß Säuger-Zelllinien für die gentechnische Herstellung vieler proteinhaltiger Produkte, sowie für die Herstellung von Virusvakzinen gut geeignet sein könnten. Bei der Verwendung solcher Zelllinien sind jedoch bestimmte Probleme zu erwarten. Viele Produkte werden von Säugerzellen nicht direkt in das Kulturmedium freigesetzt oder sekretiert. Demgemäß wird die Gewinnung solcher Produkte oftmals ein Aufbrechen der Zellmembranen erfordern, um diese Produkte in das Medium freizusetzen, von welchem sie danach raffiniert oder gereinigt werden können. Ein solches Aufbrechen wird jedoch auch Nucleinsäure der Zellen in das Medium freisetzen. Besonders weil viele leicht kultivierbare Zelllinien transformierte tumorogene Säuger - Zelllinien mit einem onkogenen Potential sind, wie MDCK-Zellen oder SK-Hep-Zellen, ist es notwendig, zu gewährleisten, daß keine aktive Nucleinsäure als Kontamination im proteinhaltigen Endprodukt oder in der Vakzinpräparation vorhanden ist. Daher wurden Versuche unternommen, Zell-Nucleinsäuren, die mit einem Oncogenitätsrisiko verbunden sein könnten, zu inaktivieren.

Impfung gegen Viruserkrankungen war eines der Hauptziele der Medizin im Laufe des letzten Jahrhunderts. Obgleich wirksame Vakzine gegen eine große Anzahl von Krankheiten entwickelt wurden, bleibt die Entwicklung sicherer und wirksamer Vakzine für eine Reihe anderer Krankheiten, z.B. HIV-Infektionen, problematisch. Die Verwendung inaktivierter oder getöteter viraler Agentien als Vakzin ist, obwohl sie im allgemeinen sicher ist nicht immer wirksam, wenn die immunogenen Charakteristika des Agens geändert sind. Wenn jedoch ein hoch infektiöses, virulentes Virus für die Vakzinerzeugung verwendet wird, muß man sicher sein, daß das Inaktivierungsverfahren dazu führt, daß die Infektiosität ganz verloren geht.

Die Verwendung lebender, abgeschwächter viraler Agentien als Vakzine führt oft zu einer verbesserten immunologischen Reaktivität, erhöht jedoch das mit der Impfung verbundene Risiko, daß das Vakzin selbst infektiös ist. Beispielsweise kann das Virus in eine aktive, virulente Form zurückkehren, und der Organismus kann fähig sein, sich zu vermehren und zu verbreiten, was zu einer Erkrankung führt.

So muß man im allgemeinen zwischen einer verbesserten Wirksamkeit und einem größeren Maß an Sicherheit wählen, wenn man eine Wahl trifft zwischen lebenden, abgeschwächten und inaktivierten Vakzinpräparationen. Die Wahl ist besonders schwierig, wenn das Virus gegenüber Inaktivierungsprozessen resistent ist und sehr rigorose Inaktivierungsbedingungen erfordert, die die Wahrscheinlichkeit bergen, die antigenen Charakteristika abzubauen.

Zum Töten von Viren für die Verwendung als Vakzin sind verschiedene Techniken bekannt. Zu diesen zählen die chemische oder physikalische Behandlung, z.B. Inaktivierung mit Formaldehyd, Hydroxylamin, β -Propiolacton, UV-Bestrahlung oder photodynamische Farbstoffe, z.B. Methyleneblau und sichtbares Licht. Trotz dieser allgemeinen Offenbarungen ist es notwendig, die Selektivität solcher Inaktivierungen so zu verbessern, daß die viralen Proteinhüllen ihre Integrität besser beibehalten, während die Inaktivierungs/Tötungsraten verbessert werden.

Ein Hauptproblem inaktivierter Virus-Vakzine ist, daß wenn der Inaktivierungsprozeß der viralen Nucleinsäure nicht vollständig ist, das Risiko besteht, daß die Virus-Nucleinsäure einem zum Virus-Vakzin zugehörigen Wirt verabreicht werden kann, und unter bestimmten Umständen kann diese selbst infektiös sein, beispielsweise könnte HIV-RNA durch Virus- oder Zell-Enzyme revers-transkribiert werden und in das Wirts-Genom integriert werden, was zu einer HIV-Replikation führt.

Es wurden viele Versuche unternommen, Viren in einer Probe, wie Vakzinen oder Plasma, oder Zell-Nucleinsäuren zu inaktivieren, und dabei die antigenen und immunogenen Eigenschaften der Proteine in dieser Probe zu erhalten.

US 5,106,619 offenbart ein virales Vakzin mit konservierten antigenen und immunogenen Charakteristika, erzeugt durch Inaktivierung von umhülltem und nicht-umhülltem Virus mit UV-Licht in Anwesenheit von Furocoumarin in einer nicht-oxidierenden Atmosphäre.

US 4,880,512 offenbart ein Verfahren zur Behandlung biologischer Medien, wie Blutfraktionen, gentechnisch hergestellter Proteinprodukte und Vakzinpräparationen, zur Photolyse von Nucleinsäure in Anwesenheit von Proteinen und Erhaltung der antigenen und immunogenen Eigenschaften des Proteins. Biologische Medien, die Tryptophan-enthaltende Proteine aufwiesen, wurden mit gepulstem Licht von verschiedener Wellenlänge und Strömung bestrahlt.

Matthews et al. (1992, Blood Cells 18:75-89) berichtete über die Inaktivierung von Viren in virusinfizierten Zellen in Kulturmedien oder in Vollblut durch Bestrahlung mit gefilterter Xenonlichtquelle und/oder einem gepulsten Farblaser in Anwesenheit eines photodynamischen Farbstoffs. Prodous et al. (1987, Blood 70:589-592) offenbarten ein Verfahren zur Virusinaktivierung in Proben mittels UV-Bestrahlung, wobei eine Strahlung von 308 nm eines XeX1-Eximer-Lasers verwendet wurde. In WO 96/00091 werden Proben mit elektromagnetischer Strahlung, die von einem gepulsten Lasergerät mit einer Wellenlänge im Bereich von 300 bis 370 nm erzeugt werden, zur Virus-Inaktivierung bestrahlt.

Perrin et al. (1995, Biologicals 23: 207-211) verwendeten β -Propionlacton zur Inaktivierung von kontaminierender Restzell-DNA in biologischen Mitteln. Obwohl man weiß, daß dieses Agens Viren inaktiviert, ist seine Verwendung wegen der Labilität und Reaktivität dieses Agens schwer steuerbar. Es hydrolysiert rasch in wässrigen Lösungen, und es kann auch das Produkt modifizieren, z.B. durch eine Reduktion der Fc-Funktion in Immunoglobulinen.

Die Verwendung von Nucleasen zur Inaktivierung von DNA oder RNA wurde ebenfalls vorgeschlagen, doch ist es bekannt, daß dies keine sehr wirkungsvolle Vorgangsweise ist, insofern, als ein hoher Prozentsatz der Nucleinsäure mit Protein verbunden und daher für Nucleasen nicht zugänglich sein könnte.

Es ist bekannt, daß lichtempfindliche Farbstoffe und insbesondere Phenothiazin-Farbstoffe, wie Methylenblau, Bengalrosa, Neutralrot oder Toluidinblau, in Anwesenheit von Licht oder UV-Licht Viren inaktivieren kann. Dies wird durch die bevorzugte Affinität der Photofarbstoffe für die Nucleinsäure bewirkt.

Die Reaktivität von Phenothiazin-Farbstoff mit Viren wurde seit dem Jahr 1930 untersucht. Perdrau et al. (1933, Proc. Roy. Soc. 122:288-298) berichteten, daß ein breites Spektrum von Viren durch die Wirkung von Methylenblau in Anwesenheit von Licht inaktiviert werden kann. Es zeigte sich, daß Rabies-Virus, Influenza-Virus, Junin-Virus, Canine distemper-Virus, HIV und Herpes simplex-Virus durch Methylenblau und Licht-Bestrahlung inaktiviert wurden (Swartz et al., 1979, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 161:204-209; Schnipper et al., 1980, J. Clin. Invest., 65:432-438; Cobo et al., 1986, Med. Microbiol. Immunol., 175:67-69; Bachmann et al., 1995, J. Med. Virol., 47:172-178). Umhüllte Viren besitzen im allgemeinen eine gewisse inhärente Lichtempfindlichkeit, wogegen nicht-umhüllte Viren photoresistent sind (Wallis et al., 1964, Virology 23:520-527).

Die EP 0 196 515 offenbart ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in einer therapeutischen Proteinzusammensetzung durch Einwirkung von Licht in Anwesenheit eines Photosensibilisators auf die Zusammensetzung. Bevorzugt verwendete Photosensibilisatoren waren Protoporphyrin und Chlorpromazin. Es zeigte sich, daß Viren inaktiviert werden konnten, daß aber unter den getesteten Bedingungen auch ein gewisses Ausmaß an Inaktivierung von Faktor VIII auftritt.

US 4,181,128 offenbart ein System zur Inaktivierung von Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Toxinen und Tumorzellen, durch Überlagerung mit Methylenblau, Licht, Elektrizität und

Sauerstoff.

US 4,950,665 offenbart ein Verfahren zur Verwendung von Methylenblau zur selektiven Derivatisierung von Guanosin und zur Inaktivierung von Virus- und Krebszellen in vivo.

Die Behandlung von Plasma mit Methylenblau und Licht führt zur Inaktivierung von umhüllten Viren, einschließlich HIV, HSV, VSV, und einigen nicht-umhüllten Viren, wie SV40 (Mohr et al., 1992, Ann. Hematol. 65:224-228). Obwohl man annimmt, daß Nucleinsäuren die am meisten bevorzugten Ziele der Methylenblau/Licht-Behandlung sind (Tuite et al., 1993, Photochem. Photobiol. B: Biol. 21:103-124), wurden einige Veränderungen in Capsid-Proteinen von mit Methylenblau-Licht-inaktivierten Viren, sowie ein Verlust der Aktivität von Plasmaproteinen beobachtet (Specht et al., 1994, Photochem. Photobiol. 59:506-514; Bachmann et al., 1995, J. Med. Virol. 47:172-178, Mohr et al., 1995, Immunol. Invest. 24:73-85).

In der DE 35 05 728 A1 wird ein Verfahren zur Inaktivierung von Nukleinsäuren mit Lichtpulsen, insbesondere mit Laserlicht ausgewählter Wellenlängen, beschrieben. Dabei wird die Inaktivierung der Nukleinsäure entweder mit Lichtpulsen einer einzigen Wellenlänge im UV-Bereich oder mit Lichtpulsen unterschiedlicher Wellenlänge (mit einem Erstpuls einer Wellenlänge im UV-Bereich und einem Zweitpuls einer höheren Wellenlänge) vorgenommen. Dabei wird die "virale Aktivität der Nukleinsäuren" um einen Faktor von 10^4 bis 10^5 verringert, während die Funktionalität der Proteine zu mindestens 60% erhalten bleiben soll. Die Inaktivierung der Nukleinsäure wird in der DE 35 05 728 A1 über den Virus-Titer, also über die Virus-Aktivität bzw. Infektiosität der Viren bestimmt. Dieser Test gibt jedoch keine Aussage darüber, ob die Reduktion des Virus-Titers aufgrund der zerstörten Nukleinsäure oder auf Grund einer Zerstörung der Hüllproteine, die eine spezifische Bindung an den Wirt und damit eine erfolgreiche Infektion nicht erlaubt, erfolgt ist.

Die JP 4-131 085 A beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Zellmutanten durch Laserbehandlung, wobei die Zellen perforiert und mit DNA transfiziert werden. Durch die Laserbehandlung wird demnach nur die Zellwand und die Zellmembran durchlässiger gemacht, um das Einführen von Fremd-DNA in die Zellen zu erleichtern. Gemäß diesem Verfahren muß also vermieden werden, daß die zelluläre Nukleinsäure zerstört wird, vor allem da die Zellen nach der Transfektion mit Fremd-DNA zur weiteren Kultivierung eingesetzt werden und damit notwendigerweise weiterhin aktive Nukleinsäure besitzen müssen.

Die AT 389 889 B beschreibt ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren mittels Ultraschall, also mittels Schallwellen. Es wird betont, daß Lichtwellen und Schallwellen eine völlig unterschiedliche Physik aufweisen. Die DE 44 03 798 A1 offenbart ein Verfahren zur Sterilisierung von Viren und Bakterien durch UV-Strahlen.

Es ist daher offensichtlich, daß ein verbessertes Verfahren zur Inaktivierung von Nucleinsäuren in biologischen Mitteln entwickelt werden muß, welches das Risiko einer Restkontaminierung aktiver Nucleinsäuren in einem biologischen Mittel verringert, während die biologische Integrität und Aktivität proteinhaltiger Produkte in dieser Probe erhalten bleibt.

Es ist Ziel der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Desintegration von Nucleinsäuren in einem biologischen Material zu schaffen.

Es ist ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines sicheren biologischen Materials zu schaffen, bei welchem im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure desintegriert ist, während die biologische Integrität und Aktivität des proteinhaltigen Materials erhalten bleibt.

Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, sichere biologische Mittel, wie rekombinante Proteine, monoklonale Antikörper, Vakzine oder Blutderivate, zu schaffen.

Zur Erreichung dieser Ziele ist gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Inaktivierung von

Nucleinsäuren in einem biologisch aktiven proteinhaltigen Material und Gewinnung von biologischem Material vorgesehen, wobei einem biologischen Material eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird, und die Mischung einer Bestrahlung mit Laserlicht ausgesetzt wird.

