



NORGE

(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **308749**

(13) **B1**

(51) **Int Cl⁷ C 12 N 7/04**

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19911876	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1991.05.14	søknadsnummer	
(24) Løpedag	1991.05.14	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	1991.11.18	(30) Prioritet	1990.05.15, US, 524208
(45) Meddelt dato	2000.10.23		

(71) Patenthaver	New York Blood Center, 310 East 67 Street, New York, NY 10021, US
(72) Oppfinner	Bernard Horowitz, New Rochelle, NY, US Jay E. Valinsky, New York, NY, US Nicholas E. Geacintov, New York, NY, US Bolanle Williams, Forest Hills, NY, US Shanti B. Rywkin, Brooklyn, NY, US Henrietta Nunno, New York, NY, US
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for inaktivering av et ekstracellulært lipidinnkapslet, patogen virus**

(56) **Anførte publikasjoner** EP A 124363, EP 66886
US 4791062, US 4775625, WO 8810087, WO 8911277
Photochemistry and photobiology vol. 50 (3), aug-89, s. 367-371
J. of virological methods, 26 (1), 1989, s. 125-132
Transfusjon, 28 (1), 1988, s. 81-83

(57) **Sammendrag**

Foreliggende oppfinnelse vedrører det produkt som fremstilles ved inaktivering av ekstracellulært lipidomhyllert patogen virus eller intracellulært patogen virus i en blanding inneholdende $\geq 1 \times 10^9$ celler/ml og nevnte virus, uten å forårsake vesentlig sprengning eller inaktivering av slike celler, idet inaktiveringsprosessen omfatter å kontakte blandingen med en virucidalt effektiv mengde av minst én fotoreaktiv forbindelse som har et absorpsjonsmaksimum på ≥ 630 nm, lys og et oksydasjonsmiddel, for derved i alt vesentlig å inaktivere viruset under bibehold av cellefunksjonalitet, høyere enn 80%. Foreliggende oppfinnelse angår også det produkt som fremstilles ved inaktivering av virus i en biologisk blanding uten å forårsake vesentlig sprengning eller inaktivering derav, idet inaktiveringsfremgangsmåten omfatter å kontakte nevnte blanding med en virucidalt effektiv mengde av minst én fotoreaktiv forbindelse, lys, og et undertrykkingsmiddel for derved å inaktivere nevnte virus under bibehold av funksjonaliteten for nevnte substans.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte ved inaktivering av virus i biologiske blandinger, f.eks. i helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer, uten å forårsake betydelig sprenging eller inaktivering av celler, f.eks. uten skadelig å påvirke de røde blodlegemenes struktur eller funksjon, ved anvendelse av en fotoaktiv forbindelse, f.eks. et ftalocyanin, sammen med lyseksponering og variasjoner av denne. Det er blitt gjort betydelig fremgang med å redusere virus-smitteevnen av helt blod og dets komponenter gjennom forbedret donorutvalg og fremgangsmåter for screening av donorblod. Til tross for denne fremgang er det fortsatt risiko for overføring av virus omfattende hepatittvirus og humant immunsvikt-virus (HIV) gjennom helt blod og blodprodukter.

Risikoen for overføring av visse virus (f.eks. hepatitt B virus (HBV) hepatitt C virus (HCV), humant immunsviktivirus (HIV)) er blitt betydelig redusert og kanskje eliminert i koagulasjonsfaktorkonsentrater ved anvendelse av virucidale fremgangsmåter under fremstillingen (Prince, A.M. Horowitz, B., Horowitz, M.S., Zang, E., "The Development of Virus-Free Labile Blood Derivatives - A Review", Eur. J. Epidemiol., 1987;3:103-118 og Mannucci, P.M., Colombo, M., "Virucidal Treatment of Clotting Factor Concentrates", The Lancet, 1988;782-785). Ved behandling av koagulasjonsfaktorkonsentrater kan imidlertid noen virus (f.eks. parvovirus) holde seg smittsomme. Dessuten har utviklingen av virucidale fremgangsmåter som kan anvendes på cellekomponenter, dvs. blodcellefraksjoner såsom røde blodlegemer eller blodplater, vært langsom, både fordi cellene er skrøpeligere enn proteiner, og cellene tjener til å skjule og beskytte virus mot inaktivering. Dersom virusoverføring gjennom helt blod eller blodkomponenter skal elimineres, vil det allikevel kreves effektiv virusfjerning eller kraftige virucidale metoder som lar seg anvende på blodlegemer. Siden både røde blodlegemer og blodplater er ikke-replikerende, kan metoder som er rettet mot nukleinsyremodifisering kanskje gi den nødvendige spesifisitet.

Ved vurdering av virucidale fremgangsmåter for celleholdige løsninger er det viktig å erkjenne at virus vil være tilstede i flere former: virus fri fra cellen; dannet virus i forbindelse med cellen; funksjonell, men ikke-innpakket viral nukleinsyre inne i cellen; og viral nukleinsyre integrert i cellegenomet. Alle former bør betraktes som smittsomme og i stand til å forårsake virussykdom *in vivo*. Virucidale metoder som inaktiverer virus i en form, f.eks. cellefri virus, kan ikke inaktivere virus i andre former, f.eks. celleassosierte former. Dessuten er tilstedeværelsen av celler kjent for

å inhibere virkningen av både fysiske og kjemiske metoder for virusinaktivering. Cellene konkurrerer om tilsatte virucidale reagenser og absorberer stråling som ellers ville være virucidal. Selv om ultrafiolett bestråling er høyst virucidal i salt-løsninger eller i fortynnet proteinløsning, er således f.eks. graden av virucidal aktivitet ufullstendig ved behandling av celleholdige løsninger. I denne sammenheng er det dessuten ikke tilstrekkelig å inaktivere virus alene; isteden er det nødvendig å gjøre dette med tilstrekkelig kraft slik at virusmitteevnen blir eliminert uten skadelige virkninger på de verdifulle cellekomponentene, f.eks. røde blodlegemer.

De fleste virucidale fremgangsmåter som er blitt utviklet, f.eks. pasteurisering eller løsningsmiddel/tensidbehandling, kan ikke anvendes på blodcellepreparater uten å ødelegge cellene og gjøre dem uskikket for transfusjon.

Tidligere har det ikke vært mulig å fremstille virussteriliserte former av helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer eller blodplatekonsentrater hvor minst 10^4 smittsomme enheter (ID_{50}) og fortrinnsvis $\geq 10^6 ID_{50}$ av både intracellulære og ekstracellulære virus ble inaktivert, uten skadelig å påvirke cellene og/eller uten å anvende svært toksiske agenser.

Ftalocyaniner

Selv om det har vært økende interesse for anvendelse av ftalocyaniner for behandling av kreftceller (Rosenthal, I. og Ben Hur, E., "Phthalocyanines in Photobiology", Lezhoff C.C. og Lever A.B.P. utg., Phthalocyanines, VCH Publishers, Inc., New York, New York, 1989, 393-425) tenker man vanligvis på ftalocyaniner som hemolytiske, hvilket gjør søkerens resultater heri enda mer overraskende. F.eks. studerte Ben-Hur og Rosenthal ("Photohemolysis of Human Erythrocytes Induced by Aluminium Phthalocyanine Tetrasulfonate", Cancer Lett., **30**: 321-327, 1986) fotohemolyse av humane røde blodlegemer indusert med aluminium-ftalocyanintetrasulfonat. Betydelig (20-100%) hemolyse ble indusert ved behandling med 2,5 til 10 μM $AlPcS_4$ ved alle belysningsmengder ≥ 40 KJ/m^2 (≥ 4 J/cm^2). Ben-Hur og Rosenthal beskjeftiget seg ikke med problemet tilintetgjørelse av virus. På lignende måte studerte Sonoda, Krishna og Riesz ("The Role of Singlet Oxygen in the Photohemolysis of Red Blood Cells Sensitized by Phthalocyanine", Photochem. Photobiol., **46**: 625-631, 1987) fotohemolyse indusert av hvert av flere ftalocyaninderivater. Aluminium- og sinkftalocyaniner var alle hemolytiske, mens fritt ftalocyanin (intet metall) eller de med jern, kobber eller kobolt som det sentrale metallkation, ikke var hemolytiske. Virustilintetgjørelse ble ikke studert.

Singer et al (C.R.J. Singer, T. Azim og Q. Sattentau, "Preliminary Evaluation of Phthalocyanine Photosensitization For Inactivation Of Viral Pathogens in Blood Products", [abstract] British J. Hematology, March 23-25, 1988:Abs. 31),

demonstrerte i det som antas å være den eneste studie over virustilintetgjørelse som er gjennomført med ftalocyaniner at en ikke angitt mengde av både Epstein Barr virus og av HIV tilsatt til plasma ble inaktivert ved behandling med 5 og 25 µg/ml av sulfonert aluminiumftalocyanin og 2 mW/cm² i 30 min. (3,6 J/cm²). Faktor VIII gjenvinningen var bare 50%. Singer et al rapporterte intet aktuelt arbeid over celler eller celleassosiert virus, selv om de angir at anvendelse på røde blodlegemer blir vurdert. I lys av den relativt dårlige gjenvinning (50%) av faktor VIII rapportert av Singer, den større skrøpeligheit av celler enn av proteiner, og den tidligere erfaring fra fotohemolyse av røde blodlegemer ved behandling med ftalocyanin, er resultatene heri enda mer overraskende.

Andre lipofile fargestoffer ved behandling av helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer

Cole et al (Cole, M.; Stromberg, R., Friedman L., Benade, L., Shumaker, J., "Photochemical Inactivation of Virus in Red Cells", Transfusion, 29, Supp:42s Abs., 1989) undersøkte anvendelse av merocyanin 540 ved behandling av pakkede røde blodlegemer fortynnet til en hematocrit på 15%. Når plasma blir fjernet slik at dens konsentrasjon var 2,6%, ble det oppnådd en 6 log reduksjon av vesikulært stomatitis virus. Det ble imidlertid oppnådd bare en 1 log reduksjon i VSV i prøver som inneholdt 15% plasma. Forfatterne sluttet at "selv om plasma er nødvendig for å beskytte de røde blodlegemer fra ødeleggelse, blir virustilintetgjørelsen også signifikant redusert." Denne konklusjonen understøttes av den observasjon at tilstedeværelse av 5% albumin inhiberte virustilintetgjørelsen i en oppslemming av vaskede blodplater (Prodouz, K.N., "Effect of Merocyanin 540 on Platelet Function and Reduction of its Antiviral Activity by Albumin", Transfusion, 29, Supp:42s Abs., 1989), og at selv om 6 loger av modellvirus i buffer kunne inaktiveres av merocyanin 540, kunne bare 1-3 loger av virus inaktiveres i nærvær av 12-25% plasma (Moroff, G., Benade, L.E., Dabay, M., George, V.M., Shumaker, J. og Dodd, R.Y., "Use of Photochemical Procedures to Inactivate Viruses in Platelet Suspensions", Transfusion, 29, Supp:S15 Abs., 1989). Dessuten hevdet forfatterne at fremgangsmåten "skadelig påvirket blodplateegenskapene."

