(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 32 351 T2** 2004.02.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 710 124 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 351.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA94/00401**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 922 207.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/003071**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.07.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.02.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.05.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **26.03.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61L 2/00**
A61L 2/08

(30) Unionspriorität:
95698 **22.07.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Clearant, Inc., Los Angeles, Calif., US

(72) Erfinder:
KENT, S., Randall, Thousand Oaks, US

(74) Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM STERILISIEREN VON PRODUKTEN**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Sterilisieren von Produkten, um biologische Verunreinigungen wie beispielsweise Viren, Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Mykoplasmen und Parasiten zu entfernen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Mehrere Produkte, die zur menschlichen, tiermedizinischen oder experimentellen Anwendung hergestellt werden, können unerwünschte und potentiell gefährliche Verunreinigungen wie beispielsweise Viren, Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Mykoplasmen und Parasiten enthalten. Folglich ist es von äußerster Wichtigkeit, dass bei solchen Produkten festgestellt wird, dass diese von Verunreinigungen frei sind, bevor sie verwendet werden. Dieses ist besonders kritisch, wenn das Produkt direkt an einen Patienten verabreicht werden soll, beispielsweise bei Bluttransfusionen, Organtransplantationen und anderen Formen von Therapien beim Menschen. Dieses ist ebenfalls kritisch für verschiedene biotechnologische Produkte, welche in Medien kultiviert werden, die verschiedene Typen von Plasma enthalten und welche Mykoplasma oder anderen viralen Verunreinigungen ausgesetzt sein können.

[0003] Früher haben die meisten Prozeduren Verfahren beinhaltet, welche die Produkte im Hinblick auf eine bestimmte Verunreinigung screenen oder testen, anstatt die Verunreinigung aus dem Produkt zu entfernen (1). Produkte, die im Hinblick auf eine Verunreinigung positiv getestet werden, werden lediglich nicht verwendet. Beispiele für Screeningverfahren umfassen das Testen auf ein bestimmtes Virus im menschlichen Blut von Blutspendern. Jedoch sind solche Verfahren nicht immer zuverlässig und nicht in der Lage, das Vorliegen von Viren in sehr geringer Anzahl nachzuweisen. Dieses vermindert den Wert oder die Gewissheit des Tests im Hinblick auf die Folgen, die mit einem falschen negativen Ergebnis verbunden sind. Falsche negative Ergebnisse können in gewissen Fällen, beispielsweise im Fall des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS), lebensbedrohend sein. Weiterhin kann es in einigen Fällen Wochen, wenn nicht Monate dauern, um festzustellen, ob das Produkt verunreinigt ist oder nicht.

[0004] Neuere Bemühungen haben sich auf Verfahren konzentriert, um Verunreinigungen in den Produkten zu entfernen oder zu inaktivieren. Derartige Verfahren umfassen eine Wärmebehandlung, Filtration, Zugabe von chemischen Inaktivierungsmitteln und Gammabestrahlung (2). Es ist gut dokumentiert, dass eine Gammabestrahlung wirksam ist, um Viren und Bakterien zu zerstören (2, 3). Tatsächlich schlussfolgert ein Autor, dass die Gammastrahlung das wirksamste Verfahren ist, um Gehalte von Viren zu verringern oder zu eliminieren (2). Wenn sie jedoch auf strahlungsempfindliche Produkte wie beispielsweise Blut oder Blutprodukte angewendet wird, kann die Gammabestrahlung ebenfalls schädigende Auswirkungen auf das Produkt selbst haben. Insbesondere wurde gezeigt, dass hohe Strahlungsdosen für Erythrozyten, Blutplättchen und Granulozyten schädlich sind (3).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] In Anbetracht des Obigen besteht ein Bedarf, ein Verfahren zum Sterilisieren von Produkten bereitrustellen, das wirksam ist, um biologische Verunreinigungen zu entfernen während es gleichzeitig keine schädlichen Auswirkungen auf das Produkt aufweist. Beispiele für Verunreinigungen umfassen Viren, Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Mykoplasmen und Parasiten.

