

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 164537 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1629/83

(51) Int.Cl.5

A 61 K 35/16

(22) Indleveringsdag: 13 apr 1983

(41) Alm. tilgængelig: 15 okt 1983

(44) Fremlagt: 13 jul 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 apr 1982 US 368250

(71) Ansøger: *NEW YORK BLOOD CENTER INC.; 310 East 67th Street; New York; New York 10021, US

(72) Opfinder: Alfred Mayer *Prince; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Fremgangsmåde til inaktivering af hepatitis-B-virus eller non-A, non-B-hepatitisvirus i pattedyrsblodplasma eller pattedyrsplasma proteinopløsninger

(56) Fremdragne publikationer

- EP off.g.skrift nr. 35204
US pat. nr. 4314997

(57) Sammendrag:

1629-83

Pattedyrsblodplasma eller -plasmaderivat, der i det væsentlige er fri for aktive hepatitis-B eller non-A, non-B-virus, indeholder faktor VIII, idet mængden af denatureret faktor VIII i forhold til summen af udenatureret og denatureret faktor VIII er mindre end 50 vægtprocent. Plasmaet steriliseres ved at blive bragt i kontakt med et detergent, en alkohol eller en ether, fortrinsvis en blanding af detergent og ether, sædvanligvis efterfulgt af fjernelse af det virusinaktiverende middel.

DK 164537 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til inaktivering af hepatitis-B eller -non-A, -non-B-virus i pattedyrsblodplasma eller i pattedyrs-plasmaproteinopløsninger. Blodplasmaet eller plasmaproteinopløsningen bliver herved i det væsentlige fri for aktiv hepatitisvirus på en
5 sådan måde, at de værdifulde proteiner, som er til stede i blodplasmaet såsom faktor VIII, ikke væsentligt denatureres.

Der er gjort adskillige forsøg på at inaktivere virus såsom hepatitis-B-virus (HBV) i blodplasma fra pattedyr, især mennesker. Det er praksis i nogle lande at forårsage inaktivering af hepatitis-B-virus
10 i blodplasma ved at lade plasmaet komme i kontakt med et virusinaktiverende middel af den type, der bliver tværbundet med den proteinholdige del af hepatitis-B-viruset, eller som samvirker med virusets nucleinsyre. Det er fx kendt at forsøge at inaktivere hepatitis-B-virus ved kontakt med et aldehyd såsom formaldehyd, hvorved der sker
15 en tværbinding til proteinet, og hepatitis-B-viruset inaktiveres. Det er også kendt at forårsage inaktivering af viruset ved kontakt med β -propiolacton (BPL), et middel, der indvirker på virusets nucleinsyre. Det er endvidere kendt at anvende ultraviolet lys, især efter β -propiolactonbehandling.

20 Uheldigvis har disse midler kun en begrænset evne til at inaktivere vira og har også en skadelig virkning på andre værdifulde proteinbestanddele i plasmaet. Ved sådanne inaktiveringsmetoder inaktiveres eller denatureres fx faktor VIII i et omfang af 50-90% eller mere af den faktor VIII, der findes i ubehandlet plasma. På grund af de denaturerende virkninger af disse virusinaktiverende midler er det
25 nødvendigt ved fremstilling af derivater til administration til patienter at koncentrere store mængder plasma, for at det materiale, der administreres til patienten, har en tilstrækkelig koncentration af det udenaturerede protein til effektiv terapeutisk behandling.

30 Denne koncentration påvirker imidlertid ikke nedsættelsen af mængden af denatureret protein. Som følge heraf modtager patienten ikke alene det udenaturerede protein, men også en mængde denatureret protein, der ofte er mange gange højere end mængden af det udenaturerede protein.

Hvis der fx som følge af inaktivering af hepatitis-B-virus i humant blodplasma med β -propiolacton fås et plasma, hvis faktor VIII er blevet inaktiveret med 75%, er de resterende 25% faktor VIII derfor til stede i en så lille koncentration, målt som en funktion af selve plasmaet, at det er nødvendigt at koncentrere store mængder faktor VIII for at tilvejebringe en tilstrækkelig koncentration til, at den er af terapeutisk værdi. Da sådanne separationsteknikker ikke effektivt fjerner denatureret faktor VIII fra udenatureret faktor VIII, kan det materiale, der administreres til patienten, indeholde mere denatureret protein end udenatureret protein. En sådan inaktivering er selvfølgelig værdifuld ud fra det synspunkt, at risikoen for hepatitis-B-virusinfektion nedsættes, men kræver forarbejdning af store mængder plasma og giver et væsentligt tab af værdifulde proteinbestanddele. Administration af store mængde denaturerede proteiner kan endvidere gøre disse antigene over for værten og således forårsage autoimmune sygdomme, fx reumatoid arthritis, eller antistof over for selve den denaturerede faktor VIII.

Tabet af disse værdifulde proteinbestanddele er ikke begrænset til faktor VIII, som er det mest ustabile af de værdifulde proteiner i pattedyrs blodplasma. En tilsvarende proteindenaturering finder sted med hensyn til de nedennævnte andre værdifulde plasmabestanddele: koagulationsfaktor II, VII, IX, X, plasminfibrinogen, IgM, etc.

