



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 871 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 129 728 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 871.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 107 780.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **29.08.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.09.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **08.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61L 2/16** (2006.01)

**C12N 7/06** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**521245**      **29.08.1995**      **US**

(73) Patentinhaber:

**Panacos Pharmaceuticals, Inc., Watertown, Ma.,  
US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler  
Wichmann Huhn, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Budowsky, Edward I., Brookline, MA 02445, US;  
Ackerman, Samuel K., Weston, MA 02193, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Zusammensetzungen zur selektiven Modikation von Nukleinsäuren**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## HINTERGRUND

**[0001]** Diese Erfindung liegt auf den Gebieten bioorganische Chemie, Molekularbiologie, Biochemie, Immunologie und Virologie sowie Human- und Veterinärmedizin. Insbesondere betrifft sie Verfahren und Zusammensetzungen zur selektiven chemischen Modifikation von Nukleinsäuren, die in Zusammensetzungen wie beispielsweise humanem Blut, zellulären Blutbestandteilen, Blutplasma und aus Blut gereinigten Biopolymeren des Plasmas (Albumin, Gerinnungsfaktoren, Immunglobulin, Fibrinogen u.s.w.), Zellkultur-Bestandteilen wie beispielsweise foetales Rinderserumalbumin und schweineartiges Trypsin, sowie Nicht-Blut-Produkten, die derart aus normalen oder krebsartigen Zellen hergestellt werden (z.B. rekombinante DNA-Technologie), dass jedes im Wesentlichen frei von infektiösen viralen Kontaminationen wird und für therapeutische oder diagnostische Anwendungen geeignet bleibt, enthalten sind. Diese Erfindung betrifft insbesondere auch Verfahren zur Inaktivierung von viralen, bakteriellen und zellulären Genomen bei der Herstellung von abgetöteten Impfstoffen und anderen medizinischen Produkten.

**[0002]** Die Übertragung von Viruserkrankungen (z.B. Hepatitis A und B, AIDS (HIV), Cytomegalovirus-Infektionen) durch Blut oder Blutprodukte ist ein erhebliches Problem in der Medizin. Während besondere Kriterien für die Spenderauswahl und die Untersuchung des Spenderbluts auf virale Marker für die Reduzierung der Übertragung von Viren auf Empfänger hilfreich sind, sind die Untersuchungsverfahren lückenhaft oder nicht 100%ig empfindlich, da die meisten nur auf wenige einzelne Viren gerichtet sind und ihre Empfindlichkeit selbst in diesem Fall ungenügend ist. Es ist erstrebenswert, jedes in Spenderblut oder Blutprodukten enthaltene Virus zu inaktivieren, ohne die Struktur und Funktion der wertvollen Bestandteile, z.B. rote Blutzellen, Blutplättchen, Leukozyten sowie Biopolymere des Plasmas wie beispielsweise Proteine, Polysaccharide etc., zu ändern. Andere biologische Zusammensetzungen, z.B. Säuger- und Hybridom-Zelllinien, Produkte von Zelllinien, Milch, Vormilch und Sperma, können ebenfalls infektiöse Viren enthalten, und es wäre vorteilhaft, diese Viren unter Erhaltung der wertvollen Bestandteile oder Produkte dieser Zusammensetzungen zu inaktivieren. Schließlich ist es auch oft unbekannt, ob Blut, Blutprodukte oder Produkte von Säugetierzellen infektiöse Viren enthalten. In diesem Fall wäre es wertvoll, Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung solcher Zellen oder Biopolymere enthaltenden Zusammensetzungen zur Verfügung zu haben, um die vorhandenen infektiösen Viren zu inaktivieren.

**[0003]** Die Herstellung von maximal sicheren und effektiven abgetöteten Impfstoffen für human- oder veterinärmedizinische Anwendungen erfordert Verfahren, die lebende Mikroorganismen, z.B. Viren und Bakterien, vollständig und zuverlässig nicht-infektiös („inaktiviert“) machen, die aber minimale Auswirkungen auf deren Immunogenität haben. Typischerweise für die Inaktivierung von Viren verwendete Verfahren, wie beispielsweise solche, die für die Herstellung von viralen Impfstoffen brauchbar sind, verändern oder zerstören im Allgemeinen die Funktion und Struktur der Zellen, Proteine und anderer Antigene.

**[0004]** Gängige Inaktivierungsverfahren, einschließlich der Verwendung von Formalin,  $\beta$ -Propiolakton und ultravioletter Strahlung, wurden empirisch, unter nur geringer Berücksichtigung der fundamentalen chemischen und strukturellen Prinzipien entwickelt. Ethylenimin-Monomere wurden zur Inaktivierung des Maul-und-Klauenseuche-Virus verwendet (russisches Patent Nr. SU 1915956). Ethylenimin-Monomere wurden ebenfalls zur Inaktivierung von Mycoplasma und Acholeplasma (WO 92/18161) sowie Geflügelinfektionen (rumänisches Patent Nr. RO 101400) verwendet. Binäres Ethylenimin wurde zur Inaktivierung des felines enteralen Coronavirus, FECV (EP 94200383) verwendet. Polyethylenimin wurde als Kontrollagens für Pflanzenviren verwendet (JP 7882735). Die genannten Verfahren und Präparate modifizieren Mikroorganismen wie beispielsweise Viren und Bakterien unspezifisch und sind nur schwer zu standardisieren und reproduzierbar anzuwenden. Im Allgemeinen wird eine Vielzahl von Bestandteilen des Mikroorganismus, einschließlich wichtiger oberflächenantigener Determinanten, z.B. viraler Capsidproteine, durch die gegenwärtig verwendeten Inaktivierungsmittel angegriffen, welche nicht nur Nukleinsäuren, sondern auch andere Biopolymere, wie beispielsweise Proteine, Kohlenhydrate und Lipide, modifizieren und so deren Funktion beeinträchtigen. Veränderte Antigene oder Inaktivierung von protektiven Epitopen kann zu reduzierter Immunogenität und somit geringer Wirksamkeit (z.B. inaktivierter Polio-Impfstoff) oder zu veränderter antigener Wirkung und somit Immunpotenzierung der Erkrankung anstelle einer Krankheitsvermeidung führen (z.B. Respiratory-Syncytial-Virus und inaktivierter Masern-Impfstoff, hergestellt durch Formalin-Inaktivierung). Ein anderes Beispiel ist die Herstellung eines Hepatitis B-Impfstoffs, wobei es übliche Praxis ist, die Zusammensetzung auf Temperaturen über 80°C zu erhitzen und mit Formaldehyd zu behandeln. Diese Behandlungen inaktivieren nicht nur die virale Infektiosität, sondern schädigen auch Proteine und andere Antigene. Als Stabilisatoren dem Impfstoff hinzugefügte Trägersubstanzen können ebenfalls ungewollt modifiziert werden, wodurch allergische Reaktionen ausgelöst werden.

Dies tritt bei humanem Serumalbumin in Tollwut-Impfstoff, der mit  $\beta$ -Propiolakton inaktiviert wurde, auf. Die Unkenntnis darüber, welche chemischen Veränderungen den Mikroorganismus nicht-infektiös machen, machen die Anwendung des Verfahrens ferner schwer reproduzierbar. Periodische Ausbrüche der Krankheit aufgrund unzureichender Inaktivierung oder Rückartung nach der Inaktivierung sind die Folge. Aufgrund dieses Problems sind bedeutende Ausbrüche der Kinderlähmung, der Maul-und-Klauen-Seuche und der Venezuelanischen-Pferde-Encephalitis erfolgt.

**[0005]** Folglich ist keines der gegenwärtig verfügbaren Mittel zur Herstellung inaktivierter viraler Impfstoffe selektiv genug, um infektiöse Viren vollständig zu inaktivieren und gleichzeitig die antigenen Eigenschaften der Viruspartikel, zumindest unter Bedingungen, die bis jetzt zur Inaktivierung des viralen Genoms verwendet wurden, zu erhalten.

**[0006]** Es ist ein weiteres Problem, dass einige der Viren, die Blut oder andere biologische Flüssigkeiten kontaminieren, sich in den Zellen befinden, entweder als vollständig gebildetes Virus, virale DNA-Fragmente oder in das Wirtsgenom integrierte virale Nukleinsäure. So ist beispielsweise das HI-Virus in den Leukozyten enthalten. Es ist ein besonderes Anliegen, in der Lage zu sein, sowohl zellfreie als auch in Zellen enthaltene Formen von Viren zu inaktivieren und gleichzeitig die strukturelle Integrität der Zellen zu erhalten.

**[0007]** Die Probleme der Inaktivierung von Viren in biologischen Gemischen unterscheiden sich von den Problemen der Inaktivierung von Viren alleine aufgrund der zusätzlichen Anwesenheit der begehrten Biopolymere wie beispielsweise Proteine, Kohlenhydrate und Glykoproteine im Plasma. Während es möglich ist, das Hepatitis B-Virus durch die Verwendung von Mitteln wie beispielsweise Formaldehyd oder oxidierende Agenzien zu inaktivieren, sind diese Verfahren für die Inaktivierung des Virus' in Blut nicht geeignet, da festgestellt wurde, dass die meisten dieser Inaktivierungsmittel die biologische Aktivität der Biopolymere im Plasma oder in zellulären Blutbestandteilen beeinträchtigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von ultraviolettem Licht Viren in einem Blutplättchenkonzentrat inaktivieren kann. Bei höheren Intensitäten resultierten daraus jedoch ernsthafte Schädigungen der Blutplättchen.  $\beta$ -Propiolakton reagiert mit Nukleinsäuren und Protein in ähnlichen Anteilen, so dass bei der Inaktivierung der Viren auch über die Hälfte des Faktor VIII-Gehalts des Plasmas verloren geht.

**[0008]** Probleme können auch bei der Gewinnung von wertvollen Biopolymeren aus blutfremden Quellen auftreten, da pathogene Viren auch solche Zusammensetzungen kontaminieren können. Solche Quellen umfassen unter anderem Vormilch und Milch von Säugetieren, Aszites, Serum, Salbeiöl, Plazenta-Extrakte, Gewebekultur-Zelllinien und ihre Extrakte, einschließlich z.B. transformierte Zellen, und Fermentationsprodukte.

**[0009]** Es ist eine Aufgabe der Erfindung, Verfahren und Zusammensetzungen zur Verfügung zu stellen, die eine selektive Modifikation von Nukleinsäuren bei Anwesenheit anderer wertvoller biologischer Makromoleküle und Zellen ermöglichen. Entsprechend der erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen werden die Nukleinsäuren von Viren, anderen Mikroorganismen und Zellen selektiv chemisch modifiziert, während die Struktur und Funktion der Bestandteile, die keine Nukleinsäuren sind, erhalten bleibt. Es ist auch eine Aufgabe der Erfindung, selektive Inaktivierungsmittel zu schaffen, um das Virus, den Mikroorganismus oder die Zellen unter gleichzeitiger Erhaltung ihrer Immunogenität zu inaktivieren und maximale Reproduzierbarkeit zu erreichen. Es ist ferner eine Aufgabe der Erfindung, effektive abgetötete Impfstoffe zu schaffen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Es wurde nun herausgefunden, dass Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel kontaminierende Viren in einer biologischen Zusammensetzung, wie beispielsweise einer Zellen oder Biopolymere enthaltenden Zusammensetzung, effektiv und spezifisch inaktivieren können. Diese Erfindung ist auf die Verwendung eines Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels zur selektiven Inaktivierung von Mikroorganismen in einer Biopolymere enthaltenden biologischen Zusammensetzung gerichtet, wie in den Ansprüchen spezifiziert. Die Patentschrift offenbart Verfahren zur selektiven Modifikation der Nukleinsäuremoleküle von Viren oder anderen Mikroorganismen in einer Zusammensetzung von gemischten Biopolymeren, die das In-Kontakt-Bringen der Zusammensetzung mit einem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel umfassen.

**[0011]** Während die meisten gegenwärtig erhältlichen viralen Inaktivierungsmittel Biopolymere, wie beispielsweise das Blutprotein Faktor VIII, verändern und dadurch biologisch inaktiv machen, hat sich nun herausgestellt, dass die erfindungsgemäßen, unter inaktivierenden Bedingungen angewendeten Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel diese Wirkung nicht haben. Es wurde herausgefunden, dass in einer Zusammensetzung vorhandene Viren bis zum gewünschten Umfang (mindestens ca. 6 logs bei der Messung viraler Inakti-

vierung oder bis zumindest ca. 20 logs bei Berechnung) ohne signifikante Schädigung der darin enthaltenen Biopolymere, wie beispielsweise Proteine, inaktiviert werden, wenn die Biopolymere enthaltende Zusammensetzung, z.B. Blutzellproteine, Blutplasma, ein Präzipitat einer Blutplasma-Fraktionierung, ein Überstand einer Blutplasma-Fraktionierung, Kältepräzipitat, Kälteüberstand, oder ein Teil oder Derivat davon, oder Serum oder ein blutfremdes, aus normalen oder transformierten Zellen (z.B. durch rekombinante DNA-Technologie) hergestelltes Produkt, mit einem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel für eine ausreichende Dauer in Kontakt gebracht wird. Durch die Kontaktierung eines Gemisches oder Konzentrats von Blutproteinen mit einem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel kann das Virus, wie beispielsweise Hepatitis A oder B oder HIV, bis zum gewünschten Umfang, z.B. bis zu einem messbaren Inaktivierungsgrad von mehr als mindestens ca. 6 logs oder durch Berechnung bis mindestens ca. 20 Größenordnungen, inaktiviert werden. Biopolymere wie beispielsweise Proteine, Kohlenhydrate und Lipide behalten in einer behandelten Zusammensetzung im Wesentlichen ihre gesamte Aktivität auf dem Niveau vor der Inaktivierung.

**[0012]** Die Inaktivierungsmittel und Verfahren stellen Biopolymer enthaltende Zusammensetzungen, beispielsweise Derivate von Blutzellen (z.B. Hämoglobin,  $\alpha$ -Interferon, humanes Wachstumshormon, Erythropoietin, PDGF, tPA etc.), Blutplasma, Blutplasma-Fraktion, Blutplasma-Präzipitat (z.B. Kältepräzipitat, Ethanol-Überstand oder Polyethylenglykol-Überstand), zur Verfügung, welche im wesentlichen von infektiösen Viren befreit sind, während die vor der Inaktivierung vorhandene Aktivität der Proteine im Wesentlichen quantitativ erhalten bleibt. Der Gehalt an Viren in einer Zusammensetzung wird durch Infektiositätstiter bestimmt.

