Изобретение относится к способу инактивации вирусов и уничтожения лейкоцитов в суспензиях тромбоцитов посредством комбинации фотодинамического лечения и облучения УФ-В лучами.

Известно, что терапевтическое применение препаратов крови скрывает в себе тот риск, что реципиенты препарата крови инфицируются вирусами. Назовем, например, вирусы гепатита - вирусы В (HBV) и С (HCV), а также возбудители спида HIV-1 и HIV-2. Риск всегда имеет место тогда, когда при изготовлении препарата не принимаются меры для инактивации или выделения вирусов.

С очищенными концентратами протеина' плазмы, например альбумином, препаратами фактора VIII и фактора IX применяются способы инактивации или выведения вирусов так, что они считаются надежными от вирусов. Также можно, по меньшей мере, уменьшить риск от вирусов в свежей плазме разными методами. Один метод заключается, например, в карантинном хранении. При этом плазма хранится в течение 3-6 месяцев замороженной и выдается для применения только тогда, когда новая проба крови соответствующего донора снова проверена на общепринятые маркеры для HBV, HCV, HIV-1 и HIV-2 и признана отрицательной. Подобный метод не применим для клеточных продуктов крови, например концентратов эритроцитов и тромбоцитов, так как они имеют жизнеспособность только в течение 7 недель или 5 дней. Клеточные продукты крови по вполне понятным причинам также нельзя обезопасить от вирусов обработкой растворителями и детергентами, как это можно сделать в концентратах протеина плазмы, а также в плазме: эритроциты и тромбоциты в результате этого были бы лизированы.

Осуществляются интенсивные работы над тем, чтобы дезактивировать клеточные продукты крови фотодинамическим способом. Фотодинамическая инактивация вирусов основана на том, что соответствующий препарат в растворе или суспензии освещают в присутствии фотоактивного вещества, фотосенсибилизатора. Поглощенный свет должен иметь длину волны, которая поглощается фотоактивным веществом. Тем самым он активируется и передает эту энергию активации или непосредственно на субстрат, который вследствие этого разрушается или повреждается, или же на молекулы кислорода: активированные виды кислорода, то есть радикалы кислорода или синглетный кислород, действуют с очень сильным антивирусным эффектом. В благоприятном случае использованное фотоактивное вещество имеет высокое сродство с составными частями вирусов, например с вирусной нуклеиновой кислотой, и только минимальное с прочими компонентами, которые содержатся в данном препарате. Таким образом, вирусы инактивируются, а другие компоненты не изменяются. Широкое применение находит в настоящее время только фотодинамический способ в соответствии с европейским патентом 0 491 757-B1 (H. Mohr и B. Lambrecht, Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blut und Blutprodukten). Он применяется для инактивации вирусов в свежей плазме. В качестве фотоактивного вещества в техническом использовании применяется прежде всего фенотиазиновый краситель фенотиазин метиленовый синий. Вместо метиленового синего можно применять также толуидиновый синий. Также деметилирующие продукты метиленового синего, то есть азуровые красители А, В и С, а также тионин являются фотодинамически активными и пригодными для фотодинамической инактивации вирусов.

Патент США US 5,545,516 (S.J. Wagner: Inactivation of extra-cellular enveloped viruses in blood and blood components by phenthiazin-5-ium dyes plus light) описывает инактивацию внеклеточных вирусов с помощью фенотиазиновых красителей в комбинации с видимым светом. В соответствии с US 5,545,516 препараты перед фотодинамической обработкой с помощью специальных фильтров освобождаются от лейкоцитов, так как способ инактивации вирусов не охватывает ассоциированные с клетками вирусы и провирусы. Способ также не в состоянии инактивировать имеющиеся в крови малые вирусы без оболочки, например вирусы гепатита А (HAV). Свободные вирусы, имеющие липидные оболочки, например\, возбудитель спида HIV-1 и вирусы гепатита В и С (HBV, HCV), в противоположность этому способу могут инактивироваться. Также из WO 00/04930 и WO 96/08965 известны способы инактивации патогенов в биологических пробах, использующие фотоактивные вещества, которые абсорбируются в диапазоне УФ-А и активируются облучением в диапазоне длин волн от УФ-А до видимого диапазона.