Matthews, J.T., Newman, J.T., Sogandares-Bernal, F., et al, "Photodynamic Therapy of Viral Contaminants with Potential For Blood Banking Applications", Transfusion, 1988;28:81-83 studerte behandling av helt blod med hematoporfyrinderivater og lys. De rapporterte inaktivering av 3×10^5 PFU av herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ved behandling av kulturmedium med 2,5 µg/ml dihematoporfyrineter (DHE) og lys, men aktivering av bare 10^3 PFU ved behandling av blod under samme betingelser. Økning av DHE konsentrasjonen til 20 µg/ml

forbedret ikke virustilintetgjørelsen. Selv om de røde blodlegemenes struktur og funksjon ble godt bibeholdt ved 2,5 µg/ml DHE og lys ved 5 J/cm², ble celle-fri HIV (2 x 10³ ID₅₀) tilsatt til buffer alene, ikke fullstendig tilintetgjort under denne betingelse.

Andre fotoaktive forbindelser

Lin et al (Lin, L., Wieseahn, G.P., Morel, P.A. og Corash, L., "Use of 8-Methoxypsoralen and Longwavelength Ultraviolet Radiation for Decontamination of Platelet Concentrates", Blood, 74:517-525, 1989) viste at psoralen og eksponering for UV-A inaktiverte $\geq 10^{5.5}$ ID av felint leukemivirus tilsatt til blodplatekonsentrat; studier av helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer ble imidlertid ikke gjennomført. Blodplatemorfologi, -aggregering, og avgivelsesreaksjonen ble godt opprettholdt umiddelbart etter behandlingen, og viste sammenlignbare verdier sammenlignet med ubehandlede kontroller ved lagring i opptil 96 timer. I motsetning undersøkte Moroff et al (Moroff G., Benade, L.E., Dabay, M., Gorge, V.M., Shumaker, J. og Dodd, R.Y., "Use of Photochemical Procedures to Inactivate Viruses in Platelet Suspensions", Transfusion, 29, Supp, S15 Abs., 1989) anvendelse av psoralen for behandling av blodplater, og konkluderte at tilstedeværelse av så lite som 12% plasma inhiberte virustilintetgjørelsen og at blodplateegenskapene ble skadelig påvirket. Det bør påpekes at røde blodlegemer og blodplatekonsentrater som typisk fremstilt for transfusjon blir oppslemmet i 100% plasma.

Andre Agenser

I U.S. patentsøknad serie nr. 07/279,179 inngitt 2. desember 1988, og i et nylig publisert sammendrag (Williams et al., Blood, 1988, 72:Suppl.:287a), ble vesikulært stomatitis virus tilsatt til helt blod rapportert å bli inaktivert ved inkubering med et hydrolyserbart, aryldiolepoksyd uten å forårsake lysis av røde blodlegemer.

Det er blitt hevdet at ozon vil dekontaminere helt blod inneholdende 10⁹ pFU/ml av hepatitis virus (Zee, Y.C. og Bolton, D.C., "Ozone Decontamination of Blood and Blood Products", U.S. patent 4.632.980). Ingen data ble imidlertid gitt til støtte for denne påstanden.

Prodouz, K.N., Fratantoni, J.C., Boone, J.E. og Bonner R.F., "Use of Laser-UV for Inactivation of Virus in Blood Products", Blood, 1987; 70:589-592 rapporterte at laser-UV behandling av et blodplatekonsentrat i alt vesentlig opprettholdt blodplatefunksjonen under betingelser hvor opptil 10⁶ (ID₅₀) av poliovirus ble inaktivert. Virusinaktiveringen ble imidlertid studert i bufret medium alene og ikke i nærvær av blodplater, og det ble anvendt bare en cellefri form av viruset.

Hartman et al (Hartman, F.W., Mangun, G.H., Feeley, N., Jackson, E., "On the Chemical Sterilization of Blood and Blood Products", Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,

70:248-254, 1949) viste at behandling av helt blod med nitrogensenep, metylbis(beta-kloretyl)aminhydroklorid førte til inaktivering av $10^{6.6}$ ID₅₀ av vesikulært stomatitis virus under betingelser hvor hemolysen av røde blodlegemer ikke var større enn kontrollen. Det bør påpekes at nitrogenseneper er karsinogene.

LoGrippe (LoGrippe, G.A., "Investigations of the Use of Beta-Propiolactone in Virus Inactivation", Ann. NY Aca. Sci., 83, 578-594, (1959)) behandlet røde blodlegemer separat fra plasma med beta-propiolakton. Behandlingen førte til inaktivering av mer enn 10^8 ID₅₀ av østlig equine encefalitisvirus uten å forårsake hemolyse av røde blodlegemer. Påfølgende injisering av de behandlede røde blodlegemer i menneske førte til en forkortet sirkulatorisk halveringstid.

Det er et formål ifølge den foreliggende oppfinnelse å inaktivere virus i celleholdige blandinger uten å forårsake vesentlig sprekning eller inaktivering av cellene.

Det er et annet formål ifølge den foreliggende oppfinnelse å inaktivere virus i helt blod, konsentrater av røde blodlegemer og blodplatekonsentrater, uten skadelig å påvirke struktur eller funksjon av røde blodlegemer eller blodplater.

Det er et annet formål ifølge den foreliggende oppfinnelse å inaktivere virus i biologiske blandinger uten å forårsake vesentlig inaktivering av ønskede, løselige biologiske substanser (f.eks. koagulasjonsfaktorkonsentrater, hemoglobinløsninger).

Det er et ytterligere formål ifølge denne oppfinnelse å forbedre virussikkerheten i blodbanker for både helt blod, konsentrater av røde blodlegemer og blodplatekonsentrater, og eventuelle produkter avledet av helt blod, konsentrater av røde blodlegemer eller blodplatekonsentrater.

Det er videre et ytterligere formål ifølge denne oppfinnelse å redusere eksponering av hospitalpersonale og andre helsearbeidere for virus som de ellers ville bli eksponert for.

Det er enda et ytterligere formål å redusere den sirkulerende virusbyrde hos dyr og mennesker.

Det er fremdeles et ytterligere formål ifølge denne oppfinnelse å forbedre lagringsegenskapene for celleholdige blandinger, f.eks. konsentrat av røde blodlegemer, før anvendelse.

Ovennevnte formål, så vel som andre formål, mål og fordeler blir tilfredsstilt ved den foreliggende oppfinnelse.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte ved inaktivering av et ekstracellulært lipidinnkapslet patogent virus og/eller et intracellulært patogent virus som kan være tilstede i en blodcelleblanding, inneholdende minst $\geq 1 \times 10^9$ celler/ml, mens strukturell integritet på større enn 80% av minst én type blodcelle i nevnte blanding bibeholdes, kjennetegnet ved at nevnte blanding kontaktes med en

virucid effektiv mengde av minst én fotoreaktiv forbindelse med et absorpsjonsmaksimum ≥ 630 nm, lys og et oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher".

Mer spesielt angår den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for inaktivering av ekstracellulære så vel som intracellulære virus i helt blod, konsentrater av røde blodlegemer, blodplatekonsentrater eller produkter avledet av helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer eller blodplatekonsentrater, omfattende å kontakte nevnte hele blod, konsentrater av røde blodlegemer eller produkter avledet av helt blod eller konsentrater av røde blodlegemer med en effektiv virucidal mengde av en fotoreaktiv forbindelse som har et absorpsjonsmaksimum høyere enn 630 nm, f.eks., et purpurin eller et ftalocyanin, og eksponering av den resulterende blanding for lys i nærvær av et oksydasjonsmiddel, sammen med eventuell tilstedeværelse av en quencher, f.eks. glutation.

Det beskrives også en blanding omfattende humane røde blodlegemer som egner seg for transfusjon ved konsentrasjon på $\geq 1 \times 10^9$ celler/ml og som har alle ekstracellulære lipidomhyllede og intracellulære humane patogene virus i en ikke-smittsom form, idet de røde blodlegemer fortrinnsvis har en normal gjenvinning ved infusjon på 70% eller høyere, fortrinnsvis 85% eller høyere, og har en tilfredsstillende sirkulatorisk overlevelse, f.eks. for røde blodlegemer på = 20 døgn og fortrinnsvis 30 døgn.

De foran nevnte blandinger har fortrinnsvis høyere bestandighet mot osmotisk sjokk enn normalt.

Fig. 1 omfatter fire diagrammer som beskriver inaktivering av cellefrie vesikulære stomatitis virus (VSV) med aluminiumftalocyaninklorid (AlPc). Fig. 1a beskriver resultatene ved anvendelse av helt blod. Fig. 1b beskriver resultatene ved anvendelse av et konsentrat av røde blodlegemer. Fig. 1c beskriver resultatene ved anvendelse av helt blod fortynnet 5 ganger med PBS. Fig. 1d beskriver resultatene ved anvendelse av et konsentrat av røde blodlegemer fortynnet 2 ganger med PBS.

Fig. 2 omfatter fire diagrammer som beskriver inaktivering av cellefritt VSV med sulfonert aluminiumftalocyanin. Fig. 2a beskriver resultatene ved anvendelse av AlPcS₂ med helt blod. Fig. 2b beskriver resultatene ved anvendelse av AlPcS₂ med et konsentrat av røde blodlegemer. Fig. 2c beskriver resultatene ved anvendelse av AlPcS₄ med helt blod. Fig. 2d beskriver resultatene ved anvendelse av AlPcS₄ med et konsentrat av røde blodlegemer.

Fig. 3 er et diagram som beskriver erytrocytenes osmotiske fragilitet før og etter behandling med AlPc.

Blod består av faste stoffer (celler, dvs. erytrocytter, leukocytter og blodplater)

og væske (plasma). Cellene blir transfusert ved behandling av anemi, levringsforstyrrelser, infeksjoner osv.. Dessuten inneholder cellene potensielt verdifulle substanser såsom hemoglobin, og de kan induseres til å fremstille andre potensielt verdifulle substanser såsom interferon, vekstfaktorer og andre biologiske responsmodifikasjonsmidler. Plasmaet består hovedsakelig av vann, salter, lipider og proteiner. Proteinene er inndelt i grupper som kalles fibrinogener, serumglobuliner og serumalbuminer. Typiske antistoffer (immunglobuliner) som finnes i humant blodplasma omfatter dem som er rettet mot smittsom hepatitis, influensa H, osv..