Vorzugsweise absorbiert die photodynamische Substanz Licht im Wellenlängenbereich des Laserstrahls oder darüber, wobei die Wellenlänge des verwendeten Laserstrahls die Wellenlänge der maximalen Aktivierungsrate der photodynamischen Substanz ist. Die Wellenlänge des verwendeten Laserstrahls liegt vorzugsweise zwischen 600 und 680 nm, insbesondere zwischen

630 und 660 nm. Wenn eine einzige photodynamische Substanz zum Material zugegeben wird, wird das Material vorzugsweise mit einem Laserstrahl einer ausgewählten Wellenlänge bestrahlt. Wenn mehr als eine photodynamische Substanz zum biologischen Material zugegeben wird, wird das Material mit verschiedenen Laserstrahl-Wellenlängen bestrahlt, wobei die gewählten Wellenlängen ausgewählt sind aus der maximalen Aktivierungsrate der verwendeten photodynamischen Substanzen. Die zugegebene photodynamische Substanz liegt vorzugsweise in einer Konzentration zwischen 0,01 μM und 50 μM vor, vorzugsweise zwischen 10 μM und 35 μM . Die photodynamische Substanz ist ausgewählt aus der Gruppe photodynamischer Phenothiazine, wie Methylenblau, Neutralrot, Toluidinblau, Azurblau, Bengalrot, makrozyklische oder heterozyklische Photosensibilatoren, wie Benzophorphyrin oder Derivate davon oder andere, auf dem Gebiet gut bekannte photoaktive Substanzen. Die photodynamische Substanz ist gewöhnlich in einer Lösung gelöst, welche die vollständige Auflösung der Substanz bei Vereinigung mit dem biologischen Material ermöglicht. Die photodynamische Substanz kann dem biologischen Material im Dunklen zugegeben werden, und die Mischung wird dann durch ein System mit einem Fenster für die Laserstrahl-Einwirkung für eine Zeitdauer, die ausreicht, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure in diesem biologischen Material zu desintegrieren, gepumpt. Um die biologische Aktivität und Integrität des biologischen Mittels zu erhalten, erfolgt die Laserstrahl-Bestrahlung in einer Zeit, die ausreicht, um die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure zu desintegrieren, ohne die biologische Integrität und Aktivität eines proteinhaltigen

Materials zu beeinträchtigen. Die Parameter für die Desintegration sind der Durchmesser des Laserstrahls, der Durchmesser des Fensters, durch welches das biologische Mittel bestrahlt wird, die Fließgeschwindigkeit, mit welcher die Substanz durch das Fenster gepumpt wird, die Einwirkungszeit, die Wellenlänge des Laserstrahls, gegebenenfalls die Konzentration der photodynamischen Substanz und die Konzentration der Nucleinsäure im Material. Gemäß einem Aspekt der Erfindung kann das Verfahren in einem gepufferten System in einem pH-Bereich zwischen 5 und 10 und bei einer Temperatur zwischen 4°C und 35°C, je nach der zugesetzten photodynamischen Substanz, doch unter optimalen Bedingungen zur Desintegration der Nucleinsäure durchgeführt werden, während die biologische Integrität und Aktivität des biologisch aktiven Materials erhalten bleiben. Vorzugsweise werden die für die Nucleinsäure-Desintegration gewählten Temperatur-, pH-Wert- und Ionenstärke-Bedingungen für die Gesamtdauer des Verfahrens stabil gehalten. Die für die Inaktivierung relevanten Parameter werden für jedes biologische Material optimiert.

Wenn die photodynamische Substanz/Laserstrahl-Behandlung zur Desintegration biologisch aktiver Nucleinsäure von mikrobiologischen oder molekularbiologischen Pathogenen in Blut, Plasma, Serum, einer Zellsuspension, einer Zellschicht, einem Zellüberstand oder einer aufgebrochenen Zellpräparation verwendet wird, die aus einer infizierten, transfektierten oder transformierten Zelle stammt, können ein Stabilisator, wie Zucker, Polyalkohole, Aminosäuren, Peptide oder Carbonsäuren, ein Quencher und/oder Scavenger, wie Mannit, Glycerin, reduziertes Glutathion oder Superoxid-Dismutase, oder eine Kombination davon dem biologischen Material vor der Laserstrahl-Einwirkung oder der Zugabe einer photodynamischen Substanz zugegeben werden. Gemäß dem Verfahren können auch ein oder mehrere verschiedene Quencher und/oder Scavenger und/oder Stabilisatoren zum biologischen Material vor der Laserstrahl-Einwirkung zugegeben werden. Die Zugabe von Quenchern von photodynamischen Reaktionen vom Typ 1 (freie Radikale), wie Mannit, Glycerin, reduziertes Glutathion (GSH), oder Superoxid-Dismutase (SOD) können die Verwendung hoher Lichtintensitäten und Konzentration von beispielsweise photodynamischen Substanzen ohne erhöhte Verluste der Aktivität,

Integrität, Antigenität, Immunogenität oder enzymatischen Aktivität eines biologischen Mittels gestatten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß eine Reaktion vom Typ II (Singulett-Sauerstoff) der Hauptvermittler der Nucleinsäure-Inaktivierung ist, wobei sowohl die Typ-I - als auch die Typ-II-Reaktion zur Protein-Inaktivierung beiträgt. Dies ist besonders wichtig für die Verwendung dieser Vorgangsweise für die Inaktivierung von Viren in Vollblut, Plasma oder Plasmaprodukten und/oder Desintegration von viraler und genomischer Nucleinsäure in biologischem Material, ohne Verluste an Aktivität und Integrität spezifischer Proteine von therapeutischer Bedeutung herbeizuführen. Unter den für die Desintegration aktiver Nucleinsäuren verwendeten Bedingungen hat es sich gezeigt, daß höhere Lichtintensitäten zur Inaktivierung selbst der resistentesten Viren verwendet

werden können, ohne die biologische Aktivität und Integrität der Blutfaktoren oder Plasmaproteine zu zerstören.

Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird (werden) vor der Laserstrahl-Einwirkung mindestens ein Quencher und/oder Scavenger und/oder Stabilisator zugegeben, und die Mischung wird mit einer oder mehreren verschiedenen Laserstrahl-Wellenlänge (n) bestrahlt, wobei die Laserstrahl-Wellenlänge die Wellenlänge der maximalen Aktivierungsrate der zugesetzten photodynamischen Substanz (en) ist.

Die photodynamische Substanz und/oder der Quencher und/oder der Scavenger und/oder der Stabilisator können in einen Behälter gegeben werden, welcher das biologisch aktive Material enthält, und die Mischung aus der (den) photodynamischen Substanz(en) und dem biologisch aktiven Material wird zwecks Laserstrahl-Einwirkung durch ein System gepumpt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die dem Laserstrahl ausgesetzte Mischung direkt zu einem zweiten Behälter gepumpt. Die dem Laserstrahl ausgesetzte Mischung kann in umgekehrter Richtung durch das System für mindestens eine zweite Laser-Bestrahlung zurückgepumpt werden. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens, kann (können) der Mischung im zweiten Behälter mindestens eine zweite Portion von einer oder mehreren photodynamischen Substanz (en) und/oder einem Quencher und/oder einem Scavenger und/oder einem Stabilisator zugesetzt werden, und die Mischung wird durch das System in umgekehrter Richtung für mindestens eine zweite Laser-Bestrahlung zurückgepumpt. Die Zusätze können zur Mischung in einer einzigen Zugabe oder in mehreren Zugaben zugesetzt werden, wobei die Mischung zwischen den Zugaben dem Laserstrahl ausgesetzt wird, oder sie können während der gesamten Behandlungsdauer kontinuierlich zugesetzt werden. Gewöhnlich ist die Zahl der Zugaben 1. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dies durch Rezyklieren der Laserstrahlbehandelten Mischung aus biologischem Material und Zusätzen in einem kontinuierlichen Verfahren erfolgen. Das Verfahren kann für mehrere Laserstrahlbehandlungszyklen, vorzugsweise 5 bis 50 Zyklen, insbesondere 10 bis 30 Zyklen, wiederholt werden.

Gemäß dem Verfahren der Erfindung weist das biologisch aktive Material eine biologisch aktive Substanz mit hohem Molekulargewicht, die keine biologisch aktive Nucleinsäure ist, auf.

Gemäß dem Verfahren der Erfindung ist die durch das Verfahren der Erfindung inaktivierte Nucleinsäure DNA oder RNA.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Inaktivierung einer biologisch aktiven Nucleinsäure in einem virushaltigen biologischen Material vorgesehen, wobei ein Laserstrahl auf das virushaltige, biologisch aktive Material einwirkt, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im biologischen Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität, Immunogenität und Protektivität, des Virus im biologischen Material erhalten bleibt.

Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens stammt das virushaltige biologische Material aus einer Kultur von virusinfizierten Zellen, einem Kulturüberstand von virusinfizierten Zellen, einer Zellkomponente von virusinfizierten Zellen oder einer ein gereinigtes Virus aufweisenden Lösung.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird das Verfahren zur Erzeugung eines inaktivierten Virus verwendet. Vorzugsweise ist das Virus ein Lipid-(umhülltes) oder Non-Lipid-(nicht umhülltes) Virus, ein DNA oder ein RNA-Virus, ein abgeschwächtes Virus.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein inaktiviertes Virus vorgesehen, das durch Laserstrahl-Einwirkung auf eine virushaltige Lösung erhalten wird, wobei das inaktivierte Virus eine desintegrierte biologisch aktive Nucleinsäure aufweist, während seine biologische Integrität und Aktivität, wie antigene, immunogene und protektive Eigenschaft, erhalten bleibt.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein ein inaktiviertes Virus aufweisendes Vakzin vorgesehen, wobei beim inaktivierten Virus die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure desintegriert ist, wogegen seine biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität, Immunogenität und Protektivität, erhalten bleibt. Gegebenenfalls weist die Vakzinpräparation einen physiologisch akzeptablen Träger auf.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Inaktivierung einer biologisch aktiven Nucleinsäure in einem biologischen Material mit einem gentechnisch

hergestellten proteinhaltigen Produkt vorgesehen, wobei das biologisch aktive Material mit einer photodynamischen Substanz ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine versetzt wird und dann einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität des

5 gentechnisch hergestellten proteinhaltigen Produkts erhalten bleibt.
Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines inaktivierten mikrobiologischen Vakzins vorgesehen.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein biologisch aktives Material vorgesehen, welches mit einer photodynamischen Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine

10 versetzt und dann einem Laserstrahl ausgesetzt worden ist, wobei die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure des biologischen Materials desintegriert worden ist, während seine biologische Integrität und Aktivität, wie antigenen, immunogenen und protektive Eigenschaften erhalten geblieben sind.
Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Präparation

15 vorgesehen, welche ein biologisches Material, wie oben beschrieben, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist. Die pharmazeutische Präparation der vorliegenden Erfindung kann zur Behandlung eines Säugers verwendet werden.

Andere Ziele, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung gehen aus der folgenden Beschreibung hervor. Es sei jedoch verstanden, daß die detaillierte Beschreibung und die

20 spezifischen Beispiele, die bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angeben, nur zur Veranschaulichung angeführt sind, da verschiedene Veränderungen und Modifikationen im Geist und Rahmen der Erfindung für den Fachmann aus dieser detaillierten Beschreibung offensichtlich sein werden.
Die vorliegende Erfindung sieht ein neues Verfahren zur Inaktivierung biologisch aktiver

25 Nucleinsäuren in einem biologisch aktiven Material vor. "Biologisch aktives Material" bedeutet ein Material mit biologisch aktiven proteinhaltigen Produkten, die durch unerwünschte Nucleinsäure kontaminiert sind, welche entweder von einer Zelle, einer Zellkulturlinie, einem Virus, einem Nucleinsäurevektor, einem prokaryontischen Pathogen oder einem Onkogen stammt. "Inaktivierung" bzw. "Desintegration" einer Nucleinsäure bedeutet die Zerstörung der

30 Nucleinsäureeinheiten und der Aktivität in Anwesenheit von Proteinen, um den Verlust der Lebensfähigkeit und Infektiosität der Nucleinsäure zu bewirken, während die Funktionalität und biologische Integrität und Aktivität des im biologischen Material vorhandenen Proteins im wesentlichen erhalten bleibt. Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Desintegration von im wesentlichen allen biologisch aktiven Nucleinsäuren, wie DNA oder RNA, einschließlich infektiöser

35 Nucleinsäuremoleküle, die transformationsfähig sind, welche im biologischen Material vermutet werden, während die Integrität und Aktivität der Proteine im biologischen Material intakt belassen werden. Bei dem nach dem Desintegrationsprozeß erhaltenen, ein biologisch aktives Protein enthaltenden Material sind im wesentlichen alle biologisch aktiven Nucleinsäuren desintegriert. "Im wesentlichen" bedeutet, daß die restliche aktive Nucleinsäure im biologischen Material unter der

40 Nachweisgrenze einer hochempfindlichen Nucleinsäure-Amplifikationsmethode liegt.
Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wird die Menge der restlichen, kontaminierenden genomischen DNA und/oder viral-aktiven Nucleinsäure, RNA oder DNA, nach dem Desintegrations- oder Inaktivierungsverfahren bestimmt. Diese Bestimmung ist besonders

45 wichtig, wenn man die kontaminierende aktive Nucleinsäure in Blutprodukten, Vakzinen, oder bei der Qualitätskontrolle rekombinanter, aus Zellkulturen stammender Produkte bestimmt. Die Effizienz der Desintegration kann durch Bestimmung der restlichen Nucleinsäure mittels eines Nucleinsäure-Amplifikationsverfahrens, wie der Ligase-Kettenreaktion (ligase chain reaction, LCR), der Amplifikation auf Basis der Nucleinsäure-Sequenz (nucleic acid sequence based amplification, NASBA), der selbständigen Sequenz-Replikation (self-sustained sequence replication, 3SR), dem

50 Amplifikationssystem auf Transkriptionsbasis (transcriptional based amplification system, TAS) oder der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) gemessen werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung ist die Amplifikationsmethode PCR.

Um die Nucleinsäure in einer Probe quantitativ zu bestimmen, wird vorzugsweise LIF-PCR

55 (Laser-induzierte Fluoreszenz-PCR) verwendet. Durch Verwendung von nicht-radioaktiv markierten

Primern (vorzugsweise werden mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Primer verwendet) können die PCR-Produkte mittels LIF-PCR detektiert werden. Im Falle von LIF-PCR wird die Nucleinsäure in Anwesenheit von Fluoreszenz-markierten Primern amplifiziert, und die Amplifikationsprodukte werden danach mittels PAGE getrennt. Die Amplifikation erfolgt mit Primern, die für die entsprechende Nucleinsäure des mikrobiologischen oder molekularen Pathogens oder der kontaminierenden genomischen DNA spezifisch sind.