**[0013]** Das Verfahren wurde im Hinblick auf die Behandlung von Plasma, Plasma-Fraktionen, Plasma-Konzentraten oder Bestandteilen davon beschrieben. Das Verfahren ist aber auch nützlich bei der Behandlung von Lysaten oder von Proteinen, die durch Zellen ausgeschieden wurden. Es ist auch vorgesehen, Fraktionen aus Blutplättchen, weißen Blutzellen (Leukozyten), roten Blutzellen und Fibroblasten zu behandeln. Ferner sind Lösungen von Interferon, Wachstumshormon, tPA, Faktor VIII, Übertragungsfaktor, Hämoglobin, Wachstumsfaktoren, EPO und DNAse eingeschlossen.

**[0014]** Darüber hinaus ist vorgesehen, die Inaktivierungsmittel und Verfahren anzuwenden, um die Behandlung von frischem, gefrorenem Plasma, aufgetautem, gefrorenem Plasma, Kältepräzipitat, Kälteüberständen oder Konzentraten von gefrorenem Plasma sowie hieraus verdünnten Produkten zu ermöglichen.

**[0015]** Durch das gleiche hier beschriebene Verfahren können in Produkten von normalen oder transformierten Zellen vorhandene Viren inaktiviert werden, während die Aktivität der Biopolymere in solchen Produkten erhalten bleibt. Bei Verwendung des Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels können beispielsweise Produkte inaktiviert werden, die unter Verwendung von normalen oder transformierten Zellen, dem Exsudat aus normalen oder transformierten Zellen, Hybridomzellen und durch Gentechnik hergestellten Produkten hergestellt wurden. Solch eine Behandlung beeinflusst die gewünschten Biopolymere wie beispielsweise ein bestimmtes Protein nicht nachteilig. Die Zellen, die zur Herstellung eines gewünschten Proteins verwendet werden, können selbstverständlich sowohl Säuger- als auch Nicht-Säugerzellen sein.

**[0016]** Die Verfahren und Zusammensetzungen inaktivieren im Wesentlichen alle in einer Probe enthaltenen Viren. Verfahren zur Bestimmung des Grades der Infektiosität sind dem durchschnittlichen Fachmann gut bekannt. Siehe z.B. Lennette, E.H. und Schmidt, N.J. (eds) (1985) Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 62nd ed, American Publisher's Assn., Washington, D.C.. Gemäß der Erfindung wird experimentell messbare Virusinaktivierung bis zum Ausmaß von mindestens ca. „6 logs“ ( $6,0 \log_{10}$ ) erhalten. Das heißt, wenn dieses Virus in einer unbehandelten Zusammensetzung in einer solchen Konzentration vorliegt, dass sogar nach Verdünnung um einen Faktor von  $10^6$  die Virusinfektiosität detektiert werden kann, ist das Virus in der behandelten Probe bis zu dem durch Infektiositätsstudien bestimmten Ausmaß vollständig inaktiviert, sodass nach der Behandlung kein Virus in dem unverdünnten Material detektierbar ist. Noch bedeutender ist, dass man eine berechnete Reduktion der Infektiosität von Virus-enthaltenden Verbindungen von mindestens ca. 20 Größenordnungen erreichen kann, wenn man eine präzise Beschreibung der Kinetik des Inaktivierungsprozesses, wie hier beschrieben, erhalten hat.

**[0017]** In einigen Ausführungsformen ist das Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ein Trimer, ein lineares Tetramer oder ein verzweigtes Tetramer. Bevorzugte Inaktivierungsbedingungen schließen das Inkubieren der Verbindung mit ca. 0,0001 M bis ca. 0,010 M Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ein, bei ca. pH 6,5 bis ca. pH 8,5, in einer Lösung mit einer Ionenstärke von ca. 0,01 M bis ca. 0,5 M. Insbesondere bevorzugte Reaktionsbedingungen sind das Inkubieren der Verbindung mit ca. 0,001 M bis ca. 0,01 M Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel, bei ca. pH 6,9 bis ca. pH 8,5, in einer Lösung mit einer Ionenstärke von ca. 0,1 bis ca. weniger als ca. 0,5 M. Die am meisten bevorzugten Inaktivierungsbedingungen sind das Kontaktieren der

Zelle oder der Biopolymer enthaltenden Verbindungen mit einem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel, wie beispielsweise dem Trimer, linearen Tetramer oder verzweigten Tetramer, bei einer Temperatur im Bereich von ca. 4°C bis 30°C.

**[0018]** Die Patentschrift offenbart ebenfalls Zusammensetzungen von Inaktivierungsmitteln zur selektiven Modifikation von Nukleinsäuren in einer Mischung von Biopolymeren, die ca. 0,0001 M bis ca. 0,015 M eines Ethylenimin-Oligomers mit einer Ionenstärke von ca. 0,1 M bis ca. 0,2 M bei ca. pH 6,5 bis ca. pH 8,5 umfasst.

**[0019]** Die Patentschrift offenbart ferner Verfahren zur selektiven Inaktivierung von funktionellen Nukleinsäuren in einer biologischen Zusammensetzung, die ein In-Kontakt-Bringen der Zusammensetzung mit einer effektiven Konzentration eines selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels umfassen.

**[0020]** Die Patentschrift offenbart auch Verfahren zur Zubereitung eines abgetöteten Impfstoffs durch In-Kontakt-Bringen gereinigter oder nicht-gereinigter Virus-enthaltender Zusammensetzungen mit einem selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel unter Virus-inaktivierenden Bedingungen.

**[0021]** In einer weiteren Ausführungsform offenbart diese Patentschrift abgetötete Impfstoffe mit einer effektiven Menge inaktivierter Viren, d.h. einer Menge, die ausreichend ist, um einem Organismus einen gewünschten Immunitätsgrad zu verleihen, und einem pharmazeutisch geeigneten Träger, wobei die inaktivierten Viren durch das Verfahren der Inkubation von Viren mit dem erfindungsgemäßen Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel unter Virusinaktivierenden Bedingungen, die es ermöglichen, die messbare Infektiosität um mindestens ca.  $6,0 \log_{10}$  (oder bis zu dem gewünschten Ausmaß von mindestens ca. 20 logs durch Berechnung) zu reduzieren, derart hergestellt werden, dass der Impfstoff einem Patienten oder Tier zu therapeutischen Zwecken verabreicht werden kann.

**[0022]** Hinsichtlich eines therapeutischen Verfahrens offenbart diese Patentschrift das Immunisieren einer Testperson gegen ein Virus durch Verabreichung eines abgetöteten Impfstoffes an die Testperson.

**[0023]** Die Patentschrift offenbart ferner Vorrichtungen zum Sammeln von Blut, die ein Behältnis zur Aufnahme von Blut oder einer Fraktion davon umfasst, wobei das Behältnis unter anderem ein Ethylenimin-Inaktivierungsmittel in einer Menge enthält, die eine Inaktivierung von Viren in Blut oder einer Fraktion davon, das bzw. die in dem Behältnis enthalten ist, ermöglicht.

**[0024]** In einer weiteren Ausführungsform offenbart diese Patentschrift diagnostische Reagenzien und diagnostische Proben, welche Viren enthalten, die mit den viralen Inaktivierungsmitteln unter inaktivierenden Bedingungen behandelt wurden.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0025]** **Fig. 1.** Struktur von Monomer (I), Dimer (II), Trimer (III), linearen und verzweigten Tetrameren (IV bzw. V) von Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel(n).

**[0026]** **Fig. 2.** Potenziometrische Titrationskurven von Ethylenimin und seinen Oligomeren. Die römischen Ziffern entsprechen den in **Fig. 1** abgebildeten Strukturen.

**[0027]** **Fig. 3.** Phage MS2-Überlebenskurven unter der Einwirkung von Ethylenimin (0,025 M, Kurve 1), seinem Dimer (0,007 M, Kurve 2), Trimer (0,003 M, Kurve 3) und äquimolaren Mischungen von linearen und verzweigten Tetrameren (0,0015 M, Kurve 4) in 0,15 M NaCl, pH 7,5, 20°C.

**[0028]** **Fig. 4.** Phage MS2-Überlebenskurven unter der Einwirkung von 0,007 M Ethylenimin in 0,15 M NaCl (20°C) bei pH 6,5, 6,9, 7,5 und 8,5 (Kurven 1, 2, 3 bzw. 4).

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

##### 1. Definitionen:

**[0029]** „Selektive Inaktivierungsmittel“ bezeichnet Ethylenimin-Oligomer-Reagenzien mit einem Aziridin-Rest und einer spezifischen Affinität für Polyanionen, z.B. Polynukleotide, gegenüber anderen biologischen Molekülen. Die selektiven Inaktivierungsmittel umfassen eine Klasse von Komponenten relativ geringer Toxizität, welche selektiv an die Nukleinsäuren binden (einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA oder RNA), die das

genetische Material von Viren enthalten und die funktionellen Nucleinsäuren irreversibel modifizieren, um die Viren bei Verwendung unter inaktivierenden Bedingungen inaktiv zu machen.

**[0030]** Ein „Ethylenimin-Oligomer“ bezeichnet Oligomere von Ethylenimin, die eine terminale Aziridino-Gruppe aufweisen und optional substituiert sind. Bevorzugte erfindungsgemäße Ethylenimin-Oligomere weisen mindestens drei Ethylenimin-Einheiten auf und schließen zum Beispiel das Trimer oder das Tetramer, entweder linear oder verzweigt, ein. Die Synthese der Ethylenimin-Oligomere wird unter Verwendung synthetischer Schemata durchgeführt, die dem durchschnittlichen Fachmann gut bekannt sind. Siehe zum Beispiel Kostyanovskii, R.G. et al. (übersetzt von Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya, 11:2566–2577, 1988). Repräsentative Ethylenimin-Oligomere sind in [Fig. 1](#) dargestellt. In den Verfahren sind Ethylenimin-Oligomere mit weniger als zehn Einheiten zu bevorzugen und Ethylenimin-Oligomere mit ca. drei oder vier Einheiten sind insbesondere zu bevorzugen.

**[0031]** Ethylenimin-Oligomere können auch substituiert werden, solange dies nicht die wesentliche Eigenschaft des Ethylenimins eliminiert. In einer Ausführungsform sind die Ethylenimin-Oligomere mit Halogenen substituiert und haben die allgemeine Formel  $\beta\text{-Hal}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH})_n\text{H}$ . Solche Komponenten, auf die oft als Stickstoffsenfgase verwiesen wird, sind durch die quantitative Umwandlung durch Hydrogenchlorid oder Hydrogenbromid von Ethylenimin oder seinen Oligomeren in  $\beta$ -Halogenmono- oder -oligoethylaminen synthetisiert. Die Stickstoffsenfgase sind starke Elektrophile und alkylieren nukleophile Gruppen von Nucleinbasen, entweder direkt oder über Zwischenumwandlung in die jeweiligen Aziridine. Wie Ethylenimin-Oligomere haben die  $\beta$ -Halogenoligoethylamine eine hohe Affinität für Polyanionen. Dadurch haben diese Ethylenimin-Oligomere eine hohe Selektivität für Nucleinsäuren, die Modifikationskinetik erfordert jedoch eine Einstellung.

**[0032]** Ein Inaktivierungsmittel weist „Selektivität“ für Nucleinsäuren auf oder reagiert „selektiv“ mit Nucleinsäuren, wenn der Reaktionsgrad des Inaktivierungsmittels mit Nucleinsäuren im Vergleich höher ist als der Reaktionsgrad mit anderen biologischen Molekülen, z.B. Proteinen, Kohlenhydraten oder Lipiden. Der Selektivitätsspiegel eines Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels für Nucleinsäuren gegenüber Proteinen ist im Hinblick auf Ethyleniminmonomer unerwartet, welches für Nucleinsäuren ungefähr genauso selektiv ist wie andere alkylierende Mittel.

**[0033]** „Nucleinsäure“ bezeichnet sowohl DNA als auch RNA, sowohl einzel- als auch doppelsträngig.

**[0034]** „Biologische Zusammensetzung“ bedeutet eine Zusammensetzung, die Zellen oder Biopolymere enthält. Zellen enthaltende Zusammensetzungen schließen zum Beispiel Vollblut, rote Zellen-Konzentrate, Blutplättchen-Konzentrate, Leukozyten-Konzentrate, Blutzellenproteine, Blutplasmaprotein-Fractionen, gereinigte Blutproteine, Serum, Samen, Säugetiervormilch und -milch, Plazenta-Extrakte, Fermentationsprodukte, Aszites und Produkte, die in Zellkulturen durch normale oder transformierte Zellen hergestellt werden (z.B. über rekombinante DNA- oder monoklonale Antikörpertechnologie), ein. „Biopolymer“ oder „biologisches Molekül“ bedeutet eine beliebige Klasse eines organischen Moleküls, wie es normalerweise in lebenden Organismen vorgefunden wird, einschließlich zum Beispiel Nucleinsäuren, Polypeptide, post-translational modifizierte Proteine (z.B. Glycoproteine), Polysaccharide und Lipide. Biopolymer enthaltende Zusammensetzungen schließen zum Beispiel Blutzellproteine, Blutplasma, Präzipitat von Blutplasmafractionen, Überstand von Blutplasmafractionen, Kältepräzipitat, Kälteüberstand oder Teile oder Derivate hiervon oder Serum oder ein Nicht-Blut-Produkt, hergestellt von normalen oder transformierten Zellen (z.B. über rekombinante DNA-Technologie), ein. Biologische Zusammensetzungen können zellfrei sein.

**[0035]** „Funktionelle Nucleinsäure“ bedeutet eine Nucleinsäure mit Sequenzelementen, die als Template in Replikation, Transkription, Translation oder anderer Aktivität des Nucleinsäuremoleküls dienen. Solche Elemente schließen zum Beispiel Sequenzen ein, die den Replikationsursprung eines Nucleinsäuremoleküls, Transkriptionselemente, wie Promotoren/Enhancer, Transkriptionsterminatoren und andere regulatorische Elemente, Translationselemente, wie Ribosomenbindungsstellen, Translationsstartcodons und Kodierungssequenzen und In-Phase-Stop-Codons, sowie Sequenzen, die katalytische RNA-Aktivitäten übertragen, kodieren.

**[0036]** „Inhibieren der Wirkung eines Biopolymers“ bedeutet, die Funktion oder Wirkung des Biopolymers messbar herabzusetzen. Die Herabsetzung in Funktion oder Wirkung kann durch ein beliebiges Standard-Assay bestimmt werden, welches zur Messung der Wirkung des einzelnen Biopolymers verwendet wird. Zum Beispiel kann die Inhibierung eines Enzyms (Proteins) oder die Antigenaktivität durch die Messung von Veränderungen in der Rate enzymatischer Prozesse oder einer Immunantwort auf das Antigen unter Verwendung herkömmlicher Assays bestimmt werden. Ein weiteres Beispiel einer solchen Inhibierung ist die Inhibierung der

Translation einer RNA, die bestimmt werden kann durch Messung der durch die RNA kodierten Proteinmenge, die in einem geeigneten in vitro- oder in vivo-Translationssystem hergestellt wird.