Blodtransfusjoner anvendes til behandling av anemi som skriver seg fra sykdom eller blødning, sjokk som skriver seg fra tap av plasmaproteiner eller tap av sirkulerende volum, sykdommer hvor et adekvat nivå av plasmaprotein ikke blir opprettholdt, f.eks. hemofili, og for å gi passiv immunisering.

Under visse sykdommer kan det mangle én eller flere av blodets komponenter. Derfor vil administrasjon av den egnede fraksjon være tilstrekkelig, og de andre komponentene vil ikke være "bortkastet" på pasienten; de andre fraksjoner kan anvendes til andre pasienter. Separasjonen av blod i komponenter og deres påfølgende fraksjonering tillater oppkonsentrering av cellene og/eller proteinene, og øker således deres terapeutiske anvendelse.

Celletyper som finnes i humant blod, omfatter røde blodlegemer, blodplater og flere typer av leukocytter. Fremgangsmåter for fremstilling av cellekonsentrater som kan anvendes til transfusjon, kan finnes i Kirk Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology, tredje utgave, Interscience Publishers, volum 4, pp 25-37, hvis komplette innhold er inkorporert heri ved referanse.

Proteiner som finnes i blodlegemefraksjonen omfatter hemoglobin, fibronektin, fibrinogen, blodplateavledet vekstfaktor, superoksyddismutase, enzymer for karbohydrat- og proteinmetabolismen, osv.. Dessuten kan det induseres syntese av andre proteiner, såsom interferoner og vekstfaktorer.

En fullstendig liste over induserbare leukocytproteiner kan finnes i Stanley Cohen, Edgar Pick, J.J. Oppenheim, "Biology of the Lymphokines", Academic Press, New York, (1979).

Den foreliggende oppfinnelse vedrører å kontakte minst én fotoreaktiv forbindelse med en celleholdig blanding såsom helt blod, konsentrater av røde blodlegemer, blodplatekonsentrater, blodplateekstrakter, leukocyttkonsentrater, semen, ascites fluid, melk, lymfatisk fluid, hybridomcellelinjer og produkter avledet fra hvilken som helst av de ovennevnte.

Den foreliggende oppfinnelse kan anvendes til behandling av produktet av en blanding inneholdende ikke-blod normale eller kreftceller eller produktet av

genspleising.

Når quencherer ikke blir tilsatt, vil egnede fotosensitizerforbindelser for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse omfatte ftalocyaniner, purpuriner og andre molekyler som ligner porfyrinene i struktur, selv om noen av atomene i den porfyrinlignende basisramme (så vel som deres arrangement) kan variere. F.eks. er ftalocyaninene porfyrinlignende (azaporfyriner) bortsett fra at tetrapyrrolringen sammenbundet av metinkarbonatomer i porfyrinene, er erstattet av fire isoindolenheter sammenbundet av azanitrogenatomer. Disse ftalocyanin-, porfyrin- og purpurinmolekyler kan eller behøver ikke inneholde metallo- eller metalloid-sentralatomer, og forskjellige substituenten kan plasseres på det molekyllære basisrammeverk for (a) og rødsifte de lengste bølgelengdeabsorpsjonsmaksima ut over 630 nm, (b) øke den molare ekstinksjonskoeffisient for å forbedre absorpsjonsevnen for det eksiterende røde lys, og (c) modulere løselighetene for fotosensitizermolekylene i vandig miljø, så vel som deres lipofilisitet, eller DNA-bindingsevne.

Fotoreaktive forbindelser for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse som inneholder metaller, f.eks. germanium eller gallium, er diamagnetiske eller enn paramagnetiske.

Fotosensitizere, omfattende substituerte fotosensitizere, som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse vil resultere i forbindelser som har følgende egenskaper:

- (a) en molar ekstinksjonskoeffisient på $\geq 50.000 \text{ Molar}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- (b) et absorpsjonsmaksimum på $\geq 630 \text{ nm}$, fortrinnsvis 660 til 730;
- (c) en løselighet på $\geq 1 \text{ }\mu\text{M}$ i både vann og ikke polare løsningsmidler;
- (d) som har amfifile egenskaper;
- (e) løselige i vandige saltholdige bufferløsninger ved anvendelseskonsentrasjonene innenfor en tidsramme på ca. 2 timer.

Foretrukne fotoreaktive forbindelser for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse er ftalocyaniner (Pc'er eller PC'er). Ftalocyaniner er Porfyrinlignende forbindelser som er kjemisk stabile, veldefinert, og som lett lar seg syntetisere (Spikes, J., "Phthalocyanines as Photosensitizers in Biological Systems and for the Photodynamic Therapy of Tumors", Photochemistry and Photobiology, 1986;43:691-699 og Ben-Hur, E. og Rosenthal, I., "The Phthalocyanines: A New Class of Mammalian Cells Photosensitizers with a Potential for Cancer Phototherapy", Int. J. Radiat. Biol., 1989;47:145-147). Det er oppmuntrende bevis i litteraturen som viser mangel på toksisitet av ftalocyaninfargestoffer overfor pattedyr (Moser, F.H. og Thomas, A.C., The Phthalocyanines, Boca Raton: CRC Press, 1984). Ftalocyaninene har svært sterke elektronabsorpsjonsbånd ved bølgelengder over 630 nm. Hemoglobin har en relativt lav absorbans i dette spektralområdet.

Ikke-begrensede eksempler på ftalocyaniner for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse omfatter følgende:

sinktetrasulfotalocyanin,
tetrasulfoftalocyanin,
aluminiumtetranitroftalocyanin,
sink-tetranitroftalocyanin,
tetrakarboksyftalocyanin,
GaCl-tetrasulfoftalocyanin,
AlCl-tetrasulfoftalocyanin og
Ga-tetrasulfoftalocyanin og
GaCl-, AlCl- eller Ga-tetranitroftalocyanin.

I en foretrukken utførelse av oppfinnelsen anvendes aluminiumftalocyaniner. Foretrukne aluminiumftalocyaniner omfatter aluminiumftalocyaninklorid (AlPc) og sulfonerte former av aluminiumftalocyanin, f.eks. AlPcS₂ og AlPcS₄. Sink kan erstatte aluminium som sentralatom, og ringen kan nitreres istedenfor sulfoneres.

Når det tilsettes quencherer vil egnede fotosensitizerforbindelser for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse omfatte ftalocyaniner, purpuriner og andre molekyler som ligner porfyrinene i struktur (som beskrevet ovenfor) samt fotoaktive forbindelser som eksiteres av ultrafiolett lys (f.eks. psoralen 8-metoksysoralen, 4'-aminometyl-4,5',8-trimetylpsoralen bergapten, og angelicin), og fargestoffer som absorberer lys i det synlige spektrum (f.eks. hypericinmetylenblått, eosinfluoresceiner og flaviner).

Egnede quencherer er hvilken som helst substans som er kjent for å reagere med frie radikaler eller reaktive former av oksygen, mer spesifikt som nedsetter effektiviteten av fotodynamisk katalyserte kjemiske reaksjoner (f.eks. DNA trådbrudd, eller nedsetter cytotoxisiteten i fotodynamiske celletilintetgjørelseseksperimenter. Ifølge den foreliggende oppfinnelse gjennomføres imidlertid quenchingen overraskende uten vesentlig nedsettelse av virucidal virkning.

Representative quencherer omfatter umettede fettsyrer, reduserte sukker, kolesterol, indolderivater o.l., azider, såsom natriumazid, tryptofan, flerverdige alkoholer såsom glyserol og mannitol, tioler såsom glutation, superoksyddismutase, quercetin, DABCO o.l.. Anvendelse av blandinger av quencherer blir også overveid.

Quencheren blir anvendt i vanlige quenchemengder, men når den anvendes vil den samlede fremgangsmåte overraskende føre til fortrinnsvis ødeleggelse av viruset, men ikke av det ønskede biologiske materialet.

Ikke-begrensede eksempler på lipidbelagte, humane patogene virus som kan inaktiveres ved den foreliggende oppfinnelse, omfatter vesikulært stomatitis virus (VSV), Moloney sarcoma virus, Sindbis virus, humane immunsviktvirus (HIV-1;

HIV-2), humant T-celle lymfotropisk virus-I (HTLV-I), hepatitis B virus, ikke-A, ikke-B hepatitis virus (NANB) (hepatitis C), cytomegalovirus, Epstein Barr virus, laktat-dehydrogenase eleverende virus, herpes gruppevirus, rhabdovirus, leukovirus, myxovirus, alfavirus, Arbovirus (gruppe B), paramyxovirus, arenavirus og coronavirus. Ikke-begrensede eksempler på ikke-omhyllende virus som kan inaktiveres ved den foreliggende oppfinnelse omfatter parvirus, poliovirus, hepatitis A virus og enteriske ikke-A, ikke-B hepatitis virus.

Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse gjennomføres fortrinnsvis ved 0 til 45°C, og mest fortrinnsvis ved 4 til 37°C i opp til 48 timer og fortrinnsvis i 2 til 24 timer.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gjennomføres fortrinnsvis i et nøytralt pH område på 6,3 til 7,7. Et typisk belsningsstyrkeområde for oppfinnelsen er 5 til 500 J/cm², fortrinnsvis 100 til 500 J/cm² med ftalocyanin og 5 til 100 J/cm² med psoralen. Jo klarere lyset er, jo mindre tid er nødvendig. Med strømmende systemer ville man anvende svært klart lys i korte tider. For blodposer kan det anvendes lengre tider og mindre klart lys.

Fortrinnsvis vil konsentrasjonen av den fotoreaktive forbindelse i fravær av quencher være 1 til 100 µM; for konsentrater av røde blodlegemer vil konsentrasjonen av den fotoreaktive forbindelse mest fortrinnsvis være 10 til 25 µM. Når det anvendes quencher, vil konsentrasjonene av fotoaktive forbindelser være dem som typisk anvendes, f.eks. 25 µg/ml for AMT.

Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse blir utført i nærvær av et oksydationsmiddel. Oksygen er et ikke-begrensende eksempel på et oksydationsmiddel for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse. Konsentrasjonen av oksygen kan være den endogene mengde, eller kan modifiseres ved plassering av det materialet som blir behandlet, i en atmosfære utformet til å senke eller heve oksygenkonsentrasjonen.

Celleholdige blandinger som skal behandles ifølge oppfinnelsen har $\geq 1 \times 10^9$ celler/ml, fortrinnsvis $\geq 5 \times 10^9$ celler/ml og mest fortrinnsvis $\geq 1 \times 10^{10}$ celler/ml. Dessuten har celleholdige blandinger som skal behandles ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis > 4 mg/ml protein og mer fortrinnsvis > 25 mg/ml protein og mest fortrinnsvis 50 til 60 mg/ml protein (uvaskede celler).