Faktor VIII bliver imidlertid denatureret i større omfang end de øvrige værdifulde proteiner, der findes i blodplasma.

Som følge af det ovenstående er det undtagen ved fremstilling af serumalbumin og en stabil plasmaproteinopløsning, der kan tåle pasteurisering, for tiden praksis i USA, hvad angår forarbejdning af blodplasma og derivater deraf, at undgå at sterilisere plasmaet til inaktivering af hepatitisvirus. Som følge heraf er modtagere af faktor VIII, gammaglobulin, faktor IX, fibrinogen, etc., nødt til at acceptere den risiko, at de værdifulde proteinbestanddele, der administreres, kan være kontamineret med hepatitisvirus. Som følge heraf er modtagerne i fare for at blive inficeret med disse virus og blive nødsaget til at udholde de skader, som viruset påfører leveren, med den deraf følgende invaliditet og sygdom, som kan føre til døden.

Den ovenfor beskrevne BPL/UV inaktiveringsmetode er endnu ikke taget i brug i USA af flere grunde, bl.a. fordi mange forskere mener, at BPL i sig selv er skadelig, da det ikke kan fjernes fuldstændigt efter inaktiveringen og således kan forblive i plasmaet og plasma-derivaterne i ikke ubetydelige mængder. BPL har vist sig at være kræftfremkaldende hos dyr.

Der kendes andre metoder til inaktivering af hepatitis-B-virus i plasma, men disse er sædvanligvis upraktiske. En fremgangsmåde omfatter tilsætning af antistoffer til plasmaet, hvorved der dannes et immuncomplex. De omkostninger, der er forbundet med antistofdannelse og rensning, bidrager væsentligt til omkostningerne ved plasmaproduktion; endvidere er der ingen sikkerhed for, at en tilstrækkelig mængde hepatitis-B- eller non-A, non-B-virus inaktiveres. Der findes for tiden ingen test for non-A, non-B-antistoffer (selv om der er en test for viruset), hvorfor det ikke er muligt at vælge plasma, der indeholder høje titre af anti-non-A, non-B-antistof.

Det er klart, at problemerne med inaktivering af hepatitisvirus i plasma er forskellige fra problemerne med inaktivering af selve virus som følge af, at plasmaet samtidig indeholder de ønskelige proteinbestanddele. Medens det er kendt at inaktivere hepatitis-B-virus ved hjælp af tværbindingmidler, fx glutaraldehyd, med nucleinsyrereagerende kemikalier, fx BPL eller formaldehyd, eller oxidationsmidler, fx chlorox (natriumhypochloritopløsning) etc., har man formodet, at disse metoder ikke egner sig til inaktivering af virus i plasma som følge af den iagttagelse, at de fleste af disse inaktiverende midler (natriumhypochlorit, formaldehyd, β -propiolacton) denaturerer de værdifulde proteinbestanddele i plasmaet.

Det er derfor ønskeligt at tilvejebringe en fremgangsmåde til sterilisation af blodplasma eller plasmaproteinopløsninger fra pattedyr, hvilken fremgangsmåde i det væsentlige ikke forårsager denaturering af de værdifulde bestanddele i plasmaet, og som ikke medfører anvendelsen af et potentielt kræftfremkaldende middel. Det er især ønskeligt at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af blodplasma eller plasmaproteinopløsninger, i hvilke alle de tilstede-

værende hepatitisvirus er inaktiveret, og i hvilke denatureret protein såsom faktor VIII kun udgør en ringe mængde af den samlede mængde af disse proteiner i plasmaet eller i plasmaopløsningen.

En yderligere fordel ved de foreslåede fremgangsmåder er, at plasma
5 eller plasmaproteinopløsninger behandlet på denne måde er fuldstændig klare og gennemsigtige som følge af fjernelse af plasmalipider. Endvidere bevares klarheden på ubestemt tid ved lagring ved 4°C. Dette frembyder væsentlige fordele fremfor ubehandlet plasma eller plasmaproteinopløsninger, idet

10 1) det let bliver muligt at detektere kontaminering med bakterier ved eftersyn, hvilket er vanskeligt i uklare suspensioner, og

2) udvikling af mikroaggregater af udfældede lipoproteiner, der normalt opstår ved opbevaring i kulde af ubehandlet plasma eller plasmaproteinopløsninger, forhindres, hvorved de potentielt ugunstige virkninger ved infusion af sådanne mikroaggregater, der kan sætte sig
15 fast i lunge-, nyre- eller hjernekapillarerne og blokere disse, undgås.

Sluttelig muliggør de foreslåede fremgangsmåder inaktivering af virusinfektioner i plasma eller i plasmaproteinopløsninger, som
20 stammer fra kroniske bærere af hepatitis- B-virus, hvilket muliggør en sikrere fremstillingsproces og et sikrere produkt. De ovenfor beskrevne ideer og bevæggrunde er vist i fig. 1.