**[0037]** „Inaktivierend," „Inaktivierung" oder „inaktivieren" bezogen auf die funktionellen Nukleinsäuren bedeutet, die Aktivität von DNA oder RNA im Wesentlichen zu eliminieren, zum Beispiel durch Zerstören der Fähigkeit, eine Nachricht zu replizieren, transkribieren oder translatieren. Beispielsweise kann die Inhibierung der Translation einer RNA durch Messung der Proteinmenge bestimmt werden, die durch eine definierte RNA-Menge kodiert wird, welche wiederum in einem geeigneten in vitro- oder in vivo- Translationssystem hergestellt wird. Auf Viren bezogen bedeutet der Begriff Verminderung oder Eliminierung der Anzahl infektiöser Viruspartikel, die in Form der Herabsetzung des infektiösen Titers oder der Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro ml gemessen wird. Solch eine Abnahme infektiöser Viruspartikel wird durch Assays bestimmt, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind (Lennette, E.H. und Schmidt, N.J. (eds) (1985) Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 62nd ed, American publisher's Assn., Washington, D.C.).

**[0038]** Experimentell kann eine Abnahme der Infektiosität auf mindestens ca. „6 logs" in einer Zelt- oder Biopolymer-enthaltenden Zusammensetzung gemessen werden, in der das Virus in einem Maße inaktiviert ist, das durch Infektiositätsstudien bestimmt wird, bei denen das Virus in einem unbehandelten Serum in solch einer Konzentration vorliegt, dass sogar nach Verdünnung auf  $10^6$  Virusaktivität gemessen werden kann. Sofern ein spezifisches Virus nicht mit einem Titer von  $10^6$  hergestellt werden kann, wird die Inaktivierung durch direkte Mengenummessung bis zu dem Titer des produzierten Virus bestimmt. Alternativ wird die Abnahme der Anzahl infektiöser Viruspartikel durch die hier beschriebene Berechnung basierend auf einer kinetischen Beschreibung des Inaktivierungsverfahrens bis zum Umfang von mindestens „20 logs" basierend auf einer präzisen experimentellen Bestimmung der Infektiosität der Virussuspension während der Inaktivierung unter Berücksichtigung chemischer, physikalischer und biologischer Faktoren, die sich auf die Inaktivierungskinetik auswirken, bestimmt.

**[0039]** „Virus-inaktivierende Bedingungen" bezeichnen die Bedingungen, unter denen die Viruspartikel mit den erfindungsgemäßen selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmitteln inkubiert werden, einschließlich zum Beispiel Behandlungszeit, pH-Wert, Temperatur, Salzzusammensetzung und -konzentration des selektiven Inaktivierungsmittels, um das Virusgenom bis zum gewünschten Umfang zu inaktivieren. Virus-inaktivierende Bedingungen sind aus den Bedingungen ausgewählt, die nachfolgend für selektive Modifikation von Nukleinsäuren beschrieben sind.

**[0040]** „Virus" bedeutet sowohl DNA- als auch RNA-Viren. Viren schließen sowohl umhüllte als auch nicht-umhüllte Viren ein, zum Beispiel Pockenviren, Herpesviren, Adenoviren, Papovaviren, Parvoviren, Reoviren, Orbiviren, Picornavirus, Rotaviren, Alphaviren, Rubiviren, Influenzavirus, Typ A und B, Flaviviren, Coronaviren, Paramyxoviren, Morbilliviren, Pneumoviren, Rhabdoviren, Lyssaviren, Orthomyxoviren, Bunyaviren, Phleboviren, Nairoviren, Hepadnaviren, Arenaviren, Retroviren, Enteroviren, Rhinoviren und die Filoviren.

**[0041]** „Impfstoff" wird entsprechend seinem üblichen Sinn verwendet für einen Wirkstoff, der den notwendigen Immunitätsgrad auf einen Organismus überträgt, während lediglich sehr geringe Morbiditäts- oder Mortalitätsgrade verursacht werden. Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen sind selbstverständlich nützlich für die Untersuchung des Immunsystems und die Prävention von tierische oder menschlichen Krankheiten.

**[0042]** „Pharmazeutisch geeignet" bedeutet relativ nicht-toxisch gegenüber dem Tier, welchem die Komponente verabreicht wird. „Pharmazeutisch geeigneter Träger" umfasst einen beliebigen pharmazeutischen Standardträger, Puffer und Arzneistoffträger, wie eine Phosphat-gepufferte Salzlösung, Wasser und Emulsionen, wie eine Öl/Wasser- oder Wasser/Öl-Emulsion und verschiedene Typen von Benetzungswirkstoffen und/oder Hilfsstoffen.

## 2. Allgemeines:

**[0043]** Diese Erfindung basiert auf der unerwarteten und überraschenden Erkenntnis, dass verglichen mit vielen Nukleinsäure modifizierenden Wirkstoffen und insbesondere mit Ethyleniminmonomer (Aziridin), Ethylenimin-Oligomeren, wie Trimer- und Tetramerformen, signifikant selektiver in ihrer Modifikation von Nukleinsäuren im Vergleich zu anderen Biopolymeren, wie Proteinen, sind. Ethylenimin-Oligomere sind um viele Größenordnungen selektiver als ein Ethylenimin-Monomer, in einigen Fällen um sechs Größenordnungen. Die Verwendung der selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ist insbesondere effektiv bei Zusammensetzungen, die Nukleinsäuren in enger Verbindung mit Proteinen, wie Nukleoproteinen oder Viren, umfassen.

**[0044]** Diese Patentschrift offenbart Verfahren und Bedingungen zur selektiven Amino-Alkylierung von Nukleinsäuremolekülen in einer Zellen oder Biopolymere enthaltenden Zusammensetzung, die das In-Kontakt-Bringen der Zusammensetzung mit einem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel umfassen. Als Resultat des Verfahrens werden die Nukleinsäuren in der Zusammensetzung mit einer weit schnelleren Rate als die anderen biologischen Moleküle chemisch modifiziert. Die Verfahren sind in jedem Prozess einsetzbar, in dem der Praktiker Nukleinsäuren modifizieren, aber andere biologische Moleküle relativ unverändert lassen möchte. Beispielsweise sind die Verfahren nützlich, um vorzugsweise Nukleinsäure in einem Nukleoprotein (z.B. Chromatin oder Ribosomen) mit einem Ethylenimin-Oligomer zu markieren, das eine detektierbare Markierung (radioaktiv, fluoreszent, enzymatisch usw.) trägt, zum Beispiel zur Kartierung oder zur Inaktivierung des Virusgenoms oder anderer lebender Organismen.

**[0045]** Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel modifizieren Nukleinsäuren vorzugsweise durch die Reaktion der protonierten Aziridinogruppe mit Nukleinbasen in Polynukleotiden. Die Fähigkeit des viralen Inaktivierungsmittels, sich mit einem Polyanion zu verbinden, hängt zum Teil von der Anzahl der protonisierbaren Gruppen pro Molekül und von dem totalen Protonierungsgrad unter gegebenen Bedingungen ab. Die Modifikation findet durch die Verbindung des oligokationischen viralen Inaktivierungsmittels mit dem Nukleinsäurepolyanion statt. Der Protonierungsgrad hängt zum Teil vom pH-Wert ab. Wie hier beschrieben, nimmt der pK-Wert der Aziridinogruppe mit der Länge des Polymers ab. Jedoch nimmt die Fähigkeit von Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmitteln, sich selektiv mit Nukleinsäuren zu verbinden, signifikant mit der Länge des Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels zu. Demnach kann der Praktiker Nukleinsäuren bei physiologischem pH-Wert effektiv und selektiv alkylieren.

**[0046]** Eine Ausführungsform eines Verfahrens zur selektiven Aminoalkylierung von Nukleinsäuren beinhaltet den Schritt des In-Kontakt-Bringens der Nukleinsäuren mit ca. 0,0001 M bis ca. 0,015 M eines selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels bei ca. pH 6,5 bis ca. pH 8,5 und bevorzugt ca. pH 7,0 bis ca. pH 8,0 und am meisten bevorzugt ca. pH 7,5. Die Konzentration des Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels hängt zum Teil von der Anzahl der protonisierbaren Gruppen in dem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel und die Wahl des pH-Werts von der Stabilität des Virions ab. Das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ist bevorzugt ein Ethylenimin, Trimer, lineares Tetramer oder verzweigtes Tetramer. In einer anderen Ausführungsform schließt das Verfahren den Schritt der Exposition oder des In-Kontakt-Bringens der Nukleinsäuren mit selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmitteln in einer Lösung mit einer Ionenstärke von ca. 0,1 M bis ca. 0,5 M, vorzugsweise ca. 0,15 M, ein. Die Salze können normalerweise in der Biochemie verwendete Salze sein, einschließlich Natrium, Kalium, Phosphat oder Acetat u.s.w.. Der Praktiker kann den pH-Wert der Lösung anhand beliebiger Puffer einstellen, die üblicherweise in der Technik, Biopolymere oder Zellen zu handhaben, verwendet werden, wie beispielsweise Phosphat, Acetat, Borat, Tris, HEPES, MOPS u.s.w.. MOPS und Tris sind bevorzugte Puffer. Hohe Konzentrationen von Phosphat in Puffern sind unerwünscht. Der Praktiker kann die Reaktionsbedingungen einstellen, um den gewünschten pH-Wert und die gewünschte Ionenstärke zu erreichen. Der Praktiker kann auch andere Faktoren einstellen, wie beispielsweise die Konzentration der Reaktionspartner, Temperatur, Inkubationszeit, die von den Reaktionsbedingungen und dem gewünschten Maß der Inaktivierung der Infektiosität abhängt. Wie hier nachfolgend beschrieben, sollte unter Verwendung einer kinetischen Annäherung der Inaktivierungsendpunkt bestimmt werden, ebenso wie diejenigen der beschriebenen Bedingungen zur Aminoalkylierung von Nukleinsäuren, um bis zu einem vorbestimmten Maß funktionelle Nukleinsäuren oder Viren zu inaktivieren.

**[0047]** Der Praktiker kann das Ausmaß der Alkylierung einer viralen Nukleinsäure durch das Maß der Aktivierung der viralen Infektiosität unter Verwendung verschiedener Assays bestimmen, die dem durchschnittlichen Fachmann bekannt sind, wie beispielsweise die Bestimmung des cytopathischen Effektes (CPE) in Gewebekulturen unter Verwendung fortlaufender Verdünnungen von Virus-enthaltenden Gemischen, die in empfängliche Zellen eingeführt werden, gefolgt von einer Inkubation bei 37°C. Die Modifikation von Proteinen, Polysacchariden und Glycoproteinen mit Ethylenimin-Oligomeren würde zu einer Einführung von zusätzlichen positiven Ladungen führen. Der Umfang dieser Modifikation der Biopolymere kann durch im Stand der Technik bekannte Mittel bestimmt werden, einschließlich beispielsweise isoelektrische Fokussierung, Autoradiographie, Polyacrylamid-Gelelektrophorese, HPLC und andere Formen der Chromatographie.

**[0048]** Diese Patentschrift offenbart ferner Zusammensetzungen für die selektive Modifikation, Aminoalkylierung, von Nukleinsäuren in einer Zellen oder Biopolymere enthaltenden Zusammensetzung, die ca. 0,0001 M bis ca. 0,015 M Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel umfassen, eine Ionenstärke von ca. 0,1 M bis ca. 0,2 M, vorzugsweise ca.

**[0049]** 0,15 M, aufweisen, und bei ca. pH 6,5 bis ca. pH 8,5 und vorzugsweise pH 7,0 bis ca. pH 8,0 und am

meisten bevorzugt ca. pH 7,5 gepuffert sind. Das Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ist vorzugsweise ein Trimer oder Tetramer, entweder linear oder verzweigt. Die Salze und Puffer können beliebige der oben beschriebenen sein. In einer Ausführungsform weist die Zusammensetzung Mengen an Ethylenimin-Oligomer, eine Ionenstärke und einen pH-Wert in Größenordnungen auf, die es effektiv ermöglichen, eine funktionelle Nukleinsäure zu amino-alkylieren. In einer weiteren Ausführungsform weist die Zusammensetzung Konzentrationen von Ethylenimin-Oligomer, eine Ionenstärke und einen pH-Wert in Größenordnungen auf, die es effektiv ermöglichen, Viren zu inaktivieren. Diese Zusammensetzungen sind als Desinfektionsmittel oder als Viruzide nützlich und in allen hier beschriebenen Verfahren einsetzbar.

**[0050]** Diese Patentschrift offenbart auch Verfahren zur selektiven Inhibierung der Aktivität von funktionellen Nukleinsäuren in einer biologischen Probe, die das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer effektiven Menge eines selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels umfassen. Diese Verfahren haben zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten. Wenn die funktionelle Nukleinsäure eine nackte Nukleinsäure ist, wie ein Plasmid oder ein DNA-Segment, ist eine Inhibierung geeignet, die Fähigkeit des Moleküls, eine Zelle zu transformieren, in welche es zum Beispiel durch Transfektion aufgenommen wird, herabzusetzen. In einem zellfreien Translationssystem ist eine Inhibierung geeignet, die Translation der RNA herabzusetzen. Wenn die funktionelle Nukleinsäure eine katalytische Nukleinsäure wie beispielsweise ein Ribozym ist, sind die Verfahren geeignet, um die Wirkung der Nukleinsäure auf sein Zielmolekül zu inhibieren.

**[0051]** Wenn die funktionelle Nukleinsäure ein Virusgenom ist, welches Teil eines infektiösen Virus ist, sind die Verfahren nützlich zur Desinfektion einer Zone, zur Inaktivierung oder Eliminierung von Viren aus Zellen oder Biopolymer enthaltenden Zusammensetzungen, wie beispielsweise Vollblut, Blutprodukten oder biologischen Produkten wie beispielsweise in Zellkulturen hergestellten Proteinen, und um die Infektiosität eines Virus bis zum gewünschten Maß (z.B. mindestens ca. 20 logs durch Berechnung, wie hier beschrieben) zu inaktivieren. Die Biopolymere enthaltende Zusammensetzung kann beispielsweise Proteine enthalten, die aus Vollblut gereinigt wurden, Blutprodukte (wie z.B. Gerinnungsfaktoren, wie Faktor VIII, Hormone, wie Erythropoietin u.s.w.), die Produkte einer Zellkultur, wie Zellextrakte, Wachstumsmedium, das mit biologischen Molekülen (z.B. rekombinanten Proteinen) angereichert ist, Protein enthaltende Zusammensetzungen, die mit Blutprodukten (z.B. mit Kälberserum inkubierte Zusammensetzungen) und Pflanzenprodukten aufgearbeitet wurden. Diese Verfahren sind geeignet, die Reinheit und Sicherheit dieser Produkte zur Verwendung sowohl im Labor als auch in der Therapie zu gewährleisten, während die kritischen biologischen Eigenschaften des biologischen Produktes in der Zusammensetzung erhalten bleiben.