Um die Effizienz des Inaktivierungs- und Desintegrierungs-verfahrens vor der Amplifikation zu quantifizieren, wird eine bestimmte Menge einer bekannten Nucleinsäure zur Probe als innerer Standard zugegeben, wobei sich die Standard-Nucleinsäure von der zu bestimmenden genomischen oder viralen Nucleinsäure in mindestens einem detektierbaren Charakteristikum unterscheidet, doch sollte sie mit Hilfe desselben Primers amplifizierbar sein.

Bis zur vorliegenden Erfindung war es nicht möglich, biologisch aktive Nucleinsäuren in einer biologischen Probe vollständig zu desintegrieren, ohne die biologische Aktivität und/oder Integrität von in der Probe vorhandenen Proteinen wesentlich zu beeinträchtigen. Es war auch nicht möglich, die Effizienz des Nucleinsäure-Desintegrationsverfahrens mittels PCR-Amplifikationsmethoden zu bestimmen und zu quantifizieren, um ein reproduzierbares System für die Herstellung von sicheren und qualitätskontrollierten biologischen Mitteln zu besitzen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Desintegration jeglicher biologisch aktiver Nucleinsäure in einem biologischen Material vorgesehen, wobei ein biologisch aktives Material ein- oder mehrfach einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte, biologisch aktive Nucleinsäure im biologischen Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität des biologischen Materials erhalten bleibt.

Gemäß einem Aspekt des Verfahrens umfaßt das biologisch aktive Material eine biologisch aktive Substanz mit hohem Molekulargewicht, die keine biologisch aktive Nucleinsäure ist. Vorzugsweise ist das biologisch aktive Material eine Lösung, welche einen Blutfaktor, einen Plasmfaktor, ein Immunglobulin, ein gentechnisch hergestelltes proteinhaltiges Produkt, wie ein rekombinantes Protein oder einen monoklonalen Antikörper oder ein mikrobiologisches und/oder molekulares Pathogen, wie ein Virus oder ein Bakterium, oder einen Teil davon aufweist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt das biologische Material ein proteinhaltiges Produkt. Vorzugsweise ist das Material ausgewählt aus einer Lösung umfassend einen Blutfaktor, wie Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Faktor XI II, Protein C, Protein S, von Willebrand-Faktor oder ein Plasmprotein, wie Plasminogen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, Antithrombin III, C1-Esterase-Inhibitor, Albumin, Fibrinogen, γ -Globulin, Immuno-globulin, ein gentechnisch erzeugtes Proteinprodukt, wie ein rekombinantes Protein oder einen monoklonalen Antikörper, oder ein Pathogen, wie ein Virus oder ein Bakterium. Das biologisch aktive Material kann Vollblut, eine Blutkomponente oder ein Derivat davon, wie eine Plasmafraktion, ein Plasmprotein mit einer Nucleinsäure in Form eines potentiellen mikrobiologischen oder molekularen Pathogens, eine Zellsuspension, eine Zellschicht, ein Zellkulturüberstand oder eine aufgebrochene Zellpräparation sein, die von infizierten, transfektierten oder transformierten Zellen oder einer Zellkultur stammt, die eine kontaminierende biologisch aktive Nucleinsäure aufweist.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist geeignet, biologisch aktive Nucleinsäure zu desintegrieren und virale Pathogene, wie HIV-1, HIV-2, HAV, HCV, HBV, Parvovirus, CMV, HHV-6, HTLV-1, HTLV-2, EBV, HDV, Echovirus und Coxsackie-Virus in Plasma oder einer Plasmafraktion zu inaktivieren.

Zellen in dieser Zellkultur, Zellsuspension, Zellschicht, Zellkulturüberstand oder in der aufgebrochenen Zellpräparation können von Vertebraten-Zellen, wie VERO-Zellen, CHO-Zellen, BHK-Zellen, Hühnerembryozellen, MDCK-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK2-Zellen, MDBK-Zellen, WI-38-Zellen, MRC-5-Zellen, SK-Hep-Zellen oder einer anderen kontinuierlichen Zelllinie, wie einer Tumor-zelllinie oder einer Hybridom-Zelllinie, stammen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das biologisch aktive Material für eine Vakzinpräparation verwendet.

Die biologisch aktive Nucleinsäure, die mittels des Verfahrens der Erfindung desintegriert wird, ist DNA oder RNA. Die Nucleinsäure kann eine genomische DNA aus einem Genom oder einem

Teil davon, wie einem Gen, sein. Die Nucleinsäure hat eine Nucleinsäure-Template-Aktivität und umfaßt eine Sequenz für Primer und Polymerase-Bindung. Sie ist auch mittels eines Nucleinsäure-Amplifikationsverfahrens amplifizierbar. Die Nucleinsäure kann aus einem eukaryontischen Ausgangsmaterial, wie einer Vertebraten-Zelle, einer Tumor-Zelllinie oder einer Hybridom-Zelllinie, aus einem Mikroorganismus, wie einem Proto-zoon, einem Bakterium, einem Virus, einem mikrobiologischen oder molekularen Pathogen oder einem Teil davon, oder aus einem Onkogen oder einem Protoonkogen stammen.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein inaktiviertes Virus vorgesehen, welches gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist und bei welchem im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im biologischen Material desintegriert, bzw. inaktiviert ist, während die biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität, Immunogenität und Protektivität, des Virus erhalten sind.

Das inaktivierte Virus mit den oben beschriebenen Eigenschaften kann jede Art von Virus sein, wie ein Lipid(umhülltes) oder ein Non-Lipid- (nicht-umhülltes) Virus, ein DNA- oder ein RNA-Virus, ein abgeschwächtes Virus.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist das inaktivierte Virus zu einer Vakzinpräparation formuliert und kann vorzugsweise zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung von Säugern verwendet werden.

Gemäß vorliegender Erfindung sind Vakzine vorgesehen, die für die Impfung von Säugern, einschließlich sowohl Tiere als auch Menschen, gegen virale oder bakterielle Infektionen geeignet sind. Die Vakzine werden durch Desintegration biologisch aktiver Nucleinsäuren eines Mikroorganismus, wie eines lebenden Virus oder einer prokaryontischen Zelle, hergestellt, ohne die biologische Integrität und Aktivität, wie die Antigenität, Immunogenität oder Protektivität dieses Mikroorganismus zu beeinträchtigen. Das Desintegrationsverfahren erfolgt in einem geeigneten Medium, welches eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine in einer Konzentration enthält, die ausreicht, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure bei Laserstrahl-Einwirkung zu desintegrieren. Durch Verwendung einer photodynamischen Substanz in einer Konzentration, die eine Bindung der Substanz an die Nucleinsäure ermöglicht, und der Laserstrahl-Einwirkung zur Desintegration der biologischen Aktivität der Nucleinsäure, wird der Abbau der antigenen und immunogenen Charakteristika von Proteinen vermieden. Gegebenenfalls kann vor der Laserstrahl-Einwirkung auf das biologische Material ein Quencher und/oder Scavenger und/oder Stabilisator zugegeben werden.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung eines inaktivierten Vakzins in einem mikroorganismushaltigen biologischen Material vorgesehen, wobei ein mikroorganismushaltiges biologisch aktives Material mit einer photodynamischen Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine versetzt wird und die Mischung einer Bestrahlung mit Laserlicht ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im biologischen Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität, Immunogenität und Protektivität des Mikroorganismus im biologischen Material erhalten bleibt.

Die vorliegende Erfindung ist zur Erzeugung von inaktivierten Vakzinen gegen eine große Vielfalt von Viren, einschließlich menschlicher Viren und tierischer Viren, geeignet. Das Verfahren ist zur Inaktivierung doppelsträngiger DNA-Viren, einzelsträngiger DNA-Viren, doppelsträngiger RNA-Viren und einzelsträngiger RNA-Viren, einschließlich sowohl umhüllter als auch nicht-umhüllter Viren, wie ausgewählt aus der Gruppe Adenovirus, Herpesvirus, Papovavirus, Poxvirus, Parvovirus, Reovirus, Retrovirus, Myxovirus, Paramyxovirus, Picornavirus, Togavirus, Flavivirus, Orthomyxovirus oder Rhadovirus, geeignet. Insbesondere ist das Virus ein Influenza-Virus, Herpes-simplex-Virus, HIV, HBV, HAV, HCV, HSV, TBEV oder CMV.

Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens stammt das virushaltige biologische Material aus einer Kultur virusinfizierter Zellen, einem Kulturüberstand virusinfizierter Zellen, einer Zellkomponente virusinfizierter Zellen oder aus einer Lösung, die ein gereinigtes Virus aufweist. Die Zellen zur Vermehrung des Virus sind virusinfizierte Zellen, vorzugsweise Vertebraten-Zellen, einschließlich Zellen wie Hühnerembryozellen, VER0-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK-2-Zellen, MDCK-Zellen, MDBK-Zellen, WI-38-Zellen oder MRC-5-Zellen.

Die gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung desintegrierte biologisch aktive Nucleinsäure stammt aus den Zellen und/oder dem Virus.

5 Bakterielle Vakzine können durch Inaktivierung bakterieller Pathogene in der Kultur, in Medium oder im Puffer gemäß dem Verfahren der Erfindung hergestellt werden, wobei die Bakterien ausgewählt sind aus der Gruppe der Pneumokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Neisseriae, enterischen Bazillen, Pseudomonas, Haemophilus, Bortedella, Mykobakterien oder Spirochaeten oder einem viralen Pathogen, wie einem Lipid- oder Non-Lipid-Virus.

10 Die vorliegende Erfindung ist auch zur Herstellung von Virusvakzinen geeignet, wobei das zu inaktivierende Virus ein abgeschwächtes Virus ist. Dies ist besonders in einem solchen Fall verständlich, in welchem das ursprünglich aktive Virus hoch virulent ist, z.B. HIV oder HCV, so daß der Herstellungsprozeß an sich Sicherheitsprobleme für das Laborpersonal verursachen könnte, indem dieses mit hochtitrigen Virus-Präparationen arbeitet. Durch Verwendung eines abgeschwächten Virusstammes für den Vakzin-Erzeugungsprozeß ist das Risiko geringer als bei Verwendung des virulenten Stammes. Außerdem würde die Verwendung eines abgeschwächten Virus für die Vakzinherstellung anstelle der virulenten Form die Sicherheit eines solchen Vakzins maximieren, obwohl mittels des vorliegenden Verfahrens ein vollständig inaktiviertes, nicht-infektiöses Virus, bei dem alle biologisch aktiven Nucleinsäuren desintegriert sind, erhalten wird.

15 Bei der Herstellung der vorliegenden Vakzine können ausreichende Mengen an zu inaktivierendem Virus erhalten werden, indem Virus aus stark kontaminiertem Plasma konzentriert wird. Stark kontaminiertes Plasma kann auf herkömmliche Weise fraktioniert werden, indem Ethanol/PEG-Fällung, Sephadex-Adsorption und andere herkömmliche Reinigungsschritte verwendet werden, um hoch-konzentrierte Präparationen dieser Viren herzustellen, welche dann durch Behandlung mit einer photodynamischen Substanz und/oder mit Laserstrahl inaktiviert werden können. Viren können auch durch Verwendung von Nanofiltrationstechniken konzentriert werden, wobei gegebenenfalls kleine Viren, wie Parvovirus, mit spezifischen Antikörpern komplexiert werden können, um einen Immunkomplex zu schaffen, welcher durch Nanofiltration zurückgehalten werden kann. Diese Technik wird vorzugsweise für Viren verwendet, welche in Zellkulturen nicht hätten gezüchtet werden können, wie HCV, HBV oder Parvovirus. Die vorliegenden Vakzine können auch durch Züchtung von Impfvirus in einer geeigneten Vertebraten-Zellkultur erhalten werden. Impfvirus kann durch direkte Isolation aus einem infizierten Wirt oder aus einer Quelle, wie einer Sammlung von Mikroorganismen erhalten werden. Zu den geeigneten Zellkulturen zählen primäre oder sekundäre Kulturen, die von Geweben oder etablierten Zelllinien stammen, wie CEC, Vero-Zellen, Affennierenzellen, BHK-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK-2-Zellen, MDCK-Zellen, MDBK-Zellen, LTMK-Zellen, WI-38-Zellen, MRC-5-Zellen oder anderen Zellen, die für das gewünschte Virus permissiv sind und die als Einzelschichten oder Suspensionskultur 25 gezüchtet werden können. Die Zellkultur wird entweder mittels herkömmlicher Verfahren, wie dem Züchten von Zellen in serumhaltigem Medium erhalten, oder insbesondere werden sie unter serum- oder proteinfreien Bedingungen aus der Originalampulle zu einer Zell-Biomasse in großem Umfang gezüchtet. Unerwarteterweise wurde festgestellt, daß bei Durchführung der erfindungsgemäßen Behandlung unter serum- oder proteinfreien Bedingungen, der Nucleinsäure-Desintegrationsprozeß sehr effizient ist und die biologische Integrität und Aktivität, wie die immunogenen und antigenen Charakteristika der Proteine im wesentlichen erhalten bleiben.

30 Daher wird gemäß einem wesentlichen Aspekt der vorliegenden Erfindung die Virusinfektion vorzugsweise unter serum- oder proteinfreien Bedingungen durchgeführt. Dies kann durch Züchten der Zellkultur in serum- oder proteinfreiem Medium für mehrere Generationen vor der Infektion, oder durch Ersetzen von serumhaltigem Wachstumsmedium durch serum- oder proteinfreies Medium vor der Infektion erfolgen. Zellen werden unter Standardbedingungen mit einer Vielzahl von Infektionen (multiplicity of infection, m.o.i.), vorzugsweise zwischen 0,001 und 0,1 TCID₅₀, insbesondere etwa 0,01, mit dem Virus infiziert. Zellwachstum, Infektion und Viruserzeugung werden periodisch überwacht. Die Überwachung kann automatisch oder mit anderen Mitteln 50 erfolgen, und die Ergebnisse der Überwachung können zur Steuerung des Herstellungsprozesses verwendet werden. Durch Infektion und Inkubation der Zell-Biomasse mit dem Virus wird eine Zellkultur, die einen virushaltigen Überstand aufweist, und/oder eine Zellbiomasse, die Virus und Virus-Antigen aufweist, erhalten. Je nach der Art des verwendeten Virus findet man die erzeugten Virus-Teilchen entweder im Überstand der Zellkultur und/oder in Verbindung mit der Zell-

Biomasse.