Лейкоциты в продуктах крови могут быть уничтожены с помощью ультрафиолетового облучения. Для этого в суспензиях тромбоцитов целесообразно применение облучения УФ-В лучами (диапазон длин волн 290-320 нм), так как для снижения лейкоцитов, как правило, достаточно количества энергии 1-3 Дж/см^2, которое не оказывает слишком большое влияние на тромбоциты, поэтому их можно применять в терапевтических целях. Количество энергии облучением УФ-В лучами более 10 Дж/см^2 дополнительно действует вируцидно (K.N. Prodoux; J.C. Fratanoni, E.J. Boone и R.F. Bonner в Blood, 70(2), 589-592 (1987): Use of Laser-UV for inactivation of virus in blood products). Правда, при этом тромбоциты повреждаются так, что необходимо поставить под сомнение их применимость (J.C. Fratanoni и K.N. Prodoux в Transfusion 30(6); 480-481 (1990): Viral inactivation of blood products).

Таким образом, задача изобретения заключается в том, чтобы предоставить в распоряжение эффективный способ инактивации патогенных для человека вирусов и лейкоцитов в суспензиях тромбоцитов, в частности концентратах тромбоцитов (ТК). Концентраты тромбоцитов получают из донорской крови путем дифференциального центрифугирования или непосредственно от доноров путем машинного афереза тромбоцитов. Неожиданным образом было обнаружено, что комбинация фотодинамической обработки с облучением УФ-В лучами тробоцитов в суспензиях или концентратов тромбоцитов эффективно охватывает доступные для фотодинамической инактивации вирусы и одновременно может уничтожить содержащиеся в средах лейкоциты и тем самым уничтожает риск инфекции ассоциированными с клетками вирусами и провирусами. Кроме того, неожиданным образом было обнаружено, что посредством комбинации методов необходимая для уничтожения лейкоцитов интенсивность излучения УФ-В лучами может быть значительно ниже, чем при облучении только УФ-В лучами. Также неожиданно было то, что дополнительная обработка суспензий тромбоцитов УФ-В лучами с интенсивностью, которая сама по себе почти неэффективна при инактивации вирусов, значительно повышает эффективность фотодинамической обработки.

Способ в соответствии с изобретением для обработки суспензии тромбоцитов отличается следующим образом:

A) суспензию периодически подвергают облучению с диапазоном длин волн 400-750 нм, предпочтительно 550-700 нм, в присутствии одного или нескольких фотоактивных веществ, имеющих в диапазоне длин волн одно или несколько максимальных значений поглощения, и

B) суспензию периодически подвергают облучению с диапазоном длин волн 270-320 нм, предпочтительно с вводом энергии в количестве 0,1-10 Дж/см^2, причем операции (A) и (B) применяют в любой очередности и/или с перекрыванием времени, а в операции (B) отсутствует вещество, фотоактивируемое в диапазоне длин волн облучения в соответствии с операцией (B). Предпочтительные варианты выполнения являются предметом зависимых пунктов или независимого п.13 формулы изобретения.

Суспензия тромбоцитов предпочтительно имеет концентрацию более 5x10^8 тромбоцитов в мл, в частности, предпочтительно более 10^9/мл. Тромбоциты могут быть взвешены, например, в плазме или в среде хранения тромбоцитов с любым содержанием плазмы.

Операция A включает в себя фотодинамическую обработку суспензии тромбоцитов в присутствии фотоактивного вещества видимым светом; операция B включает облучение препарата - содержащей тромбоциты суспензии - светом в диапазоне длин волн УФ-В. В качестве УФ-В диапазона длин волн излучения согласно изобретению рассматривается диапазон длин волн 270-330 нм.