**[0052]** Diese Patentschrift offenbart ferner Blutsammelvorrichtungen zum Sammeln und/oder Aufarbeiten von Blutproben und zur Inaktivierung von darin enthaltenen Viren. Die Vorrichtungen zum Sammeln von Blut umfassen einen Behälter zur Aufnahme des Blutes oder einer Blutfraktion und eine Menge eines selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels, welche effektiv ermöglicht, Viren in dem aufgenommenen Blut oder einer Fraktion davon zu inaktivieren. Ein Beispiel dieser Ausführungsform schließt mit Pfropfen verschlossene Vakuumröhrchen, wie beispielsweise einen Vacutainer, die Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel enthalten, ein. Wenn eine Blutprobe in das Röhrchen gegeben wird, kommt sie in Kontakt mit dem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel. Ein anderes Beispiel ist eine Blutaufnahme tasche, wie sie beispielsweise für Blutspenden verwendet wird. Die Blutaufnahme taschen umfassen das Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel, welches mit dem Blut, das die Tasche füllt, in Kontakt tritt.

**[0053]** Wenn die funktionelle Nukleinsäure bakteriell oder Teil eines Genoms eines anderen Organismus ist, sind die Verfahren ebenso zur Desinfektion oder Eliminierung solcher Bakterien oder des anderen Organismus verwendbar.

**[0054]** Eine Modifikation des Virusgenoms durch die zuvor beschriebenen Verfahren schließt eine Reproduktion von Viren aus und beseitigt daher die Infektiosität der abgetöteten Impfstoffe. Darüber hinaus behält der Impfstoff eine signifikante Immunogenität, da die Virion-Hüllproteine nicht im gleichen Ausmaß modifiziert werden. Da Ethylenimin-Oligomere, verglichen mit anderen selektiv inaktivierenden Wirkstoffen, erheblich selektiver in ihrer Modifikation von Nukleinsäuren sind, weisen Zusammensetzungen, die Ethylenimin-Oligomere enthalten, erhebliche Vorteile gegenüber anderen weniger selektiv inaktivierenden Wirkstoffen, die gegenwärtig verwendet werden, auf.

**[0055]** Demnach offenbart diese Patentschrift ebenfalls Verfahren zur Zubereitung eines abgetöteten Impfstoffes, die das In-Kontakt-Bringen eines Virus mit einem selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel unter Virus-inaktivierenden Bedingungen umfassen. Virusinaktivierende Bedingungen sind aus den oben beschriebenen Verfahren zur Amino-Alkylierung und Inaktivierung von viralen, bakteriellen oder aus anderen Or-

ganismen stammenden Nukleinsäuren ausgewählt. Im Allgemeinen wird das Virus bei einem hohen Titer von ca.  $10^7$  bis  $10^8$  Einheiten pro ml mit Ethylenimin-Oligomer bei ca. pH 6,5 bis ca. pH 8,5 in einer Lösung mit einer Ionenstärke von ca. weniger als 0,50 M bei ca. 4°C bis ca. 40°C inkubiert. Die Behandlungszeit (d.h. der Inaktivierungsendpunkt) hängt von der Struktur und Zusammensetzung des einzelnen Virus, der Inkubationstemperatur, der Ionenstärke und der Anzahl protonisierbarer Gruppen in den Ethylenimin-Oligomeren ab. Jedoch deuten kinetische Studien darauf hin, dass in Abhängigkeit vom pH-Wert und dem zu inaktivierenden Virus die Inkubationszeit nur einige wenige Sekunden betragen könnte, aber ebenso auch ca. 1 Stunde, 5 Stunden, 50 Stunden, 100 Stunden, 300 Stunden oder 500 Stunden betragen kann. Vorzugsweise ist das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel ein Trimer, lineares Tetramer oder verzweigtes Tetramer. Verfahren zur Zubereitung von Impfstoffen sind aus dem Stand der Technik gut bekannt und können zum Beispiel in Vaccines (Slorein, G. Martance, E. eds) Second edition, 1994, Saunders, Harcourt-Brace, Phil, Toronto gefunden werden.

**[0056]** Zur Verwendung als Impfstoff kann das abgetötete Virus direkt in Impfstoffformulierungen oder gefriergetrocknet in Einzel- oder Mehrfachdosierungsbehältern zur nachfolgenden Mischung mit dem pharmazeutisch geeigneten Träger verwendet werden. Gefriergetrocknete abgetötete Viren werden gewöhnlich bei 4°C aufbewahrt.

**[0057]** Der Impfstoff kann ebenfalls in einem Hilfsstoff verabreicht werden, d.h. einer Substanz, die eine Immunantwort verstärkt, wenn sie in Verbindung mit einem Antigen verwendet wird. Der Impfstoff kann in einer Immunisierungsdosis verabreicht werden. Eine Immunisierungsdosis ist eine Menge eines Antigens oder Immunogens, die benötigt wird, um eine Immunantwort zu erzeugen oder zu verstärken. Diese Menge wird mit der Anwesenheit und Effektivität verschiedener Hilfsstoffe variieren. Die Menge wird je nach Tier und Immunogen oder Antigen oder Hilfsstoff variieren, im Allgemeinen aber bei weniger als ca. 100 mg pro Dosis liegen. Die Immunisierungsdosis ist leicht durch Verfahren zu bestimmen, die dem Fachmann gut bekannt sind, wie beispielsweise durch die statistisch gültige Durchführung von Wirtstier-Immunisierung und Antigenexpositions-Studien. Siehe z. B. Manual of Clinical Immunology, H.R. Rose und H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1980).

**[0058]** Verfahren zur Behandlung von Zellen oder Biopolymere enthaltenden Verbindungen oder zur Zubereitung abgetöteter Impfstoffe sind insbesondere zur Inaktivierung von Viren geeignet, die bereits im Stand der Technik als durch andere alkylierende Wirkstoffe, wie Ethylenimin-Monomer und  $\beta$ -Propiolakton, irreversibel inaktivierbar bekannt sind. Während daher die erfindungsgemäßen Mittel aufgrund ihrer Selektivität eine breitere Verwendung bei der Selektion von Viren für die Herstellung von Impfstoffen oder biologischen Produkten für die Dekontamination haben, wird der Praktiker zum Teil durch Erfahrungswerte aus dem Stand der Technik mit anderen inaktivierenden Wirkstoffen angeleitet.

**[0059]** Diese Patentschrift offenbart ebenfalls einen abgetöteten Impfstoff, der eine effektive Menge inaktivierter Viren und einen pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst, wobei die inaktivierten Viren durch ein Verfahren der Virenbehandlung unter Virus-inaktivierenden Bedingungen hergestellt wurden, die eine Verminderung der Infektiosität bis zu einem gewünschten Ausmaß (bis zu mindestens ca. 6 logs durch direkte Messung oder bis zu mindestens ca. 20 logs durch Berechnung, wie hier beschrieben) bewirken. Die Impfstoffe sind zur Vorbeugung von Krankheit bei Tieren oder Menschen geeignet. Impfstoffe, die imstande sind, den gewünschten Immunitätsgrad zu verleihen, werden selbstverständlich eine zur Hervorrufung der Immunantwort effektive Menge an inaktiviertem Virus enthalten. Das Virusgenom in diesen Impfstoffen ist im Vergleich zu anderen Impfstoffen an dem endozyklischen Stickstoff der Nukleinbase alkyliert, unterscheidet sich jedoch wesentlich durch die Tatsache, dass die Inaktivierung viel effizienter ist, da die relative Modifikationsrate von Nukleinsäuren gegenüber anderen Biopolymeren in dem Virion erheblich höher ist als dies mit irgendwelchen anderen selektiv inaktivierenden Wirkstoffen erreicht werden kann. Bei der Herstellung von abgetöteten Impfstoffen wird die Virusprobe mit den selektiven Inaktivierungsmitteln in Mengen und unter solchen Bedingungen inkubiert, dass das Virus inaktiviert wird, während die Immunogenität erhalten bleibt.

**[0060]** Geeignete pharmazeutische Träger und deren Formulierungen sind in Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995) beschrieben. Solche Zusammensetzungen werden im Allgemeinen eine effektive Menge des Inhaltsstoffs zusammen mit einer geeigneten Menge des Trägers enthalten, um die geeignete Dosierungsform für eine richtige Verabreichung an die Testperson zuzubereiten.

**[0061]** Diese Patentschrift offenbart darüber hinaus therapeutische Verfahren zur Immunisierung einer Testperson gegen ein Virus durch Verabreichung des zuvor beschriebenen abgetöteten Impfstoffes an die Testper-

son. Die Testperson kann ein humanes oder nicht-humanes Tier sein. In der Praxis der therapeutischen Verfahren wird eine effektive Menge einer oben beschriebenen Komponente über irgendein beliebiges, herkömmliches und geeignetes Verfahren aus dem Stand der Technik verabreicht, entweder einzeln oder in Kombination mit einer anderen oben beschriebenen Komponente.

**[0062]** In der Praxis der therapeutischen Verfahren hängt die Impfstoffdosis, die der Testperson verabreicht wird, von zahlreichen Erwägungen ab, einschließlich der Natur des Virus, der geplanten Verabreichung, dem Alter und den physischen Merkmalen der Testperson und so weiter. Richtige Dosierungen können nach den in der medizinischen Praxis bekannten Vorgehensweisen festgelegt werden.

**[0063]** Da eine Einschränkung durch die Theorie vermieden werden soll, schließt die erhöhte Spezifität von selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmitteln für Nukleinsäuren offensichtlich folgende Faktoren ein, die bei der Anwendung dieser Erfindung manipuliert werden können. Ethylenimin-Monomer und Ethylenimin-Oligomere enthalten eine einzelne Aziridinogruppe ([Fig. 1](#)). Die Reaktivität von Aziridinen als elektrophile Agenzien nimmt dramatisch mit der Protonierung des Aziridin-Stickstoffs zu (Van Etten, R.L. und Dolhun, J.J. (1968) J. Org. Chem. 33:3904–3913), wird aber nur leicht beeinflusst durch ihre Alkylierung (Earley, J.E. et al. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80:3458–3462). Daher ist die Form dieser an der Aziridinogruppe protonierten Komponenten vermutlich die einzige reaktive Form. Der Grad normaler elektrophiler Reaktionen von Aziridinen sollte proportional zu der Konzentration ihrer protonierten Form in der Lösung sein.

**[0064]** Die Komponenten I bis V aus [Fig. 1](#) unterscheiden sich deutlich im  $pK_a$  ihrer Aziridinogruppen und in der Anzahl, gegenseitigen Anordnung sowie dem  $pK_a$  der Aminogruppen voneinander (Tabelle 1). Daher hängt sowohl der Anteil der reaktiven Form dieser Komponenten, in denen die Aziridinogruppe protoniert ist, als auch ihre positive Gesamtdurchschnittsladung erheblich vom pH-Wert ab (Tabelle 2).

Tabelle 1

$pK_a$ -Werte protonierbarer Gruppen der Oligoethylenimine

	Aziridino	primäre Amino	sekundäre Amino	tertiäre Amino
Monomer (I)	8,10	–	–	–
Trimer (III)	4,10	10,0	7,35	–
Tetramer (IV) (linear)	3,3	10,0	7,05*	–
Tetramer (V) (verzweigt)	3,0	10,0	–	6,4

\*) Mittelwert für zwei sekundäre Aminogruppen

\*\*) Mittelwert für zwei primäre Aminogruppen

**[0065]** Die Wirkung von Aziridinen auf Proteine und Polynukleotide führt zur Aminoalkylierung von nukleophilen Gruppen sowohl in Aminosäureresten als auch in Nukleinbasen (Dermer, O.C. und Ham, G.E. (1969) Ethyleneimine and Other Aziridines, Acad. Press, NY-London 52:249–285). Aziridine modifizieren wie viele elektrophile Wirkstoffe Nukleinsäuren bevorzugt an N7, N3 und N1 der Purine und zu einem weit geringeren Ausmaß

an N3 der Pyrimidine (Hemminki, K. und Ludlum, D.B. (1981) J. Natl. Cancer Inst. 73:1021–1027; Musser, S.M. et al. (1992) Chem. Res. Toxicol. 5:95–99; Singer, B. und Grunberger, D. (1983) Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens, Plenum Press, New York-London; Loveless, A. (1966) Genetic and Allied Effects of Alkylating Agents. Butterworths, London; und Kochetkov, N.K. und Budowsky, E.I. eds. (1972) Organic Chemistry of Nucleic Acids, Part B, Plenum Press, London-New York). Die Template-Synthese wird durch alkylierende Wirkstoffe gestoppt, hauptsächlich durch die relativ langsame Öffnung des Imidazolrings von N7-alkylierten Purinen, überwiegend von Guanin (O'Connor, T.R. et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:5879–93; Hemminki, K. (1984) Chem.-Biol. Interactions. 48:249–260). Zum Beispiel modifiziert Ethylenimin Guanosin, um N7-(Aminoethyl)-Guanosin zu erzeugen, welches in weitaus höherem Grad eine Imidazolringöffnung entwickelt als N7-Alkylguanosin (Hemminki, K. (1984) Chem.-Biol. Interactions. 48:249–260; Hemminki, K. et al. (1989) Chem.-Biol. Interactions. 70:289–303).

Tabelle 2

Gesamtmittelwert der positiven Ladung der Oligoethylenimine (A) und das Maß ihrer Aziridinogruppen-Protonierung (B)

pH-Werte	A			B		
	6,5	7,5	8,5	6,5	7,5	8,5
Monomer (I)	0,96	0,80	0,28	0,98	0,80	0,28
Trimer (III)	1,88	1,41	1,04	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$
Tetramer (IV) (linear)	2,67	1,41	1,01	$6,3 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
Tetramer (V) (verzweigt)	2,44	2,07	1,98	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$

**[0066]** Die Transition von Ethylenimin-Monomer (I) in seine Tetramere (IV und V) bei pH 7,5 erzeugt einen Anstieg um mehr als zwei Größenordnungen in der Wirkungs-Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung der Phageninfektiosität ( $k$ ), berechnet auf Basis der durchschnittlichen Konzentration des Wirkstoffs in Lösung (Tabelle 3). Solche Transition führt zur Herabsetzung um fünf Größenordnungen in dem  $pK_a$ -Wert der Aziridinogruppe. Demgemäß nimmt der Anteil der reaktiven Form des Wirkstoffs bei diesem pH-Wert um ca. vier Größenordnungen ab (Tabelle 2). Dadurch führt die Transition vom Monomer zu den Tetrameren bei pH 7,5 zu einem Anstieg um ca. sechs Größenordnungen der Geschwindigkeitskonstante, berechnet auf Basis der Durchschnittskonzentration der reaktiven Form des Wirkstoffs in Lösung ( $k_1$ ).