[0006] Demgemäss stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Sterilisieren eines Produkts zur Verfügung, welches das Bestrahlen des Produkts mit Gammastrahlung bei einer Rate von ca. 0,5 kGy/h bis ca. 3,0 kGy/h für einen Zeitraum von nicht weniger als 10 Stunden umfasst.

[0007] Durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird die Gammastrahlung über einen verlängerten Zeitraum abgegeben, was die Schädigung des Produkts deutlich verringert. Typischerweise wird die Bestrahlung für einen Zeitraum von nicht weniger als 10 Stunden, vorzugsweise von ca. 20 bis ca. 40 Stunden, insbesondere von ca. 20 bis ca. 30 Stunden, durchgeführt. Die Bestrahlungsrate liegt in dem Bereich von ca. 0,5 kGy/h bis ca. 3,0 kGy/h, was von dem zu sterilisierenden Produkt wie auch von der Länge der Bestrahlungsdauer abhängt. Die Gesamtmenge der abgegebenen Strahlung liegt typischerweise im Bereich von ca. 20 bis ca. 32 kGy, da von diesen Mengen gezeigt wurde, dass sie wirksam sind, um Verunreinigungen wie Beispielsweise Viren zu zerstören.

[0008] Das Produkt wird in einer Form bestrahlt, die vorzugsweise weniger als 20% Feststoffe enthält. Folglich müssen gewisse Produkte vor der Bestrahlung verdünnt werden. Die Behandlung von Produkten in verdünnter Form dient ebenfalls dazu, den Abbau des Produkts während der Bestrahlung zu verringern. Die Auswahl des Verdünnungsmittels hängt von der Art des Produktes, das bestrahlt werden soll, ab, Wenn beispiels-

weise Blutzellen bestrahlt werden, würde man ein physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel wie beispielsweise Citratphosphat-Dextrose auswählen.

[0009] Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann bei Umgebungstemperatur durchgeführt werden und erfordert nicht das Abkühlen, Einfrieren oder eine chemische Behandlung des Produkts, bevor das Verfahren durchgeführt wird. Dieses vermeidet einige der zusätzlichen Behandlungsschritte, die in Verfahren nach dem Stand der Technik vorkommen.

[0010] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist nützlich, um organische Produkte zu behandeln, die gegenüber einer Bestrahlung empfindlich sind. Derartige Produkte können für einen Abbau anfällig sein, wenn sie durch Standardverfahren bestrahlt werden. Es wird jedoch nicht erwartet, dass ein Bestrahlen empfindlicher Produkte durch das vorliegende Verfahren für die Produkte schädlich ist. Das Verfahren wird typischerweise auf biologische Produkte wie beispielsweise Blut und Blutkomponenten angewendet, obwohl es nicht darauf beschränkt ist.

[0011] In Fällen, wo lebende Zellen (wie beispielsweise Blutzellen) bestrahlt werden sollen, kann eine Fängersubstanz zugegeben werden, um freie Radikale und andere Materialien, die für Zellen toxisch sind, zu binden. Eine geeignete Fängersubstanz ist Ethanol.

[0012] Die Wirksamkeit des Verfahrens der vorliegenden Erfindung steht im Gegensatz zu dem, was andere Fachleute auf diesem Gebiet vorhergesagt haben. Insbesondere wird in dem Patent Nr. 4,620,908 aus den Vereinigten Staaten (1) angegeben, dass, wenn eine Gammabestrahlung mit einem Proteinmaterial bei Umgebungstemperatur durchgeführt würde, das Material fast vollständig zerstört würde oder in einem solchen Ausmaß zerstört würde, dass das Material praktisch unwirksam würde. Wenn das Verfahren der vorliegenden Erfindung jedoch mit Blut getestet wurde, wurde im Gegensatz dazu die Lebensfähigkeit der darin enthaltenen Zellen nicht zerstört.

[0013] Die EP 0 334 679 A1 zeigt die Bestrahlung von Blutplasma oder aus Plasma abgeleiteten Produkten bei Temperaturen von –20°C bis –60°C unter Verwendung von Dosen von 1 oder 2 bis 20 oder 40 kGy/Stunde, üblicherweise 4 bis 15 kGy/Stunde.