Det har nu overraskende vist sig, at medens de fleste virusinaktiverende midler denaturerer faktor VIII og andre værdifulde blodplasma-
25 proteiner, har ikke alle virusinaktiverende midler en sådan virkning. Det har vist sig, at hvis blodplasmaet eller plasmaproteinopløsningen behandles med et præparat bestående af en ether og et ikke-ionisk detergent, inaktiveres de hepatitis-virus, der findes i plasmaet eller plasmaproteinopløsningen, i det væsentlige fuldstændigt,
30 uden at der sker nogen væsentlig denaturering af andre proteiner. Fremgangsmåden er derfor ejendommelig ved, at plasmaet eller plasmaproteinopløsningen bringes i kontakt med et virusinaktiverende middel bestående af en ether og et ikke-ionisk detergent. Fremgangsmåden

efterfølges af fjernelse af de inaktiverende midler, og således bliver både hepatitis-B- og -non-A, -non-B- virus i det væsentlige inaktiveret, og vægtprocentdelen af den denaturerede faktor VIII i plasmaet eller plasmaproteinopløsningen er mindre end 30-50% baseret på den samlede mængde af denatureret og udenatureret faktor VIII deri. Før behandlingen har en pulje af humant blodplasma sædvanligvis et indhold af aktive hepatitis-B-virus på mellem 10^1 og 10^3 viruspartikler pr. ml samt væsentlige (10^1 - 10^2) mængder non-A, non-B-viruspartikler. Efter behandlingen er der ikke nogen levende viruspartikler tilbage.

Ved sådanne fremgangsmåder tilvejebringes blodplasma eller plasmaproteinopløsninger fra pattedyr, der indeholder faktor VIII, hvor vægtprocentdelen af denatureret faktor VIII i forhold til summen af udenatureret faktor VIII og denatureret faktor VIII er mindre end 30-50%, hvilke plasma eller plasmaproteinopløsninger ikke indeholder hepatitis-B- eller non-A, non-B-virus.

Pattedyrs blodplasma indeholder fortrinsvis mindre end 50 vægtprocent denatureret faktor VIII baseret på summen af denatureret og udenatureret faktor VIII deri. Det foretrækkes især, at denne værdi er mindre end 15, fortrinsvis mindre end 10 vægtprocent. Ved hensigtsmæssig forarbejdning kan man reducere mængden af denatureret faktor VIII til mindre end 5 vægtprocent, især mindre end 3 vægtprocent, fortrinsvis mindre end 2 vægtprocent baseret på den samlede vægt af denatureret og udenatureret faktor VIII.

Ved inaktiveringsfremgangsmåden ifølge opfindelsen inaktiveres i det væsentlige alle hepatitisvirus i blodplasmaet eller plasmaproteinopløsningen. Metoden til bestemmelse af infektivitetsniveauer ved in vivo tests på chimpanser er beskrevet af Prince, A.M., Stephen, W., Brotman, B. og van den Ende, M.C., "Evaluation of the Effect of Beta-propiolactone/Ultraviolet Irradiation (BPL/UV): Treatment of Source Plasma on Hepatitis Transmission by Factor IV Complex in Chimpanzees", *Thrombosis and Haemostasis* 44, 1980, side 138-142.

Det inaktiverede hepatitisvirus inaktiveres ved behandlingen med de her omhandlede specifikke inaktiverende midler og inaktiveres ikke på

grund af, at plasmaet indeholder antistoffer, der binder til hepatitisvirus og danner immuncomplexer, selv om dette også kan forekomme.

Behandling af plasmaet eller plasmaproteinopløsningen omfatter til-
sætning af virusinaktiverende midler bestående af en ether og et
5 ikke-ionisk detergent. Som følge af denne behandling kan der være en
lille restmængde tilbage af et sådant ikke-ionisk detergent eller
ether. Blodplasmaet kan derfor indeholde en restmængde af ether eller
ikke-ionisk detergent, men denne ether eller ikke-ioniske detergent
findes i en koncentration på mindre end 1%, fortrinsvis mindre end
10 0,001%.

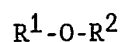
Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan plasma fra donorer samles i
en pulje uden særlige forholdsregler for at sikre, at plasma, som in-
deholder aktivt hepatitis-B-virus, ikke sættes til puljen. Dette
letter forarbejdningen af plasmaet og gør det muligt at eliminere
15 flere trin, herunder tidlig testning af hver halve liter blod, som
modtages fra donoren. Dette gør det muligt at forarbejde store mæng-
der plasma ledsaget af en nedsættelse af omkostningerne.

Ved forarbejdning af plasma inaktiveres hepatitisvirus ved behandling
med et virusinaktiverende middel bestående af en ether og et ikke-
20 ionisk detergent. Generelt benyttes i fremgangsmåden ifølge opfindel-
sen fortrinsvis mindst 0,1 vægtprocent virusinaktiverende middel ba-
seret på rumfanget af det plasma eller de plasmaproteinopløsninger
der skal behandles.

Etheren kan tilsættes i en mængde på 5-50 volumenprocent, fortrinsvis
25 20-40 volumenprocent, baseret på rumfanget af det plasma eller de
plasmaproteinopløsninger, som skal behandles.