Ikke-celleholdige blandinger som skal behandles ifølge oppfinnelsen, har $\geq 0,1$ mg/ml og fortrinnsvis ≥ 5 mg/ml protein.

I oppfinnelsesprosessen blir minst 10^4 , fortrinnsvis 10^6 , smittebærende virusenheter inaktivert.

Oppfinnelsesfremgangsmåten fører til forbedret lagringsstabilitet, dvs. behandlede celler som kan lagres i flytende eller frosset form og for hvilke det

oppnås redusert celleødeleggelse.

Den celleholdige blanding ifølge oppfinnelsen som til å begynne med inneholdt ≥ 1000 smittebærende virusenheter/l, etter at viruset er blitt inaktivert og behandlingen ifølge oppfinnelsen er blitt gjennomført, har en retensjon av intakt cellefunksjonalitet og -struktur på mer enn 80%, fortrinnsvis mer enn 90% og mest fortrinnsvis mer enn 98%.

Ved inaktiveringsfremgangsmåten ifølge oppfinnelsen ville mesteparten om ikke praktisk talt all den virus som inneholdes deri, bli inaktivert. En fremgangsmåte til bestemmelse av infektivitetsnivået ved inokulering i sjimpanser (*in vivo*) diskuteres av Prince, A.M., Stephen, W., Bortman, B. og van den Ende, M.C., "Evaluation of the Effect of Betapropiolactone/Ultraviolet Irradiation (BPL/UV) Treatment of Source Plasma on Hepatitis Transmission by Factor IX Complex in Chimpanzees", Thrombosis and Hemostasis, 44: 138-142, (1980).

Ifølge oppfinnelsen oppnås inaktivering av virus i en utstrekning på minst "4 loger", fortrinnsvis ≥ 6 loger, dvs. at virus i prøven blir fullstendig inaktivert i den utstrekning som bestemmes ved infektivitetsstudier hvor dette virus er tilstede i den ubehandlede prøve i en slik konsentrasjon at selv etter fortynning til 10^4 (eller 10^6), kan det måles viral aktivitet.

Den foreliggende oppfinnelse beskriver inaktivering av virus mens det samtidig beholdes labile funksjonelle og strukturelle trekk for blodcellene.

Funksjonelle aktiviteter for røde celler blir bestemt ved måling av metabolitt-nivå, enzymatisk aktivitet, elektrolyttnivå og oksygenbærende kapasitet. Strukturell integritet av røde celler bestemmes ved måling av hemoglobinfri frigjøring, osmotisk fragilitet, overleving *in vivo* etter radioaktiv merking med krom-51, antigenisitet og ved evaluering av modifikasjon av celleoverflateproteiner.

Funksjonelle aktiviteter for blodplater bestemmes ved deres evne til å aggregere i nærvær av visse biologiske agenser og deres morfologi. Strukturell integritet for blodplater blir bestemt ved *in vivo*-overleving etter radioaktiv merking med indium-111 og identifikasjon av tilstedeværelsen av spesifikke blodplate-antigener.

Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes i sammenheng med andre virusinaktiverende agenser, f.eks. beta-propiolakton eller UV eller andre former for bestråling, f.eks. gammastråler.

Den foreliggende oppfinnelse demonstrerer følgende:

- (1) fotoreaktive forbindelser såsom ftalocyaniner sammen med lys-eksponering kan inaktivere virus i helt blod eller konsentrater av røde celler, uten skadelig å påvirke struktur eller funksjon av røde celler,
- (2) et lipofilt fargestoff med et absorpsjonsmaksimum ≈ 630 nm kan

inaktivere store mengder (f.eks. $=10^{5.5}ID_{50}$) av virus i helt blod eller et konsentrat av røde celler under betingelser som opprettholder struktur og funksjon av røde celler.

(3) både ekstracellulære og intracellulære virus tilstede i helt blod, et konsentrat av røde celler eller et blodplatekonsentrat kan inaktiveres uten skadelig å påvirke celledstruktur eller funksjon, og

(4) et lipofilt fargestoff kan ved eksponering for lys stabilisere røde blodceller mot osmotisk skade.

(5) innbefatning av en quencher for en fotokjemisk katalysert reaksjon under eller etter nevnte reaksjon, reduserer celle- eller proteinskade som kan forekomme uten vesentlig å redusere virustilintetgjørelsen.

Hovedfordelen med ftalocyaninene i forhold til andre lipofile fargestoffer såsom hematoporfyrinderivat er den ekstremt sterke optiske absorpsjon for ftalocyaniner ved 630-700 nm. Lys av denne bølgelengde har forbedrede vevsgjennomtrengende egenskaper, sammenlignet med den kortere bølgelengde for lys som absorberes av de vanlige porfyrin- og hematoporfyrinsensitizerer. Dessuten er absorpsjonsspekteret for ftalocyaniner bedre adskilt fra spekteret av blodkomponenter, spesielt hemoglobin som har et absorpsjonsmaksimum ved 578 nm.

Som rapportert heri vil fotokatalyserte reaksjoner med hydrofobe fargestoffer føre til inaktivering av ekstracellulært omhyllt virus såsom VSV og HIV, mens ekstracellulært encefalomyokarditisvirus (EMC), et ikke-omhyllt virus, ikke ble inaktivert. I tillegg var $AlPcS_2$ og $AlPcS_4$, som binder seg til cellens mer hydrofile regioner, mer effektive virucidale midler enn $AlPc$ ved lignende konsentrasjon. Det er viktig å bemerke at både cellefrie og celleassosierte virus ble inaktivert under de undersøkte betingelser, og at de røde blodlegemenes integritet ble opprettholdt, som bedømt ved fraværet av hemoglobinavgivelse (<2%) ved behandlingen, eller etter lagring. I virkeligheten stabiliserte behandlingen av en rødcelleoppslemming med $AlPc$ og lys de røde blodlegemene mot hypotinisk sjokk. Ytterligere bevis på integriteten av $AlPcS_4$ -behandlede røde blodlegemer, kommer fra målingen av deres sirkulatoriske halveringstid. Behandlede røde blodlegemer fra bavianer hadde en halveringstid på 13,4 døgn, mens ubehandlede røde blodlegemer fra bavianer hadde en halveringstid på 13,9 døgn.

At VSV tilsatt til en fullstendig konsentratenhet av røde blodlegemer ble inaktivert, viser at en fremgangsmåte basert på $AlPc$ -tilsetning og eksponering for lys kan gjennomføres i et blodbankmiljø. Behandling av oppsamlede enheter i et lyskabinett, kanskje for en periode så lang som 6 til 24 timer, eller for kortere perioder dersom flere eller mer intense lyskilder anvendes, blir forutsett.

I en foretrukket utførelse ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes en

belysningsstyrke på 250 til 1000 J/cm² på en 2 til 4 cm tykk prøve og det anvendes omrøring. I en ytterligere foretrukket utførelse ifølge oppfinnelsen anvendes fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen på en prøve i en blodpose.

Etter behandling med den fotoreaktive forbindelse kan overskudd av fotoreaktiv forbindelse fjernes ved sentrifugering, vasking og/eller dialyse.

I en utførelse ifølge den foreliggende oppfinnelse blir den behandlede celleholdige fraksjon fra oppfinnellesfremgangsmåten transfusert eller gitt tilbake til giveren, f.eks. en human giver, hvorfra den opprinnelige celleholdige fraksjon ble skaffet. På denne måte vil nivået av sirkulerende virus i giveren bli redusert, og således forbedre giverens evne til å bli kvitt virus og/eller forbedre effektiviteten av antivirale medikamenter.

Som bemerket heri ovenfor omfatter oppfinnelsen også en inaktiveringsmetode som medfører en fotoaktiv forbindelse, lys og en quencher, med eller uten et oksydasjonsmiddel.

Innbefatningen av en quencher under AMT/UVA-behandling av et blodplatekonsentrat i nærvær av oksygen førte til normal blodplatefunksjon, som målt ved standard aggregasjonsreaksjon, og inaktivering på $\geq 10^{5.5}$ TCID₅₀ av VSV; uten quenchertilsetning ble hastigheten og graden av blodplateaggregasjon redusert. Overraskende var virustilintetgjørelsen lik i begge prøver. På lignende måte førte innbefatningen av en quencher under AMT/UVA-behandlingen av blodplasma til kvantitativ gjenvinning av koagulasjonsfaktor VIII; uten quenchertilsetning var gjenvinningen bare 77%. Overraskende var det igjen ingen forskjell i VSV-tilintetgjørelsen. I ytterligere et annet eksempel ble den sirkulatoriske halveringstid for røde blodlegemer fra kanin bestemt etter behandling med aluminiumftalocyanin tetrasulfonat og synlig lys. Uten skadelig å påvirke virustilintetgjørelsen førte innbefatning av en quencher til forlengelse av den sirkulatoriske overleving av behandlede røde blodlegemer.

Oppfinnelsen skal nå beskrives med referanse til følgende eksempler.

EKSEMPLER

Materialer og metoder

Blod

Helt blod var typisk mindre enn 48 timer gammelt når det ble anvendt. Før anvendelse ble det lagret ved 4°C. Konsentrater av røde blodlegemer (RBCC) ble fremstilt fra helt blod ved sentrifugering i 20 min. ved 2000 opm med fjerning av det meste av plasmasjiktet. Hvor angitt ble helt blod fortynnet 5 ganger eller konsentratene av røde blodlegemer ble fortynnet 2 ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS; Gibco Laboratories, Grand Island, New York).

Aluminiumftalocyaninløsninger

Aluminiumftalocyaninklorid (AlPc) ble kjøpt fra Kodak Laboratory Chemicals, Rochester, New York. Stockløsninger av AlPc (0,01M) ble fremstilt i N,N-dimetylformamid av spektrofotometrisk kvalitet (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin). Aluminiumftalocyanintetrasulfonat (AlPcS₄) og aluminiumftalocyanindisulfonat (AlPcS₂) ble kjøpt fra Porphyrin Products Inc., Logan, Utah. Stockløsninger av AlPcS₂ og AlPcS₄ ($6,2 \times 10^{-4}$ M) ble fremstilt i PBS. Konsentrasjonen av alle ftalocyaninløsningene ble bestemt spektrofotometrisk ved anvendelse av en molar ekstinksjonskoeffisient på $2 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ved absorpsjonsmaksimum på 670 nm for AlPc, 674 nm for AlPcS₂ og 675 nm for AlPcS₄.

Psoralenløsninger

4'-aminometyl-4,5',8-trimetylpsoralen (AMT) ble kjøpt fra HRI Assoc. Inc., Concord, CA. Stock-løsninger av AMT (4 mg/ml) ble fremstilt i destillert vann.

