



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 410 218 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1443/99 (51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/68**
(22) Anmeldetag: 20.08.1999
(42) Beginn der Patentdauer: 15.07.2002
(45) Ausgabetag: 25.03.2003

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

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES QUALITÄTSGESICHERTEN POOLS BIOLOGISCHER PROBEN

AT 410 218 B

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung eines hinsichtlich der Belastung mit Mikroorganismen qualitäts-gesicherten Pools biologischer Proben unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren, bei welchem ein Screening-Pool mit einem hoch-sensitiven Nuklein-säure-Amplifikations-Verfahren getestet wird und in Sub-Screening-Pools aufgespalten werden kann, die mit einem weniger sensitiven Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren getestet werden, wobei Einzelproben aufgefunden und eliminiert werden können.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines hinsichtlich der Belastung mit Mikroorganismen qualitätsgesicherten Pools biologischer Proben unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren.

Biologische Proben, wie etwa Plasmaspenden oder Chargen von Zellkulturüberständen können mit unerwünschten Mikroorganismen, insbesondere Viren oder Fremd-DNA kontaminiert sein. Diese Kontaminationen können zu unerwünschten Reaktionen in Präparaten führen, die aus derartigen biologischen Präparaten hergestellt und an Menschen verabreicht werden.

Vor allem menschliches Plasma ist als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Plasmaderivaten von außerordentlicher klinischer Bedeutung, insbesondere zur Substitutionstherapie bei angeborenen oder erworbenem Mangel an Plasmakomponenten. Derzeitige pharmazeutische Präparationen werden in der Regel nicht aus Einzelspenden, sondern aus einem Plasma-Pool, bestehend aus sehr vielen Einzelspenden, hergestellt.

Bei der Verwendung von menschlichem Plasma ist aber darauf zu achten, dass keine infektiösen Agentien enthalten sind, die mit dem pharmazeutischen Präparat bzw. mit den Plasmaderivaten übertragen werden können. Zu den möglicherweise im Blut vorkommenden infektiösen Agentien zählen vor allem Viren, die durch Blut übertragbar sind (haematogene Viren), z.B. HI-Viren oder Hepatitisviren (A, B, C, D, E oder G), aber auch Parvovirus.

Aufgrund des großen Bedarfs an Arzneimitteln enthaltend Plasmaderivate ist die ökonomische Herstellung dieser Arzneimittel nur im industriellen Maßstab möglich.

Plasma wird von Spendern erhalten und zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten gepoolt. Die Größe eines üblichen Pools beträgt etwa 2000-6000 Einzelplasmaspenden. Dabei besteht das Risiko, dass durch eine einzelne Virus-kontaminierte Plasmaspende der gesamte Plasma-Pool kontaminiert wird.

Obwohl es bereits gegen Ende der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelungen war, menschliches Albumin durch Erhitzen zu einem virussicheren Präparat zu verarbeiten, war dies bei allen anderen aus Plasma gewinnbaren Arzneimitteln wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hitze zunächst nicht möglich. Bis heute sind bei millionenfacher Anwendung von adäquat hergestellten Albuminpräparaten nie Infektionen mit beim Menschen im Blut auftretenden Viren vorgekommen.

Im Gegensatz hierzu wurde bei vielen anderen aus Plasma hergestellten Arzneimitteln immer wieder über Virusinfektionen, insbesondere mit Hepatitisviren, berichtet und seit den 80iger Jahren im großen Umfang auch über Infektionen mit Aids-Virus.

Um 1980 wurden erstmals bei entsprechend stabilisierten Faktor VIII-Konzentraten Hitzebehandlungen durchgeführt, mit der Absicht, hierdurch Inaktivierungen von Viruskontaminanten zu erreichen. Zunächst musste aber ein großer Verlust an Faktor VIII-Aktivität in Kauf genommen werden bzw. blieb das tatsächliche Inaktivierungspotential zunächst unbekannt.

Durch Verbesserung der Hitzeinaktivierungsverfahren und Anwendung von anderen, neuen Inaktivierungsverfahren konnten schließlich Arzneimittel aus Plasma hergestellt werden, die in den meisten Fällen zu keinen Virusinfektionen beim Empfänger führten. Hand in Hand mit dieser Entwicklung ging auch die Verbesserung der Spender- und Spendenauswahl mit der Zielrichtung, jene Spender und Spenden auszuschließen, bei denen der Verdacht einer Virämie und damit eines virushaltigen Plasmas bestand.