Концентрация примененного фотоактивного вещества и количество энергии, вводимой облучением световыми или УФ-В лучами, выбираются такими, что имеющиеся вирусы инактивируются и содержащиеся в суспензиях тромбоцитов лейкоциты убиваются, а функциональная способность тромбоцитов сохраняется.

В качестве емкостей для обработки суспензий тромбоцитов служат проницаемые для УФ-В излучения емкости, которые состоят предпочтительно из синтетического материала и могут иметь, например, форму пакета. Возможно также производить фотодинамическую обработку и обработку УФ-В излучением в разных емкостях.

Возможно также производить обработку УФ-В излучением суспензий тромбоцитов, в то время как суспензии тромбоцитов переносятся из одной емкости в другую.

В качестве фотоактивных веществ можно использовать, например, фенотиазиновые красители метиленовый синий, азуровый A, B, C и тионин. Другие фотоактивные вещества также с преимуществом применимы, например, в концентрациях, известных из литературных источников для инактивации вирусов в продуктах крови. Для фенотиазиновых красителей, например тионина, возможный диапазон концентраций составляет приблизительно около 0,1-10 μM, предпочтительно около 0,5-5 μM или 1-5 μM.

В качестве источника света для фотодинамической обработки, в частности, при использовании тионина служат предпочтительно натриевые лампы низкого давления, максимальное значение светового излучения которых составляет 590 нм. Это соответствует приблизительно максимальному значению поглощения тионина, которое в водном растворе составляет приблизительно 595 нм. Возможны также другие источники света, в частности тогда, когда применяется фотоактивное вещество, которое поглощает свет в другом диапазоне длин волн чем, например, тионин.

Для облучения УФ-В лучами можно применять специальные трубки, лампы или лазеры, которые испускают ультрафиолетовый свет в диапазоне длин волн приблизительно 270-330 нм. Количество энергии, вводимой облучением УФ-В лучами, может составлять 0,1-10 Дж/см^2, предпочтительно 0,3-6 Дж/см^2, особенно предпочтительно 0,5-3 Дж/см^2.

Примеры опытов

1. Общие положения

Нижеописанные опыты проведены с концентратами тромбоцитов, которые были изолированы из отдельных проб донорской крови и суспензированы в плазме крови. В качестве фотоактивного вещества был применен тионин

(Th). Похожие результаты можно получить также с другими фотоактивными веществами, например с фенотиазиновыми красителями метиленовым синим и их производными азуром A, B и C. Примерами опытов изобретение только объясняет, но не ограничивает его объем.

2. Материалы и методы

Использованные в опытах концентраты тромбоцитов сохранялись в ротаторах до 5 дней. Емкости для хранения представляли собой имеющиеся в торговле поливинилхлоридные пакеты. Для фотодинамической обработки и обработки облучением УФ-В лучами концентраты тромбоцитов были перемещены в пластиковые пакеты из полиолефина, пленочный материал которых проницаем для УФ-В лучей. Для облучения световыми лучами в присутствии тионина использована установка, оборудованная натриевыми лампами низкого давления. Концентраты тромбоцитов освещались с обеих сторон. Для облучения УФ-В лучами был применен плоскостный излучатель, снабженный ультрафиолетовыми трубками, излучающими преимущественно ультрафиолетовый свет в диапазоне длин волн 290-320 нм.

В качестве вируса для опыта использован в общем вирус везикулярного стоматита (VSV), который легко распространяется в культуре клеток и вследствие этого можно определить его количество в анализе цитопатического эффекта CPE (CPE - цитопатический эффект). Кроме того, в опыте 1 был использован еще ряд других вирусов. Вирус (VSV) был распространен в vero-клетках. Те же клетки были применены для анализа инфекционности, с помощью которых определяются титры вирусов. Использованной средой для культуры клеток была RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиком. Анализы проводились в микротитровых пластинках. Соответствующие пробы были разбавлены за 1-3 приема. На одно разбавление были тестированы 8 реплик. Титры вирусов выражены в виде $\log_{10}TCID_{50}$ (TCID=Tissue Culture Infective Doses) и были рассчитаны в соответствии с данными Kärber и "Spearman (G. Kärber in Naunim-Schmiedebers Auch. Exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480-483 (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche; C. Spearman in Br. J. Psychol. 2, 277-282 (1908): The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss for mulae).