Modell virusstudier

Inaktiveringen av følgende virus ble studert: vesikulært stomatitisvirus (VSV), et lipidomhylllet, RNA-virus; encefalomyokarditisvirus (EMC), et proteinomhylllet RNA-virus; og humant immunsviktivirus (HIV), et humant, patogent retrovirus.

VSV ble dyrket i humane A549-celler. Lager av EMC ble fremstilt i mus L929 eller humane A459 celler. Dyrking og bestemmelsesfremgangsmåter var lik dem som er beskrevet i Horowitz, B., Wiebe, M.E., Lippin, A. og Stryker, M.H., "Inactivation of Viruses in Labile Blood Derivatives", Transfusion, 1985;25:516-522. Infektivitet av VSV og EMC ble bestemt ved slutt punkt, 10-gangers seriefortynninger i DMEM dyrkingsmedium (Gibco Laboratories, Grand Island, New York) med 10% fetalt kalveserum (FCS; MA Bioproducts, Walkersville, Maryland). Hver fortynning ble anvendt til inokulering av åtte replikate brønner med humane A549 celler i 96-brønners mikrotiterplater. Virus-indusert cytopatologi ble oppnådd etter 72 timers inkubering ved 37°C i 5% CO₂. Den rapporterte virustiter ble beregnet ved anvendelse av Spearman-Kärbermetoden (Spearman, C., "The Method of Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') Without Gauss's Formula", Br. J. Psychol., 1908;2:227-242) og angir den mengde virus som infiserer 50% av vevskultur-brønnene (TCID₅₀).

Celleassosiert VSV ble fremstilt ved inkubering av et konfluentmonosjikt av humane A549 celler med 5 ml av $10^7 \text{ ID}_{50}/\text{ml}$ VSV i serumfritt DMEM i 1 time ved 37°C under 5% CO₂ i 150 cm² vevskulturflasker. Mangfoldigheten av infeksjon under disse betingelser var ca. 2,1 TCID₅₀/celle. Etter avdekantering av væsken ble de sammenklebede cellene vasket tre ganger for å fjerne fri virus med 50 ml PBS pr.

vasking. Deretter ble tilsatt 40 ml DMEM inneholdende 5% FCS, og cellene ble inkubert i ytterligere 4 3/4 time. De sammenklebede cellene ble vasket tre ganger med PBS og frigjort ved behandling i 10 min. med en vanlig saltløsning inneholdende 0,01% trypsin (Cooper Biomedical, Freehold, New Jersey; krystallisert to ganger) og 5 µg/ml EDTA. De frigjorte cellene ble oppsamlet ved sentrifugering, vasket tre ganger med PBS og slemmet opp igjen i PBS.

For å bestemme inaktiveringen ved cellefri virus tilsatt til blodkomponenten under studium i 1:10 fortykning, og 3 ml alikvoter av denne blanding ble fordelt i polystyrenrør (Fisher Scientific, Springfield, New Jersey; Cat. # 2027; 7 ml kapasitet) etterfulgt av tilsetning av ftalocyaninderivatet. Prøvene ble blandet kontinuerlig ved bruk av en hematologiblander (Fisher Scientific, Cat. # 14-060-1) og fotobestrålt med lys fra en Solar Simulator (Oriol Corp, Stratford, Connecticut) utstyrt med en Zenith 300 Watt Xe kortbuelampe utstyrt med et gult 570 nm long-pass filter (Oriol Corp.). Belysningsstyrken ved prøven var ca. 25-26 mWatts/cm² målt med et fotometer (Model nr. IL1350 International Light, Newburyport, Massachusetts) med en detektor (modell nr. SED038) utstyrt med et bredbånd passfilter (F#8174) og en diffusor (W#4425). Sammenlignet med de data som er gitt nedenfor tillot filtrering gjennom et 676 nm interferensfilter (the Optometrics Corp., Katalog nr. 02-6765, Ayer, MA) plassert på detektoren, transmisjon av 1,3% av belysningsstyrken. Bestrålingstidene var typisk 30, 60 og 120 min. tilsvarende belysningsmengder på hhv. 44, 88 og 176 J/cm². En konstant luftstrøm ble levert med en vifte og prøvetemperaturen steg ikke over 28°C under belysningen.

Virusinaktivering av en fullstendig rød blodcellekonsentratenhet (RBCC) ble utført i en pose # 5J359 med 600 ml kapasitet (Fenwall Division, Deerfield, Illinois). En Thermolyne Speci-mix blander modell M26125 (Sybron Corp., Iowa) ble anvendt til å blande prøven i posen under fotobestrålingen.

For bestemmelse av virusinaktiveringen ble reaksjonen stanset ved 10 gangers fortykning i DMEM inneholdende 5% fetalt kalveserum, og de røde blodlegemene ble fjernet ved sentrifugering ved 1500 opm i 10 min.. Mangel på virusinaktivering ved denne fortykning eller i fravær av lys ble bekreftet for hver av de studerte inaktiveringsbetingelser. Prøvene ble sterilfiltrert (Swinneffiltere, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) og frosset ved -70°C eller lavere inntil analyse.

Fremgangsmåtene for bestemmelse av inaktiveringen av celleassosiert VSV var lik dem for cellefri VSV, bortsett fra at alle eksperimenter med celleassosiert VSV ble utført under fullstendig kontrollerte aseptiske betingelser. Ved avslutning av eksperimentet ble de infiserte A549 celler isolert ved tilsetning av Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey) og sentrifugert i en rotor med

svingende holder ved 1800 xg i 30 min. ved omgivende temperatur. Sjøktet inneholdende A549 cellene ble oppsamlet, vasket tre ganger med PBS ved sentrifugering, slemmet opp igjen i 1 ml PBS og umiddelbart analysert på VSV infektivitet ved slutt punkt 10-gangers seriefortynninger som med cellefri virus.

Bestemmelse av HIV-inaktivering

HTLV III_b-stammen av humant immunsviktvirus (HIV) ble anvendt i disse eksperimenter. Måling av infektivitet var lik den som er rapportert tidligere (Prince, A.M., Pascual, D., Kosolapov, L.B., et al, "Prevalence Clinical Significance,, and Strain Specificity of Neutralizing Antibody to the Human Immunodeficiency Virus", The Journal of Infectious Diseases, 1987;156:268-272). Ti tusen-gangers konsentrater av cellefri HIV, fremstilt ved continuous flow sucrose banding, ble kjøpt fra Bionetics, Inc. (Rockville, M.D.). Titreringer ble utført med ti-gangers seriefortynninger i mikrotiterplater ved anvendelse av RPMI 1640 inneholdende 10% FCS, med enten CEM eller H9 celler ved en konsentrasjon på 8×10^5 /ml. Før anvendelse ble cellene kondisjonert ved inkubering i 1 time ved 37°C i mediet ovenfor inneholdende 2 µg/ml polybren. Virus i behandlede prøver ble adsorbent til celler i 2 timer ved 37°C i mørket. Kulturene ble deretter vasket to ganger i medium ved sentrifugering av plater i 10 min. ved 2000 opm og aspirering av supernatantene for å fjerne den behandelende forbindelse og redusere toksisiteten. 150 µl kulturer ble deretter matet med 25 µl av medium ved 4, 7 og 10 døgn. Ved 14 døgn ble kulturene vasket to ganger med PBS (fosfatbufret saltløsning) for å fjerne virale antigener båret over fra inokulum, og cellene ble lyset i PBS inneholdende 0,5% Triton X-100. Lysatene ble analysert for HIV p55 antigener ved ELISA ved anvendelse av plater belagt med kaninantiserum mot rekombinant p55 (Syntex Corp., Palo Alto, CA.) og peroksydasemerket kanin anti-p55. Denne analyse hadde i alt vesentlig den samme sensitivitet ved måling av p24 som Dupont p24 antigenbestemmelsen.

For å øke sensitiviteten for måling av små mengder av restvirus ble 0,5-1,0 ml av ufortynnete virusholdige fluider behandlet med AIPc også inokulert i 5 ml makro-kulturer, og ble matet ved å fjerne halve volumet og erstatte det med friskt medium to ganger ukentlig i 4 uker.

For celleassosiert HIV ble 25 ml kultur av 8×10^5 /ml CEM av H9 celler inokulert med 10^4 TCID₅₀ av HIV. Kulturene ble matet ved fjerning av halve volumet og erstatning med friskt medium to ganger ukentlig. Ved hver mating ble supernatante fluider analysert for p55 antigener ved ELISA. Når titeren nådde 1:64 eller høyere, vanligvis ved 10-12 døgn, ble de infiserte celler anvendt i følgende eksperimenter. Før anvendelse i eksperimentene ble alikvoter på 10^6 infiserte celler

pelletert og oppslemmet igjen i 100 μ l av HIV immunglobulin (Prince, A.M., Horowitz, B., Baker, L. et al, "Failure of an HIV Immune Globulin To Protect Chimpanzees Against Experimental Challenge With HIV", PNAS, 1988;85:6944-6948), inkubert i 1 time ved 37°C og vasket tre ganger i kulturmedium for å redusere mengden av ikke-celleassosiert virus. Infiserte celler ble deretter oppslemmet i medium, eller helt blod antikoagulert med CPD (citrattfosfatdekstrose), til en konsentrasjon på 10^6 /ml. Disse blandinger ble eksponert for varierende konsentrasjoner av AIPc med eller uten eksponering for lys. Etter behandling ble prøvene fortynnet 1:2 med RPMI-1640 og sentrifugert gjennom Ficoll-Hypaque for å adskille lymfocytter fra erytrocytter. De gjenvunnede lymfocytter ble vasket tre ganger, telt og seriefortynnet i 100 μ l medium. Uinfiserte CEM-celler ble deretter tilsatt og kulturene bearbeidet som for infektivitetstitreringen beskrevet ovenfor.

Målinger av røde blodlegemer

Total hemoglobin ble kvantifisert ved anvendelse av Drabkins reagens (Sigma Procedure No. 525, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri). Plasmahemoglobin ble bestemt, etter fjerning av celler ved sentrifugering, ved måling av den optiske tetthet av plasmaet ved A540 og ved å anta en absorbans på 0,86 for en 1 mg/ml løsning (Antonini, E. og Brunori, M., "Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands", Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1971. (Neuberger A., Tatum E.L., utg., Frontiers of Biology; Vol. 21)). Før sentrifugering ble konsentrater av røde blodlegemer fortynnet 1:1 med PBS. Resultatene ble uttrykt som en prosent av det totale tilstedeværende hemoglobin. Osmotisk fragilitet av behandlede røde blodlegemer ble målt som tidligere beskrevet i Dacie, J.V., Lord, M.B., Vaughan, J.M. og Oxon, D.M., "The Fragility of Red Blood Cells, Its Measurements and Significance", J. Path Bact., 1938, 46:341-356. pH-målinger ble utført med et PHM 82 pH-meter (Radiometer America Inc., Cleveland, Ohio). Den sirkulatoriske halveringstid for autologe røde blodlegemer fra kanin ble bestemt ved vasking av de behandlede røde blodlegemer for å fjerne plasmaproteiner og merking av cellene med ^{51}Cr .