Seit längerer Zeit wird entweder durch Antigennachweis oder durch Antikörpernachweis von bzw. gegen ein bestimmtes Virus im Blut versucht, solche Spenden, die ein positives Ergebnis liefern, auszuschließen und sie nicht in einen größeren Plasmapool einzubringen, der als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Blutprodukten dienen soll. Bei Einzelspendern, die in allen Untersuchungen keine Krankheitssymptome oder pathologische Untersuchungsergebnisse aufweisen, trotzdem aber bestimmte Viren in ihrem Blut sogar in hoher Konzentration über längere Zeiträume beherbergen können, kann nunmehr das Auftreten solcher Virämien durch ein bestimmtes Virus mit Hilfe einer Amplifikationsmethode eindeutig nachgewiesen werden.

Durch das Poolen von Plasmaeinheiten wird zwar naturgemäß eine einzelne mit Viren kontaminierte Plasmaspende verdünnt, der Nachweis von viralen Genomsequenzen mit Hilfe von Amplifikationsreaktionen ist aber so empfindlich, dass selbst in den Verdünnungen Virusgenome bzw. deren Sequenzen eindeutig bestimmbar sind und falls sie, wie oben erwähnt, unter eine bestimmte Bestimmbarkeitsgrenze fallen, dann nicht mehr eine klinische Relevanz im Sinne der Möglichkeit einer Infektion aufweisen.

Die EG-Richtlinie gemäß dem „EEC Regulatory Document Note for Guidance“, Guidelines for Medicinal Products Derived from Human Blood and Plasma (Biologicals 1992, 20: 159-164) schlägt ein Qualitätssicherheitssystem zur Kontrolle der Plasmaspender bzw. Plasmaspenden vor. Demnach muss jede Plasmaspende mit validierten Tests auf die Abwesenheit von Virus-Markern, wie Hepatitis-B Antigen, HIV-1- und HIV-2-Antikörpern untersucht werden, da diese indikativ für eine entsprechende virale Infektion des Plasmaspenders sind. Tests zum Ausschluss einer Hepatitis C-Infektion sollen gleichfalls vorgenommen werden.

5 Gemäß der europäischen Pharmacopoeia ist beschrieben, dass spezielle Tests zur Bestimmung von Hepatitis B-Oberflächenantigen, für Hepatitis C-Virus-Antikörper und für HIV-Antikörper an jeder Spende durchgeführt werden sollen (European Pharmacopoeia, 2. Ausgabe, Teil II, 1994, Seiten 853 bis 853-4).

10 Eine FDA-Richtlinie vom 14.3.1995 sieht die PCR-Testung an einem Endprodukt (Immunglobulin-Produkt) als zusätzlichen Sicherheitsfaktor vor.

15 Trotz der vorgeschlagenen Tests wird in der EG-Richtlinie betont, dass die Sicherheit von einzelnen Plasmaspenden nur allein durch eine Kontrolle dieser Virus-Marker nicht ausreichend ist. Auch wenn die Abwesenheit der genannten Marker in einer Plasmaprobe bestätigt wird, ist eine Virämie des Spenders nicht auszuschließen. Virale Antigene und entsprechende Antikörper sind nämlich nicht immer sofort nach der Infektion nachweisbar, die ersten Marker für eine virale Infektion treten oft erst nach Wochen oder Monaten nach dem Kontakt mit infektiösem Material auf. 20 Dieser kritische Zeitraum nach Infektion und vor dem Auftreten von Antikörpern wird allgemein als „Window-Periode“ bezeichnet. Der Zeitpunkt nach Infektion, bei dem die ersten viralen Marker nachweisbar sind, ist jedoch von Virus zu Virus verschieden.

25 Darüberhinaus ist auch bekannt, dass für manche aus Plasma hergestellte Arzneimittel es im Rahmen des Herstellungsverfahrens zu einer Abreicherung bzw. Inaktivierung von Viren kommt und solche Produkte von sich aus in hohem Ausmaß virussicher sind.

30 Obwohl Virusinaktivierungen von Plasmaderivaten im industriellen Ausmaß äußerst erfolgreich durchgeführt wurden, kam es in seltenen Fällen trotzdem zu Übertragungen haematogener Viren wie AIDS, Hepatitis A, B, C-Virus, wodurch angenommen werden muss, dass Hersteller trotz Anwendung einer gleichbleibenden Herstellungsmethode bei einigen wenigen Herstellungschargen 35 viruskontaminierte Produkte erzeugten (Lancet 340, 305-306 (1992); MMWR 43 (28), 505-509 (1994); Thromb.Haemost. 68, 781 (1992)). Die Ursache dafür ist wahrscheinlich in einer überaus hohen Kontamination bestimmter Ausgangschargen zu suchen. Da bei der Gewinnung des Plasmas nur indirekte Methoden zum Ausschluss von viruskontaminierten Plasmaspenden zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit, dass das Ausgangsmaterial so stark kontaminiert ist, dass die ansonsten erfolgreich anwendbaren Virusinaktivierungs- und Virusabreicherungsmethoden nicht mehr genügen, um virussichere Endprodukte herzustellen.