В качестве функциональных тестов для тромбоцитов были применены гипотоническая шоковая реакция и индуцированная коллагеном агрегация.

Одноядерные клетки были изолированы из крови донора с помощью центрифугирования градиентов плотности. В соответствующих экспериментах они были добавлены в суспензии тромбоцитов в концентрации $5x10^5$/мл. После фотодинамической обработки и/или облучения УФ-В лучами аликвотные пробы суспензий были подвергнуты центрифугированию с низкой скоростью вращения (1500 rpm за 4 мин). Гранулированные клетки были трижды вымыты средой культуры клеток (RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиком) и затем повторно взвешены в той же среде. Концентрация клеток была установлена на $5x10^5$/мл. Для анализа пролиферации клетки стимулировали конканавалином A (CoA, 2μг/мл) и культивировали в 200 μл-аликвотной пробе в течение 3-4 дней при температуре 37°C в термостате с CO_2. Затем добавили в культуры клеток. Через 4 ч спектрально-фотометрическим методом была определена доля встраивания BRDU (BRDU=Brom-Deoxyuridin бромдезоксиуридин) при длине волны 450 нм (OD_{450}). Значения экстинкции (светопоглощения) пропорциональны встраиванию BRDU и тем самым жизнеспособности клеток.

Опыт 1. Инактивация вирусов в концентратах тромбоцитов посредством обработки тионином/светом.

Ряд вирусов был исследован на то, инактивируются ли они и в какой мере обработкой тионином/светом. Концентрация фотоактивного вещества составляла 1 μM. Как показывают обобщенные в табл. 1 результаты, различные вирусы оказались чувствительными по-разному: так, вирусы-модели для вируса гепатита с человека BVDV и CSFV, а также вирус toga SFV были полностью инактивированы через 5 мин облучения световыми лучами, а инфекционность VSV и SV-40 еще не была устранена полностью и через 30 мин.

Опыт 2. Инактивация VSV в концентрате тромбоцитов посредством облучения УФ-В лучами.

Как видно из табл. 2, VSV имеет большое сопротивление по отношению к облучению УФ-В лучами. Еще через 60 мин или после ввода энергии в количестве приблизительно 20 Дж/см^2 вирус был инактивирован не полностью. В противоположность этому, начиная с 10 мин или 3 Дж/см^2, облучение ультрафиолетовыми УФ-В лучами действовало отрицательно на функции и способность к сохранению тромбоцитов (не показано).

Вирус	VSV	CSFV	BVDV	SFV
Семейство	Rhabdo	Flavi	Flavi	Toga
Геном	ssRNA	ssRNA	ssRNA	ssRNA
Время облучения, мин	30	≥5	≥5	≥5
Уменьшение титра вируса	4,4	≥5,5	≥4,9	≥5,2

Вирус	HIV-1	SVH-1	SV-40
Семейство	Retro	Herpes	Papova
Геном	ssRNA	dsDNA	dsDRNA
Время облучения, мин	30	10	30
Уменьшение титра вируса	≥5,7	≥3,6	≥3,95

Таблица 1. Фотодинамическая инактивация вирусов в концентратах тромбоцитов путем обработки тиомином и светом. VSV=Vesicular Stomatitis-Virus; CSFV=Classical Swine Fever-Virus; BVDV=Bovines Virales Diarrhoe-Virus; SFV=Semliki Forest-Virus; HIV-1=Humanes Immundefizienz-Virus, Тип 1; SHV-1=Suid Herpes-Virus; SV-40=Simian-Virus40; ssRNA=Single Strand RNA; dsDNA=Double Strand DNA, * уменьшение титра вируса в $\log_{10}TCID_{50}$.