Eksempel 1: Inaktivering av VSV og EMC med AIPc

Inaktivering av cellefritt VSV tilsatt til helt blod (5×10^9 røde blodlegemer/ml) eller et konsentrat av røde blodlegemer (1×10^{10} røde blodlegemer/ml) i nærvær av AIPc var avhengig av dets konsentrasjon og av belysningsmengden (doseringen) (fig. 1). Cellefritt VSV og AIPc i den angitte konsentrasjon ble tilsatt til helt blod (fig. 1a), et konsentrat av røde blodlegemer (fig. 1b), helt blod fortynnet 5 ganger med PBS (fig. 1c) og et konsentrat av røde blodlegemer fortynnet 2 ganger med

PBS (fig. 1d). Plasmaproteinkonsentrasjonen i helt blod og konsentratet av røde blodlegemer var 60 mg/ml før den angitte fortynning. Prøver (3 ml) ble eksponert for en konstant lysintensitet ($25\text{--}26\text{ mWatt/cm}^2$) i varierende tidsrom slik at den samlede belysningsmengde var 44 J/cm^2 (lukkede sirkler), 88 J/cm^2 (åpne sirkler), eller 176 J/cm^2 (åpne triangler). Etter eksponering for lys ble virusinfektiviteten bestemt som beskrevet heri.

Fullstendig inaktivering av VSV ($\geq 10^{4.0}$ til $10^{4.5}\text{ TCID}_{50}$) tilsatt til helt blod ble observert ved en AlPc-konsentrasjon på $10\text{ }\mu\text{M}$ og en belysningsmengde på 88 og 176 J/cm^2 , tilsvarende en lysintensitet på 25 mWatt/cm^2 og eksponeringstider på hhv. 60 og 120 min.. Ved en belysningsmengde på 44 J/cm^2 var det nødvendig for fullstendig inaktivering av tilsatt VSV med en AlPc-konsentrajon på $25\text{ }\mu\text{M}$ (fig. 1a). Inaktivering av VSV tilsatt til et konsentrat av røde blodlegemer (RBC-konsentrasjon = $1 \times 10^{10}/\text{ml}$; fig. 1b) var lik den som ble observert i helt blod (fig. 1a). Fullstendig inaktivering av VSV tilsatt til helt blod først fortynnet 5-ganger (fig. 1c) eller til et konsentrat av røde blodlegemer først fortynnet 2-ganger (fig. 1d) med PBS, foregikk ved en lavere AlPc-konsentrasjon for en gitt belysningsmengde enn den som ble observert med deres ufortynnede motstykker. VSV-inaktivering forekom ikke i fravær av AlPc eller i mørket (data ikke vist).

Integriteten av røde blodlegemer, som bestemt ved hemoglobinfripgjøring under behandlingsperioden, ble godt opprettholdt (lysis < 2%) under hver av betingelsene presentert i fig. 1.

Cellefritt EMC, et ikke-omhyllt virus, ble ikke inaktivert ved behandling med AlPc, når det ble evaluert under betingelser lik dem som er beskrevet ovenfor (data ikke vist).

Eksempel 2:

Intracellulært VSV ble fremstilt som beskrevet heri ovenfor. Sammenligning av konsentrasjonen av celler høstet etter trypsinbehandling ($2,07 \times 10^7/\text{ml}$) med virale smittebærende enheter ($1 \times 10^6\text{ TCID}_{50}/50\text{ }\mu\text{l}$; $2,0 \times 10^6\text{ TCID}_{50}/\text{ml}$) antyder at praktisk talt hver celle inneholdt smittebærende virus. Dette intracellulære VSV, tilsatt til et konsentrat av røde blodlegemer, ble fullstendig inaktivert ($\geq 10^{5.6}\text{ TCID}_{50}$) ved behandling av dette konsentrat av røde blodlegemer med $10\text{ }\mu\text{M}$ AlPc og 88 J/cm^2 (tabell I). Sammenligning med resultatene rapportert med cellefritt virus (fig. 1b) viser at inaktivering av den celle-assosierte formen er mer vanskelig. Struktur og funksjon av røde blodlegemer var upåvirket.

TABELL I

Inaktivering av intracellulært VSV tilsatt
til et konsentrat av røde blodlegemer med AlPc

AlPc-konsentrasjon (µM)	VSV titer(log ₁₀)		Log ₁₀ avliving
	Mørke	Lys*	
0	5,2	5,1	0,0
0	5,0	3,6	1,5
2	5,1	≤-0,5	≥5,6
5	5,3	≤-0,5	≥5,6
10	—		
	Av 5,1		
*88 J/cm ²			

Eksempel 3:

Inaktivering av cellefritt VSV i nærvær av de di- og tetrasulfonerte derivater av AlPc ble også undersøkt. Cellefritt VSV og AlPcS₂ (fig. 2a og fig. 2b) eller AlPcS₄ (fig. 2c og fig. 2d) ved den angitte konsentrasjon ble tilsatt til helt blod (fig. 2a og fig. 2c) eller et konsentrat av røde blodlegemer (fig. 2b og fig. 2d). Andre detaljer er som beskrevet ovenfor med hensyn til fig. 1. Fullstendig inaktivering ($\geq 10^4$ TCID₅₀) av VSV med de sulfonerte derivater foregikk ved en lavere AlPc-konsentrasjon for en gitt belysningsmengde enn den som ble observert med den ikke-sulfonerte form (fig. 1 vs. fig. 2). Fullstendig inaktivering av VSV tilsatt til enten helt blod fortynnet 5 ganger eller et konsentrat av røde blodlegemer fortynnet 2 ganger med PBS ble observert med 2 μM av hvert av de sulfonerte derivater og en belysningsmengde på 44 J/cm² (data ikke vist). Når det gjelder hemoglobinavgivelse i løpet av behandlingen ble lite ($\geq 2\%$) observert ved AlPcS_x-konsentrasjoner opp til 25 μM og en belysningsmengde opp til 176 J/cm² (tabell II).

TABELL II

Prosent hemoglobin frigjort ved behandling av
et konsentrat av røde blodlegemer med AIPc-derivater

AIPc derivat	Lysmengde (J/cm ²)	Prosent frigjort hemoglobin		
		AIPc-kons: 5 µM 10 µM 25 µM		
AIPc	88	1,1	0,8	1,1
	176	1,5	0,9	1,4
AIPcS ₂	88	0,6	0,5	0,3
	176	0,6	0,5	0,4
AIPcS ₄	88	0,2	0,5	0,3
	176	0,3	0,5	0,3

Eksempel 4: Inaktivering av HIV med AIPc

HIV i enten en cellefri eller intracellulær form ble tilsatt til enten helt blod eller et konsentrat av røde blodlegemer i et prøverør. Behandling av cellefritt HIV anvendte 10 µM AIPc og 176 J/cm²; behandling av intracellulær HIV anvendte 5 µM AIPc og 44 J/cm². Ved avslutningen av behandlingen ble prøvene bearbeidet som beskrevet ovenfor, og HIV-antigenmålinger ble utført.

Behandling av helt blod eller et konsentrat av røde blodlegemer med AIPc ble vist å inaktivere $\geq 10^{4,2}$ TCID₅₀ av cellefritt og $\geq 10^{3,6}$ TCID₅₀ av et intracellulært HIV (tabell III). Struktur og funksjon av røde blodlegemer var upåvirket.

TABELL III

INAKTIVERING AV HIV

	Log ₁₀ inaktivering	
	Cellefritt	Intracellulært
Helt blod	$\geq 4,2$	$\geq 3,6$
Konsentrat av røde blodlegemer	$\geq 4,2$	ikke utført

Eksempel 5: Integritet av røde blodlegemer

Typiske resultater av prosent hemoglobin frigjort fra røde blodlegemer i løpet av behandlingen med AIPc-derivatene er gitt i tabell II. Frigjortprosenten varierte mellom 0,2 og 1,5% av det samlede tilstedeværende hemoglobin.

Erytrocyttenes osmotiske fragilitet etter behandling av helt blod ble målt uten forutgående fjerning av AIPc (fig. 3). Helt blod ble behandlet med 10 μM AIPcCl og en belysningsmengde på 44 J/cm^2 (åpne sirkler), 88 J/cm^2 (åpne triangler) og 176 J/cm^2 (åpne kvadrater). Etter behandling og uten påfølgende bearbeiding ble erytrocyttenes osmotiske fragilitet bestemt i disse prøver og i de ubehandlede kontroller (lukkede sirkler) ved fortykning i saltløsninger med den angitte konsentrasjon. Etter inkubering i 30 min. og sentrifugering ble frigjort hemoglobin målt med Drabkins løsning og sammenlignet med den som ble frigjort ved fortykning i destillert vann.

Sammenlignet med den ubehandlede kontroll viste det seg at behandling med 10 μM AIPc ved belysningsmengder på 44, 88 og 176 J/cm^2 økte bestandigheten av de røde blodlegemer mot osmotisk sjokk.

Eksempel 6:

For å evaluere lagringsstabilitet av behandlede røde blodlegemer ble 3 ml helt blod behandlet med 10 μM AIPc og en belysningsmengde på 176 J/cm^2 , som i eksempel 1. Etter en lagringsperiode på 17 døgn var avgitt hemoglobin 1,8% av totalen, og pH i prøven var 6,9, en indikasjon på utmerket lagringsforlikelighet.

Eksempel 7:

Det ble gjennomført en studie av VSV-inaktivering i en konsentratenhet av intakte røde blodlegemer. Et konsentrat av røde blodlegemer inneholdt i en Fenwal 5J359 blodpose ble belyst bare fra den ene siden. Inaktiveringen av alt påvisbart cellefritt VSV ($\geq 10^{4.5}$ TCID₅₀) ble oppnådd med 10,5 μM AIPc og en lysmengde på 264 J/cm^2 tilsvarende en behandlingsvarighet på 3 timer (tabell IV). En 10 ganger mer sensitiv makrokulturbestemmelse viste ikke tilstedeværelse av VSV (tilintetgjørelse $\geq 10^{5.5}$ TCID₅₀) ved 352 og 396 J/cm^2 . Mindre enn 2% lysis ble observert endog ved 396 J/cm^2 .