Beispiele für lytische Viren inkludieren Influenza-Virus und Vaccinia-Virus, und für nicht-lytische Viren, TBEV. Das Virus wird erzeugt und in das Zellkulturmedium abgegeben, um ein virushaltiges Medium zu erzeugen. Das virushaltige biologische Material kann portionsweise oder vollständig in einem kontinuierlichen Verfahren oder chargenweise aus dem Zellkulturgefäß entfernt und in einen zweiten Behälter transferiert werden, welchem die photoaktive Substanz zugesetzt wird. Die photodynamische Substanz kann der Virussuspension in einer einzigen Zugabe oder in mehreren Zugaben zugesetzt werden, wobei das Virus zwischen den Zugaben einem Laserstrahl ausgesetzt wird, oder sie kann kontinuierlich während der gesamten Behandlungsdauer oder einem Teil derselben zugesetzt werden. Üblicherweise ist die Anzahl der Zugaben 1. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dies durch Rezyklieren der photodynamischen Substanz und des Laserstrahl-behandelten Mediums in einem kontinuierlichen Prozeß erfolgen. Das virushaltige Medium wird aus dem Kulturgefäß in einen Behälter transferiert, in welchem die photodynamische Substanz in einer gewählten Konzentration zugegeben wird, und diese Mischung wird durch ein System mit einem Fenster zwecks Laserstrahl-Einwirkung während einer Zeit, die ausreicht, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure zu zersetzen, gepumpt.

Gemäß dem Verfahren der Erfindung können während aller Stufen des Virusinaktivierungsverfahrens ein oder mehrere Quencher und/oder Scavenger und/oder Stabilisatoren alleine oder in jeder geeigneten Kombination zugegeben werden. Das inaktivierte Virus wird weiters einer Reinigung unterzogen, oder das virushaltige Material wird direkt zum zweiten Behälter zurückgepumpt oder für einen zweiten Laserstrahl-Einwirkungszyklus in umgekehrter Richtung durch das Fenster gepumpt, wobei eine zweite Portion von photodynamischer Substanz und/oder Quencher und/oder Scavenger und/oder Stabilisator zugegeben oder auch nicht zugegeben werden kann, und einem zweiten Laserstrahl-Zyklus unterzogen. Dieses Verfahren kann für mehrere Zyklen, vorzugsweise 5 bis 50 Zyklen, insbesondere 10 bis 30 Zyklen, wiederholt werden.

Während der Laserstrahl-Bestrahlung kann das Medium ruhig, gerührt oder im Kreislauf gehalten werden, und es kann entweder einer kontinuierlichen Einwirkung oder abwechselnden Perioden von Einwirkung und Nichteinwirkung unterzogen werden. Der Kreislauf kann in einem System mit geschlossenem Wirkungskreis oder in einem Einzelsystem erfolgen, wobei gewährleistet ist, daß alle Proben dem Licht ausgesetzt worden sind.

Während der Infektion und der Vermehrung werden nicht alle von der Zelle produzierten Virusteilchen in den Überstand freigesetzt. Statt dessen hängen diese Teilchen noch immer an den Zellen der Zell-Biomasse. Daher enthält die Zellkultur Virusteilchen im Überstand und vollständige Virusteilchen sowie Virusproteine in Verbindung mit der Zell-Biomasse. Um eine größere Virusausschüttung zu erhalten, werden die Virusteilchen aus dem Überstand geerntet, und das Virus und/oder Virus-Antigen, das mit der Zell-Biomasse verbunden ist, wird isoliert. Das in den Zellen der Zell-Biomasse gefundene Virus wird durch Lyse aus den Zellen freigesetzt. Die Zellen können mittels herkömmlicher Methoden, wie Behandlung der Zellen mit einem Detergens, Behandlung mit Hitze, Ultraschallbehandlung, French-Press oder anderen Zell-Lysemethoden lysiert werden. Die aus den Zellen freigesetzten Viren werden beispielsweise mittels Zentrifugation geerntet und in einem Puffer resuspendiert. Virale Antigene, die noch mit der Zell-Biomasse oder mit Zellfragmenten verbunden sind, können mittels zum Stand der Technik gehörender chemischer oder mechanischer Methoden aus den Zellen oder Zellfragmenten extrahiert werden. Zu diesen Methoden zählen die Ultraschallbehandlung oder die Behandlung mit einem geeigneten Detergens, um das Virus-Antigen aus der Zelle oder den Zellfragmenten, insbesondere von der Membran, freizusetzen. Die Nucleinsäuren in dieser Suspension, die entweder von den Zellen oder vom Virus stammen, werden durch Behandlung der Lösung mit einer vorgewählten Konzentration einer photodynamischen Substanz und nachfolgende Laserstrahl-Einwirkung desintegriert. Das Virus-Antigen, einschließlich Viren, die aus der Zell-Biomasse isoliert sind, können dann weiters einem Reinigungsschritt einschließlich Auftrennung auf einem Saccharose-Gradienten, Adsorption an einer Chromatographiesäule, Waschen und Elution des gereinigten Virus oder Virus-Antigens unterzogen werden. Die verwendete Chromatographiesäule ist ausgewählt aus Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie oder Größenfiltrations-Chromatographie.

Das virushaltige Medium kann auch durch Zentrifugation und Suspension in einem wässrigen

gepufferten Medium durch einen anorganischen Puffer ersetzt werden. Der anorganische Puffer ist vorzugsweise ein Phosphat-Puffer oder Tris/HCl. Die Menge der Virusausbeute in der Suspension ist im allgemeinen etwa 10^6 bis 10^9 pfu/ml, vorzugsweise etwa 10^7 bis 5×10^8 pfu/ml.

Weiters kann die Erfindung den Schritt der Herstellung eines Vakzins mit dem inaktivierten Virus/Virus-Antigen umfassen.

Obwohl die Desintegration von Nucleinsäure in einem Mikroorganismen-enthaltenden biologischen Material gemäß der vorliegenden Erfindung normalerweise in einer Inaktivierungs- oder Desintegrationslösung durchgeführt wird, kann es in einigen Fällen erwünscht sein, die photodynamische Substanz direkt in das Zellkulturmedium, in welchem das Virus gezüchtet wird, einzubringen. Unter solchen Bedingungen kann die Zellkultur über mehrere Generationen in Serum- oder Protein-freiem Medium in Anwesenheit einer photodynamischen Substanz, vorzugsweise vor der Infektion, im Dunklen und unter optimalen Wachstumsbedingungen gezüchtet werden. Nach der Virusinfektion und der Virusvermehrung erfolgt die Nucleinsäure-Desintegration durch Entfernen des lebenden Virus enthaltenden Mediums, das mit photodynamischer Substanz aus der Zellkultur behandelt worden ist oder auch nicht, und Einwirkung eines Laserstrahls einer gewählten Wellenlänge auf die Viruspartikel im Inaktivierungsmedium, in welchem ein Quencher und/oder ein Scavenger und/oder ein Stabilisator enthalten oder auch nicht enthalten sein können.

Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist die Möglichkeit, weniger rigorose Inaktivierungsbedingungen verwenden zu können, von großem Vorteil bei der Erhaltung der Antigenität, Immunogenität und Protektivität des Virus während der Desintegration der viralen Nucleinsäure. Überraschenderweise zeigte es sich, daß unter den vorliegenden Bedingungen, wenn Virus mit einer photodynamischen Substanz behandelt und mit Laserstrahl bestrahlt wird, bestimmte Viren, insbesondere Non-Lipidviren mit starren Kapsiden inaktiviert werden können, wobei sie ihre Infektiosität vollständig verlieren.

Gemäß einem besonderen Aspekt betrifft daher die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Inaktivierung von nicht-umhüllten Viren in einem proteinhaltigen biologischen Material, wobei einem biologischen Material eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird und die Mischung einem Laserstrahl im Wellenbereich der maximalen Aktivierungsrate der photodynamischen Substanz ausgesetzt wird. Bevorzugterweise werden Viren aus der Gruppe der Picornaviridae und Parvoviridae inaktiviert.

Ein derartiges Verfahren kann vorzugsweise in der Herstellung eines virus-inaktivierten biologischen Materials, das insbesondere keine infektiösen nicht-lipid-umhüllten Viren aufweist, angewendet werden.

In einigen Fällen kann es erwünscht sein, ein organisches Lösungsmittel zuzugeben, um die Permeabilität der äußeren Hülle oder Membran des Virus zu erhöhen. Eine solche Erhöhung der Permeabilität würde das Eindringen der photodynamischen Substanz erleichtern und die Desintegration der viralen Nucleinsäure im inneren Kern des Virus verbessern. Die photodynamische Substanz und das organische Lösungsmittel können auch zum Zellkulturmedium, in dem das Virus gezüchtet wird, zugegeben werden.

Es mag erwünscht sein, die verbrauchte photodynamische Substanz und/oder ihre Photozerfallsprodukte aus der Mischung zu entfernen. Dies kann durch ein oder mehrere Standard-Laborverfahren, wie Dialyse über einer entsprechend großen Membran oder einem Hohlfasersystem nach Beendigung der Laserstrahl-Einwirkung erfolgen. Alternativ könnte man Affinitäts- oder Gelfiltrations-Chromatographiemethoden für ein oder mehrere zu entfernende Materialien mit niedrigem Molekulargewicht verwenden.

Es zeigte sich, daß solche Bedingungen die Herstellung von inaktivierten, umhüllten oder nicht-umhüllten Viren ermöglichen, wobei im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure desintegriert wird, ohne die biologische Integrität und Aktivität, wie die antigenen und immunogenen Eigenschaften des inaktivierten Virus zu beeinträchtigen. So können Viren, die gegen eine Inaktivierung und Desintegration der Nucleinsäure resistent waren oder nur ineffizient inaktiviert werden konnten, ohne Verlust der gewünschten biologischen Aktivität vollständig inaktiviert werden. Viren, die bisher erfolgreich inaktiviert wurden, können nun unter Bedingungen inaktiviert werden, bei welchen ihre antigenen Charakteristika besser erhalten bleiben, wodurch sie zu effizienteren immunogenen Substanzen zur Verwendung in Vakzinen werden.

Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Virusvermehrung und Virusinaktivierung in einem geschlossenen, einstufigen System vor, welches gewährleistet, daß während des Herstellungsverfahrens keine Arbeiter in Kontakt mit einem nicht-inaktivierten Virus kommen.

5 Das inaktivierte Virus kann auf vielfältige Weise zur Verwendung als Vakzin formuliert werden. Die Konzentration des Virus ist im allgemeinen von 10^6 bis 10^9 pfu/ml bei einer Gesamtdosierung von mindestens 10^5 pfu/ml, üblicherweise mindestens 10^6 pfu/ml, vorzugsweise mindestens 10^7 pfu/ml. Geeignete Vakzine können durch Kombination der inaktivierten Viren mit einem physiologisch akzeptablen Träger, typischerweise einem Adjuvans, in einer geeigneten Menge zur
10 Bewirkung einer Immunreaktion hergestellt werden, z.B. der Produktion von Serum-neutralisierenden Antikörpern, nach nachfolgender Impfung des Wirtes. Es kann in einem inerten, physiologisch akzeptablen

Medium, wie ionisiertem Wasser, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, oder Kochsalzlösung vorliegen, oder kann in Kombination mit einem physiologisch akzeptablen immunologischen
15 Adjuvans, einschließlich doch nicht beschränkt auf Mineralöl, Freund'sches Adjuvans, Pflanzenöle, Mineralsalze und Immunpotentioren, verabreicht werden. Das Vakzin kann subkutan, intramuskulär, intraperitoneal, oral oder nasal verabreicht werden. Gewöhnlich liegt eine spezifische Dosierung an der spezifischen Stelle im Bereich von etwa 0,1 bis 1,0 ml, wobei die Gesamtdosierung im Bereich von 1,0 ml bis 10 ml liegt. Die Anzahl der Injektionen und ihr
20 zeitlicher Abstand kann stark variieren, doch üblicherweise sind 1 bis 3 Injektionen in 1-, 4- und 24-Wochen-Intervallen wirksam.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung sieht das Verfahren weiters die Behandlung einer Virusinfektion und/oder die Prophylaxe einer Virusinfektion durch Verabreichung eines wie oben beschriebenen Vakzins an ein Tier oder einen Menschen vor.

25 Die Verringerung oder der Verlust der Infektiosität und die vollständige Inaktivierung von Viren wird auf herkömmliche Weise durch Blind-Passage von Proben bestimmt, wobei ein biologischer Test, wie ein Enzymtest (z.B. Reduktion in reverser Transcriptase) oder die Bestimmung von Virus-Titer, CPE, TCID₅₀, pfu/ml oder in einem Tiermodell verwendet wird. Eine empfindlichere Methode ist von Hanson et al. (1990, J. Clin. Microbiol. 28: 2030-2034) beschrieben. Tatsächlich stellte sich
30 heraus, daß bei dieser Vorgangsweise der Messung der Virusinaktivierung typischerweise nicht unterschieden werden kann zwischen einer Situation, in welcher die Inaktivierung des Virus vollständig ist, und jener Situation, in welcher die Inaktivierung nicht vollständig ist und die restliche biologisch aktive virale Nucleinsäure noch in vivo infektiös sein könnte. Zur Herstellung eines inaktivierten Virus-Vakzins von beispielsweise HIV wäre es sehr erwünscht, zu gewährleisten, daß
35 die Infektiosität verloren ist, und daß die gesamte aktive Nucleinsäure des Virus vollständig desintegriert ist. Dies erfordert die Verwendung eines verbesserten Inaktivierungsverfahrens und die Quantifizierung der übrigen biologisch aktiven Nucleinsäure mit einem hochempfindlichen, genauen und reproduzierbaren Verfahren.

Bachmann et al. (1995, J. Med. Virol. 47: 172-178) offenbarten die Verwendung des PCR-Inhibitionstests zur Bestimmung der Menge der viralen RNA nach Inaktivierung mit Methylenblau und Licht. Sie konnten nach 25 Amplifikationszyklen keine virale Nucleinsäure entdecken, wogegen spezifische Amplifikationsprodukte gefunden wurden, wenn die RNA 30 Zyklen lang
40 amplifiziert wurde. Daher ermöglichte der Nucleinsäure-Quantifizierungstest keine genaue Bestimmung des Inaktivierungsverfahrens und lieferte auch keinen Beweis dafür, daß die Inaktivierung der Nucleinsäure mittels dieses Verfahrens nicht vollständig war. Man braucht daher
45 ein umfassendes und quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Inaktivierungseffizienz.