Tabelle 3

Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der Infektiosität des Phagen MS2 ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) durch die Wirkung von Oligoethyleniminen in 0,15 M NaCl bei 20°C, berechnet auf der Basis der Gesamtdurchschnittskonzentration der reaktiven Form des Wirkstoffs ( $k_1$ , in Klammern)

pH-Werte	6,5	6,9	7,5	8,5
Monomer (I)	–	–	1,5±0,07 (1,25)	–
Dimer (II)	102±3* (2,4 · 10 <sup>3</sup> )	35±2,3 (2,0 · 10 <sup>3</sup> )	13±1,4 (2,9 · 10 <sup>3</sup> )	1,7±0,05 (3,8 · 10 <sup>3</sup> )
Trimer (III)	–	–	47±2,7 (1,5 · 10 <sup>6</sup> )	–
Tetramer **	–	–	150±12,5 (3,6 · 10 <sup>6</sup> )	–

\* Geschwindigkeitskonstante wurde berechnet unter Verwendung des Anfangsteils der Überlebenskurve.

\*\* äquimolare Mischung von linearen und verzweigten Tetrameren.

**[0067]** Als Oligokationen haben Ethylenimin-Oligomere eine hohe Affinität für Polynukleotide, was sich in ihrer Assoziationskonstante zeigt. Diese Assoziationskonstante, beeinflusst durch elektrostatische Interaktion, ist proportional zu den Oligokation- und Polyanion-Volumenladungsdichten und wächst daher an mit der positiven Gesamtdurchschnittsladung des Oligokations. Die Transition von Ethylenimin-Monomer zu seinen Oligomeren führt zu einem deutlichen Anstieg der positiven Gesamtdurchschnittsladung des Moleküls (Tabelle 2). Zusätzlich sind die Abstände zwischen protonisierbaren Gruppen in den Ethylenimin-Oligomeren vergleichbar mit dem Abstand zwischen Internukleotid-Phosphatgruppen in Polynukleotiden. Ein Anstieg in der Anzahl protonisierbarer Gruppen in Oligoethyleniminen bei der Transition von Monomer zu Tetramer sollte daher zu einem Anstieg ihrer Verbindung mit Polynukleotiden führen, zum Beispiel mit Virus-RNA (Manning, G.S. (1978) *Q. Rev. Biophys.* 2:179–246; Thomas, T.J. und Bloomfield, V.A. (1984) *Biopolymers* 23:1295–1306; und Stevens, L.S. (1967) *Biochem. J.* 103:811–815).

**[0068]** Viele alkylierende Wirkstoffe, die zur Nukleinsäuremodifikation verwendet werden, haben keine deutliche Affinität für Polynukleotide. Ein Vergleich der pH-Abhängigkeit von Modifikationen der Polynukleotid mit den pK-Werten von Nukleinbasen zeigt, dass in dem pH-Bereich 6,0–8,0 hauptsächlich die neutralen Formen der Nukleinbasen alkyliert werden (Budowsky, E.I. und Zalesskaya, M.A. (1991) *Vaccine*, 9:319–325; Singer, B. und Grunberger, D. (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum Press, New York-London; Loveless, A. (1966) *Genetic and Allied Effects of Alkylating Agents*, Butterworths, London; und Kochetkov, N.K. und Budowsky, E.I. eds. (1972) *Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Part B, Plenum Press, London-New York) 48, 50, 51). Ein weiterer Anstieg im pH sollte zu einem Anstieg in einer Fraktion mit reaktiveren deprotonierten Formen von Guanosin und Uridin, und damit zu einem Anstieg in dem Phageninaktivierungsgrad führen. Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung der Phageninfektiosität bei pH 8,5 ist jedoch geringer als bei pH 7,5 (Tabelle 3). Deshalb ist, zumindest in diesem pH-Bereich, der Einfluss der Fraktion der reaktiven Form des Wirkstoffs auf den Inaktivierungsgrad größer als derjenige der Nukleinbasen. Daher nahmen wir bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Infektiositätsinaktivierung in dem pH-Bereich 6,0–8,5 an, dass die Fraktion der Nukleinbasen in ihrer reaktiven (deprotonierten) Form im Wesentlichen konstant ist. Für die Inaktivierung des Oligoethylenimins des Phagen MS2 ist demnach die pH-Abhängigkeit von der Geschwin-

digkeitskonstante der Inaktivierung hauptsächlich durch die Fraktion der reaktiven Form und die positive Gesamtdurchschnittsladung des Inaktivierungsmittels verursacht.

**[0069]** Ein 60-facher Anstieg in der effektiven Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung wird durch die Herabsetzung des pH von 8,5 auf 6,5 verursacht. Dies korreliert mit dem Anstieg der reaktiven Fraktion dieses Wirkstoffs in der Lösung (Tabelle 2 und 3). In diesem Fall wird der Effekt des pH-Wertes auf die Inaktivierungsrate daher hauptsächlich durch die Konzentrationsänderung der reaktiven Form in Lösung bestimmt. Es sollte jedoch betont werden, dass die pH-Abhängigkeit der positiven Gesamtdurchschnittsladung für das Trimer und die Tetramere weit ausgeprägter ist als für das Ethylenimin-Monomer (Tabelle 1), welches zu einer größeren Variation in der Polynukleotid-Modifikationsrate bei dem Trimer und den Tetrameren verglichen zu den Monomeren und Dimeren führt.

**[0070]** Die Modifikationsrate einer beliebigen Virionkomponente durch herkömmliche Inaktivierungsmittel wird gewöhnlich als eine Funktion der Durchschnittslösungskonzentration des Wirkstoffs betrachtet. Wenn ein Wirkstoff mit geringer Molekülmasse eine spezifische Affinität für einige Polymere hat, ist jedoch die lokale Konzentration des Wirkstoffs in der Nähe dieses Polymers höher als die Durchschnittslösungskonzentration dieses Wirkstoffs und nimmt exponentiell ab mit ansteigendem Abstand von dem Polymer (Dolar, D. und Peterlin, A., (1969) J. Chem. Phys., 50:3011–3015). Die Selektivität einer Virusgenominaktivierung sollte proportional zu dem Unterschied in der lokalen Wirkstoffkonzentration nahe diesen Biopolymeren sein. Daher sollte sogar ein lokaler Anstieg der Oligoethylenimin-Konzentration in der Nähe des Genoms vorzugsweise seine Modifikationsrate erhöhen. Wie jedoch oben betrachtet, sollte die Bildung von Komplexen zwischen Oligomeren von Ethylenimin und Polynukleotiden das Ausmaß der Aziridinogruppenprotonierung erhöhen, und damit die Geschwindigkeitskonstante ( $k_1$ ) der Polynukleotidmodifikation. Aufgrund der exponentiellen Herabsetzung der Wirkstoffkonzentration mit dem Abstand, ist die lokale Wirkstoffkonzentration bei 1–2 nm Entfernung von dem Polymer im Wesentlichen gleich mit seiner Durchschnittslösungskonzentration (Dolar, D. und Peterlin, A. (1969) J. Chem. Phys., 50:3011–3015). In nahe liegender Weise sollte der Anteil der reaktiven Form des Reagens bei diesem Abstand der gleiche sein wie bei freiem (nicht gebundenem) Zustand in Lösung. Daher sollte der Konzentrationsanstieg des Inaktivierungsmittels in der Umgebung eines Polynukleotids ebenso wie die Verbindung des Inaktivierungsmittels mit einem Polynukleotid sich nicht auf die Modifikationsrate einer Capsidkomponente, besonders ihrer Antigenträgenden Regionen an der Oberfläche des Virions, auswirken. Die Selektivität der Virusgenominaktivierung wird durch die Verwendung der erfindungsgemäßen selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel erhöht, die eine spezifische Affinität für Nukleinsäuren im Vergleich zu herkömmlichen inaktivierenden Wirkstoffen besitzen.

**[0071]** Alle diese Daten und Betrachtungen erlauben es, ein Ethylenimin-Trimer oder Tetramer auszuwählen, mit begleitendem Anstieg in der Polynukleotidaffinität, mit einem ansteigenden Grad an Reaktivität und Selektivität der Virusgenommodifikation. Wie oben dargestellt, führt eine solche Transition zu einem Selektivitätsanstieg um mindestens sechs Größenordnungen. Daher macht der signifikante Selektivitätsanstieg des Trimers und Tetramers den Effekt der Modifikation der Virionkomponenten auf die Immunogenität, die Stabilität und andere Virioneigenschaften vernachlässigbar, selbst wenn die Selektivität des Ethylenimin-Monomers nicht besser ist als die Selektivität anderer Wirkstoffe, die derzeit für die Zubereitung von abgetöteten Gesamtvirion-Impfstoffen verwendet werden.

**[0072]** Die Verwendung der selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel mit Selektivität für die Modifikation von Polynukleotiden stellt neue Möglichkeiten für die Zubereitung von sicheren und effizienten abgetöteten antiviralen Impfstoffen bereit. Die gleiche Methode kann zur selektiven Inaktivierung von Viren verwendet werden, welche die schädlichsten Verunreinigungen sowohl in Spenderblut und -serum sind, als auch in medizinischen und tiermedizinischen Zubereitungen, die aus tierischen Geweben und Zellkulturen isoliert werden. Die gleiche Methode kann zur selektiven Inaktivierung von biologisch aktiven (z.B. transformierenden) DNA-Fragmenten verwendet werden, welche die Zellen oder Biopolymer enthaltenden Zusammensetzungen kontaminieren können.

**[0073]** Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung und sind nicht einschränkend.

## Beispiel 1

## Bakteriophageninaktivierung

## Kinetische Bestimmung

**[0074]** Der Bakteriophage MS2 wurde nach herkömmlicher Methode aufbereitet. Die Aufreinigung wurde durch Polyethylenglycol (PEG 6000, Serva)-Resedimentierung oder durch Chromatographie an DEAE-Sephadex A25 in einem linearen Gradienten von NaCl (0,02–1,0 M, 20 mM Tris HCl, pH 7,4) durchgeführt. Der aufgereinigte Phage wurde in 0,15 M NaCl-Lösung (2–10 mg per ml) suspendiert und bei +4°C gelagert. Die Infektiosität der Virussuspension wurde durch herkömmliche Bilayer-Technik auf einem Fleisch-Pepton-Agar mit *Escherichia coli* CA180 bestimmt.

**[0075]** Ethylenimin (I), sein Trimer (III) und lineares (IV) und verzweigtes (V) Tetramer wurden nach der Methode von Kostyanovsky et al. (1988) Izv. Akad. Nauk SSR 11:2566–2575 zubereitet. Die PMR-Daten bewiesen, dass die Reinheit dieser Komponenten größer als 95% war. Lösungen von Ethyleniminen wurden unmittelbar vor der Verwendung durch Hinzufügen des berechneten Volumens der Komponente (spezifische Dichten bei 20°C sind 0,836, 0,945 und 0,968 g·cm<sup>-3</sup> jeweils für Komponenten I, III und IV (V)) zu 0,15 M NaCl-Lösung zubereitet.

**[0076]** Die pK<sub>a</sub>-Werte der protonisierbaren Gruppen der Ethylenimine in 0,15 M NaCl wässriger Lösung bei 25°C wurden auf der Basis der Ergebnisse der potenziometrischen Titration ([Fig. 2](#)) mit HCl unter Verwendung eines Autotitrators TTT-60 (Radiometer) mit einer thermostatischen Zellokammer berechnet. Die Genauigkeit der pK<sub>a</sub>-Wertbestimmung ist nicht geringer als 0,05. Der Anteil der reaktiven (am Aziridin-Stickstoff protonisierten) Form des Wirkstoffs (Q) wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$Q = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_i}} \quad (1)$$

worin pK<sub>i</sub> der pK<sub>a</sub>-Wert der Aziridinogruppe der jeweiligen Komponente ist.

**[0077]** Die positive Gesamtdurchschnittsladung des Moleküls (p) wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet:

$$p = \frac{\sum_{n=0}^{\infty} n \cdot d \cdot (H_n \cdot A^{n+})}{\sum_{n=0}^{\infty} d \cdot (H_n \cdot A^{n+})} \quad (2)$$

worin d·(H<sub>n</sub>·A<sup>n+</sup>) der Anteil des Wirkstoffs mit positiver Ladung n bei gegebenem pH-Wert ist.

**[0078]** Vor dem Mischen wurden die Phagen enthaltende Zusammensetzung und die frisch zubereitete Lösung von selektivem Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel bei 20°C aufbewahrt und der gewünschte pH-Wert durch Hinzufügen verdünnter NaOH- oder HCl-Lösungen eingestellt. Aliquots der bei 20°C inkubierten Reaktionsmischung (Endkonzentrationen des Inaktivierungsmittels sind in der kurzen Beschreibung von [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gegeben) wurden in bestimmten Zeitintervallen entnommen und nach unverzüglicher 100-facher Verdünnung für die Bestimmung der Infektiosität (Titer) verwendet. Die effektiven Geschwindigkeitskonstanten der Infektiositätsinaktivierung (k) wurden nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$k = \frac{2 \cdot 3}{A \cdot t} \log S_0/S_t \quad (3)$$

worin A die Konzentration (gesamt oder des reaktiven Anteils) des Wirkstoffs ist; S<sub>0</sub> und S<sub>t</sub> sind die Infektiositäten (Titer) der Suspension vor und t Minuten nach dem Start der Inaktivierung.