TABELL IV

Inaktivering av cellefritt VSV tilsatt til
en individuell konsentratenhet av røde blodlegemer

AlPc-konsentrasjon (μM)	Belysningsmengde (J/cm^2)	VSV-titer ($\log_{10} \text{TCID}_{50}$)
0	0	4,0
10,5	88	2,8
10,5	176	1,3
10,5	264	$\leq -0,5$
10,5	352	$\leq -0,5$
10,5	396	$\leq -0,5$

Eksempel 8

En bestemmelse av virkningen av ftalocyaninbehandling på blodplatefunksjonen ble gjennomført. Sinkftalocyanin (ZnPc) i dimetylformamid ble tilsatt til et blodplatekonsentrat inneholdende $5,36 \times 10^9$ blodplater/ml og en plasmaproteinkonsentrasjon på 60 mg/ml. Sluttkonsentrasjonen av ZnPc var 20 μM . Ved de angitte tider ble blodplate tallet bestemt, blodplatemorfologien ble bestemt ved måling av middelvolumer, og blodplatenes aggregeringsevne ved tilsetning av adenosindifosfat (ADP) ble bestemt (tabell V). Gjennom hele behandlingstiden ble blodplatetallet beholdt i en utstrekning på 86-91%. Gjennomsnittsvolumet av blodplatene var upåvirket. Aggregasjon som respons på ADP, uttrykt enten i form av starthastighet for aggregeringen eller graden av aggregering var uforandret, sammenlignet med utelukkende DMF-kontroll ved 10 minutters lyseksponering, selv om den ble noe nedsatt ved 15 og 30 minutters lyseksponering.

TABELL V

Virkningen av sinkftalocyanin på blodplater

Prøve	Blodplate tall (x10 ⁻⁹ /ml)	Midlere blodplate volum (µm ³)	Aggregasjons- respons	
			Start- hastighet (A/min)	Maksimal grad (A)
<u>Kontroller</u>				
Intet lys, Intet ZnPc Utelukkende løsningsmiddel (DMF)	5,36	6,1	38	45
	5,65	6,4	34	26
<u>Test</u>				
ZnPC + 10 min. lys	4,74	6,3	35	28
ZnPC + 15 min. lys	4,87	6,1	25	22
ZnPC + 30 min. lys	4,63	5,8	25	20

Eksempel 9: Virkningen av konsentrasjonen av røde blodlegemer påAIPcS₄-indusert lysis

Humane røde blodlegemer ble vasket to ganger med fosfatbufret saltløsning for å fjerne plasma og deretter fortynnet til den angitte konsentrasjon. Aluminium-ftalocyanintetrasulfonat ($10 \mu\text{M}$) ble tilsatt til alle, og prøvene bestrålt som beskrevet ovenfor med $88 \text{ J}/\text{cm}^2$. Etter bestrålingen ble lysisgraden bestemt ved mengden av frigjort hemoglobin. Som vist i tabell VI, ble 100% lysis observert ved en konsentrasjon av røde blodlegemer på $4,5 \times 10^8$ celler/ml, men forbedret seg plutselig når cellekonsentrasjonen ble hevet til $2,25 \times 10^9$ celler/ml eller høyere

TABELL VI

Prosent hemolyse som funksjon av konsentrasjonen av røde blodlegemer

Kons. av røde blodlegemer (celler/ml)	Prosent hemolyse
9×10^9	2,9
$4,5 \times 10^9$	2,9
$2,25 \times 10^9$	2,7
$4,5 \times 10^8$	100

Eksempel 10: Sammenligning av virustilintetgjørelse ved aluminium-ftalocyanin med hematoporfyrinderivat

Vesikulært stomatitisvirus (VSV) ble tilsatt til helt blod etterfulgt av enten hematoporfyrinderivat (HPD), et fargestoff med et absorpsjonsmaksimum under 630 nm, eller aluminiumftalocyaninsulfonat. Begge ble eksponert for lys som ovenfor. Resultatene (tabell VII nedenfor) viser at virustilintetgjørelsen er både raskere og mer fullstendig med AlPcS₄ enn med HPD.

TABELL VII

Forbindelse	Kons. (μ M)	<u>VSV-tilintetgjørelse</u>	
		30 min.	(log ₁₀) 120 min.
HDP*	18	1,3	1,4
	36	1,4	2,4
	54	1,7	4,0
AlPcS ₄	5	$\geq 4,0$	$\geq 4,0$

*Antatt molvekt 1106

EKSEMPEL 11

Sirkulatorisk halveringstid for autologe røde blodlegemer fra kanin behandlet med aluminiumftalocyaninderivater i nærvær av quenchemidler.

Et konsentrat av røde blodlegemer fra kanin (RBCC) inneholdende 1×10^{10} RBC/ml oppslemmet i plasma ble blandet med aluminiumftalocyanintetrasulfonat (AlPcS₄) og, hvor angitt, tilsatt et quenchemiddel. Blandingen ble deretter eksponert for 25 mW/cm² av synlig lys i 30 min., hvorefter det behandlede RBCC ble vasket ved sentrifugering, merket med ⁵¹Cr, og administrert intravenøst til den opprinnelige kanin. Resultatene viser at RBC behandlet i nærvær av det tilsatte quenchemiddel

hadde tilnærmet normal sirkulatorisk *in vivo* overleving, mens RBC behandlet uten det tilsatte quenchemiddel hadde en forkortet *in vivo* sirkulatorisk overleving (tabell VIII).

Aluminiumftalocyaminaninderivatet og quenchemidlet ble tilsatt til en separat RBCC-prøve inneholdende vesikulært stomatitisvirus og eksponert for lignende bestrålingsbetingelser. Inaktiveringen av virus var upåvirket av tilsetningen av quencher (tabell VIII).

Tabell VIII: *In vivo* sirkulatorisk overleving av røde blodlegemer fra kanin etter behandling med AIPcS4

Fargestoff	Quencher	Halveringstid (døgn)	Log ₁₀ VSV Tilintetgjørelse
10 µM AIPcS ₄ (Dark Control)	4 mM glutation	12,5	0
10 µM AIPcS ₄	Ingen	3,75	≥ 5,5
10 µM AIPcS ₄	1 mM mannitol	6	≥ 5,5
10 µM AIPcS ₄	1 mM tryptofan	8	≥ 5,5
10 µM AIPcS ₄	1 mM glutation	10,5	≥ 5,5

Eksempel 12: Aggregeringsrespons for blodplater behandlet med et psoralenderivat i nærvær eller fravær av tilsatt quenchemiddel.

Den virucidale og funksjonelle virkning på blodplatekonsentrater ble bestemt etter tilsetning av 25 µg/ml av 4'-aminometyl-4,5',8-trimetylpsoralen (AMT) med og uten tilstedeværelse av quenchemidlet, redusert glutation (GSH). Prøvene ble bestrålt med 6,5 mW/cm² av UVA-lys i 20-30 min. i nærvær av oksygen. Grad og hastighet av blodplateaggregering i respons på kollagen, målt 24 timer etter behandling, forbedret seg i nærvær av GSH (tabell IX). Dette var spesielt åpenbart med 30 min. UVA-eksponering, betingelsene som var nødvendige for å oppnå fullstendig virustilintetgjørelse.

Tabell IX:

Virkningen av tilsetning av GSH på grad/hastighet av aggregering i blodplater etter UVA-behandling med AMT.

AMT $\mu\text{g/ml}$	Eksponerings- GSH tid		Blodplate-aggre- gering (% kontroll) Grad Hastighet	Log ₁₀ VSV tilintetgjørelse	
25	0	20 min.	98	75	4,1
25	1 mM	20 min.	100	84	4,5
25	0	30 min.	88	63	$\geq 5,5$
25	1 mM	30 min.	98	90	$\geq 5,1$

Eksempel 13: Forbedret fremgangsmåte for gjenvinning av koagulasjonsfaktorer ved behandling av plasma med AMT og UVA med tilsetning av quencher.

Human plasma ble behandlet med 25 $\mu\text{g/ml}$ AMT og eksponert for 6,5 mW/cm^2 UVA-lys i 20 min.. Måling av virustilintetgjørelse og fremgangsmåte-gjenvinning av koagulasjonsfaktorer ble sammenlignet etter behandling med og uten tilsetning av glutation. I fravær av redusert glutation (GSH), eller i nærvær av 1 mM og 4 mM GSH, var graden av virustilintetgjørelse hhv. 5,1, 5,3 og 5,3 $\log_{10}$. Mens AHF-gjenvinning i fravær av GSH var bare 77%, økte gjenvinningen til i alt vesentlig 100% i nærvær av 4 mM GSH.

Tabell X:

Prosessgjenvinning av koagulasjonsfaktor VIII etter behandling av humanplasma med AMT og undertrykkingsmiddel.

	GSH-konsentrasjon		
	Ingen	1 mM	4 mM
Virustilintetgjørelse (TCID ₅₀)	5,1	5,3	5,3
Faktor VIII-gjenvinning			
Ubehandlet (μml)	1,24	--	--
Behandlet (μml)	0,95	1,16	1,26
% gjenvinning	77%	94%	102%

Eksempel 14: Økning i gjenvinningen av plasmakoagulasjonsfaktorer behandlet for å inaktivere virus med AMT; reduksjon av oksygeninnhold sammenlignet med anvendelse av undertrykkingsmiddel.

Humanplasma ble behandlet med 25 µg/ml AMT under vanlige atmosfæriske betingelser i nærvær og fravær av 1 mM glutation tilsatt som undertrykkingsmiddel, sammenlignet med behandling under redusert oksygenkonsentrasjon ved utbytting med nitrogengass. Normalt gjennomluftede prøver ble bestrålt med UVA lys i 20 min., mens avoksygenererte prøver måtte bestråles i 120 min. for å gi om lag den samme virustilintetgjørelse. Disse data viser at, sammenlignet med behandling av normalt gjennomluftet plasma i fravær av undertrykkingsmiddel, (1) tilsetning av 1 mM glutation forbedrer AHF-gjenvinningen uten å sette virustilintetgjørelsen i fare, (2) et høyt nivå av virustilintetgjørelse og et høyt nivå av koagulasjonsfaktorgjenvinning kan oppnås ved reduksjon av oksygeninnholdet, forutsatt at behandlingsperioden blir forlenget, og (3) anvendelse av undertrykkingsmiddel forebygger behovet for å gjennomføre en gassutbytting og reduserer varigheten av den behandling som er nødvendig for en høy grad av virustilintetgjørelse.