Opløsningen, dispersionen eller suspensionen af det inaktiverende
middel har sædvanligvis en pH-værdi på 6,0-8,0.

Særligt foretrukne ethere til anvendelse ved inaktivering ved frem-
30 gangsmåden ifølge opfindelsen er ethere med den almene formel



hvor R^1 og R^2 uafhængigt af hinanden betegner C_{1-18} -alkyl eller -alkenyl, som kan indeholde et oxygen- eller svovlatom i kæden, især C_{1-8} -alkyl eller -alkenyl. Særligt foretrukne ethere er dimethylether, diethylether, ethylpropylether, methylbutylether, methylisopropylether og methylisobutylether.

Egnede ikke-ioniske detergenter omfatter sådanne, som ved omgivelsestemperatur dispergerer op til 0,1 vægtprocent fedt i en vandig opløsning, som indeholder 0,1 vægtprocent fedt, når der tilsættes 1 g pr. 100 ml detergent deri. Særligt velegnede detergenter omfatter polyoxyethylenderivater af fedtsyrer, partielle estere af sorbitol-anhydrider, fx de produkter, der er kendt under navnet Tween®80 og Tween®20, ikke-ionisk olieopløseligt, vandopløseligt detergent som det, der sælges kommercielt under navnet Triton®X100. Natriumdeoxycholat er også egnet såvel som "Zwittergenterne", som er syntetiske zwitterioniske detergenter, der er kendt som "sulfobetainer" såsom N-dodecyl-N,N-dimethyl-2-ammonio-1-ethansulfonat og dermed beslægtede forbindelser eller ikke-ioniske detergenter såsom octyl- β -D-glucopyranosid.

Andre egnede ikke-ioniske detergenter er sådanne, som har ca. 15-35, især ca. 18-33, oxyethylenenheder i molekylet, især i nærværelse af et mercaptanreduktionsmiddel såsom fx mercaptoethanol, dithiothreitol, dithioerythritol og dithiooctansyre. Egnede ikke-ioniske overfladeaktive midler er oxyethylerede alkylphenoler, polyoxyethylen-sorbitanfedsyreestere, polyoxyethylen-syrer, polyoxyethylenalkoholer, polyoxyethylenolier og polyoxyethylen-oxypropylenfedsyrer. Specifikke eksempler herpå er følgende:

alkylphenoxypolyethoxy-(30)-ethanol,
polyoxyethylen-(2)-sorbitan-monolaurat,
polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monopalmitat,
polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monostearat,
polyoxyethylen-(20)-sorbitan-tristearat,
polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monooleat,
polyoxyethylen-(20)-sorbitan-trioleat,
polyoxyethylen-(20)-palmitat,

- polyoxyethylen-(20)-laurylether,
polyoxyethylen-(20)-cetylether,
polyoxyethylen-(20)-stearylether,
polyoxyethylen-(20)-oleylether,
5 polyoxyethylen-(25)-hydrogeneret ricinusolie,
polyoxyethylen-(25)-oxypropylen-monostearat.

Behandling af plasma eller plasmaproteinopløsninger med det inaktiverende middel udføres ved en temperatur på mellem -5°C og 50°C, fortrinsvis mellem 1°C og 4°C i mindst 1 minut, fortrinsvis mindst 16
10 timer og sædvanligvis i 16-24 timer. Behandlingen er sædvanligvis effektiv ved atmosfærisk tryk, selv om subatmosfærisk og superatmosfærisk tryk også kan anvendes.

Efter behandling fjernes det virusinaktiverende middel sædvanligvis, selv om dette ikke i alle tilfælde er nødvendigt, afhængigt af det
15 virusinaktiverende middels karakter og den påtænkte yderligere behandling af plasmaet eller plasmaproteinopløsningen.

For at fjerne ether fra plasmaet eller plasmaproteinopløsningen udsættes disse sædvanligvis for en temperatur på 4-37°C, idet der anvendes et let vakuum for at fjerne den resterende ether. Fortrinsvis tilvejebringes der midler til at sprede plasmaet eller plasmaproteinopløsningen som en tynd film for at sikre maksimal kontakt og fjernelse af etheren. Andre fremgangsmåder til fjernelse af etheren i
20 inaktiverende midler omfatter

- 1) gennembobling af nitrogengas,
- 25 2) diafiltrering under anvendelse af i ether uopløselige (fx Teflon®) mikroporøse membraner, der tilbageholder plasmaproteiner,
- 3) absorption af ønskede plasmakomponenter på chromatografiske eller affinitetschromatografiske underlag,
- 30 4) udfældning, fx ved udsaltning af plasmaproteiner,
- 5) lyofilisering, etc.

Når der anvendes ikke-ioniske detergenter i det inaktiverende middel, fjernes de ved 2)-5) ovenfor.

Ether til stede, fjernes sædvanligvis før fjernelsen af detergent. Etheren kan udvindes til genanvendelse ved anvendelse af hensigtsmæssige destillations/kondensationssystemer, som er velkendte inden for fagområdet.