**[0079]** Die eindeutig definierten Formen der potenziometrischen Titrationskurven ([Fig. 2](#)) reflektieren die Wechsel in dem ionischen Zustand des Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels. Im Fall des Monomers

entspricht die einzelne Ebene der Protonierung der Aziridinogruppe. Der errechnete  $pK_a$ -Wert (Tabelle 1) liegt in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (O'Rourke, C.E., et al., (1956) J. Am. Chem. Soci., 78:2159–2160). Für andere Komponenten entsprechen die Ebenen der Protonierung von Amino- und Aziridinogruppen (Tabelle 1). Der Säureverbrauch durch die Oligomere II bis V zeigt an, dass jedes eine einzelne Gruppe mit  $pK_a$  5,15–3,0 besitzt, was der Gegenwart einer einzelnen Aziridinogruppe in diesen Molekülen entspricht. Die Moleküle II bis V demonstrieren einen herabgesetzten Aziridino- $pK_a$  relativ zu Ethylenimin, da die größere Anzahl stark basischer Aminogruppen die positive Gesamtladung des Moleküls erhöht, wodurch die Protonierung von Aziridinogruppen herabgesetzt wird. Der geringer ausgeprägte  $pK_a$ -Unterschied zwischen den Molekülen IV und V ist höchstwahrscheinlich Folge des Unterschiedes in der gegenseitigen Anordnung von Aziridino- und Aminogruppen in diesen Molekülen. Ein Äquivalent Säure wird für die Protonierung der meisten basischen Aminogruppen im Fall der Komponenten II bis IV benötigt, während zwei für Komponente V benötigt werden. Diese Daten korrelieren mit der Gegenwart einer primären Aminogruppe in jeder der ersten drei Komponenten und zweier solcher Gruppen in V. Der Verbrauch von einem und zwei Äquivalenten Säure, entsprechend der Existenz von einer oder zwei sekundären Aminogruppen, ist notwendig für die Ionentransitionen der Komponenten II und IV jeweils bei pH 7,35 und 7,05. Der Verbrauch von einem Äquivalent Säure für die Ionentransition der Komponente V bei pH 6,4 entspricht der Existenz einer tertiären Aminogruppe. In diesen Komponenten sind die höheren  $pK_a$ -Werte der primären gegenüber der sekundären und tertiären Aminogruppen höchstwahrscheinlich durch elektronische Effekte ebenso wie durch die Struktur des Polyaminmoleküls verursacht (vgl. M.D. Bratek-Wiewiorowsak et al. (1986) Bull. Pol. Ac. Sci., Chem. 34:229–249). Diese Daten wurden verwendet, um die positive Gesamtdurchschnittsladung und das Ausmaß der Aziridinogruppen-Protonierung bei beliebigem pH-Wert für die Komponenten I bis V (Tabelle 2) zu berechnen.

**[0080]** Die exponentielle Abfall der Infektiosität des Phagen MS2 durch die Wirkung der Komponenten I bis V bei pH 7,5 (Fig. 3) zeigt an, dass die Konzentration dieser Komponenten unter den verwendeten Bedingungen konstant bleibt. Dies erlaubt die Berechnung der effektiven Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) für die Inaktivierung der Infektiosität, basierend auf den erhaltenen Daten. Wie in Tabelle 3 gezeigt, führt die Transition von Ethylenimin-Monomer zu seinem Tetramer zu einem Anstieg um zwei Größenordnungen in dieser Geschwindigkeitskonstante.

**[0081]** Die Herabsetzung des pH von 8,5 auf 6,5 verursacht einen 60-fachen Anstieg in der Inaktivierungsrate der Phageinfektiosität durch Ethylenimin (Fig. 4, Tabelle 3). Die Verwendung dieser Komponente bei pH 6,5 führt zu einer signifikanten Abweichung der Überlebenskurvenform von der exponentiellen Form (Fig. 4). Diese Veränderung zeigt eine rapide Herabsetzung der Konzentration von Komponente II an, höchstwahrscheinlich durch ihre kationische Polymerisierung bei diesem pH (vgl. Gembitsky, P.A., et al., (1971) Nauka, Moskau). Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung für Komponente II bei pH 6,5 wurde daher unter Verwendung lediglich des Anfangsteils der Überlebenskurve berechnet. Die Geschwindigkeitskonstante für den Komponenten-II-Verbrauch bei pH 6,5 ist ca.  $0,02 \text{ min}^{-1}$ , wie unter Verwendung der Geschwindigkeitskonstante in der frühen Aktivierungsperiode und dem endgültigen Ausmaß der Infektiositätsinaktivierung berechnet (vgl. Budowski, E.I. und Zaleskaya, M.A., (1991), Vaccine, 9:319–325).

## Beispiel 2

### Berechnung des Endpunktes der Inaktivierung

**[0082]** Der Umfang der Reduzierung der Infektiosität der Virus enthaltenden Zusammensetzung kann experimentell durch mindestens ca. 6 Größenordnungen gesteuert werden, selbst wenn man das Probenvolumen (innerhalb angemessener Grenzen) erhöht und den Vorzug einer Reihe aufeinander folgender Passagen nimmt. Jedoch erfordert die Herstellung sicherer abgetöteter antiviraler Impfstoffe, dass die Infektiosität der originalen Virus enthaltenden Zusammensetzung um mindestens ca. 20 Größenordnungen reduziert wird. Daher kann die Sicherheit der abgetöteten antiviralen Impfstoffe im Allgemeinen nicht allein durch ein Experiment bestimmt werden und muss in das hierin beschriebene Verfahren eingearbeitet werden und kann bedeutungsvoller durch eine Berechnung mit kinetischem Ansatz festgelegt werden. Dies erfordert eine exakte kinetische Beschreibung der Inaktivierungsbedingungen für das Virus unter Einbeziehung der Eigenschaften des selektiven Inaktivierungsmittels dieser Erfindung. Daten können aus dem frühen (experimentell kontrollierten) Teil der Überlebenskurve erhalten werden.

**[0083]** Eine exakte kinetische Beschreibung sollte auf der präzisen Bestimmung der Infektiosität der Virususpension während der Inaktivierung basieren. Der Fachmann sollte sicherstellen, dass die Infektiositäts-(Titer-) Bestimmung exakt ist, um eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung und der minimalen Dauer der selektiven Wirkung des Inaktivierungsmittels ( $t_1$ ) sicherzustellen. Ein zuverlässiger  $t_1$ -Wert

kann unter Verwendung der oben beschriebenen kinetischen Methode erhalten werden, insbesondere wenn die Überlebenskurven eine gute kinetische Beschreibung bis zu einem spezifizierten Reduzierungsgrad in der Infektiosität bereitstellen. Vorausgesetzt, dass die Modifikation des Virusgenoms nicht durch biologische Faktoren (wie DNA-Reparatur) verzerrt ist und angenommen, dass die Bildung der ersten Inaktivierungsläsion, ungeachtet ihrer Position in der Virusnukleinsäure, die komplette Replikation des Genoms blockiert, folgen die Überlebenskurven für das Virus während der Wirkung des selektiven Inaktivierungsmittels dieser Erfindung der folgenden Gleichung:

$$S = S_0 \exp(-Akt)$$

wobei  $S_0$  und  $S$  die Infektionstiter der Virus enthaltenden Zusammensetzung vor und im Zeitpunkt  $t$  nach dem Start der Wirkung des selektiven Inaktivierungsmittels sind,  $A$  die Konzentration des selektiven Inaktivierungsmittels und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante für die Inaktivierung, d.h., die Modifikation eines Nukleotidrestes pro Genom, ist.

**[0084]** Unter der Annahme, dass die Werte von  $A$  und  $k$  während der Inaktivierung konstant sind, sind die Überlebenskurven exponential. In diesem Fall kann die Inaktivierungsdauer, die für die Reduktion der Infektiosität zu einem gegebenen Ausmaß erforderlich ist, gemäß der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$t_1 = [2,3/(Ak)] \log(S/S_0)$$

**[0085]** Unter Anwendung der in Beispiel Eins erhaltenen Geschwindigkeitskonstante für die Inaktivierung, wie in Tabelle 3 dargestellt, die Inaktivierungsdauer, angenommen, die Ethylenimin-Oligomer-Konzentration beträgt  $10^{-3}$  (für das Tetramer) und die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung  $k = 150$ , entnommen der Tabelle 3 (pH 7,5) und  $\log(S/S_0)$ , entspricht dem gewünschten Maß der Inaktivierung, in diesem Fall mindestens ca. 20, dann beträgt die Zeit der Reduzierung der Infektiosität in Beispiel Eins 15,3 Minuten, ausgeführt bei  $20^\circ\text{C}$ .

**[0086]** Gemäß dieser Erfindung kann der Endpunkt der Inaktivierung für ein beliebiges Virus und eine beliebiges selektives Inaktivierungsmittel gemäß dieser Erfindung unter Inaktivierungsbedingungen bestimmt werden, die auf den Daten basieren, die aus dem Anfangsteil der Überlebenskurve hervorgehen.

### Beispiel 3

**[0087]** Picornavirus. Hepatitis-A-Virus (Gattung Enterovirus) und Maul-und-Klauen-Seuche-Virus (Aphthovirus), die einzelsträngige RNA einer positiven Kette enthalten, und das Capsid lediglich Protein enthält, werden untersucht. Die Viren werden nach herkömmlicher Vorgehensweise zubereitet, einschließlich Aufreinigung und Bestimmung der Infektiosität und Stabilität. Das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel gemäß der Erfindung wird wie oben beschrieben zubereitet. Die  $pK_a$ -Werte der Ethylenimine werden in einer bestimmten Salzlösung bei einer bestimmten Temperatur ermittelt. Das Virus und das ausgewählte virale Inaktivierungsmittel, d.h. das Ethylenimin-Oligomer, wird bei einem/einer bestimmten pH, Temperatur und Konzentration gemischt, wobei für jedes Virus die in Tabelle 4 dargestellten Bedingungen angewendet werden.

Tabelle 4

Die Inaktivierungszeit der Infektiosität einiger Tierviren (15–20 Größenordnungen) durch die Wirkung von Ethylenimin-Tetramer bei 20°C.

Virus	Stabilität unter Behandlungs- bedingungen	Inkubationszeit Konzentration des Mittels				Stunden*
		1 mM		15 mM		
		pH 7,0	pH 8,0	pH 7,2	pH 8,0	
Vesikuläres Stomatitis- Virus	mäßig	120	1200			
Influenza-A- Virus	mäßig	1-50	10-300	0,07-0,2	0,7-2	
Hepatitis-A- Virus	stabil	1-30	10-300	0,15-0,3	1,5-3	

Maul-und- KlaulenSeuche- Virus	mäßig	2-5	20-500	0,15-0,3	1,5-3
--------------------------------------	-------	-----	--------	----------	-------

\*abhängig von dem Typ und Stamm des Virus, des Aufreinigungsverfahrens für das Virus und der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches

**[0088]** Proben der Reaktionsmischung, nach angemessenen Zeitintervallen entnommen, wurden für 30 Minuten mit Thiosulfat (Endkonzentration 0,1 M) für 30 Minuten ergänzt, um den Überschuss des Inaktivierungsmittels zu löschen, wobei der Infektiositätstiter des Reaktionsgemisches wie oben beschrieben gemessen wird. Die Zeit  $t_1$  zur Reduktion dieser Virusinfektiosität um bis zu 20 Größenordnungen wird unter Verwendung der oben beschriebenen Gleichung berechnet. Bei Anwendung einer Geschwindigkeitskonstante zur Inaktivierung von nahezu 500 (was dem durchschnittlichen Fachmann bekannt ist und auf einem Vergleich der Länge des Genoms von Hepatitis A zu dem Bakteriophagen MS2, wie in Beispiel Eins beschrieben, basiert), die Inaktivierungsdauer, beträgt die Zeit zur Reduktion der Infektiosität in diesem Fall beispielsweise 30 Minuten bei 20°C, unter der Annahme, dass die Konzentration von Ethylenimin-Oligomer  $10^{-4}$  M (für das Tetramer) und die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung,  $k = 500$  (pH 7,5) und  $\log(S/S_0)$  ist das gewünschte Maß der Inaktivierung, in diesem Fall bei mindestens ca. 20 liegt.

#### Beispiel 4

**[0089]** Rhabdoviren. Die Inaktivierung des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), das einzelsträngige RNA und ein Lipid-umhülltes Nukleocapsid enthält, wird untersucht.

**[0090]** VSV wird in humanen A549-Zellen kultiviert. Das zubereitete EMC-Material sind Maus-L929- oder humane A459-Zellen. Die Kultur- und Testverfahren sind dem durchschnittlichen Fachmann bekannt. Die Infektiosität von VSV wird durch den Endpunkt bestimmt, 10-fache Serienverdünnungen in DMEM-Kultur mit 10%-igem fötalem Kälberserum. Jede Verdünnung wird verwendet, um acht replikative Vertiefungen (wells) von

humanen A549-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten zu inokulieren. Die Virus-induzierte Zellpathologie wird nach 72 Inkubationsstunden bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> erreicht. Der angezeigte Virustiter wird unter Verwendung bekannter Methoden erreicht.

**[0091]** Zell-assoziiertes VSV wird durch die Inkubation einer konfluenten einlagigen Schicht von humanen A549-Zellen mit 5 ml an 10<sup>7</sup> ID<sub>50</sub>/ml VSV in Serum-freiem DMEM für 1 Stunde bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in 150 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen zubereitet. Die Multiplizität der Infektion unter diesen Bedingungen ist nahezu 2,1 TCID<sub>50</sub>/Zelle. Um die Inaktivierung festzulegen, wird das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel zu dem Zellassozierten Virus in DMEM in 3 ml Aliquots in Polystyrolröhrchen hinzugefügt. Aliquots des Reaktionsgemisches werden zu bestimmten Zeiten entnommen und mit Thiosulfat (Endkonzentration 0,1 M) für 30 Minuten ergänzt, um den Überschuss an selektivem Inaktivierungsmittel zu löschen. Die Zellen werden durch Zentrifugation entfernt und der Infektiositätstiter des Überstandes und des redispergierten Pellets ausgewertet. Die Zeit t<sub>1</sub> zur Reduktion dieser Vireninfectiosität um 20 Größenordnungen wird anhand der oben beschriebenen Gleichung berechnet.

**[0092]** Die Inaktivierung von zellfreiem VSV, hinzugefügt zu Vollblut (5 × 10<sup>9</sup> rote Blutzellen/ml) in der Gegenwart eines selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittels wird bestimmt. Die virale Infektiosität wird wie hier beschrieben bestimmt. Die Zeit t<sub>1</sub> zur Reduktion dieser viralen Infektiosität um 20 Größenordnungen wird anhand der oben beschriebenen Gleichung berechnet. Die Struktur und Funktion der roten Blutzellen wird ausgewertet.

#### Beispiel 5

**[0093]** Orthomyxoviridae. Die Inaktivierung des Influenza-A-Virus, eine einzelsträngige, fragmentierte RNA negativer Kette und ein Lipid-umhülltes Capsid-Virus, wird ausgewertet. Das Virus wird nach herkömmlichen Vorgehensweisen zubereitet, einschließlich der Aufreinigung und Bestimmung der Infektiosität und Stabilität. Das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel gemäß dieser Erfindung wird wie oben beschrieben zubereitet. Die pK<sub>a</sub>-Werte des Ethylenimin-Oligomers werden in einer bestimmten Salzlösung und bei einer bestimmten Temperatur bestimmt. Das Influenza-A-Virus und das ausgewählte virale Inaktivierungsmittel, d.h. das Ethylenimin-Oligomer, wird bei einem bestimmten pH-Wert, Temperatur und Konzentration gemischt, unter Verwendung der Bedingungen für das Virus wie oben dargelegt. Die Virusinfektiosität wird, wie hier beschrieben, bestimmt. Die Zeit t<sub>1</sub> zur Reduktion dieser Infektiosität des Virus' um 20 Größenordnungen wird anhand der oben beschriebenen Gleichung berechnet.