40 Da für die meisten human-pathogenen Viren eine menschliche infektiöse Dosis nicht bekannt und auch derzeit gar nicht bestimmbar ist, versucht man bei der Testung von Plasma-Pools möglichst jegliche Kontamination durch Auffinden der kontaminierten Einzelproben auszusortieren. Die dabei verwendeten Nukleinsäure-Amplifikationstestungen sind zwar äußerst empfindlich, jedoch sehr teuer, so dass deren Anwendung zwar bei bekanntermaßen human-pathogenen Viren gerechtfertigt ist, bei anderen Mikroorganismen von denen entweder keine human-pathogene Wirkung bekannt oder beschrieben ist oder bei welchen nur eine erhöhte Pathogen-Dosis infektiös ist, wäre dieser Aufwand nicht notwendig.

45 So beschreiben insbesondere die WO 96/35437 und die US 5 591 573-A Testsysteme für Plasma-Pools unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifizierungsverfahren und/oder Antikörpertestungen. Die US 5 591 573 offenbart ein Verfahren zum Testen von Plasma-Pools. Bei diesem Verfahren wird ein 1. Pool hergestellt und mittels PCR getestet. Falls dieser PCR-Test positiv ist wird ein 2., kleinerer Sub-Pool hergestellt und wiederum mittels PCR getestet. Dieses Verfahren 50 wird solange wiederholt, bis die kontaminierte Einzelpende identifiziert ist. Gemäß der WO 96/35437 sind auch Antikörpertestungen vorgesehen bzw. die Einhaltung vorgegebener definierter Grenzwerte, im Rahmen des Screening-Verfahrens offenbart.

55 Den beschriebenen Nukleinsäure-Amplifizierungs-Verfahren ist jedoch gemein, dass stets versucht wird diejenige Amplifikationsmethode zu verwenden, die die größte Sensitivität erlaubt. Derartige hoch-sensitive PCR-Testungen sind aber wie erwähnt äußerst kostspielig, vor allem bei

Reihentestungen von Pools von biologischen Einzelproben. PCR-Testungen mit niedriger Sensitivität, die weitaus kostengünstiger wären, werden bei derartigen Untersuchungen aber generell vermieden, da damit das Risiko von Kontaminationen, die unter der (erhöhten) Nachweisgrenze liegen, einhergehen würde.

5 Analog dazu kommt es auch bei Überständen aus rekombinanten Zellkulturen immer wieder zu Verunreinigungen durch Mikroorganismen oder durch Nukleinsäure-Material der Wirtszelle. Derartige Kontaminationen sollten im, aus den Überständen aufzureinigenden, pharmazeutischen Präparaten selbstverständlich nicht bzw. nur zu einem bestimmten Höchstwert (Grenzwert) vorhanden sein.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines hinsichtlich der Belastung mit Mikroorganismen, insbesondere mit Viren, qualitätsgesicherten Pools biologischer Proben unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches einerseits ein verlässliches Aussondern von kontaminierten Einzelproben, insbesondere von hoch kontaminierten Einzelproben, sowie die Einhaltung bestimmter Grenzwerte an 15 derartigen Verunreinigungen im Pool erlaubt, aber auf der anderen Seite eine Kostenreduktion und ein gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Pool-Testungsverfahren einfacheres Verfahren mit sich bringt.

15 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines hinsichtlich der Belastung mit Mikroorganismen qualitätsgesicherten Pools biologischer Proben, 20 ausgewählt aus der Gruppe Blut-Einzelspenden, Plasma, Serum oder Zellkulturchargen unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren, welches durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Entnehmen von Aliquoten aus den biologischen Proben,
- Vereinigen der entnommenen Aliquote zu einem Screening-Pool,
- Testen des Screening-Pools hinsichtlich des Vorhandenseins von oder des Gehaltes an Genomäquivalenten von Mikroorganismen mittels eines ersten Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens, das gegenüber den zu testenden Mikroorganismen ein bestimmtes, ausgewähltes Detektionslimit DL-1 aufweist,
- Aufspalten des Screening-Pools in Sub-Screening-Pools durch erneutes Vereinigen von entnommenen Aliquoten in kleineren Pools, wenn beim Testen des Screening-Pools ein vorgegebener Grenzwert an Genomäquivalenten überschritten wird,
- erneutes Testen der Sub-Screening-Pools hinsichtlich des Vorhandenseins von oder des Gehaltes an Genomäquivalenten der zu testenden Mikroorganismen mittels eines weiteren Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens, das gegenüber den zu testenden Mikroorganismen ein bestimmtes, ausgewähltes Detektionslimit DL-2 aufweist, wobei $DL-1 < DL-2$,
- Auffinden und Eliminieren derjenigen Proben, die DL-2 überschreiten, und
- Vereinigen der nicht-eliminierten Proben zu einem qualitätsgesicherten Pool.