Die vorliegende Erfindung umfaßt das Messen der Inhibition der Templateabhängigen enzymatischen Nucleinsäure-Synthese nach erfindungsgemäßer Laserstrahl-Einwirkung auf ein biologisch aktives Material. So würden also, wenn die Nucleinsäure mittels des Verfahrens der
50 vorliegenden Erfindung desintegriert wird, Versuche zur Amplifizierung der Nucleinsäure zu keinem Amplifikationsprodukt führen. Die Reagenzien für die Amplifikation von beispielsweise viraler Nucleinsäure sind typischerweise spezifisch für das Virus und/oder die Zell-Nucleinsäure der Zellkultur, die entweder für die Virusvermehrung oder für die Erzeugung eines gentechnisch
hergestellten Produkts verwendet wird.

55 Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Bestimmung der Effizienz einer

Nucleinsäure-Desintegrationstechnik vor, welches die Messung der Fähigkeit des Desintegrationsverfahrens, die Replikation von Virus-Nucleinsäure zu inhibieren, wie mittels eines Nucleinsäure-Amplifikationstests gemessen, umfaßt. Das Amplifikationsverfahren ist die hoch empfindliche Polymeran-Kettenreaktion (PCR), wie oben beschrieben. Die Effizienz des Desintegrationsprozesses kann dadurch bestimmt werden, daß es nicht möglich ist, amplifizierte Produkte der Polymerase-Kettenreaktion nachzuweisen. Die Wirksamkeit des PCR-Verfahrens kann durch Verwendung mindestens zweier verschiedener interner Standards, die sich von der zu amplifizierenden Sequenz durch mindestens einen Marker unterscheiden, kontrolliert werden.

Die Desintegration biologisch aktiver Virus-Nucleinsäure in der Desintegrationsmischung wird durch die Schritte des Vorsehens eines virushaltigen biologischen Materials, das zur Desintegration biologisch aktiver Nucleinsäure behandelt worden ist, des Behandeln einer Probe der Mischung, so daß die Virus-Nucleinsäure aus den Viruspartikeln freigesetzt wird, der Zubereitung einer Suspension, so daß die Nucleinsäure des Virus amplifizierbar ist, und der Zugabe eines Satzes von Primern und mindestens eines inneren Standards, der sich von der zu amplifizierenden Nucleinsäure in mindestens einem Marker unterscheidet, zur Mischung, und der Durchführung einer Amplifikationsreaktion, die ausreicht, um Amplifikationsprodukte vorzusehen, bestimmt. Die Nucleinsäure, die bestimmt und in einer aus einem Zellkultursystem stammenden Virussuspension mit der integrierten Nucleinsäure amplifiziert werden soll, ist die vom Virus stammende Nucleinsäure und die aus der Zellkultur stammende Nucleinsäure.

Die vorliegende Erfindung sieht ein Verfahren zur Herstellung eines sicheren, inaktivierten, nicht-infektiösen Vakzins vor, mit welchem die Risiken der Übertragung von biologisch aktiver Nucleinsäure auf den geeimpften Wirt eliminiert werden. Die vorliegende Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Erzeugung von sicherem, nicht-infektiösem biologischen Material vor.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird der Nucleinsäuregehalt an aktiver Nucleinsäure in einem biologischen Material bestimmt und nach dem Desintegrationsschritt mittels einer Nucleinsäure-Amplifikationsmethode, vorzugsweise PCR, quantifiziert. Der Parameter der Desintegrationskapazität ist der vollständige Verlust des Nachweises von aktiver Nucleinsäure, festgestellt mittels PCR. Wenn nach der Desintegration noch eine Nucleinsäure-Template-Aktivität mittels PCR gemessen wird, wird das Desintegrationsverfahren an Bedingungen angepaßt, die die vollständige Reduktion der Nucleinsäure-Template-Aktivität ermöglichen.

Wenn das vorliegende Verfahren der Desintegration biologisch aktiver Nucleinsäure verwendet wird, um z.B. Pathogene zu inaktivieren, die entweder für die Herstellung von Vakzinen oder zum Erhalt von nicht-infektiösem biologischem Material verwendet werden, ist es wesentlich, daß die Desintegration der biologisch aktiven Nucleinsäure vollständig ist.

Die Desintegration der Nucleinsäure in einem biologisch aktiven Material gemäß der vorliegenden Erfindung wird durch Nucleinsäureamplifikation gemessen. Dies geschieht mit einem empfindlichen, quantitativen, genauen und reproduzierbaren Verfahren zur Bestimmung von Nucleinsäureaktivität, welches die Effizienz des Desintegrationsprozesses anzeigt. Das Verfahren wird daher als Qualitätskontrolltest verwendet, um die angemessene Behandlung eines biologischen Materials mit photodynamischer Substanz/Laserstrahl zu verifizieren.

Wenn das Verfahren zur Herstellung eines Vakzins verwendet wird, wird die Immunogenität nach photodynamischer Substanz/Laserstrahl-Desintegration gewöhnlich durch Immunisierungs- und Schutzuntersuchungen an Labortieren, wie Mäusen oder Kaninchen, Bestimmung des bindenden Antikörpertiters und Neutralisierungstests beurteilt. Um zu gewährleisten, daß das Inaktivierungsverfahren die Integrität und Aktivität, wie die antigenen und immunogenen Eigenschaften des biologischen Mittels nicht verändert hat, wurde auch ein empfindlicheres Verfahren zur Bestimmung der Antigenität verwendet. Die Erhaltung der biologischen Integrität und Aktivität, wie Antigenität und Immunogenität von gemäß dem Verfahren der Erfindung behandelten biologischen Produkten wird durch Epitop-Kartierung und Wirksamkeitstest oder durch einen Aktivitätstest getestet.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung eines gentechnisch erzeugten proteinhaltigen Produktes vorgesehen, wobei ein biologisches Material, enthaltend genetisch modifizierte Zellen, die mit einer zu exprimierenden Fremd-Nucleinsäure aufweisenden Vektor transfiziert sind und von einer genetisch modifizierten Zelle mit einer im Genom stabil inserierten Fremd-Nukleinsäure oder einer Hybridome-Zelllinie stammen, mit einer

photodynamischen Substanz ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, versetzt und einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität des gentechnisch erzeugten, proteinhaltigen Produkts erhalten bleibt. Das ein gentechnisch hergestelltes, proteinhaltiges Produkt aufweisende biologische Material kann von genetisch modifizierten Zellen, die mit einem viralen Vektor transfektiert worden sind, welcher eine zu exprimierende Fremd-Nucleinsäure aufweist, von einer genetisch modifizierten Zelle mit im Genom stabil inserierter Fremd-Nucleinsäure, oder von einer Hybridom-Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper erzeugt, stammen. Geeignete, genetisch modifizierte Zellen sind Vertebraten-Zellen, wie jene ausgewählt aus VERO-Zellen, CHO-Zellen, BHK-Zellen, Hühnerembryozellen, MDCK-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK2-Zellen, MDBK-Zellen, WI-38-Zellen, MRC-5-Zellen, SK-Hep-Zellen oder aus einer anderen kontinuierlichen Zelllinie, wie einer Tumor-Zelllinie oder einer Hybridom-Zelllinie. Das gentechnisch erzeugte, proteinhaltige Produkt ist ein Protein, das von einem Virus, einem Bakterium, einem Blutfaktor, einem Zytokin, einem Chemokin, einem Hormon oder einem monoklonalen Antikörper stammt.

Die genetische Modifikation der Zellen kann durch Transfektion der Zellen mit einem viralen Vektor, welcher eine zu exprimierende Fremd-Nucleinsäure unter der Steuerung eines Transkriptions- und eines Translations-Elements aufweist, erfolgen. Der virale Vektor kann ein Adenovirus-Vektor oder ein Poxvirus-Vektor sein, vorzugsweise ein Vacciniavirus-Vektor. Geeignete, genetisch modifizierte Vertebraten-Zellen sind auch Zellen, die eine in ihrem Genom inserierte Fremd-Nucleinsäure aufweisen. Die in den viralen Vektor inserierte oder stabil im Genom der Zellen inserierte Fremd-Nucleinsäure kann für ein rekombinantes Protein, wie Virusproteine, vorzugsweise Antigene, bakterielle Proteine und Blutfaktoren, codieren. Bevorzugte virale Antigene sind jene von HIV, wie gp160 oder gp120, jene von HBV, wie HBsAg, preS2 oder preS1, jene von HCV, jene von Parvovirus, jene von HAV, jene von TBEV, wie prM/M oder E, jene von Influenzavirus, wie HA oder NA. Bevorzugte bakterielle Antigene sind jene ausgewählt aus *Borrelia*, *Pseudomonas* und *Haemophilus influenzae*. Bevorzugte Blutfaktoren inkludieren Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Faktor XIII, Protein C, Protein S, von Willbrand-Faktor und Antithrombin III. Andere rekombinante Proteine inkludieren Proteine der Gruppe der Zytokine, Chemokine oder Hormone.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung wird das rekombinante Protein im Kulturmedium erzeugt und freigesetzt. Das proteinhaltige Produkt wird konzentriert und in einer geeigneten Pufferlösung resuspendiert, mit einer photodynamischen Substanz behandelt und einem Laserstrahl ausgesetzt. Vorzugsweise wird die photodynamische Substanz dem Kulturmedium direkt, ohne vorherige Manipulation zugesetzt. Das das gentechnisch erzeugte Produkt und die photodynamische Substanz enthaltende Kulturmedium wird dann einem Laserstrahl ausgesetzt. Das Verfahren kann auf ähnliche Weise, wie für die Herstellung von inaktiviertem Virus beschrieben, durchgeführt werden.

Wenn das durch genetisch modifizierte Zellen hergestellte Protein nicht in den Überstand freigesetzt wird, sondern noch mit den Zellen verbunden ist, kann das Produkt mittels eines herkömmlichen Verfahrens, wie Konzentration der Zellen, Extraktion und Resuspension in einem geeigneten Puffer von den Zellen isoliert werden. Die das proteinhaltige Produkt aufweisende Pufferlösung wird dann weiter einem Laserstrahl ausgesetzt, gegebenenfalls nach Zugabe einer photoaktiven Substanz, wie oben beschrieben.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Inaktivierung einer biologisch aktiven Nucleinsäure in einem Mikroorganismus-enthaltenden biologischen Material vorgesehen, wobei ein Mikroorganismus-enthaltendes biologisch aktives Material mit einer photodynamischen Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, versetzt und einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im biologischen Material zu desintegrieren, während die biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität, Immunogenität und Protektivität, des Mikroorganismus im biologischen Material erhalten bleiben. Vorzugsweise ist der Mikroorganismus ein Bakterium.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines inaktivierten mikrobiologischen Vakzins vorgesehen, wobei ein biologisch aktives Material, welches ein mikrobiologisches Mittel enthält mit einer photodynamischen Substanz, ausgewählt aus der

Gruppe der Phenothiazine, versetzt wird, einem Laserstrahl ausgesetzt wird, um im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nucleinsäure im Material zu des integrieren, während die biologische Integrität und Aktivität, wie Antigenität und Immunogenität, des mikrobiologischen Mittels im biologischen Material erhalten bleiben, der inaktivierte Mikroorganismus einer weiteren Reinigung unterzogen wird, und der inaktivierte und gereinigte Mikroorganismus mit einem physiologisch akzeptablen Träger formuliert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird ein Quencher und/oder ein Scavenger und/oder ein Stabilisator vor der Einwirkung eines Laserstrahls dem biologischen Material zugesetzt.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein biologisch aktives Material vorgesehen, welches mit einer photodynamischen Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine versetzt und einem Laserstrahl ausgesetzt worden ist, wobei das biologische Material desintegrierte, biologisch aktive Nucleinsäure aufweist, während seine biologische Integrität und Aktivität, wie antigene, immunogene und protektive Eigenschaften erhalten geblieben sind.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist ein biologisch aktives Material vorgesehen, das mit einer photodynamischen Substanz behandelt und einem Laserstrahl ausgesetzt worden ist, wobei das biologische Material desintegrierte, biologisch aktive Nucleinsäure aufweist, während seine biologische Integrität und Aktivität, wie antigene, immunogene und protektive Eigenschaften, erhalten geblieben sind. Erfindungsgemäß ist das vorgesehene biologische Material ein Blutfaktor, ein Plasmaprotein, das aus der Fraktionierung von Blut oder Blutplasma stammt, ein Virus oder ein Virus-Antigen, ein virales oder bakterielles Vakzin oder ein gentechnisch hergestelltes proteinhaltiges Produkt, wie ein rekombinantes Protein oder ein monoklonaler Antikörper.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Präparation vorgesehen, die ein erfindungsgemäß erhältliches biologisches Material, wie oben beschrieben, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist. Die pharmazeutische Präparation der vorliegenden Erfindung kann zur Behandlung eines Säugers verwendet werden.

Die Erfindung ist nun anhand der folgenden Beispiele und der Zeichnungsfigur näher beschrieben, auf welche sie jedoch nicht eingeschränkt werden soll.