- 5 Som beskrevet ovenfor kan blodplasmaet eller plasmaproteinopløsningen fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen karakteriseres ved den relative mængde af denatureret faktor VIII i forhold til summen af denatureret og udenatureret faktor VIII. Især er mængden af denatureret faktor VIII i forhold til summen af denatureret og udenatureret faktor VIII mindre end 50 vægtprocent. Detektering af mængden af denatureret faktor VIII bestemmes ved at bestemme forholdet mellem faktor VIII antigen (CAG)-indholdet (et mål for faktor VIII protein) og faktor VIII aktivitet (et mål for udenatureret faktor VIII). Forholdet F VIII aktivitet og CAG antigen er ideelt 1,0, når der ikke findes nogen denaturering, og det bør ikke være mindre end 0,5.
- 10
- 15

De ovennævnte assays udføres ved standardmetoder, fx som beskrevet i *Haemostatis and Thrombosis*, A.L. Bloom, D.P. Thomas, Edw. Churchill - Livingstone, London, 1981.

- Fremgangsmåden ifølge opfindelsen gør det muligt at samle humant blodplasma i puljer og behandle det humane blodplasma, der er samlet i en pulje, som sådant. Den muliggør også at udvinde blodproduktderivater såsom plasmaproteinopløsninger indeholdende faktor VIII, gammaglobulin, faktor IX eller faktor IX-complexet (faktor II, VII, IX, X), fibrinogen og et hvilket som helst andet blodderivat (herunder HBsAg, som anvendes til fremstilling af HBV-vaccine), der alle ikke indeholder nogen resterende smitsom hepatitisvirus. Blodplasma eller plasmaproteinopløsninger fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen indeholder bestanddele, som er karakteristiske ved
- 20
- 25

- a) fravær af spormængder af et virusinaktiverende middel, som tværbinder med den proteinlignende del af et virus eller indvirker på virusets nucleinsyre, og/eller
- 30

- b) tilstedeværelsen af detekterbare mængder af virusinaktiverende middel bestående af en ether og eventuelt en alkohol og/eller et ikke-ionisk detergent i en mængde på mindre end 1 vægtprocent, og/eller
- 5 c) tilstedeværelsen af inaktiveret hepatitis-B og/eller non-A non-B-hepatitisvirus, og/eller
- d) fravær af smitsomme (levedygtige) hepatitisvirus.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

- 10 Inaktivering af hepatitis-B- og non-A, non-B-virus i plasma

A) Hepatitis-B-virus

- New York Blood Center Standard HBV infektionsvirus (plasma 78-564 udvundet fra en kronisk bærer af viruset) blev fortyndet i forholdet 1:10 med frisk normal (chimpanse nr. 222) chimpanseplasma, som manglede antistoffet HBsAg. Denne fortynding indeholdt $10^{7,9}$ chimpanseinfektionsdoser (CI_{50}) pr. ml. Der tilsattes Tween®80 indtil en slutkoncentration på 1% v/v og derefter ethylether (Malinskyodt, anæstetisk kvalitet) indtil en slutkoncentration på 20% v/v. Opløsningen blev blandet grundigt ved hvirvling og blev derefter holdt ved 4°C i
- 15 16 timer. Etheren blev derefter fjernet i vakuum, opløsningerne blev centrifugeret i 10 minutter ved 4000 omdr./minut, og det klare plasma blev udvundet. 1,25 ml heraf blev injiceret intravenøst i 2 seronegative chimpanse, der aldrig før var blevet brugt til forsøg. Dette blev efterfulgt af ugentlige tests af hepatitis-B-serologiske markører (HBsAg, anti-HB, anti-HBs, og serumtransaminaseniveauer (AST, ALS)) i 12 måneder. Den resterende del af plasmaet blev testet for faktor VIII-prokoagulantaktivitet, faktor VIII-CAG-antigenaktivitet og for mængden af HBsAg (hepatitis-B-overfladeantigen). Yderligere 2 chimpanse modtog samme smitsomme plasma fortyndet 10^{-2} , men ubehand-
- 25 30 let. Resultaterne er vist i tabel I.

Tabel I

Inaktivering af HBV-smitte med Tween®80/ether uden inaktivering af faktor VIII og HBsAg

Chimpanse nr.	Aktivitet HBV inokuleret dosis (C10 ₅₀)	Behandling af plasma	Hepatitis (ALT>50 IU/L)		
134	10 ^{6,9}	ingen	+		
137	10 ^{6,9}	ingen	+		
146	10 ^{7,9}	Tween®80	(-)		
163	10 ^{7,9}	+ ether	(-)		
Chimpanse nr.	Inkubationsperiode til dannelse af HBsAg (uger)	Udvikling af anti-HBs og anti-HBc	Plasmaanalyse faktor VIII ¹		
			Aktivitet (%)	Antigen (%)	HBsAg (µgm/mL) ²
134	4	+	100	100	90
137	4	+			
146	(-)	(-)	96±9 ³	95±9 ³	81±18 ³
163	(-)	(-)			

¹ Udtrykt i procent af ubehandlet plasma

² Justeret for fortyndinger for at anføre indholdet i det oprindelige plasma

³ ± to standardafvigelse.