УФ-В, мин	Дж/см^2	Титр вируса $Log_{10}TCID_{50}$	Коэффициент восстановления $Log_{10}TCID_{50}$
0	0	6,44	0
10	3,25	5,48	0,96
20	6,5	4,53	1,91
30	9,75	4,35	2,09
40	13	3,28	3,16
50	16,25	2,33	4,11
60	19,50	1,61	4,83

Таблица 2. Инактивация VSV в концентратах тромбоцитов путем облучения УФ-В лучами.

Опыт 3. Инактивация VSV в концентратах тромбоцитов комбинацией тионина/света и облучением УФ-В лучами.

В данных опытах концентрация тионина составляла также 1 μM и время облучения 30 мин. Количество энергии, введенной облучением УФ-В лучами, составляло 2,4 Дж/см^2 (время облучения: 8 мин). Только вследствие фотодинамической обработки инфекционность снизилась на 4 или 4,42 $\log_{10}$, только облучением УФ-В лучами на 1,97 или 2,21 $\log_{10}$. В комбинации в первом опыте инфекционность была полностью устранена (≥7,04 $\log_{10}$), во втором уменьшена на 6,26 $\log_{10}$ (табл. 3).

Тионин/свет	УФ-В	Инфекционность ($\log_{10}LTCID_{50}$)	
		Опыт 1	Опыт 2
-	-	7,28±0,29	6,68±0,21
+	-	2,86±0,31	2,68±0,12
-	+	5,07±0,12	4,71±0,17
+	+	≤0,24±0,0	0,42±0,21

Таблица 3. Инактивация VSV в концентратах тромбоцитов тионином/светом, облучением УФ-В лучами и комбинацией обеих операций.

Опыт 4. Влияние обработки тионином/светом в комбинации с УФ-В лучами на функции тромбоцитов.

Как показывают табл. 4 и 5, как HSR (гипотоническая шоковая реакция), так и наведенная коллагеном агрегация концентратов тромбоцитов испытывает несущественно большее влияние от комбинированной обработки тионином/светом и УФ-В лучами (условия опыта: см. опыт 3) по сравнению только с фотодинамической обработкой.

№ обработки	Опыт 1		Опыт 2		Опыт 3	
	День 1	День 3	День 1	День 3	День 1	День 3
1. Контроль	79,98	63,07	66,71	60,78	78,16	62,59
2. Тионин/свет	65,49	49,16	56,24	52,61	69,30	55,49
3. УФ/В (2,4 Дж/см^2)	61,06	57,09	56,26	48,80	65,67	52,49
4. Тионин/свет+УФ-В	47,86	51,16	42,37	30,26	54,45	48,31

Таблица 4. Влияние обработки суспензий тромбоцитов тионином/светом±УФ-В облучением на гипотоническую шоковую реакцию (выражено в %), измеренное в 1 день и в 3 день после обработки.

№ обработки	Опыт 1		Опыт 2		Опыт 3	
	День 1	День 3	День 1	День 3	День 1	День 3
1. Контроль	88,00	23,00	83,33	30,00	79,67	30,33
2. Тионин/свет	73,25	13,75	84,67	27,67	69,67	15,67
3. УФ/В (2,4 Дж/см^2)	76,25	11,25	73,33	24,50	75,67	20,00
4. Тионин/свет+УФ-В	69,75	16,75	76,67	53,50	58,33	30,33

Таблица 5. Влияние обработки суспензий тромбоцитов тионином/светом±УФ-В облучением на наведенную коллагеном агрегацию (выражено в %), измеренное в 1 день и в 3 день после обработки.

Опыт 5. Инактивация Т-лимфоцитов в концентрации тромбоцитов УФ-В облучением; влияние тионина/света.