25 Durch das Vorsehen von mindestens zwei Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren, die sich hinsichtlich ihrer Sensitivität unterscheiden, kann somit erfindungsgemäß ein effizientes (aufgrund der hohen Sensitivität der Pool-Testung) und dennoch kostengünstiges Verfahren zur Verfügung gestellt werden, da das Testen der Sub-Pools bis hinunter zu den Einzelproben durch ein weniger sensitives Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren ohne vorhergehende weitere Extraktion der Nukleinsäure (welches deshalb entscheidend kostengünstiger und aufwandsreduziert ist) vorgenommen wird.

30 40 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird somit in einem ersten Schritt der Screening-Pool mit einem sehr sensitiven und quantitativen Verfahren hinsichtlich der Nukleinsäure-Kontaminationen geprüft und die sehr viel aufwendigere Auffindung der kontaminierten Einzelprobe oder Einzel- 45 spende, die eine sehr viel höhere Zahl an weiteren Untersuchungen mit sich bringt, mit einem weniger sensitiven Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren bestimmt. Damit wird keinerlei Risiko eingegangen, dass eine relevante Kontamination übersehen wird, da die Screening-Pool-Testung mit einer möglichst sensitiven Methode erfolgt, andererseits aber die Kosten und der Zeitaufwand des Aussondерungsverfahrens für die kontaminierte Einzelprobe oder -charge entscheidend reduziert werden. In den Fällen, in denen die Auffindung derartiger kontaminierten Einzelspenden bislang aus diesen Gründen unterblieben ist, bietet das erfindungsgemäße Verfahren erstmalig die 50 55 Möglichkeit, den wertvollen Rohstoff, den die Einzelspenden darstellen ebenfalls kostengünstig,

einer Nutzung zuzuführen und das Verwerfen dieser Proben zu verhindern.

Die Sensitivität des Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens wird erfindungsgemäß als das mit der jeweiligen Nukleinsäure-Amplifikations-Methode gerade noch detektierbare Ausmaß an Genomäquivalenten festgesetzt. Das Vorsehen derartiger Verfahren mit genau festgelegten Grenzwerten ist für den Fachmann ohne weiteres möglich und gehört zu seinen üblichen Kenntnissen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich vor allem zur Qualitätssicherung von Pools hinsichtlich der Belastung von Mikroorganismen, die von geringer Pathogenizität bzw. Toxizität sind bzw. von denen angenommen werden kann, dass eine Belastung, die unter dem festgelegten Grenzwert liegt, im Zuge des anschließenden Aufreinigungsprozesses bis zur Fertigstellung des pharmazeutischen Präparates jedenfalls eliminiert wird bzw. die diesem Grenzwert entsprechende Menge an Kontamination in einem derartigen pharmazeutischen Präparat unbedenklich und ohne Nebenreaktionen ist. Ein besonderes Beispiel hierfür stellen Kontaminationen mit Parvoviren, insbesondere Parvo B19, dar.

Das Parvovirus B19 ist ein einsträngiges DNA Virus mit 32 nm Durchmesser, das keine Lipidmembran besitzt und deshalb relativ stabil gegenüber Virusaktivierungsverfahren ist. So zeigen die meisten Inaktivierungsverfahren, beispielsweise physikalische Methoden wie beispielsweise Pasteurisieren (60°C über 12h) oder chemischen Behandlungen, beispielsweise organische Lösungsmittel (TNBP und/oder Detergenz) keine befriedigenden Ergebnisse. Allein eine Trockenhitzebehandlung scheint sich als effektiv zu erweisen.

Das Parvovirus B19 ist Verursacher der harmlosen Ringelröteln (Erythema infectiosum), gelegentlich werden Arthralgien und Arthritiden beobachtet. Gefürchtet sind intrauterine Infektionen, die nicht selten mit dem Fruchttod enden. Zum begrenzten Kreis B19-gefährdeter Patienten gehören solche mit chronisch-hämolytischer Anämie, nach Knochenmarktransplantation, mit kongenitaler/erworberner Immundefizienz sowie Schwangere (Sibrowski et al., Beitr Infusionsther. Basel, Karger, 1990, 26, 22-26).