#### Beispiel 6

**[0094]** Das humane Immunschwäche-Virus (zwei Kopien eines einzelsträngigen RNA-Genoms, häufig mutierte Capsidproteine) wird untersucht. HIV wird entweder in zellfreier oder intrazellulärer Form hinzugefügt, entweder zu Vollblut oder einem Konzentrat roter Blutzellen in einem Teströhrchen. Das selektive Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel wird hinzugefügt und nach Bearbeitung der Proben werden HIV-Antigen-Messungen durchgeführt. Die Virusinfektiosität wird, wie hier beschrieben, bestimmt. Die Zeit t<sub>1</sub> zur Reduktion dieser Virusinfektiosität um 20 Größenordnungen wird anhand der oben beschriebenen Gleichung berechnet.

**[0095]** Anhand der vorgehenden Beschreibung wird deutlich, dass die selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel und Verfahren gemäß der Erfindung zur Inaktivierung durch Blut übertragener Viren, Bakterien oder Parasiten in Zell- oder Biopolymer enthaltenden Zusammensetzungen in verschiedenen Zusammenhängen verwendet werden können, z.B. im Krankenhaus, Labor oder als Teil eines Kits. Sofern Zusammensetzungen von Zellen ebenfalls unterschiedliche Proteine umfassen, kann das hierin beschriebene Verfahren zur Virusinaktivierung ebenfalls für Proteinfraktionen angewendet werden, insbesondere Fraktionen von Blutplasmaeigenschaften oder gereinigte Blutprodukte, einschließlich, jedoch nicht hierauf beschränkt, Fraktionen, die Gerinnungsfaktoren (wie Faktor VIII und Faktor IX), Serumalbumin und/oder Immunglobuline enthalten. Die Virus- und Bakterieninaktivierung kann durch Behandlung einer Proteinfraktion oder eines gereinigten Proteins mit einem selektiven Ethylenimin-Oligomer-Inaktivierungsmittel, wie hierin beschrieben, ausgeführt werden.

**[0096]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit noch anderen Formen der Vireninaktivierung kombiniert werden. Zum Beispiel können einige Verfahren, die bei der Zubereitung von medizinischen Produkten (z.B. Chromatographie in Puffern mit niedrigem pH-Wert oder Lagerung von roten Blutzellen in Säurelösungen, die Kalziumchelatbildner enthalten) verwendet werden, zufällig Virus-inaktivierende Eigenschaften für ausgewählte sensitive Viren, gewöhnlich umhüllte Viren, haben. Die Verwendung von Ethylenimin würde zu der Wir-

kung solcher Mittel bei der Inaktivierung solcher Viren hinzukommen.

#### Beispiel 7

##### Unabhängigkeit der Reaktionsrate von der umgebenden Proteinkonzentration

**[0097]** Die Inaktivierung des MS2 Phagen wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von Proteinkonzentrationen bis zu 3% (30 mg/ml) bestimmt, um zu bestimmen, ob eine hohe Proteinkonzentration in den Medien sich auf die Reaktionsrate mit dem Virusgenom signifikant auswirken würde. Der MS2 Phage, suspendiert in 0,15 M NaCl, wurde zu einem gleichen Volumen humanen Serumalbumins hinzugefügt. Oligoethylenimin-Trimer oder-Tetramer wurde zu den Phagensuspensionen hinzugefügt, bis zu Endkonzentrationen von 0,4 mM bzw. 0,2 mM und bei pH 7,0, 25°C inkubiert. Periodisch wurden Proben entnommen und auf die restliche Infektiosität (Phagentiter) hin analysiert. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 5 gezeigt:

Tabelle 5

Geschwindigkeitskonstanten zur Inaktivierung der Infektiosität des Phagen MS2 in Gegenwart von humanem Serumalbumin

Inaktivierung durch Oligoethylenimin-trimer (0,4 mM)		Inaktivierung durch Oligoethylenimintetramer (0,2 mM)	
Albuminkonzentration (mg/ml)	Geschwindigkeitskonstante ( $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) + SE	Albuminkonzentration (mg/ml)	Geschwindigkeitskonstante ( $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) + SE
0	$10,8 \pm 1,1$	0	$22,5 \pm 4,2$
10	$9,8 \pm 0,3$	1	$19,9 \pm 2,2$
20	$10,4 \pm 0,3$	2	$18,6 \pm 1,8$

**[0098]** Das Fehlen eines deutlichen Effekts der höheren Proteinkonzentrationen auf den Virusinaktivierungsgrad unterstützt den hohen Selektivitätsgrad der Reaktion von Ethylenimininen mit dem Virusgenom und bestätigt, dass eine Nukleinsäuremodifikation in biologischen oder anderen Flüssigkeiten erreicht werden kann, die hohe Konzentrationen von Proteinen oder anderen Biopolymeren enthalten.

#### Beispiel 8

Spezifizität der Inaktivierung der Phageninfektiosität (Nukleinsäurenmodifikation): Fehlen der Proteinmodifikation durch Ethylenimin-Oligomere

**[0099]** Die Inaktivierung von MS2 Phageninfektiosität durch Ethylenimin-Monomer (25 nM), -Trimer (0,4 mM) und -Tetramer (0,2 mM) wurde in der Gegenwart von 0,9%-igem humanem Serumalbumin bis zu verschiedenen Inaktivierungsgraden in 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,0-7,2 bei 25°C ausgeführt. Nachfolgende Terminati-on der Inaktivierungsreaktion erfolgte durch Thiosulfat (0,1 M Endkonzentration) und die Proben von jeder Inkubation wurden durch 12,5 -igen reduzierenden und nicht-reduzierenden SDS-PAGE und bei isoelektrischer Fokussierung (pH-Bereich 3 bis 7) verglichen.

**[0100]** Wie in Tabelle 6 gezeigt, zeigt weder reduziertes noch nicht-reduziertes SDS-PAGE irgendeinen Unterschied in Albumin nach Inaktivierung bis zu 80 Größenordnungen, was auf ein Fehlen von nennenswerten Effekten der Inaktivierung auf die Größe des Proteins hinweist.

Tabelle 6

Abwesenheit von Proteinmodifikation durch Ethylenimin-Oligomere, SDS-PAGE-Analyse

Inaktivierung durch Monomer (25 mM)		Inaktivierung durch Trimer (0,4 mM)		Inaktivierung durch Tetramer (0,2 mM)	
Inaktivierungsausmaß (log <sub>10</sub> )	SDS-PAGE	Inaktivierungsausmaß (log <sub>10</sub> )	SDS-PAGE	Inaktivierungsausmaß (log <sub>10</sub> )	SDS-PAGE
0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>	0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>	0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>
11	Keine Veränderung <sup>*</sup>	11	Keine Veränderung <sup>*</sup>	9	Keine Veränderung <sup>*</sup>
32	Keine Veränderung <sup>*</sup>	-	-	-	-
41	Keine	40	Keine	40	Keine
83	Veränderung <sup>*</sup> Keine Veränderung <sup>*</sup>	79	Veränderung <sup>*</sup> Keine Veränderung <sup>*</sup>	81	Veränderung <sup>*</sup> Keine Veränderung <sup>*</sup>

<sup>#</sup> Für reduzierte und nicht-reduzierte SDS-PAGE, vorherrschende Hauptbande bei annähernd 68 kDa mit nahezu 5 schwachen Banden höheren Molekulargewichts.

<sup>\*</sup> Keine Veränderung, weder in reduzierter noch nicht-reduzierter SDS-PAGE.

**[0101]** Wie jedoch in Tabelle 7 gezeigt ist, zeigten Analysen von Albuminproben durch isoelektrische Fokussierung (IEF), dass die Inaktivierung mit Ethylenimin-Monomer, nicht jedoch -Trimer oder -Tetramer, ein wesentliches Anwachsen der Ladungsheterogenität im Albumin erzeugt, was es basischer macht. Dies zeigt, dass Ethylenimin-Monomer das Albumin unter Veränderung seiner Ladung modifiziert. Im Gegensatz dazu haben Ethylenimin-Trimer und -Tetramer bei gleichem Inaktivierungsgrad bis zu 81 Größenordnungen keinen detektierbaren Effekt auf die Albuminladung. Dies zeigt, dass die Inaktivierungsreaktion mit Ethylenimin-Oligomeren noch selektiv für Nukleinsäuren ist, wohingegen die Inaktivierung mit Ethylenimin-Monomer unter denselben Bedingungen Proteine ebenso wie Nukleinsäuren modifiziert.

Tabelle 7

Abwesenheit von Proteinmodifikation durch Ethylenimin-Oligomere, isoelektrische Fokussierungsanalyse

Inaktivierung durch Monomer (25 mM)		Inaktivierung durch Trimer (0,4 mM)		Inaktivierung durch Tetramer (0,2 mM)	
s-ausmaß (log <sub>10</sub> )	IEF-Muster	s-ausmaß (log <sub>10</sub> )	IEF-Muster	s-ausmaß (log <sub>10</sub> )	IEF-Muster
0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>	0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>	0	Grundlinienmuster <sup>#</sup>
11	Ansteigende Bandbreite*	11	Keine Veränderung*	9	Keine Veränderung*
32	Ansteigende Bandbreite*	-	-	-	-
41	Ansteigende Bandbreite*	40	Keine Veränderung*	40	Keine Veränderung*
83	Ansteigende Bandbreite*	79	Keine Veränderung*	81	Keine Veränderung*

<sup>#</sup> Einzelne Hauptbande bei pI annähernd 5,5.

\* Ansteigende Breite und Diffusität der Hauptbande, überwiegend in Richtung der ansteigenden positiven Ladung (basischer).

## Beispiel 9

## Inaktivierung eines umhüllten Tiervirus

**[0102]** Um die Inaktivierung eines umhüllten Tiervirus zu demonstrieren, wurde das Venezuelanische Pferde-Encephalitisvirus („VE“) mit Ethylenimin-Trimer (2 mM) oder- Tetramer (0,5 mM) für bis zu 24 Stunden bei 22 oder 37°C in 0,02 M Phosphatpuffer, enthaltend 0,2% Rinderserumalbumin, inkubiert. Proben wurden periodisch von der Inkubationsmischung entnommen und zur Restviruskonzentration titriert. Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung wurden anhand der Daten der ersten 7 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 8 gezeigt:

Tabelle 8

Geschwindigkeitskonstanten zur Inaktivierung des Venezuelanischen Pferde-Encephalitisvirus durch Ethylenimin-Oligomere

Temperatur (°C)	Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung durch Oligoethylenimin- Trimer ( $\text{mM}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )	Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung durch Oligoethylenimin- Tetramer ( $\text{mM}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )
	25	0,33
37	1,25	3,40

Beispiel 10

Erhaltung von Antigen-Epitopen während der Inaktivierung eines umhüllten Tiervirus

**[0103]** Um die Erhaltung von Antigen-Epitopen während der Inaktivierung mit Ethylenimin-Oligomeren zu demonstrieren, wurde das Venezuelanische Pferd-Encephalitisvirus für bis zu 7 Stunden durch Ethylenimin-Trimer, 2 mM, bei 37°C inaktiviert. Die Antigenizität dieses Virus nach drei und sieben Stunden Inaktivierung wurde mit einem ELISA-Assay unter Verwendung von drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die Endpunkttiter wurden bestimmt und mit Virustitern vor der Inaktivierung verglichen. Die verwendeten monoklonalen Antikörper waren 1A1B-9, 7A1A-1 und 7A3A-4. Der Antikörper 1A1B-9 erkennt ein Typ-spezifisches Antigen, während die Antikörper 7A1A-1 und 7A3A-4 ein kryptisches Epitop erkennen, welches nach der Entfaltung eines Viruscapsid-Antigens exponiert wird.

**[0104]** Wie in Tabelle 9 gezeigt, wurde keine Veränderung in der antigenischen Reaktivität nach einer Inaktivierung von über 8 Größenordnungen (drei Stunden Inaktivierung) oder nach einer geschätzten 18,7 Größenordnung (sieben Stunden Inaktivierung) detektiert.

Tabelle 9

Erhaltung von Antigen-Epitopen während der Inaktivierung des Venezuelanischen Pferde-Encephalitisvirus durch Ethylenimin-Trimer (2 mM)

	Inkubationszeit (Stunden)		
	0	3	7
Virustiter	$2 \times 10^8$	0	0
Endpunkt, Antikörper 1A1B-9	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
Endpunkt, Antikörper 7A1A-1	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$
Endpunkt, Antikörper 7A3A-4	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$

Beispiel 11

Inaktivierungskinetiken des MS2 Phagen mit Bromidsalzen von Ethylenimin-Oligomeren

**[0105]** Zur Bestimmung der Inaktivierungskinetik des MS2 Phagen mit Bromidsalzen von Ethylenimin-Oligomeren wurde der Phage bei 25°C für verschiedene Zeiten bis zu 24 Stunden in einem von mehreren Puffern bei pH 7,0 zusammen mit Ethylenimin-Trimer, Ethylenimin-Tetramer, dem Hydrobromidsalz von Ethyleni-

min-Trimer ( $\beta$ -Bromethyl-diethylentriamin-tribromhydrat) oder dem Hydrobromidsalz von Ethylenimin-Tetramer ( $\beta$ -Bromethyl-triethylentetramin-tetrabromhydrat) inkubiert. Es wurden periodisch Proben für die Bestimmung der Restinfektiosität entnommen und die Geschwindigkeitskonstanten der Infektiosität wurden bestimmt. Die Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 10, zeigen an, dass der MS2 Phage, wenn er mit Bromidsalzen inkubiert wurde, durch Konversion in das jeweilige Trimer oder Tetramer von Ethylenimin inaktiviert wurde. Die etwas langsamere Inaktivierungsrate der Bromidsalze, verglichen mit der Inaktivierung in Gegenwart des entsprechenden Ethylenimin-Oligomers, zeigt an, dass die Konversion lediglich ungefähr 30-40% vollständig war. Dennoch kann die Verwendung von Halogensalzen wegen ihrer größeren Stabilität und Annehmlichkeiten bevorzugt sein. Die Daten illustrieren ebenso, dass das Phosphatanion die Reaktion inhibiert, vermutlich aufgrund seiner hohen negativen Ladung, die die Interaktion der Ethylenimin-Oligomere mit der Nukleinsäure stört.