Begge chimpanse (nr. 134 og 137), som modtog ubehandlet HBV, blev angrebet af hepatitis-B-infektion med en inkubationstid på 4 uger. Opfølgende resultater af chimpanse nr. 134 og 137 er vist i fig. 2, hvor lukkede cirkler betegner HBsAg, åbne cirkler betegner Anti-HBs, kvadrater betegner SGPT (Alaninaminotransferase, ALT), (-) betegner negativ test for Anti-HBc og (+) betegner positiv test for Anti-HBc.

I modsætning hertil viste intet af dyrene, som modtog Tween®80/ether-behandlet HBV smitsomt plasma, som i starten indeholdt 10 gange så stor en mængde af smitsom HBV, som der blev inokuleret i kontroldyrene, nogen tegn på HBV-infektion, hvilket viste, at alle de smitsomme vira var blevet inaktiveret. Proceseffektiviteten af denne fremgangsmåde er således større end eller lig med $10^{7,9}$, dvs. mindst 100 millioner smitsomme doser kan inaktiveres. På trods af denne bemærkelsesværdige steriliserende virkning blev den procoagulerende aktivitet af faktor VIII, faktor VIII-protein og HBsAg i det væsentlige fuldstændig bevaret. Det bør bemærkes, at bevaringen af HBsAg-aktivitet viste, at denne fremgangsmåde kan anvendes som en forbedret teknik til fremstilling af hepatitis-B-vaccine ud fra plasma fra HBV-bærere.

20 B) Inaktivering af non-A, non-B-hepatitis virus i plasma

Dette forsøg blev udført parallelt med det ovennævnte forsøg og blev udført identisk hermed med undtagelse af, at

1. det smitsomme plasma var en 10^{-1} fortynding af Hutchinson Strain (7-12-77) non-A, non-B-virus modtaget frosset i tøris fra Dr. Robert Purcell, direktør for Hepatitis Laboratory, National Institute for Allergy & Infectious Diseases, N.I.H., Bethesda, Maryland. Dette materiale danner non-A, non-B-hepatitis hos chimpanse med en inkubationstid på ca. 5-7 uger før ALT-stigning. Dette materiale har vist sig at have en titer på ca. 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ hos chimpanse og ca. 10^8 ID_{50} hos silkeaber (Feinstone, S. & Purcell, R.H., Personlig meddelelse). Det behandlede plasma, som indeholdt en 10^{-2} fortynding af Hutchinson-plasmaet, havde således et indhold af det smitsomme virus på 10^4 - 10^6 ID_{50}/ml .

2. De inokulerede chimpanser var før blevet anvendt til en sikkerhedstest af med formalin inaktiveret HBV-vaccine, men var ikke blevet anvendt i noget andet forsøg. De blev i 12 måneder fulgt med tests hver anden uge for alle de ovennævnte markører. Otte kontrolchimpanser blev inokuleret med det samme Hutchinson-stamme-podestof og fulgt på tilsvarende måde. Resultaterne er vist i tabel II.

Tabel II

Inaktivering af non-A, non-B-virus' smitsomhed uden inaktivering af faktor VIII-aktivitet

Chimpanser	NANB-virus inokuleret dosis (ID ₅₀)	Behand- ling	Hapatitis (inkubation tidsrum op til ALT>50)	Analyse af plasma faktor VIII ¹ Aktivi- Anti- tet, % gen, %	
8 chimpanser	10 ⁴ -10 ⁵	ingen	3-21	N.D.	N.D.
157	10 ⁴ -10 ⁶	Tween®	(-)	97±10 ²	98±10 ²
164		80 + ether	(-)		

Det viste sig igen, at det behandlede plasma var usmitsomt, men bevarede sin faktor VIII-aktivitet. Proceseffektiviteten til inaktivering af non-A, non-B-virus, som blev bedømt ud fra dette forsøg, er større end eller lig med 10⁴-10⁶, dvs. mindst 10.000-1.000.000 smitsomme doser kan inaktiveres.

EKSEMPEL 2

Tween®80/etherbehandling af koncentreret faktor VIII (Lyoc®, The New York Blood Center) med fuldstændig bevaring af den prokoagulerende aktivitet af faktor VIII

- 5 Lyoc® er et koncentrat af faktor VIII, som anvendes klinisk til behandling af hæmophili. Lyoc® fremstilles uden, at man forsøger at sterilisere hepatitisvirus deri, og det er således sandsynligvis i det store og hele smitsomt over for modtagere, som ikke er immune. En prøve af Lyoc® blev behandlet med Tween®80/ether som beskrevet oven-
- 10 for for at bestemme, om indholdet af faktor VIII-aktivitet kunne bevares.

Resultaterne er vist i tabel III.

Tabel III

- 15 Virkningen af Tween®80/etherbehandling af et faktor VIII-koncentrat på faktor VIII-aktivitet

Materiale	Faktor VIII-prokoagulerende aktivitet (% af ubehandlet koncentrat)
20 Lyoc® - ubehandlet	100 ± 10
Lyoc® - behandlet med Tween®80/ether	110 ± 10

Aktiviteten af faktor VIII blev i det væsentlige fuldstændig bevaret.