Die Seroprävalenz in Industrieländern ist 2-10% in Kindern unter 5 Jahren und 40-60% in Erwachsenen über 20 Jahren und 85% bei über 70-jährigen. Diese hohe Seroprävalenz bedingt daher bei Plasma-Pool-Testungen eine große Anzahl von positiven Ergebnissen, wodurch eine Vielzahl von weiteren Tests notwendig wird, um die hoch kontaminierte Einzelprobe zu bestimmen.

In der EP-A-0 922 771 ist ein Verfahren zum Nachweis von hohen Viruskonzentrationen im Blutplasma beschrieben, bei dem die Empfindlichkeit der PCR durch Anwendung suboptimaler Bedingungen bei der Extraktion, Amplifikation oder Detektion gedrosselt wird, so dass die Parvovirus-DNA nur noch in Proben nachgewiesen werden kann, deren DNA-Gehalt größer als 10^6 - 10^7 Genomäquivalente/ml ist. Dieses Verfahren hat allerdings den Nachteil, dass es sich nicht für das Testen von Pools eignet.

Nichtsdestotrotz können erfindungsgemäß sämtlichen vorgekommenen Mikroorganismen, wie Bakterien oder Viren, analysiert werden, wobei vor allem hinsichtlich der Testung von Blut- und Plasma-Einzelproben die Qualitätssicherung bezüglich Viren besonders vorrangig ist.

Bevorzugterweise werden dabei Hepatitisviren, insbesondere HAV, HBV, HCV, HDV, HEV und HGV, Retroviren, insbesondere HIV-1 und HIV-2, und Parvoviren, insbesondere Parvo B19, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet bzw. Plasma-Pools hinsichtlich derartiger Viren qualitätsgesichert.

Bei der Testung von verschiedenen Chargen einer rekombinanten Produktion von Proteinen wird erfindungsgemäß bevorzugt die Einhaltung bestimmter (z.T. vorgeschriebenen) Grenzwerte an Kontamination mit Wirtszellen-Nukleinsäuren (wobei hier als Mikroorganismen eukaryontische oder prokaryontische Zellen bzw. DNA bzw. RNA detektiert werden) oder die Kontamination mit bestimmten bakteriellen oder viralen Verunreinigungen überprüft.

Eine besonders bevorzugte Verfahrensvariante besteht erfindungsgemäß darin, dass der Grenzwert beim Testen des Screening-Pools zwischen der Nachweigrenze des ersten Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens DL-1 und 10^5 Genomäquivalente/ml vorgegeben wird, wobei sich insbesondere ein Wert um 10^4 Genomäquivalente/ml, für etwa Parvo B19, als besonders effizient herausgestellt hat. Bevorzugterweise kann der jeweilige Grenzwert auch mit dem jeweiligen Detektionslimit übereinstimmen.

Die Detektionslimits für das erste Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren DL-1 liegen bevorzugterweise in der Größenordnung von 10^2 - 10^4 Genomäquivalente/ml (können aber bis zu

10-50 GE/ml oder - in Ausnahmefällen - noch weiter darunter liegen), wohingegen die Detektionslimits DL-2 üblicherweise bei 10^4 - 10^7 Genomäquivalenten/ml gewählt werden. DL-1 und DL-2 unterscheiden sich vorzugsweise um zumindest eine Zehnerpotenz, besonders effizient hat sich aber erfindungsgemäß eine Differenz von etwa 2 Zehnerpotenzen herausgestellt, da damit auf der 5 einen Seite doch noch verlässlich die kontaminierte Einzelpende aufgefunden werden kann (dies ist erfindungsgemäß erforderlich) und andererseits die Kosten und der Aufwand für das Sub-Screening-Verfahren erheblich gegenüber den bekannten Methoden reduziert werden können.

Die Amplifikation von Nukleinsäuren kann erfindungsgemäß durch eine Reihe von in der Literatur beschriebenen Amplifikations-Prozessen erfolgen, besonders bewährt hat sich dabei das PCR-Verfahren, das in Folge seiner breiten Anwendung und industrieller Verfügbarkeit auch von den Kosten her bevorzugt wird. Das PCR-Amplifikationsverfahren wurde erstmals 1983 von Mullis et al. (US 4,683,195 und US 4,683,202) beschrieben. Virale Genomsequenzen können ebenfalls durch „nested PCR“ (Methods Enzymol. 155 (1987), 335-350) amplifiziert werden. Für die Amplifikation und den Nachweis von RNA muss die RNA erst in die DNA transkribiert werden. Dieses Verfahren wird unter Verwendung der Reversen-Transkriptase durchgeführt und als RT-PCR bezeichnet (Cell 50 (1987), 831-840).