В концентрацию тромбоцитов добавили одноядерные клетки в концентрации 5x10^5/мл; затем их в разное время облучили одними УФ-В лучами или дополнительно обработали тионином/светом (концентрация красителя: 2 μM; продолжительность освещения: 30 мин). Как показывают сведенные в табл. 6 результаты, для полной инактивации клеток достаточно времени облучения, по меньшей мере, 4 мин (1,2 Дж/см^2). Если концентрат тромбоцитов обрабатывался дополнительно тионином/светом, то оно сократилось приблизительно до 3 мин, хотя тионин/свет один не имел влияния на пролиферацию клеток.

№	УФ-В, Дж/см^2	Т/свет	Активация ConA	Абсорбция $OD_{450\ nm}$	Примечания
1	0	0	-	0,276	Отрицательный контроль
2	0	0	+	2,269	Положительный контроль
3	0,6	-	+	1,767	
4	0,9	-	+	0,747	
5	1,2	-	+	0,297	
6	0,6	+	+	1,020	
7	0,9	+	+	0,387	
8	1,2	+	+	0,240	

Таблица 6. Инактивация Т-лимфоцитов в концентрации тромбоцитов облучением УФ-В лучами. Усиление действия предшествующей

обработкой тионином/светом за 30 мин. Клетки были стимулированы ConA после облучения или обработки тионином/светом. Значения $OD_{450\ mm}$ представляют собой средние значения из трехкратного определения. Они представляют доли встраивания BRDU в клетки после 3 дней культивирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обработки суспензии тромбоцитов, включающий в себя следующие операции:

(A) облучение суспензии излучением с диапазоном длин волн 400-750 нм в присутствии одного или нескольких фотоактивных веществ, которые в диапазоне длин волн имеют одно или несколько максимальных значений поглощения, и

(B) облучение суспензии излучением с диапазоном длин волн 270-320 нм с вводом энергии в количестве 0,1-10 Дж/см^2,

причем операции (A) и (B) применяют в любой последовательности и/или с перекрыванием по времени и в операции (B) отсутствует фотоактивное вещество, которое имеет максимальное значение поглощения в диапазоне длин волн облучения в соответствии с операцией (B).

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что фотоактивным веществом является фенотиазиновый краситель.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что в качестве фенотиазиновых красителей используют тионин, метиленовый синий, толуидиновый синий и/или азуровые красители A, B и C.

4. Способ по одному из пп.2 или 3, отличающийся тем, что фотоактивное вещество в операции (A) используют в концентрации 0,5-10 μM, предпочтительно 0,5-5 μM.

5. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что интенсивность излучения в операции (B) выбирают так, чтобы способность к пролиферации Т-лимфоцитов, содержащихся в концентратах тромбоцитов, уменьшалась по меньшей мере на 50%, предпочтительно более чем на 75%.

6. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что в операции (B) количество введенной энергии составляет 0,1-10 Дж/см^2, предпочтительно 0,5-3 Дж/см^2.

7. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что в операции (B) суспензию подвергают облучению в диапазоне длин волн 290-320 нм.

8. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что суспензии тромбоцитов представляют собой концентраты тромбоцитов.

9. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что суспензии тромбоцитов или концентраты тромбоцитов получают из донорской крови или путем афереза тромбоцитов.

10. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что обработку суспензии в соответствии с операцией (A) и/или операцией (B) осуществляют в пластиковых емкостях, проницаемых для соответствующего излучения.

11. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что обработку суспензии в соответствии с операцией (A) и/или операцией (B) осуществляют в проточной аппаратуре, проницаемой для соответствующего излучения.

12. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что концентрацию вирусов суспензии снижают по меньшей мере на 5, предпочтительно по меньшей мере на 6 $\log_{10}$ ступеней.

13. Способ обработки суспензии тромбоцитов, включающий в себя следующие операции:

(A) облучение суспензии излучением с диапазоном длин волн 400-750 нм в присутствии одного или нескольких фотоактивных веществ, которые в диапазоне длин волн имеют одно или несколько максимальных значений поглощения, и

(B) облучение суспензии излучением с диапазоном длин волн 270-320 нм с вводом энергии в количестве 0,1-3 Дж/см^2,

причем операции (A) и (B) применяют в любой последовательности и/или с перекрыванием по времени.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6