- 25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes til inaktivering af andre virus, der findes i blodet, såsom cytomegalovirus, Epstein-Barr-virus, laktisk dehydrogenase-virus, herpes-virus, rhabdovirus, leucovirus, myxovirus, alphavirus, arbovirus (gruppe B), paramyxovirus, arenavirus og coronavirus.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til inaktivering af hepatitis-B-virus eller non-A-, non-B-hepatitisvirus i pattedyrsblodplasma eller pattedyrsplasmaproteinopløsninger,
5 k e n d e t e g n e t ved, at blodplasmaet eller plasmaproteinopløsningen bringes i kontakt med et virusinaktiverende middel bestående af en ether og et ikke-ionisk detergent.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at etheren har den almene formel R^1-O-R^2 ,
10 hvor R^1 og R^2 uafhængigt af hinanden betegner C_{1-18} -alkyl eller -alkenyl, som kan indeholde et oxygen- eller svovlatom i kæden.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at kontakten med ikke-ionisk detergent og ether er en successiv kontakt.
- 15 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at plasmaet eller plasmaproteinopløsningen forbliver i kontakt med det virusinaktiverende middel i et tidsrum på mindst 1 minut og holdes ved en temperatur på mellem -5°C og 50°C .
- 20 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at de virusinaktiverende midler er til stede i en mængde på mindst 0,1 vægtprocent baseret på volumen af det plasma eller den plasmaproteinopløsning, der skal behandles.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
25 k e n d e t e g n e t ved, at de virusinaktiverende midler er til stede i en mængde på mellem 0,1 og 50 vægtprocent baseret på plasmaets eller plasmaproteinopløsningens volumen.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at de virusinaktiverende midler fjernes
30 efter behandlingen.

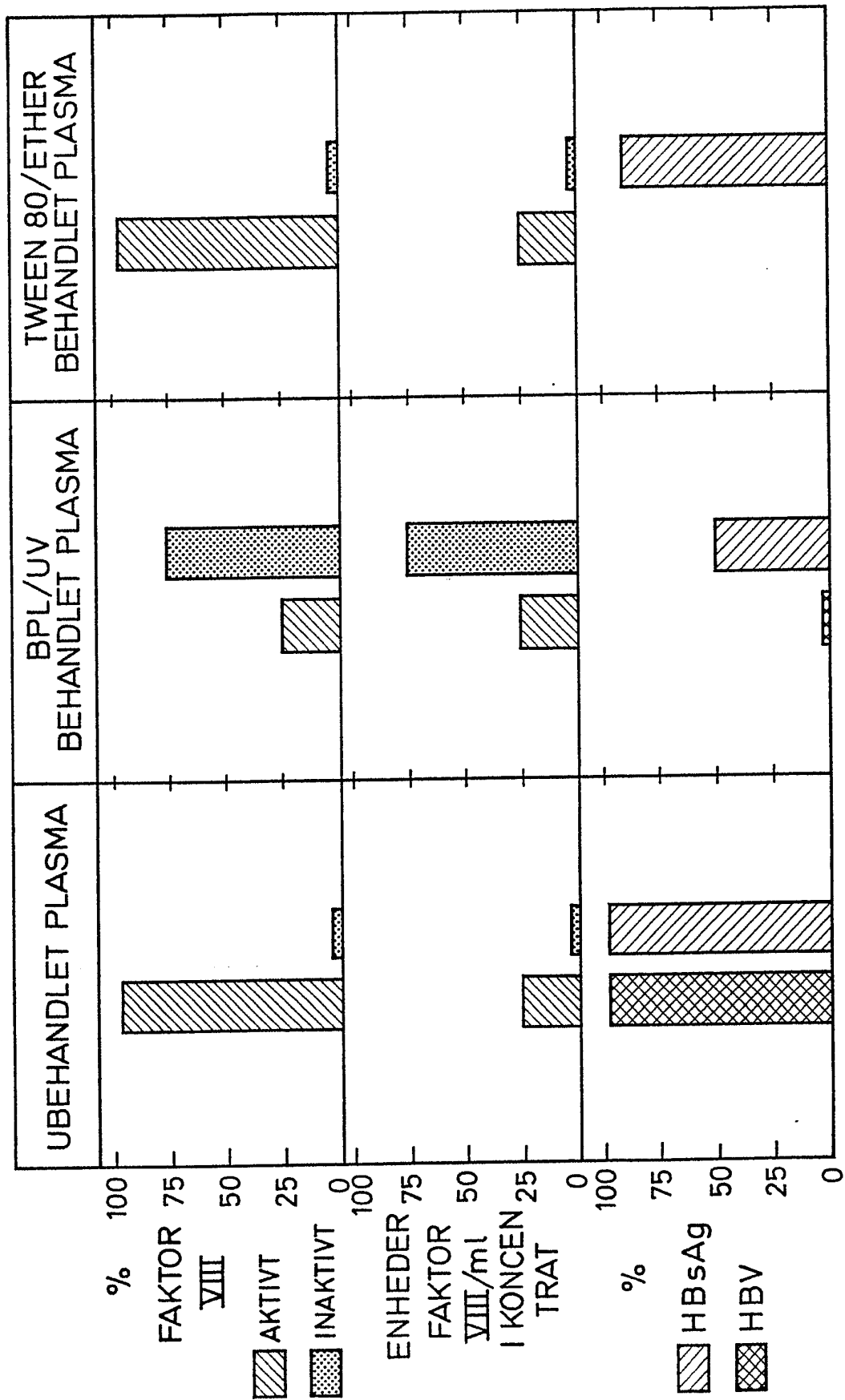
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at pattedyrsblodplasmaet eller pattedyrs-
plasmaproteinopløsningen er af human oprindelse.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8,
5 k e n d e t e g n e t ved, at det humane blodplasma er blodplasma,
som er samlet i pulje, eller at plasmaproteinopløsningen er afledt af
en sådan pulje.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det blodplasma eller den plasmaprotei-
10 nopløsning, der udsættes for fremgangsmåden, indeholder non-A, non-B-
hepatitisvirus.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at plasmaproteinopløsningen er et koncen-
trat af faktor VIII.