Tabelle 10

Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung des MS2 Phagen mit Ethylenimin-Trimer und -Tetramer und den entsprechenden Bromidsalzen

Puffer	Geschwindigkeitskonstante (mM <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )			
	Ethylenimin-Trimer	Ethylenimin-Tetramer	$\beta$ -Bromethyl-diethylentriamin-tribromhydrat	$\beta$ -Bromethyl-triethylentetramin-tetrabromhydrat
A	7,4 ± 0,6	-	-	-
B	7,6 ± 0,8	18,2 ± 1,6	3,0 ± 0,4	6,3 ± 0,9
C	5,1 ± 0,8	8,7 ± 0,9	-	-
D	0,26 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,04

A: 0,15 M NaCl

B: 0,075 M NaCl, 0,2 M MOPS

C: 0,1 M NaCl, 0,025 M Phosphat

D: 0,075 M NaCl, 0,2 M Phosphat

**[0106]** Obwohl sie im Zusammenhang mit Viren beschrieben sind, versteht es sich, dass die erfindungsgemäßen Verfahren im Allgemeinen ebenso geeignet sind, eine beliebige biologische Verunreinigung zu inaktivieren, die in gelagertem Blut oder Blutprodukten gefunden wurden, einschließlich Bakterien und durch Blut übertragene Parasiten.

**[0107]** Obwohl die genannte Erfindung zum Zwecke eines klaren Verständnisses im Detail beschrieben wurde, ist es offensichtlich, dass gewisse Modifikationen innerhalb des Schutzzumfangs der anliegenden Ansprüche vorgenommen werden können.

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Ethylenimin-Oligomer Inaktivierungsmittels zur selektiven Inaktivierung von Mikroorganismen in einer biologischen Zusammensetzung enthaltend Biopolymere.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei im Wesentlichen die gesamte Aktivität der Biopolymere auf den Niveaus vor der Inaktivierung erhalten bleibt.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Biopolymere aus Proteinen, Kohlehydraten und Lipiden ausgewählt sind.

4. Verwendung nach den Ansprüchen 1–3, wobei die biologische Zusammensetzung eines oder mehrere Proteine umfasst, ausgewählt aus Fibrinogen, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Immunglobuline, Präalbumin, Retinol-Bindeprotein, Albumin, Alphaglobuline, Gammaglobuline, Komponenten des Komplement-

systems, Fibronectin, Anti-Thrombin III, Hämoglobin, Interferon, Wachstumsfaktoren, Plaminogen-Aktivator, Wachstumshormon, Insulin, und Erythropoietin.

5. Verwendung nach den Ansprüchen 1–4, wobei die biologische Zusammensetzung ausgewählt ist aus Vollblut von Säugern, gereinigten oder teilweise gereinigten Blutproteinen, Blutzellproteinen, Milch, Speichel, Blutplasma, Blutplättchenreiches Plasma, ein Plasmakonzentrat, ein Präzipitat von irgendeiner Fraktionierung des Plasmas, ein Überstand von irgendeiner Fraktionierung des Plasmas, ein Serum, ein Kryopräzipitat, ein Kryoüberstand, ein Zelllysät, eine Säugerzellkultur, ein Plazentaextrakt, Fermentationserzeugnisse, und in Blutzellen induzierte Proteine.

6. Verwendung nach den Ansprüchen 1–4, wobei die biologische Zusammensetzung aus Säugerzellen und nicht-Säugerzellen ausgewählt ist.

7. Verwendung nach den Ansprüchen 1–4, wobei die biologische Zusammensetzung aus einem Leukozytenkonzentrat, einem Konzentrat von roten Blutkörperchen, und einem Konzentrat von Blutplättchen ausgewählt wird.

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Struktur und Funktion von nicht- Nukleinsäurekomponenten der Zellen in der biologischen Zusammensetzung bewahrt bleibt.

9. Verwendung nach den Ansprüchen 1–8, wobei die biologische Zusammensetzung zur Herstellung einer therapeutischen Zusammensetzung nach der selektiven Inaktivierung von Mikroorganismen geeignet ist.

10. Verwendung nach den Ansprüchen 1–9, wobei die Mikroorganismen aus zellfreien Formen von Viren, über das Blut übertragenen Viren, Bakterien und Parasiten ausgewählt werden.

11. Verwendung nach den Ansprüchen 1–8, wobei die Mikroorganismen aus in Zellen enthaltenen Formen von Viren, über das Blut übertragenen Viren, Bakterien und Parasiten ausgewählt werden.

12. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Viren aus umhüllten Viren und nicht umhüllten Viren ausgewählt werden.

13. Verwendung nach Anspruch 10 bis 12, wobei die Viren ausgewählt werden aus Pockenviren, Herpesviren, Adenoviren, Papoviren, Parvoviren, Reoviren, Orbiviren, Rotaviren, Alphaviren, Rubiviren, Influenzaviren, Typ A und B, Flaviviren, Coronaviren, Paramyxoviren, Morbilliviren, Pneumoviren, Rhabdoviren, Vesiculoviren, Lyssaviren, Picornaviren, Orthomyxoviren, Bunyaviren, Phleboviren, Nairoviren, Hepadnaviren, Arenaviren, Retroviren, Enteroviren, Rhinoviren und Filoviren.

14. Verwendung nach den Ansprüchen 1–13, wobei das Ethylenimin-Oligomer ein Ethylenimin-Dimer ist.

15. Verwendung nach den Ansprüchen 1–14, wobei das Ethylenimin-Oligomer ein substituiertes Ethylenimin-Oligomer ist.

16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das substituierte Ethylenimin-Oligomer die allgemeine Formel  $\beta\text{-Hal-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH)}_n\text{H}$  hat, wobei Hal Halogen bedeutet und n eine Zahl von 2 bis 4 bedeutet.

17. Verwendung nach den Ansprüchen 1–16, wobei das Ethylenimin-Oligomer bei etwa 0,0001 M bis etwa 0,015 M und bei etwa 4°C bis etwa 30°C für etwa 1 Stunde, 5 Stunden, 50 Stunden, 100 Stunden, 300 Stunden oder 500 Stunden verwendet wird.

18. Verwendung nach den Ansprüchen 1–17, wobei das Ethylenimin-Oligomer bei etwa 0,0001 M bis etwa 0,010 M verwendet wird.

19. Verwendung nach den Ansprüchen 1–18, wobei der pH bei etwa 6,9 bis etwa pH 8,5 liegt.

20. Verwendung nach den Ansprüchen 1–19, wobei der pH bei etwa 7,0 bis etwa pH 8,0 liegt.

21. Verwendung nach den Ansprüchen 1–20, wobei der pH bei etwa 7,5 liegt.

22. Verwendung nach den Ansprüchen 1–18, wobei das Ethylenimin-Oligomer bei etwa 0,007 M und bei

einem pH von etwa 7,0 bis etwa pH 8,0 verwendet wird.

23. Verwendung nach den Ansprüchen 1–22, wobei Nukleinsäuremoleküle in der biologischen Zusammensetzung selektiv modifiziert werden.

24. Verwendung nach den Ansprüchen 1–23 in einer Vorrichtung zum Sammeln von Blut.

25. Verwendung nach den Ansprüchen 1–3 oder 6–23, wobei die biologische Zusammensetzung ein Konzentrat von roten Blutkörperchen ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

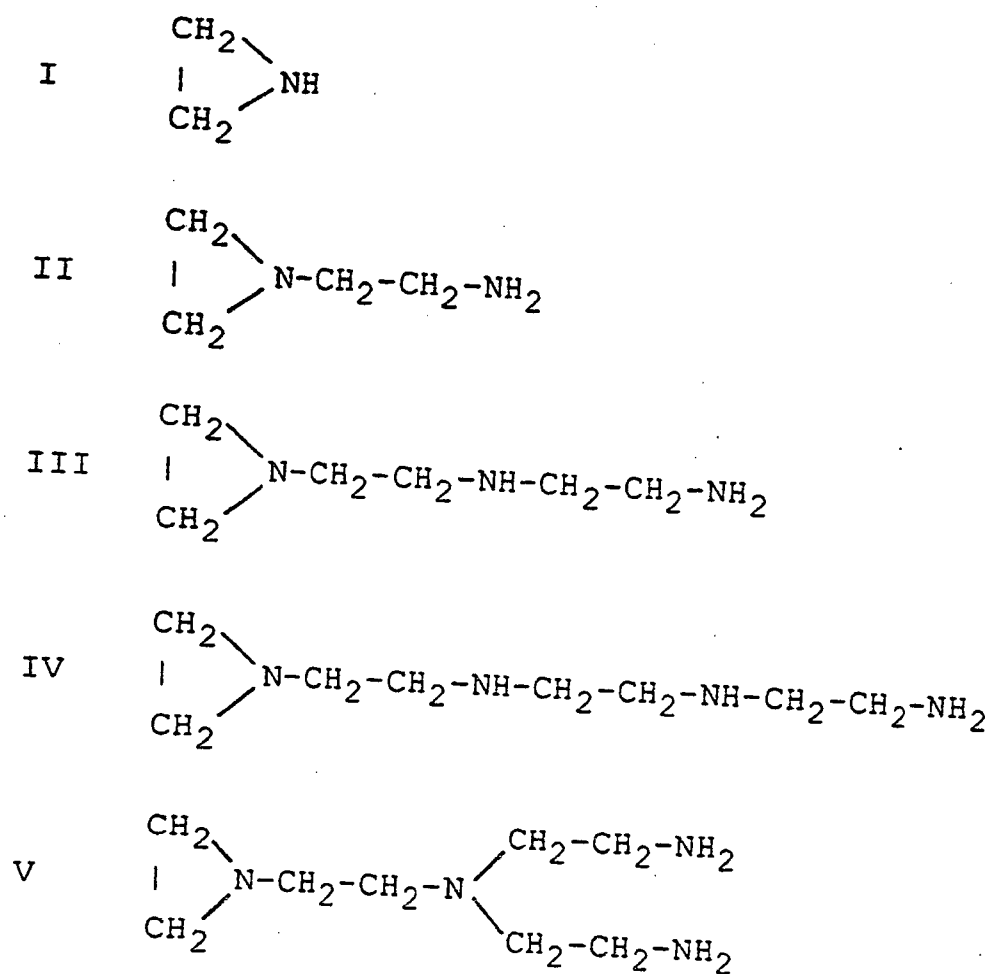
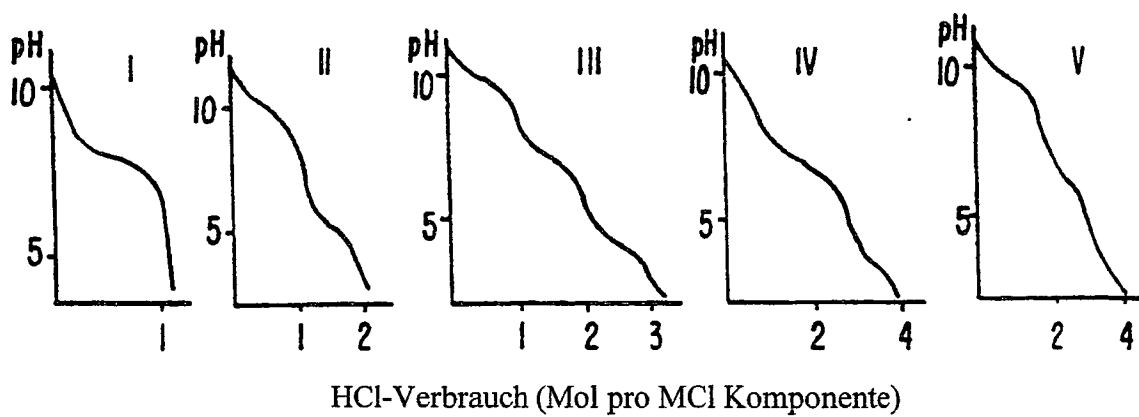
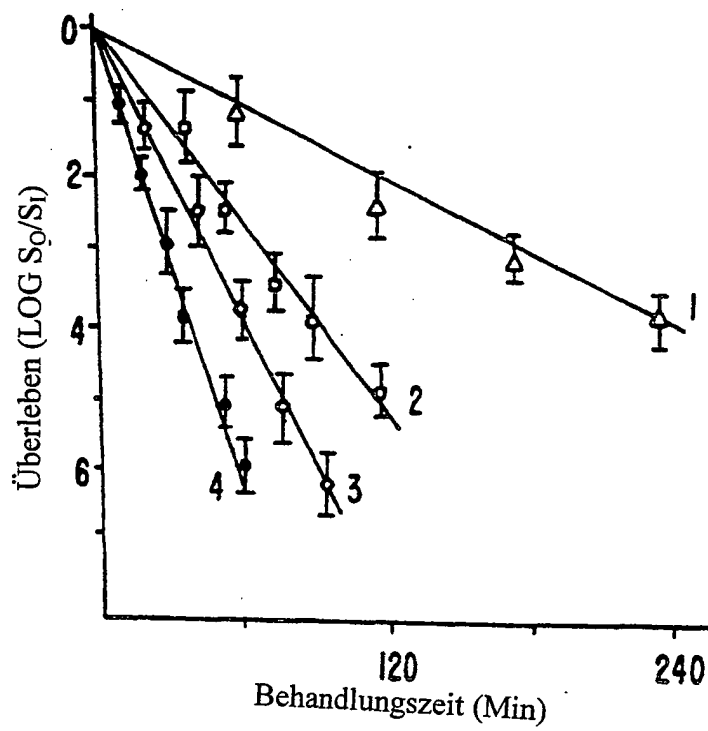


FIG. 1.



**FIG. 2.**



**FIG. 3.**

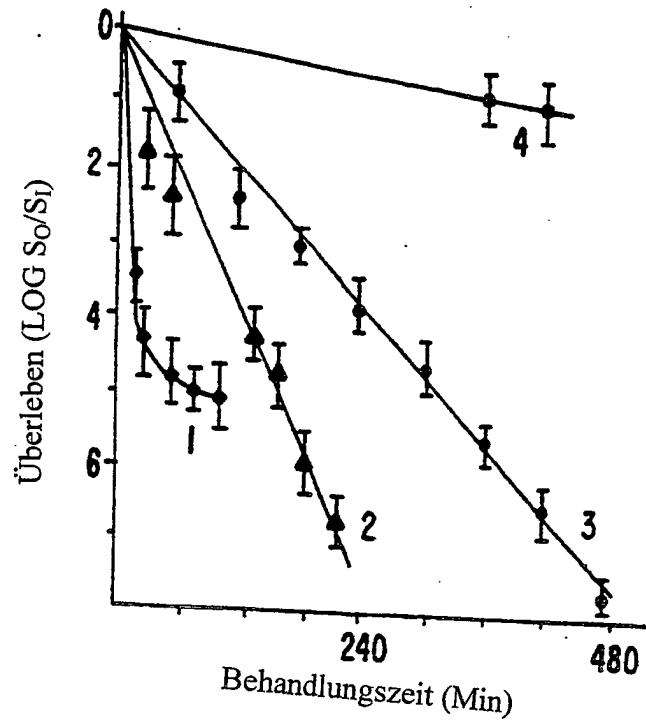


FIG. 4.