Die Analyse der Amplifikationsprodukte kann durch Verwendung von markierten Nukleotiden oder Oligonukleotid-Primern beim Elongationsprozess und der anschließenden Hybridisierung oder gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte erfolgen.

Der Nachweis der amplifizierten DNA Fragmente kann beispielsweise mittels einer Sonde, die zwei Fluoreszenzfarbstoffe trägt, erfolgen. Diese Methode ist beispielsweise von Livak et al. (PCR Method and Appl. 1995; 4:357-362) beschrieben. Die besondere Eigenschaft dieser Sonde besteht darin, dass die Fluoreszenz des am 5'Ende der Sonde befestigten Farbstoff (FAM), des Reporters, durch die Nähe des am 3'Ende des Primers angeordneten zweiten Fluoreszenzfarbstoffes (TAMRA), des Quencher, reduziert wird.

Im Verlaufe der Amplifikation wird nun unter der Einwirkung einer thermostabilen DNA-Polymerase, vorzugsweise der Taq Polymerase, der neue DNA Strang synthetisiert. Dabei verdrängt die DNA-Polymerase die Sonde nicht nur vom Einzelstrang, sondern zerlegt sie mittels ihrer endonukleolytischen Aktivität und setzt dabei die beiden Fluoreszenzfarbstoffe frei. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes wird nicht mehr durch den Quencherfarbstoff unterdrückt und steigt an. Dieser Anstieg der Fluoreszenz wird im ABI Prism 7700 während des Laufes der PCR kontinuierlich aufgezeichnet. Im Vergleich zu mehreren Negativkontrollen wird der Schwellenwert ermittelt, ab dem ein Anstieg der Fluoreszenz als positives Signal gewertet wird.

Die Quantifizierung der Belastung mit einem Mikroorganismus, beispielsweise von Parvo B19, in einer unbekannten Probe erfolgt über eine externe Eichkurve. Ein kloniertes Stück des Parvo B19 DNA in einem Trägerplasmid, welches die zu amplifizierende Sequenz umfasst, wird dazu in linearisierter Form in Konzentrationen von 10^6 Kopien/Reaktion bis 10 Kopien/Reaktion mitamplifiziert. Durch Ermittlung eines Schwellenwertes (Threshold-Wertes, entspricht einem PCR Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes zum ersten Mal über die Grundlinie ansteigt) wird im Programm eine Eichgerade erstellt mit deren Hilfe der Gehalt an Parvo B19 DNA einer unbekannten Probe über ihren Threshold-Wert quantifiziert wird.

Alternativ-Verfahren zur PCR umfassen die Ligase-Kettenreaktion (LCR), entsprechend der EP 0 320 308 A und der EP 0 336 731 A, sowie nucleic acid sequence based amplification (NASBA), self-sustained sequenced replication (SSR), entsprechend der EP 0 310 229, oder die transcription based amplification system (TAS), entsprechend der EP 0 373 960 A. In diesen Verfahren wird eine Reihe von Enzymen verwendet, die gleichzeitig oder schrittweise bei der Amplifikation verwendet werden können, wie z.B. eine DNA-Polymerase oder eine RNA-Polymerase.

Erfindungsgemäß bevorzugt können bei der Nukleinsäure-Amplifizierung interne Standards zugesetzt werden, mit welchen das prinzipielle Funktionieren der Amplifikation gewährleistet wird. In Routinetests kann die Interpretation der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Resultate üblicherweise folgendermaßen erfolgen:

- 55 a) keine Detektion des internen Standards (z.B. keine sichtbare Bande): die Bestimmung hat z.B. wegen der Amplifikationsreaktion (z.B. die PCR) nicht funktioniert; dadurch können falsch negative Resultate ausgeschlossen werden.

- b) nur der interne Standard ist detektierbar (z.B. nur die Standard-Bande ist sichtbar): die Bestimmung inklusive der Amplifikationsreaktion (z.B. die PCR) hat funktioniert, die Probe ist negativ;
- c) Standard und Proben-Nukleinsäure sind detektierbar (z.B. beide Banden sind sichtbar): positive Probe

positive Probe.
Die erfindungsgemäß vorrangig zu testenden biologischen Proben sind ausgewählt aus der Gruppe der Blut-Einzelspenden, Plasma, Serum oder Zellkultur-Chargen. Gerade bei diesen biologischen Proben kann es zu den erwähnten Kontaminationen kommen und diese werden auch vorrangig in der industriellen Herstellung von Arzneiverwendung aus biogenen Quellen verwendet.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren kann automatisiert mittels Robotersteuerung durchgeführt werden, wobei sich konventionelle Plattformen hierfür besonders eignen. Um solche Screening-Pools herzustellen sind dem Fachmann verschiedenste Möglichkeiten bekannt. So werden beispielsweise von Mortimer (Vox Sang. 1997, 73:93-96), 2 dimensionale (2D), 3 dimensionale (3D) und sogar 4 dimensionale (4D) Pools beschrieben. Um nun einen beispielsweise 3D Pool hergestellt aus 512 (8x8x8) Einzelproben aufzulösen, müssen hier beispielsweise 24 Sub-Pools hergestellt werden, um eine kontaminierte Einzelprobe eindeutig identifizieren zu können.