Fig. 1.



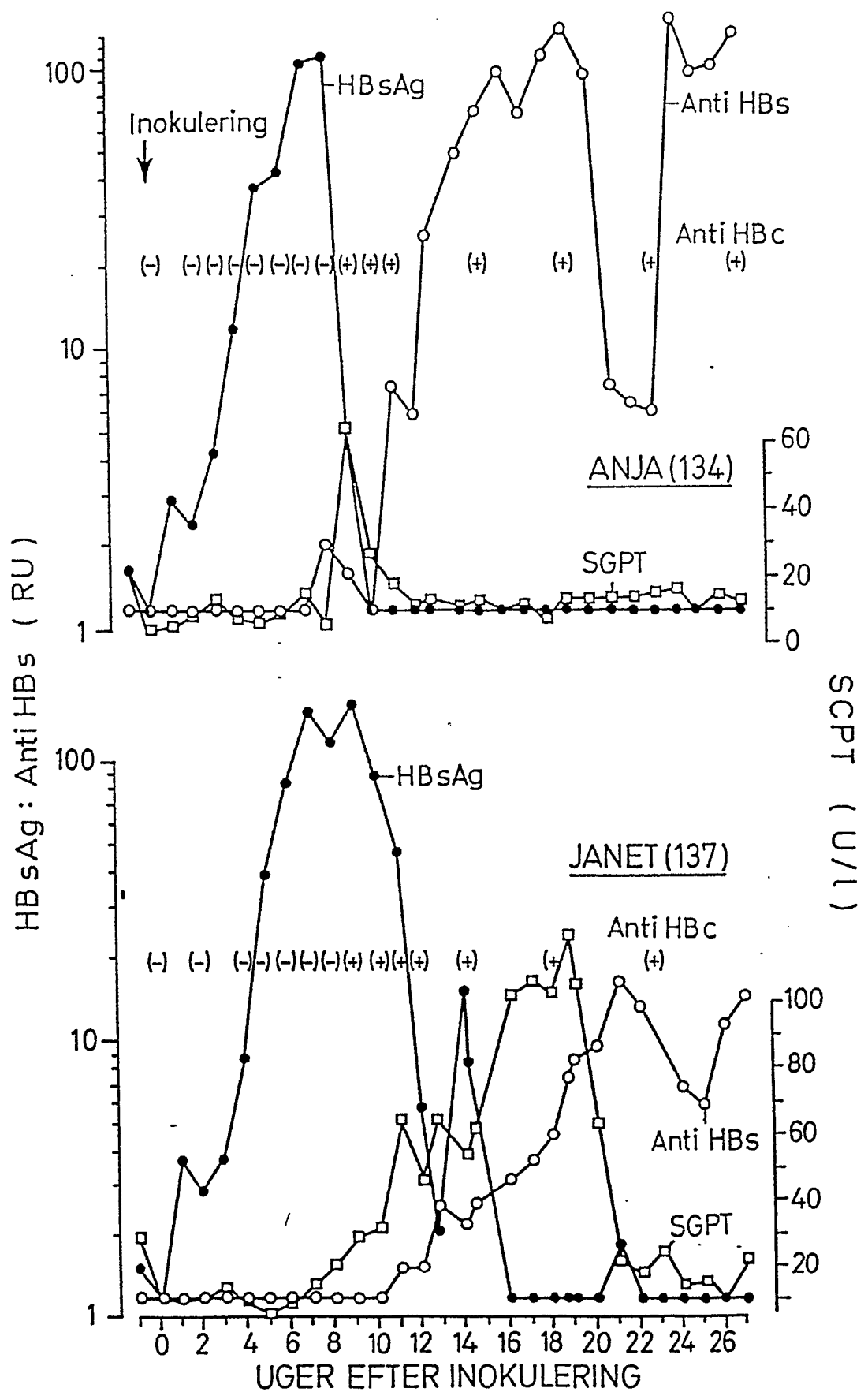


Fig. 2.