Tabell XI:

Gjenvinning av koagulasjonsfaktor VIII i plasma ved behandling med AMT; virkning av undertrykkingsmiddel-tilsetning versus deoksygenering

Behandlingsbetingelser	AMT (µg/ml)	UVA Varighet (min.)	VSV Tilintet- gjørelse (log ₁₀)	AHF Gjenvinning (%)
Normalt gjennomluftet	25	20	5,1	77
Normalt gjennomluftet + 1 mM GSH	25	20	5,3	94
Avluftet	25	120	≥6,1	91

Eksempel 15: Forbedret virustilintetgjørelse i blodplater behandlet med et Psoralenderivat: Virkning av undertrykkingsmiddeltilsetning versus deoksygenering

Et standard blodplatekonsentrat fra blodbank ble behandlet med 25 µg/ml AMT og eksponering for UVA (6,5 mW/cm²). Før behandling, hvor angitt, ble

oksygen i de normalt gjennomluftede blodplater utvekslet med nitrogen ved å erstatte gassen over løsningen ved anvendelse av nitrogen, ekvilibring i 1 min., og gjentakelse av fremgangsmåten tre ganger. Alternativt ble 1 mM av undertrykkingsmiddelet glutation tilsatt før behandling. Inaktiveringshastigheten for vesikulært stomatitisvirus, som ble tilsatt til prøven og tjente som virusmarkør, ble bestemt gjennom varigheten av UVA-eksponeringen. Aggregeringsresponsen for blodplatene ble bestemt 24 timer etter behandling i nærvær av kollagen. Resultatene viser at virustilintetgjørelsen foregikk raskere i den normalt gjennomluftede prøve inneholdende undertrykkingsmiddel enn i den avluftede prøve (tabell XII). Utmerket funksjonell gjenvinning av blodplater ble oppnådd i hvert tilfelle, når den ble målt etter 24 timer. Anvendelse av undertrykkingsmiddel unngår således det langsommelige og potensielt tidskrevende trinn med gassutveksling uten at det går ut over virustilintetgjørelse eller blodplatefunksjonalitet.

Tabell XII

Varighet av UVA (minutter)	VSV titer ($\log_{10}$)	
	O ₂ + 1 mM glutation	Avluftet
Start	5,0	5,0
10	3,1	--
20	1,4	--
30	$\leq -0,5$	--
60	$\leq -0,5$	2,4
90	$\leq -0,5$	1,4
120	$\leq -0,5$	$\leq -0,5$

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for inaktivering av et ekstracellulært lipidinnkapslet, patogent virus og/eller et intracellulært, patogent virus som kan være tilstede i en blodcelleblanding, inneholdende minst $\geq 1 \times 10^9$ celler/ml, mens strukturell integritet på større enn 80% av minst én type blodcelle i nevnte blanding bibeholdes, karakterisert ved at nevnte blanding kontaktes med en virucid effektiv mengde av minst én fotoreaktiv forbindelse med et absorpsjonsmaksimum ≥ 630 nm, lys og et oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher".

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at blodcelleblandingen omfatter minst én komponent valgt fra gruppen bestående av røde blodceller, blodplater og fullblod.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at de røde blodceller og/eller blodplater er konsentrert.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2 eller 3, karakterisert ved at typen blodceller er røde blodceller, og den strukturelle integriteten til nevnte røde blodceller fastslås ved å bestemme mengden hemoglobin som frigjøres etter behandling av nevnte blanding med nevnte fotoreaktive forbindelse, lys og oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher", idet en frigjøring på mindre enn 20% hemoglobin viser at den strukturelle integritet på høyere enn 80% av nevnte røde blodceller ble bibeholdt etter behandling med nevnte fotoreaktive forbindelse, lys og oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher".

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2 eller 3, karakterisert ved at typen blodceller er blodplater, og den strukturelle integriteten til blodplatene fastslås ved å telle antallet blodplater som er igjen etter

behandling av nevnte blanding med nevnte fotoreaktive forbindelse, lys og oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher", idet et bibehold på mer enn 80% av nevnte blodplater viser at den strukturelle integritet på større enn 80% av nevnte blodplater ble bibeholdt etter behandling med nevnte fotoreaktive forbindelse, lys og oksydasjonsmiddel og/eller eventuelt en "quencher".

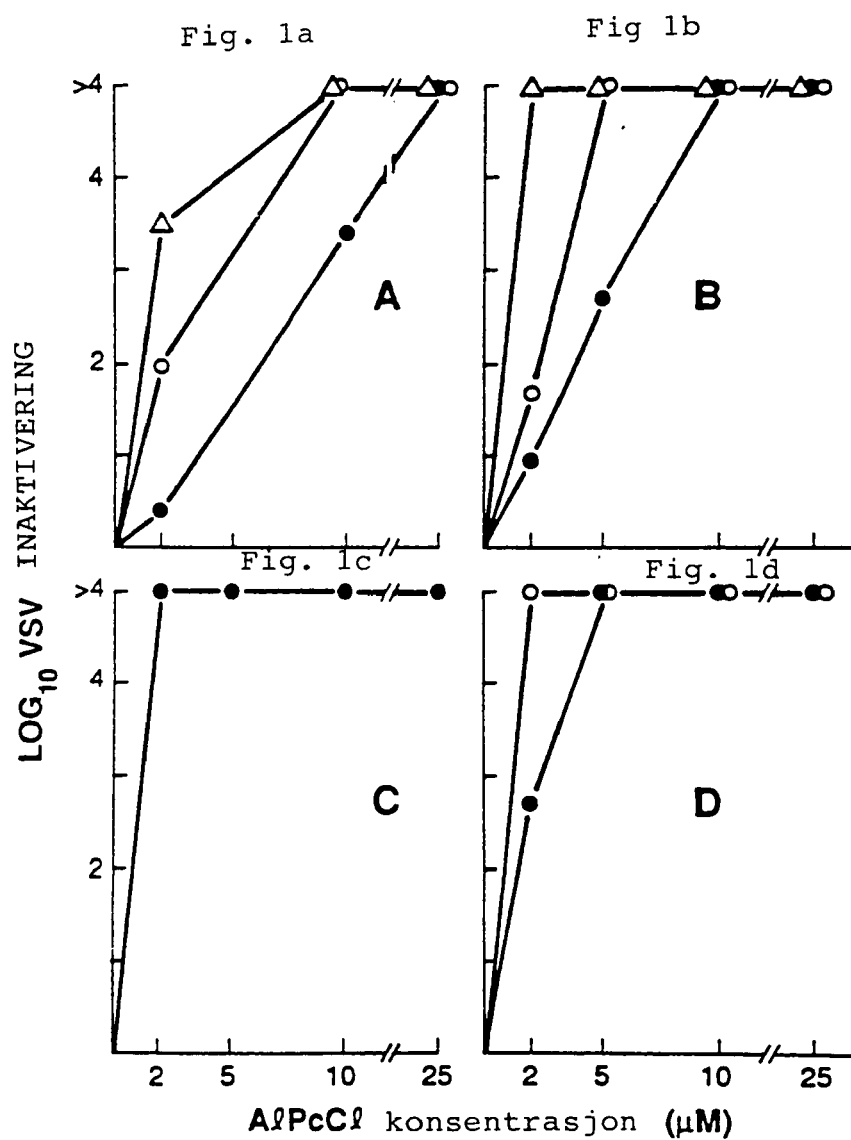
6. Fremgangsmåte ifølge hvert av kravene 1-5,
karakterisert ved at den fotoreaktive forbindelse er ftalocyanin.

7. Fremgangsmåte ifølge hvert av kravene 1-6,
karakterisert ved at det ekstracellulære lipidinnkapslede, patogene virus og/eller det intracellulære, patogene virus er et vesikulært stomatittvirus (VSV) eller et humant immun-sviktivirus (HIV).

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det ekstracellulære lipidinnkapslede patogene viruset og/eller det intracellulære patogene viruset er humant immunsviktivirus (HIV).

9. Fremgangsmåte ifølge hvert av kravene 1-8,
karakterisert ved at oksydasjonsmidlet er oksygen.

10. Fremgangsmåte ifølge hvert av kravene 1-9,
karakterisert ved at lyset er synlig lys ved en bølgelengde på 630 nm - 700 nm.



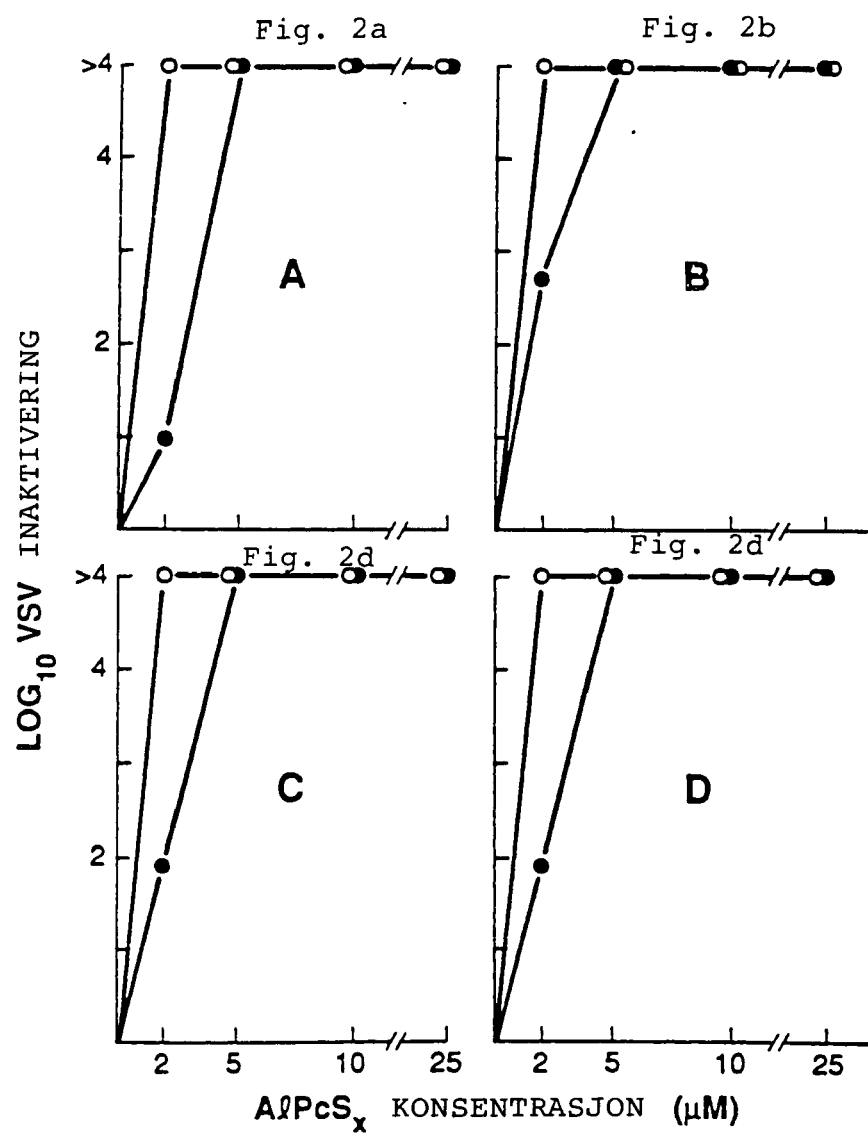


FIG. 3