Erfindungsgemäß wird bevorzugterweise das zweite Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren unmittelbar aus dem Sub-Pool nach der ersten Nukleinsäure-Amplifikation durchgeführt. Das bedeutet, dass keine weitere Extraktion der Nukleinsäure erfolgt, sondern diese direkt in den Sub-Pools bestimmt wird.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch einen qualitätsgesicherten Pool biologischer Proben, welcher durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden kann, sowie ein pharmazeutischen Präparat, das ausgehend von einem erfindungsgemäß qualitätsgesicherten Präparat hergestellt wird oder hergestellt werden kann. Diese pharmazeutischen Präparate enthalten bevorzugterweise mindestens eine Komponente, ausgewählt aus der Gruppe der Proteine, insbesondere Plasmaproteine sowie rekombinant hergestellte Proteine, und Enzyme.

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels, auf das es jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

30 Beispiel

Pooling

Aliquots von 512 Plasmaspenden werden mittels eines 3-dimensionalen Schemas zu einem Screening-Pool und 24 Sub-Pools gepoolt.

Extraktion

40 Die Nukleinsäureextraktion aus einem Screening-Pool wird mittels eines modifizierten Protokolls des QIAamp Viral Kits von QIAGEN durchgeführt. Dazu wird 1 ml des Screening-Pools einer Ultrazentrifugation unterworfen, der Überstand bis auf 140 µl abgenommen. Nach Zugabe von 560 µl AVL Lysepuffer gemäß Kit von QIAGEN wird 10 min. bei 56°C im Thermoschüttler inkubiert. Das Lysat wird auf eine Silikasäule aufgetragen und durch Zentrifugation bei 8000 rpm durch die Säule gedrückt. Nach Waschen mit je 0,5 ml Waschpuffer AW1 und AW2 wird die auf der Säule gebundene Nukleinsäure mit 50 µl H₂O eluiert.

45 **Amplifikation**

Ein kleines Fragment der Parvo B19 DNA wird durch Zugabe von 20 µl Extrakt zu 30 µl Mastermix amplifiziert.

(Perkin Elmer, TaqMan PCR Core Reagent Kit mit 5 µl 10xTaqMan Puffer, 14 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl 2,5 mM dNTPs, 1,5 µl 10 µM PT1.f(5'GACAGTTATCTGACCACCCCA3'), 1,5 µl 10 µM PT1.r(5'GCTAACTTGCCCAGGCTTGT3'), 1 µl 5 µM PT1.p(5'6-FAM-CCAGTAGCAGTCATGCAGAACCTAGAGGAGA-TAMRA3'), 1 µl Tween 20 (1%), 1,25 µl Gelatine (2%), 0,5 µl AmpErase UNG (1U/µl), 0,25 µl AmpliTaq Gold (5U/µl)).

Die Amplifikation erfolgt unter folgenden Bedingungen in einem ABI Prism 7700:

55 1. AmpErase UNG Reaktion 2 Minuten, 50°C

2. Initiale Denaturierung 10 Minuten, 95°C
3. Zyklen jeweils 15 Sekunden 95°C und 1 Minute, 58°C

Auswertung

5 Die PCR wird über die Zunahme der Fluoreszenz während der PCR ausgewertet. Der Threshold-Wert (d.h. der Zyklus bei dem das Signal über das Grundrauschen ansteigt) dient dabei der Quantifizierung. Die Threshold-Werte einer Standardreihe eines linearisierten Plasmides mit einem klonierten Fragment des Parvo B19 Genomes dienen dabei als Grundlage zur Ermittlung der Parvo B19 Konzentration im Extrakt des Screening-Pools.

10 Liegt die Anzahl der in der Probe gemessenen Genomäquivalente unter dem Grenzwert von 10^4 GE/ml im Screening-Pool werden die im diesem enthaltenen Proben freigegeben. Wird hingegen ein Wert über dem Grenzwert errechnet, wird der Screening-Pool aufgelöst.