Es zeigt Fig. 1: Schematische Zeichnung des Systems zur Laserstrahl-Aktivierung einer photodynamischen Substanz, die einem biologischen Material zugesetzt ist

Beispiele:

Beispiel 1: Inaktivierung von HIV-1, TBEV, Influenza, HSV-1 und Polio-Virus durch Methylenblau/Laserstrahlbehandlung

Eine schematische Beschreibung dieser Vorgangsweise ist in Fig. 1 gezeigt. 100 ml Virus-Stammlösung werden in einem Kolben gelassen, der unter Rühren auf 4°C gehalten wird. Eine Methylenblau-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM wird auf eine Endkonzentration von 2 µM zugegeben. Nach gründlichem Rühren wird das Material durch ein Röhrchen aus rostfreiem Stahl mit einem Glasfenster, durch welches es mit einem Laserstrahl von einem He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm und mit einer Arbeitsintensität von 10 mW bestrahlt wird, gepumpt. Das Material wurde 0 bis 30 Bestrahlungszyklen lang rezirkuliert, und Proben wurden nach der Anzahl der Zyklen zur Virus-Titrierung entnommen, wie oben beschrieben. Kontrollen mit Methylenblau wurden 30 Zyklen unter identischen Bedingungen, jedoch ohne Bestrahlung unterzogen. Die Virus-Titer wurden vor und nach Methylenblau/Laser-Behandlung bestimmt und sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Inaktivierung von HIV-1, TBEV, Influenza-, HSV-1 und Polio-Virus durch Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung

Behandlung	HIV-1	HSV-1	TBEV	Influenza	Polio
keine	$10^{7,0}$	$10^{8,4}$	$10^{7,3}$	$10^{8,2}$	$10^{8,9}$
1 Zyklus	$10^{6,5}$	$10^{7,5}$	$10^{6,2}$	$10^{7,7}$	$10^{8,7}$
2 Zyklen	$10^{6,1}$	$10^{6,0}$	$10^{5,7}$	$10^{5,5}$	$10^{8,6}$
5 Zyklen	$10^{1,9}$	$10^{2,0}$	$10^{2,9}$	$10^{1,7}$	$10^{8,9}$
10 Zyklen	$<10^{0,2}$	$<10^{0,2}$	$<10^0$	$<10^{0,2}$	$10^{8,8}$
20 Zyklen	$<10^{0,2}$	$<10^{0,2}$	$<10^0$	$<10^{0,2}$	$10^{6,4}$
30 Zyklen	$<10^{0,2}$	$<10^{0,2}$	$<10^0$	$<10^{0,2}$	$10^{4,4}$
30 Zyklen ohne Laser- strahl/+MB	$10^{6,9}$	$10^{8,1}$	$10^{7,1}$	$10^{7,6}$	$10^{8,1}$

Beispiel 2: Inaktivierung von Polio-Virus mit Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung mit erhöhter Konzentration von Methylenblau

Eine Methylenblau-Stammlösung wurde zu 100 ml einer Polio-Virus-Stammlösung auf Endkonzentrationen von 1, 3, 10 bzw. 30 μM zugegeben. Jede Probe wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, 30 Zyklen lang bestrahlt. Die Virus-Titer wurden nach Bestrahlung bei jeder Methylenblau-Konzentration bestimmt.

Tabelle 2: Inaktivierung von Polio-Virus mit Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung

MB-Konz. (μM)	Virus-Titer
1	$10^{8,9}$
3	$10^{6,2}$
10	$10^{2,7}$
30	$<10^{0,2}$

Beispiel 3: Vergleich der Antigenität von mit Methylenblau/Laserstrahl und mit Formalin inaktivierten Vakzin-Präparationen

Saccharose-Gradient-gereinigte Vollvirus-Präparationen von HIV-1, Influenza A/FPV/Rostock/34, einem TBE-Virus und einer gereinigten Virus-Glycoprotein-Untereinheit-Präparation aus mit HSV-1 infizierten Vero-Zellen wurden 30 Zyklen einer Methylenblau (2 μM)/Laserstrahl (10mW)-Behandlung unterzogen. Identische Präparationen wurden durch Formalinbehandlung (0,05% Endkonzentration, 30 h bei 37°C) inaktiviert. Nach einem Sicherheitstest, wie in Beispiel 1 beschrieben, um zu gewährleisten, daß kein infektiöses Virus vorhanden war, wurde die Antigenität aller Präparationen bestimmt.

Die Antigenität der HIV-1-Präparationen wurde durch Verwendung des handelsüblichen Antigen-Capture-ELISA bestimmt. Die mit Methylenblau/Laserstrahl inaktivierten Präparationen wurden seriell zweifach verdünnt, bevor 100 μl jeder Verdünnung in eine zuvor mit gereinigtem anti-HIV-1-IgG vorbeschichtete Vertiefung gegeben wurden. Die Platten wurden dann gründlich gewaschen, und 100 μl Human-anti-HIV-1-Antikörper, der kovalent an Meerrettich-Peroxidase gebunden war, wurden zugegeben und bei Raumtemperatur 90 min lang inkubiert. 200 μl aktiviertes Substrat (O-Phenyl-diamin) wurden dann zugegeben und im Dunklen inkubiert, bis die Reaktion durch Zugabe von 50 μl 8M Schwefelsäure gestoppt wurde und die Extinktion bei 490 nm abgelesen wurde. Der Antigentiter wurde als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung,

die eine positive Reaktion ergab, bestimmt.

Die TBEV-Antigenität wurde auch durch Antigen-Capture-ELISA unter Verwendung eines gereinigten Meerschweinchen-anti-TBEV-IgG als Capture-Antikörper bestimmt. Die inaktivierten Präparationen wurden seriell zweifach verdünnt, und 100 µl jeder Verdünnung wurden zugegeben und 90 min lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 µl Kaninchen-anti-TBEV-Serum zugegeben, und nach 60minütiger Inkubation wurden 100 µl Peroxidase-gebundenes Anti-Kaninchen-IgG zugegeben. 200 µl aktiviertes Substrat (O-Phenylendiamin-Hydrochlorid) wurden dann zugegeben, und es wurde im Dunklen inkubiert, bis die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 8M Schwefelsäure gestoppt wurde und die Extinktion bei 490 nm abgelesen wurde. Zusätzlich wurde eine hoch-reine TBEV-Antigen-Präparation im ELISA als Standard verwendet, was eine direkte Berechnung der Menge des reaktiven TBEV-Antigens ermöglichte.

Die HSV-Antigen-Reaktivität wurde ebenfalls gemessen, wobei ein modifiziertes handelsübliches ELISA-Set verwendet wurde. Die Antigenproben wurden seriell zweifach verdünnt, und 100 µl jeder Verdünnung wurden auf mit gereinigtem Kaninchen-anti-HSV-1-IgG vorbeschichtete Platten gegeben. Nach Inkubation und Waschen wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierter anti-HSV-1-Antikörper zugegeben. Dieser wurde bei 37°C 1 h lang inkubiert, und nach dem Waschen wurden 100 µl aktiviertes Substrat (O-Phenylendiamin-hydrochlorid) zugegeben und im Dunklen 10 min lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 5M Schwefelsäure gestoppt, und die Extinktion wurde bei 490 nm abgelesen. Der Antigentiter wurde nach der Erstellung einer Standardkurve unter Verwendung von hochreinem HSV-1-Antigen-Standard, dessen Reaktivität im ELISA-System bestimmt wurde, bestimmt. Die Antigenität von Influenza wurde mittels des Hämagglutinationstest, d.h. Agglutination von Virus mit Erythrozyten, gemessen. Dies wurde wie von Hirst "The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chicken Embryos Infected with Influenza Virus", Science 94: 22-23 (1941) beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Vergleich der Antigenität von mit Methylenblau/Laserstrahl und Formalin inaktivierten Vakzinen

	Formalin	Methylenblau	
HIV	1:2160	1:5120	Antigen-ELISA-Titer
Influenza	10	11	HA-Titer-HAU
TBEV	40,7 µg/ml	39,4 µg/ml	Antigen-Konz.
HSV	9001	12.370	ELISA-Einheiten/ml

Beispiel 4: Immunisierung von Mäusen mit mit Formalin inaktiviertem und mit Methylenblau/Laserstrahl inaktiviertem HIV-1

Eine mittels Saccharose-Gradienten gereinigte HIV-1-Präparation mit einem Titer von etwa 10^7 TCID₅₀/ml wurde mit einer Formalin-Endkonzentration von 0,05% 30 h lang bei 37°C inaktiviert. Nach dieser Behandlung wurde das Formalin durch Dialyse entfernt. Dieselbe HIV-1-Präparation wurde 10, 20 und 30 Zyklen einer Laserstrahl-Behandlung, wie zuvor beschrieben, nach Zugabe von Methylenblau zum Erhalt einer Endkonzentration von 2 µM unterzogen. Das Methylenblau wurde dann durch Leiten über eine G-25 Sephadex-Säule entfernt. Der Proteingehalt aller Präparationen wurde bestimmt und eingestellt. Gruppen von zehn Mäusen wurden mit 10 µg jeder Präparation, mit Al(OH)₃ als Adjuvans, immunisiert, wobei die Mäuse vier Wochen später einen Booster mit derselben Antigen-Dosis erhielten. Die Mäuse wurden zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung zwecks Serumpräparation getötet, und nach dem Poolen der Sera der Tiere jeder einzelnen Gruppe wurden die HIV-1-spezifischen Antikörpertiter unter Verwendung des handelsüblichen Gesamtvirus-ELISA-Sets bestimmt. Kurz gesagt wurden die Sera seriell zweifach verdünnt und 100 µl jeder Verdünnung wurden auf die vorbeschichteten Platten gegeben und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde jede Vertiefung mit 100 µl mit

Meerrettich-peroxidase konjugiertem Anti-Maus-IgG gefüllt und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden 200 µl aktiviertes Substrat (O-Phenylendiamin-Hydrochlorid) in jede Vertiefung zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunklen 10 min lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 5M Schwefelsäure gestoppt, und die Extinktion wurde bei 490 nm abgelesen. Der Antikörpertiter wurde als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion ergab, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Vergleich der Immunogenität von mit Laserstrahl/Methylenblau und mit Formalin inaktiviertem HIV-1

Inaktivierungsmethode	Mittlerer HIV-1-ELISA-Titer
10 Zyklen Laser/MB	38.000
20 Zyklen Laser/MB	40.000
30 Zyklen Laser/MB	36.000
Formalin	36.000

20

Beispiel 5: Vergleich der Desintegration von HIV-1- Nucleinsäure durch Methylenblau/Laserstrahl -und durch Formalin-Behandlung

Eine HIV-1-Virus-Präparation wurde durch 30stündige Behandlung mit 0,05% Formalin-Endkonzentration bei 37°C oder durch Behandlung mit Laserstrahl, wie in Beispiel 4 beschrieben, während 10, 20 oder 30 Zyklen, nach Zugabe von Methylenblau zum Erhalt einer Endkonzentration von 2µM inaktiviert. Der Virus-titer wurde unter Verwendung einer Standard TCID₅₀-Methodik (Reed et al., 1938, Amer. J. Hyg. 27:493-497) berechnet. Die RNA-Kopienzahl wurde gemäß der folgenden Vorgangsweise bestimmt:

500 µl- der inaktivierten Virus-Präparation wurden 20 min lang bei 70.000 U/min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Guanidin-Isothiocyanat-Lösung (RNAzol® von Biotec) aufgenommen, und 5 µl von 1mg/ml t-RNA aus Hefe und eine bestimmte Menge, beispielsweise 20 µl, Standard-RNA wurde zugegeben. Eine vorbestimmte Anzahl, z.B. 400 und 1200 Kopien der minus- und plus-RNA-Standards wurden zugegeben und am Vortex geschüttelt. Die Lösung wurde 10 min lang auf 70 °C erhitzt, dann wurde 1/10 Volumen Chloroform zugegeben und 10 min lang auf Eis inkubiert. Danach wurde sie in einer Tisch-Zentrifuge 5 min lang zentrifugiert, und der Überstand wurde in neue Phiolen transferiert. 500 µl Isopropanol wurden zugegeben und 15 min lang auf -80°C eingestellt. Danach wurde 10 min lang zentrifugiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, und das Pellet wurde in 50 µl Wasser aufgenommen. 5 µl wurden für die RT-PCR verwendet.

Die verwendeten Standard-Plasmide pgag-15 und pgag+12 stammten vom Plasmid pgagl, welches aus dem bekannten pBS/SK-Plasmid (von Stratagene) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 1417 bis 2008 des HIV-1 von Ratner et al. (1985, Nature 313:277-284) enthält. In pgag-15 waren bp1593 bis 1607 deletiert, in pgag+12 war ein Insert von 12 bp an der Stelle 1593 inseriert.

Bei dieser Quantifizierung wurden Primer verwendet, die an die cDNA-Sequenzen von HIV-1 binden und die ein Produkt von 115 (Gew.) bp mittels RT-PCR von Wildtyp-RNA ergeben, nämlich:

SK38: ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT HIV-1 1551-1578 und

SK39: TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC HIV-1 1665-1638 (Numerierung gemäß Ratner et al.). Die Länge der RT-PCR-Produkte der Standard- und der Wildtyp-DNA war daher 127 (pgag+12) und 100 (pgag-15). Die Primer wurden durch Verwendung der Phosphoramidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer) erzeugt.

Der RT-PCR-Aufbau enthielt auf bekannte Weise ein Aliquot der extrahierten Nucleinsäure, RT-Puffer von Perkin-Elmer, MgCl₂, dNTPs, den RT-Primer und rT.th.Polymerase (Perkin Elmer, 2,5 E/µl) und Wasser. Die RT-PCR erfolgte gemäß der Vorschriften des Herstellers von Puffer und Enzym bzw. gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschriften (Mullis et al., Methods in Enzymology 155

(1987), 335-350) in einer PCR-Vorrichtung (GeneAmp PCR System 9600 von Perkin-Elmer).

Zur Bestimmung und Quantifizierung der PCR-Produkte wurden 0,5 bis 1,0 µl der PCR-Lösung genommen und in einem Genescanner 373A-Instrument von Applied Biosystems gemäß den Instruktionen der Erzeuger analysiert.

Die RNA-Kopienzahl der HIV-Virus-Präparationen wurden vor und nach der Behandlung mit Methylengrün/Laserstrahl bestimmt, und die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Vergleich der Desintegration von HIV-1-Nucleinsäure mittels Methylengrün/Laserstrahl- und Formalin-Behandlung durch Bestimmung von Virustiter und RNA-Kopienzahl

Behandlung	Virus-Titer (TCID ₅₀ /ml)	HIV-1-RNA (Kopienzahl/ml)
Virus-Stammlösung	10 ^{7,6}	10 ¹⁰
Virus-Stammlösung mit MB	10 ^{7,1}	10 ^{9,8}
10 x Zyklen Laser mit MB	<10 ^{0,3}	<10 ^{2,6}
20 x Zyklen Laser mit MB	<10 ^{0,3}	<10 ^{2,6}
30 x Zyklen Laser mit MB	<10 ^{0,3}	<10 ^{2,6}
Formaldehyd	<10 ^{0,3}	10 ^{8,3}

Beispiel 6: Desintegration von HSV-DNA und CEC-DNA mittels Methylengrün/Laserstrahl-Behandlung

Ein HSV-1-Glycoprotein-Untereinheit-Vakzin wurde aus mit HSV-1 infizierten Hühnerembryozellen durch Detergens-Extraktion, Saccharose-Gradienten-Reinigung und nachfolgende Lentil-Lectin-Chromatographie hergestellt. Diese Präparation wurde dann einer Formalin-Inaktivierung (30 h, 0,05% Formalin Endkonzentration bei 37°) oder einer Methylengrün/Laserstrahl-Behandlung mit 30 Zyklen mit einer Methylengrün-Endkonzentration von 2 µM unterzogen. Hühnerembryozellen- und HSV-1-DNA in der mit Methylengrün/Laserstrahl und mit Formalin behandelten Probe wurde vor und nach beiden Behandlungen bestimmt.