Auflösung

15 Die 24 Sub-Pools eines Screening-Pools werden mittels eines Roboters in mehreren Schritten in H_2O_{dest} 1:200 verdünnt und ohne Extraktion in die TaqMan PCR eingesetzt.

Amplifikation der Auflösung

20 Ein kleines Fragment der Parvo B19 DANN wird durch Zugabe von 20 µl Sub-Pool-Verdünnung (entspricht 0,1 µl des Sub-Pools) zu 30 µl Mastermix amplifiziert.
(Perkin Elmer, TaqMan Gold Kit mit 5 µl 10xTaqMan Puffer, 14 µl 25 mM $MgCl_2$, 4 µl 2.5 mM dNTPs, 1,5 µl 10 µM PT1.f(5'GACAGTTATCTGACCACCCCA3'), 1,5 µl 10 µM PT1.r(5'GCTAACTTGCCCAGGGCTTGT3'), 1 µl 5 µM PT1.p(5'6-FAM-CCAGTAGCAGTCATGCAGAACCTAGAGGAGA-TAMRA3'), 1 µl Tween 20 (1%), 1,25 µl Gelatine (2%), 0,5 µl AmpErase UNG (1U/µl), 0,25 µl AmpliTaq Gold (5U/µl)).

25 Die Amplifikation erfolgt unter folgenden Bedingungen in einem ABI Prism 7700:

1. AmpErase UNG Reaktion 2 Minuten, 50°C
2. Initiale Denaturierung 10 Minuten, 95°C
- 30 3. Zyklen jeweils 15 Sekunden 95°C und 1 Minute, 58°C

Auswertung

35 Die PCR wird über die Zunahme der Fluoreszenz während der PCR ausgewertet. Durch die Ermittlung des Threshold-Wertes (d.h. der Zyklus bei dem das Signal über das Grundrauschen ansteigt) im Vergleich mit den Werten einer bekannten Standardreihe, die mitamplifiziert wurde, wird die Anzahl der Genomäquivalente im Extrakt der Screening-Probe bestimmt.

40 Da bei Zugabe von 0,1 µl Material nur Proben mit einem Gehalt von mindestens 10^4 GE/ml ein Signal ergeben können, werden alle in der Auflösung positiv erkannten Einzelpenden verworfen und die restlichen freigegeben.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung eines hinsichtlich der Belastung mit Mikroorganismen qualitäts-45 gesicherten Pools biologischer Proben ausgewählt aus der Gruppe Blut-Einzelpenden, Plasma, Serum oder Zellkultur-Chargen, unter Verwendung von Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - Entnehmen von Aliquoten aus den biologischen Proben,
 - Vereinigen der entnommenen Aliquote zu einem Screening-Pool,
 - Testen des Screening-Pools hinsichtlich des Vorhandenseins von oder des Gehaltes an Genomäquivalenten von Mikroorganismen mittels eines ersten Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens, das gegenüber den zu testenden Mikroorganismen ein bestimmtes Detektionslimit DL-1 aufweist,
 - Aufspalten des Screening-Pools in Sub-Screening-Pools durch erneutes Vereinigen von entnommenen Aliquoten in kleineren Pools, wenn beim Testen des Screening-

5 Pools ein vorgegebener Grenzwert an Genomäquivalenten überschritten wird,
- erneutes Testen der Sub-Screening-Pools hinsichtlich des Vorhandenseins von oder
des Gehaltes an Genomäquivalenten der zu testenden Mikroorganismen mittels eines
weiteren Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahrens, das gegenüber den zu testenden
Mikroorganismen ein bestimmtes, ausgewähltes Detektionslimit DL-2 aufweist, wobei
DL-1 < DL-2,
- Auffinden und Eliminieren derjenigen Proben, die DL-2 überschreiten, und
- Vereinigen der nicht-eliminierten Proben zu einem qualitätsgesicherten Pool.

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren eine PCR eingesetzt wird.

15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zu testenden Mikroorganismen Viren sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass die zu testenden
Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Hepatitisviren, insbesondere HAV,
HBV, HCV, HDV, HEV und HGV, Retroviren, insbesondere HIV-1 und HIV-2, und Parvoviren,
insbesondere Parvo B19.

20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass der Grenzwert
beim Testen des Screening-Pools zwischen DL-1 und 10^5 Genomäquivalenten/ml, insbesondere um 10^4 Genomäquivalenten/ml vorgegeben wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere
Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren unmittelbar nach dem ersten Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren durchgeführt wird.

25 8. Qualitätsgesicherter Pool biologischer Proben, erhältlich nach einem Verfahren nach
einem der Ansprüche 1-7.

KEINE ZEICHNUNG

30

35

40

45

50

55