Für die HSV-DNA-Quantifizierung wurden Primer verwendet, welche im Genom von HSV binden und ein Produkt von 114 bp mittels PCR von Wildtyp-DNA ergeben, nämlich gDR1/B: AAC TAC CCC GAT CAT CAG und gDR2/B: AGG CCC ACT TAG ACG ACA.

Das Standard-Plasmid pHerp-9 stammte vom Plasmid pHerp, welches aus dem bekannten pCRII-Plasmid (von In Vitrogen) und einem Insert von bp 128364 bis 138784 des HSV-Genoms (McGeoch D.J. et al., EMBL GenBank ID HE1CG1) besteht. 9 bp waren in pHerp-9 deletiert. Die Plasmide pHerp und pHerp-9 wurden gereinigt, die Konzentration wurde durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, und es wurde mit einem Restriktionsenzym linearisiert und in einem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) verdünnt.

Diese DNA-Präparation dient als Standard für die PCR. Die Längen der PCR-Produkte von Standard und Wildtyp waren so 105 (pHerp-9) und 114 bp (pHerp).

Die chromosomale Hühner-DNA wurde unter Verwendung des Primer-Paares CR1: ATGAGGCACTGGAACAGGTTGCCC und

CR1A: AGGGCCACATCCAGCCTGG quantifiziert. Diese Primer sind spezifisch für repetitive, von Vögeln stammende Sequenzen, insofern als sie spezifisch innerhalb der konservierten Sequenzen binden und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 846 bp amplifizieren. Die Standard-Plasmide pCR1+11 und pCR1-8 wurden durch Insertion synthetischer Oligo-nucleotide, welche die von CR1 stammende Sequenz von Position 260 bis 345 (gemäß Stumph et al., 1981, Nucl. Acid. Res. 9: 5383-5397) enthielten, zwischen die NcoI- und SacI-Stellen des p-Bluscript-Vektors, erhalten. Bei pCR1+11 enthält die CR1-Sequenz eine Insertion von 11 Nucleotiden, und beim

Standard-Plasmid pCR1-8 eine Deletion von 8 Nucleotiden an Position 302 (gemäß Stumph et al.). Daher sind die von diesen Standard-Plasmiden stammenden PCR-Produkte 95 bp bzw. 76 bp lang.

Die Ergebnisse der HSV-DNA- und CEC-DNA-Quantifizierung sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Quantifizierung von HSV-1- und CEC-Nucleinsäure vor und nach der Desintegration mittels Methylenblau/Laser-Behandlung oder Formalin- Inaktivierung eines HSV-Untereinheit-Vakzins

	DNA-Gehalt (pg/ml)	
	CEC-DNA	HSV-DNA
Ausgangsmaterial	95	66
30 Zyklen Laser/MB	<1	<1
Formalin	88	48

Beispiel 7: Vergleich der Desintegration von Vero-Zellen-DNA mittels Methylenblau/Laserstrahl- und Formalin-Behandlung

Ein HIV-1-gp160-Kandidaten-Vakzin wurde von rekombinanten, mit Vaccinia infizierten Vero-Zellen gereinigt. Dies erfolgte mittels Extraktion mit Desoxycholat, gefolgt von Lentil-Lectin und Immunoaffinitätschromatographie, wie in Barrett et al. (AIDS Res. Human Retrov. 5) (1989) 159-171).

Diese Präparation wurde dann einer Formalin-Inaktivierung (30 h, 0,05% Formalin-Endkonzentration, 37°C) unterzogen oder 30 Zyklen einer Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung mit einer Methylenblau-Endkonzentration von 2 µM, wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen. Der Vero-Zellen-DNA-Gehalt des Ausgangsmaterials und nach Inaktivierung durch Formalin- und Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung wurde unter Verwendung der Primer:

Alu A2/2: GCCGGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGT und

Alu B: GAGACAGAGTCTCGCTCTGTGCCCCAGG,

welche in einem stark konservierten Bereich in den sogenannten "Alu repeat"-Sequenzen binden und ein 146 bp-Fragment (Jelinek et al., Ann. Rec. Biochem. 51 (1982) 813-844) amplifizieren, bestimmt.

Das Standard-Plasmid pAlu20 stammt vom Plasmid pAlu-wt, welches aus dem bekannten pCRII-Plasmid (von InVitrogen) und einem Insert an der multiplen Klonierungsstelle des pCRII-Plasmids besteht, welches Insert die bp 148 bis 294 der Alu-repeat-spezifischen Sequenz von Batzer et al. (1990, Nucl. Acid. Res. 18:6793-6798) enthält. In pAlu20 waren die bp 178 bis 197 deletiert.

Die Längen der PCR-Produkte von Standard pAlu20 und Wildtyp-DNA sind somit 126 bzw. 146 bp. Die Ergebnisse der DNA-Quantifizierung vor und nach der Desintegration sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Desintegration von Vero-Zellen-DNA mittels Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung in einem rekombinanten HIV-1 GP160-Vakzin

	DNA-Gehalt (pg/ml)
Ausgangsmaterial	76
30 Zyklen Laser/MB	<10
Formalin	69

Beispiel 8: Wirkung von Methylenblau/Laserstrahl- Behandlung auf rekombinante, von FVIII stammende Zellkultur

Eine Zellkultur von rekombinanten CHO-Zellen, die mit einer für FVIII-Aktivität codierenden cDNA transfektiert wurden, wurde mit einem ecotropen Mäuse-Retrovirus, Stamm MuLV, versetzt, und Methylenblau wurde zum Erhalt einer Endkonzentration von 2 µM zugegeben. Diese wurde dann 10, 20 und 30 Zyklen einer Laserstrahl-Behandlung, wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen. Virustiter und FVIII-Aktivität wurden vor der Zugabe von Methylenblau und nach 10, 20 und 30 Zyklen Laserstrahl-Behandlung bestimmt. Der Virustiter wurde unter Verwendung des XC-Plaque-Tests, wie von Hartley et al. (1975, Virology 65, 128-134) beschrieben, bestimmt, und die FVIII-Aktivität wurde nach dem chromogenen Verfahren wie in den Instruktionen für das Immunochrom®-Reagens-Set beschrieben, bestimmt.

Die in Tabelle 8 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß das Virus nach 10 Zyklen Laserstrahl-Bestrahlung in Anwesenheit von 2 µM Methylenblau effizient inaktiviert ist. Unter diesen Bedingungen ist die FVIII-Aktivität im wesentlichen unverändert.

Tabelle 8: Inaktivierung von MuLV mittels Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung in einer rFVIII-Präparation und Bestimmung der rFVIII-Aktivität

MB/Laserstrahl-Zyklen	FVIII-Aktivität (Einheiten/ml)	MuLV-Titer (FFE/ml)
0	21,7	10 ^{5,4}
10	20,3	<10 ⁰
20	15,9	<10 ⁰
30	15,4	<10 ⁰

Beispiel 9: Wirkung von Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung auf aus einer Zellkultur stammenden, rekombinanten vWF

Ein Überstand aus einer CHO-(Chinese hamster ovary)-Zellkultur, die rekombinanten vWF exprimiert, wurde einer Methylen-blau/Laserstrahl-Behandlung, wie für rFVIII in Beispiel 8 beschrieben, unterzogen. Proben wurden für RistoCo:F-Aktivitäts- und vWF-Antigen-Bestimmung vor der Zugabe von Methylenblau und nach 10, 20 und 30 Zyklen einer Laserstrahl/Methylenblau-Behandlung genommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: RistoCo:F-Aktivität von rvWF nach Methylenblau/Laser-Behandlung

MB/Laserlicht-Zyklen	ristoCo:F/vWF Ag
0	17,8
10	17,6
20	15,5
30	15,4

Beispiel 10: **Onkogen-Desintegration durch Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung**

Eine Onkogen-Aktivierung, die zu einem Thymus-Lymphom bei C57 B1/6J-Mäusen führte, wurde durch i.p.-Injektion des chemischen Carcinogens N-Nitrosomethylharnstoff (30 mg pro kg, einmal pro Woche, 5 Wochen hintereinander) induziert. DNA mit hohem Molekulargewicht, die die induzierten Onkogene enthielt, wurde aus Thymus-Tumoren mittels Standard-Techniken hergestellt. Diese wurde mit einer Konzentration von 100 µg/ml mit 2 µmol/ml Methylenblau zubereitet und durch Einwirkung von 30 Zyklen Laserlichtstrahl bei 632 nm mit einer Intensität von 10 mW inaktiviert. Kontroll-Präparationen ohne Methylenblau wurden auf identisch Weise behandelt. Die Tumorigenität der beiden Präparationen wurde durch Transfektion-Transformations-Tests auf NIH/3T3-Zellen analysiert. Diese Zellen wurden mit Methylenblau/Laserstrahl-desintegrierter und Kontroll-DNA transfektiert, wobei die CaPO₄-Ausfällungsmethode verwendet wurde. Die ausgefällte DANN wurde mit Gewebeskulturmedium gemischt und in Kunststoff-Petrischalen gegeben, die NIH/3T3-zellen (25µg DANN zu 5 x 10⁵ Zellen) enthielten. Nach Subkultivierung und 20tägiger Inkubation wurden zahlreiche große Foci, bestehend aus morphologisch transformierten Zellen, beobachtet und für jede DNA-Präparation in insgesamt zehn Platten gezählt.

Tabelle 10: Bestimmung der Onkogenität von DNA vor und nach Laserbehandlung und Methylenblau/Laser-Behandlung

Onkogen-DNA-Präparation	Anzahl der Foci transformierter Zellen
Unbehandelte Kontrolle	109
mit Laserstrahl-behandelt, ohne Methylenblau	79
mit Methylenblau behandelt, ohne Laserstrahl	86
Laserstrahl mit Methylenblau-Behandlung	4

Beispiel 11: **Onkogen-Desintegration durch Laserstrahl-Behandlung**

DNA mit hohem Molekulargewicht, welche induzierte Onkogene enthielt, wurde hergestellt, wie in Beispiel 10 beschrieben, und mit 30 Zyklen Laserstrahl-Einwirkung bei 320 nm mit einer Intensität von 10 mW desintegriert. Die Tumorigenität der Präparation wurde, wie in Beispiel 11 beschrieben, analysiert.

Tabelle 11: Bestimmung der Onkogenität von DNA vor und nach Laserbehandlung bei 320 nm

Onkogen-DNA-Präparation	Anzahl der Foci transformierter Zellen
Unbehandelte Kontrolle	109
mit Laserstrahl behandelt, ohne Methylenblau	10
mit Methylenblau behandelt, ohne Laserstrahl	86
Laserstrahl mit Methylenblau-Behandlung	10

Beispiel 12: Inaktivierung von Mäuse-Retroviren in einem monoklonale Antikörper enthaltenden Hybridom-Überstand

Ein ecotroper Mäuse-Retrovirus, MuLV Stamm SN-E81, wurde einem Hybridom-Überstand, welcher einen gegen HIV-1 gp160 gerichteten monoklonalen Antikörper enthielt, zugesetzt. Methylenblau wurde dem Überstand bis zu einer Endkonzentration von 2 µM zugegeben, und die Mischung wurde, wie oben beschrieben, 10, 20 und 30 Zyklen einer Laserstrahlbehandlung unterzogen. Der Virus- und Antikörper-Titer wurde vor der Zugabe von Methylenblau und nach 10, 20 und 30 Zyklen Laserstrahl-Behandlung bestimmt. Der Virus-Titer wurde unter Verwendung des XC-Focusbildungstests, wie von Hartley et al., 1975 beschrieben, bestimmt. Virology 65, 128-134. Der Antikörper-Titer wurde mittels Standard-ELISA-Techniken bestimmt, wobei mit rekombinantem gp160 beschichtete Platten verwendet wurden. Kurz gesagt wurden die Mikrotiterplatten mit 0,5 µg gereinigtem, rekombinantem HIV-1 gp160 beschichtet, wobei 100 µl pro Vertiefung verwendet wurden. Die Seren wurden seriell zweifach verdünnt, und 100 µl jeder Verdünnung wurden in die vorbeschichteten Platten gegeben und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde jede Vertiefung mit 100 µl von mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem anti-Maus-IgG gefüllt und 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden 200 µl aktiviertes Substrat (O-Phenylendiamin-Hydrochlorid) in jede Vertiefung zugegeben und im Dunklen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 5M Schwefelsäure gestoppt, und die Extinktion wurde bei 490 nm abgelesen. Der Antikörper-Titer wurde als reziproker Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion ergab, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: MuLV-Titer und Antikörper-Titer nach Methylenblau/Laser-Behandlung

MB/Laserstrahl - Zyklen	MuLV-Titer	Antikörper-Titer
0	$10^{5.3}$	1:5120
10	$<10^0$	1:5120
20	$<10^0$	1:5120
30	$<10^0$	1:2560

Beispiel 13: Wirksamkeit von mit Formalin und mit Methylenblau/Strahlenlicht inaktiviertem TBEV in einem Maus-Challenge-Modell

Auf Hühnerembryozellen gezüchtetes Tick-Borne Encephalitis-Virus (TBEV) wurde entweder durch Formalin-Behandlung (0,05% Formalin, 37°C, 30 h lang) oder durch Methylenblau-Behandlung (30 Zyklen Laserstrahlen mit einer Methylenblau-Konzentration von 2 µM) inaktiviert. Beide Präparationen wurden mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, gefolgt von Dialyse, weiter gereinigt. Die Proben wurden verdünnt, um gleiche Proteinkonzentrationen zu erhalten.

Die Immunogenität der Präparationen wurde mittels PD_{50} -Bestimmung, gefolgt von Adjuvantierung mit Alaun, bestimmt. Gruppen von zwanzig Mäusen wurden subkutan mit dreifachen Verdünnungen der adjuvantierten Vakzin-Präparationen immunisiert. Eine Woche nach der Immunisierung erhielten die Mäuse einen Booster mit derselben Antigen-Dosis. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse einem Challenge durch i.p.-Impfung mit 10^2 LD₅₀-Dosen des lebenden Virus unterzogen.

Die Mäuse wurden dann über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet, und die Anzahl der nach diesem Zeitraum überlebenden Mäuse wurde aufgezeichnet. Die Schutzdosis für 50% der Mäuse (PD_{50}) wurde gemäß dem Verfahren von Kärber, 1931, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480-483, berechnet und ist in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Wirksamkeitsmessung von mit Methylenblau/Laserstrahl und mit Formalin inaktivierten TBEV-Vakzinen

Vakzin-Präparation	PD ₅₀ (ng)
mit Formalin inaktiviert	32,3
mit Laserstrahl/MB inaktiviert	18,7

Beispiel 14: **Vergleich der Reaktivität von mit Formalin inaktiviertem und mit Methylenblau/Laserstrahl inaktiviertem Tick-Borne Encephalitis-Virus bei einer Serie spezifischer monoklonaler Antikörper**

TBE-Virus wurde auf primären Hühnerembryozellen gezüchtet und mit zwei Zyklen Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Es wurde dann mittels Ultrazentrifugation pelletiert, in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, resuspendiert und eine Formalin-Inaktivierung (0,05% Formalin-Endkonzentration, 30h bei 37°C) oder Methylenblau/Laserstrahl-Inaktivierung (2 µM Methylenblau-Endkonzentration, zehn Zyklen) vorgenommen. Beide Präparationen wurden dann einer Sephadex 6-25-Chromatographie unterzogen und nach der Elution eingestellt, um gleiche Proteinkonzentrationen zu erhalten.

Die Reaktivitäten beider Präparationen mit acht verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen TBE-Virus-Glycoprotein gerichtet waren, wurden mittels Standard-ELISA-Techniken bestimmt. Kurz gesagt wurden Mikrotiterplatten mit der Viruspräparation mit einer Konzentration von 2 µg/ml in Carbonat-puffer, pH 9,6, beschichtet. Nach dem Waschen wurden die monoklonalen Antikörper zugegeben und 1 h lang bei 37°C reagieren lassen. Mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes anti-Maus-Immunglobulin wurde dann zugegeben, und nach einstündiger Inkubation bei 37°C und Waschen wurde das Substrat zugegeben, und die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen, nachdem die Reaktion durch Zugabe von 2N H₂SO₄ gestoppt worden war. Alle monoklonalen Antikörper zeigten eine höhere Reaktivität bei der mit Methylenblau/Laserstrahl inaktivierten Virus-Präparation als bei der mit Formalin inaktivierten Vakzin-Präparation. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: ELISA-Extinktionswerte monoklonaler Antikörper im Test gegen mit formalin und mit Methylenblau/Laserstrahl inaktiviertes TBE-Virus

Inaktivierungs- methode	Monoklonaler Antikörper							
	8H6	6E1	2B5	3C7	2B5	5F6	1C2	4A5
Formalin	0,46	0,45	0,46	0,62	1,21	0,10	0,34	0,47
Methylen- blau/ Laserstrahl	0,57	0,61	0,62	0,81	1,92	1,35	0,82	0,98

Beispiel 15: **Desintegration von Nucleinsäure eines pro-karyontischen Pathogens durch Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung**

Eine Kultur von B.burgdorferi-Zellen wurde bis zu einer Zellzahl von 1×10^7 Spirochäten/ml gezüchtet, und Methylenblau wurde bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Die Kultur wurde 30 Zyklen einer Laserstrahlbehandlung unterzogen. Die Anwesenheit von B. burgdorferi-DNA vor und nach der Behandlung mit Methylenblau/Laserstrahl wurde mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer

LD1: ATG CAC ACT TGG TGT TAA CTA
 LD2: GAC TTA TCA CCG GCA GTC TTA (gemäß Marconi et al., 1992, J. Clin Microbiol. 30:2830-2834) bestimmt.

5 **Beispiel 16: Inaktivierung von Parvovirus in einem von Humanplasma stammenden Produkt mittels Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung**

10 Eine hochreine FVIII-Konzentratlösung wurde mit dem Parvovirus versetzt, Minute-Mäuse-Virus (Minute Virus of Mice, MVM) und Methylenblau wurden zugegeben, um eine Endkonzentration von 30 µM zu erhalten. Diese wurde dann 10, 20 und 30 Zyklen einer Laserstrahl-Behandlung, wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen. Die Virus-Titer und die FVIII-Aktivität wurden vor der Zugabe von Methylenblau und nach 10, 20 und 30 Zyklen Laserstrahl-Behandlung bestimmt. Der Virus-Titer wurde mittels TCID₅₀-Bestimmung (Reed et al., 1938, Amer. J. Hyg. 27:493-497) unter Verwendung von A9-Zellen (ATCC CRL 6319) gemessen, und die FVIII-Aktivität wurde gemäß dem chromogenen Verfahren, wie in den Instruktionen für das Immunochrom-Reagens-Set beschrieben, bestimmt.

15 Die in Tabelle 15 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß fast 5 log MVM nach 30 Zyklen Laserstrahl/Methylenblau-Behandlung inaktiviert sein können. Unter diesen Bedingungen bleiben mehr als 50% der FVIII-Aktivität erhalten.

20 **Tabelle 15: Inaktivierung von MVM-Parvovirus in FVIII-Konzentrat durch Methylenblau/Laserstrahl-Behandlung**

25 Laserstrahl - Zyklen	MVM-Titer (TCID ₅₀ /ml)	FVIII-Aktivität (Einheiten/ml)
0	10 ^{7.2}	49,7
10	10 ^{5.2}	41,6
30 20	10 ^{3.6}	31,8
30 30	10 ^{2.5}	25,6

35

Fig. 1 Ein System zur Laserstrahl-Aktivierung einer photodynamischen Substanz, die einem biologischen Material zugegeben worden ist.

40 Eine photodynamische Substanz wird einem Behälter (A) zugegeben, welcher das biologische Material enthält. Dieses wird durch ein System mit einem Fenster (B) zwecks Einwirkung eines Laserstrahls in einen zweiten Behälter (C) gepumpt. Es kann in umgekehrter Richtung zurückgepumpt werden oder rezirkuliert werden, um zu ermöglichen, daß die Probe mehreren Zyklen einer Laserstrahl-Behandlung unterzogen wird.

45

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Inaktivierung von Nukleinsäuren in einem biologisch aktiven proteinhaltigen Material und Gewinnung von biologischem Material, dadurch gekennzeichnet, daß einem biologischen Material eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird und die Mischung einer Bestrahlung mit Laserlicht ausgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, Methylenblau, Toluidinblau oder Azurblau ist.

55

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die photodynamische Substanz in einer Konzentration zwischen 0,01 µM und 50 µM, vorzugsweise zwischen 1 µM und 35 µM, vorliegt.
- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des Laserstrahls im Wellenbereich der maximalen Aktivierungsrate der photodynamischen Substanz ist, vorzugsweise zwischen 600 und 680 nm.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Laser-Bestrahlung ein Stabilisator, wie Zucker, Polyalkohol, Aminosäuren, Peptide oder Carbonsäuren, und/oder ein Quencher und/oder Scavenger, wie Mannit, Glycerin, 10 reduziertem Glutathion oder Superoxid-Dismutase, zugegeben werden (wird).
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Zugabe der photodynamischen Substanz ein Quencher, ein Scavenger und/oder ein Stabilisator zugegeben werden (wird).
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach der 15 Virusinaktivierungsbehandlung ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, vorzugsweise ein Nukleinsäureamplifikationsverfahren, bei dem vor dem Amplifizierungsschritt eine gegebene Menge mindestens eines bekannten Nukleinsäuremoleküls als interner Standard zugegeben wird, wobei sich das Standard-Molekül von der zu quantifizierenden Nukleinsäure in mindestens einem detektierbaren Merkmal 20 unterscheidet, vorgesehen wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das biologisch aktive Material eine Lösung ist, welche einen Blutfaktor, ein gentechnisch hergestelltes proteinhaltiges Produkt oder ein mikrobiologisches und/oder molekulares Pathogen oder einen Teil davon aufweist.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Material eine Zellkultur, eine Zellsuspension, eine Zellschicht, ein Zellkulturüberstand oder eine aufgebrochene Zellpräparation ist, die von infizierten, transfektierten oder transformierten Zellen stammt.
- 30 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure DNA oder RNA, ein Genom oder ein Teil davon, wie etwa ein Gen, ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine Nukleinsäure-Template-Aktivität aufweist und eine Sequenz für Primer- und Polymerase-Bindung inkludiert, wobei die Nukleinsäure mittels eines Nukleinsäure-Amplifikationsverfahrens amplifizierbar ist.
- 35 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure von einer eukaryotischen Quelle, vorzugsweise von einer Vertebraten-Zelle, einer Tumor-Zelllinie, einem Onkogen oder einem Protoonkogen oder einer Hybridoma-Zelllinie, stammt.
- 40 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure von einem Mikroorganismus, vorzugsweise einem Protozoon, einem Bakterium, einem Virus, einem mikrobiologischen oder molekularen Pathogen oder einem Teil davon, stammt.
- 45 14. Inaktiviertes Virus, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß beim inaktivierten Virus im wesentlichen die gesamte biologisch aktive Nukleinsäure desintegriert bzw. inaktiviert ist, während die biologische Integrität und Aktivität, wie antigene, immunogene und protektive Eigenschaften, erhalten sind.
- 50 15. Inaktiviertes Virus nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Lipid-(umhülltes), ein Nicht-Lipid-(umhülltes) Virus, ein DNA- oder ein RNA-Virus oder ein attenuiertes Virus ist.
16. Inaktiviertes Virus nach einem der Ansprüche 14 oder 15, das in einer Vakzin-Präparation formuliert ist.
17. Verwendung eines inaktivierten Virus nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung von Säugern.
- 55 18. Verfahren zur Gewinnung einer inaktivierten Vakzine, dadurch gekennzeichnet, daß einem

mikroorganismushaltigen Material eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird und die Mischung einer Bestrahlung mit Laserlicht ausgesetzt wird.

- 5 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus ein virales Pathogen, wie ein Lipid- oder Nicht-lipid umhülltes Virus, ein Virus enthaltend DNA oder RNA, ausgewählt aus der Gruppe Adenovirus, Herpesvirus, Papovavirus, Pox-virus, Parvovirus, Reovirus, Retrovirus, Myxovirus, Paramyxovirus, Picornavirus, Togavirus, Flavivirus, Orthomyxovirus oder Rhadovirus, vorzugsweise ein Influenzavirus, HIV, HCV, HAV, HBV, TBEV oder CMV, ist, wobei das Virus gegebenenfalls attenuiert ist.
- 10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß das mikroorganismushaltige Material von einer Kultur von virusinfizierten Zellen, einem Kulturüberstand von virusinfizierten Zellen, einer Zellkomponente von virusinfizierten Zellen oder einer gereinigten Virus aufweisenden Lösung stammt.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die virusinfizierten Zellen Vertebraten-Zellen, vorzugsweise Hühnerembryonalzellen, VERO-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK-2-Zellen, MDCK-Zellen, MDBK-Zellen, WI-38-Zellen oder MRC 5-Zellen, sind.
- 20 22. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus ein bakterielles Pathogen, ausgewählt aus der Gruppe der Pneumokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Neisseriae, enterischen Bacillen, Pseudomonas, Haemophilus, Bordetella, Mycobakterien oder Spirochäten, ist.
- 25 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die inaktivierte bzw. desintegrierte Nukleinsäure von der Zelle und/oder dem Virus stammt.
- 30 24. Verfahren zur Gewinnung eines gentechnisch hergestellten, proteinhaltigen Produktes, dadurch gekennzeichnet, daß einem biologischen Material, enthaltend genetisch modifizierte Zellen, die mit einem eine zu exprimierende Fremd-Nukleinsäure aufweisenden Vektor transfiziert sind, und von einer genetisch modifizierten Zelle mit einer im Genom stabil insertierten Fremd-Nukleinsäure oder einer Hybridoma-Zelllinie stammen, eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird und die Mischung einer Bestrahlung mit Laserlicht ausgesetzt wird.
- 35 25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Zellen von Vertebraten-Zellen, wozugswiese VERO-Zellen, CHO-Zellen, BHK-Zellen, Hühnerembryonalzellen, MDCK-Zellen, CV-1-Zellen, LLC-MK-2-Zellen, MDBK-Zellen, WI-38-Zellen, MRC5-Zellen, SK-Hep-Zellen, oder einer kontinuierlichen Zelllinie, wie einer Tumor-Zelllinie oder einer Hybridoma-Zelllinie, stammen.
- 40 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß das gentechnisch hergestellte, proteinhaltige Produkt ein Protein ist, das von einem Virus, einem Bakterium, einem Blutfaktor, einem Cytokin, einem Chemokin, einem Hormon oder einem monoklonalen Antikörper stammt.
- 45 27. Pharmazeutische Präparation, enthaltend ein biotechnologisches Produkt, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
- 50 28. Verwendung eines biotechnologischen Produktes nach Anspruch 27 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Säugern.
- 55 29. Verfahren zur Inaktivierung von nicht-umhüllten Viren in einem proteinhaltigen biologischen Material, dadurch gekennzeichnet, daß einem biologischen Material eine photodynamische Substanz, ausgewählt aus der Gruppe der Phenothiazine, zugesetzt wird und die Mischung einem Laserstrahl im Wellenbereich der maximalen Aktivierungsrate der photodynamischen Substanz ausgesetzt wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29 dadurch gekennzeichnet, daß nicht-umhüllte Viren, insbesondere aus der Gruppe der Picomaviridae und Parvoviridae, inaktiviert werden.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß im wesentlichen die gesamte biologisch aktive, infektiöse Nukleinsäure in diesem biologischen Material desintegriert bzw. inaktiviert wird, während die biologische Integrität und Aktivität des

proteinhaltigen biologischen Materials erhalten bleibt.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung bzw. Desintegration der Nukleinsäure durch ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren kontrolliert wird.
- 5 33. Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 29 bis 32 zur Herstellung eines virus-inaktivierten biologischen Materials, das insbesondere keine infektiösen nicht-Lipid-umhüllten Viren aufweist.

10

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

15

20

25

FIG. 1