BESCHREIBUNG VON BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0014] Die folgenden Beispiele werden angegeben, um das Verfahren der vorliegenden Erfindung zu veranschaulichen, und sollen nicht dazu dienen, den Umfang der Erfindung zu beschränken.

BEISPIEL 1

Sterilisation von Blut

[0015] Ein 200 ml-Beutel mit einem 1 Tag alten Erythrozytenkonzentrat wurde verwendet. Ethanol wurde zu den Zellen zugegeben, so dass eine endgültige Ethanolkonzentration von 0,01% erreicht wurde. Die Erythrozyten wurden um einen Faktor von 1 zu 10 verdünnt, indem eine modifizierte Citratphosphat-Dextrose (CPD)-Lösung mit einem pH von ca. 6,4 bis 6,7 und mit der folgenden Zusammensetzung in einem Gesamtvolumen von 500 ml verwendet wurde:

Zitronensäuremonohydrat	0,2 g
Natriumcitratdihydrat	26,3 g
Mononatriumphosphat	2,2 g
Dinatriumphosphat	1,0 g
Dextrose	3,2 g

[0016] Die Zellen wurden in einem Gammabestrahlungsgerät kommerzieller Größe bestrahlt, welches ein Gestell mit einer Kobalt 60-Quelle enthielt. Die Bestrahlung wurde außerhalb des Trägers in einem ungeschützten Behälter durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei einer Rate von ungefähr 1 kGy/h bestrahlt. Nach der Bestrahlungsdauer wurden die Erythrozyten mit dem Auge untersucht, und es wurde gefunden, dass diese lebensfähig waren, wobei sie eine leuchtend rote Farbe aufwiesen. Eine Kontrollprobe, welche aus Erythrozytenkonzentrat bestand, das nicht mit der oben beschriebenen CPD-Lösung verdünnt wurde, war nach der Bestrahlung nicht lebensfähig.

[0017] Vier Tage nach dem Bestrahlungsvorgang wurden die verdünnten Zellen im Hinblick auf die Gehalte von verschiedenen Blutkomponenten getestet, und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Kontrollprobe bestand aus Blut aus demselben Beutel wie die Testprobe, sie erhielt aber keine Bestrahlung. Tabelle 1 zeigt, dass die Verdünnung und Bestrahlung menschlicher Blutzellen die Zahl der Leukozyten nicht signifikant veränderte. Die Blutplättchenzahl und die Hämatokritwerte waren etwas niedriger als bei der Kontrolle, jedoch liegen diese Werte immer noch innerhalb des Bereichs, den man bei normalem Blut von Erwachsenen findet. Der

Gehalt an Hämoglobin war höher als in der Kontrolle, was zeigt, dass einige Erythrozyten während des Vorgangs lysierten. Dieses wird ebenfalls durch die niedrigere Zahl von Erythrozyten belegt. Nichtsdestotrotz, im Gegensatz zu dem, was früher veröffentlicht wurde, zerstörten bis zu 25 kGy Strahlung durch das vorliegende Verfahren die Blutkomponenten nicht. Die Zellen wurden ebenfalls gezählt, und es wurde gefunden, dass sie nach 25 kGy Gammabestrahlung lebensfähig waren.

Tabelle 1

Komponente	Bestrahltes Blut	Kontrollblut
Leukozyten	4 K/mm^3	4,8 K/mm^3
Erythrozyten	3 Mi/mm^3	7,2 Mi/mm^3
Hämoglobin	42 g/dl	21 g/dl
Hämatokrit	46 %	64 %
Blutplättchen	100 k/mm^3	120 k/mm^3

BEISPIEL 2

Sterilisation von Dextrose

[0018] Dextrose- (oder Glukose)-haltige Lösungen werden bei der Behandlung von Kohlen-Hydrat- und Flüssigkeitsmangel, bei der Behandlung von Hypoglykämie, als ein Plasmaexpander, bei der Nierendialyse und um Hepatotoxinen entgegenzuwirken verwendet (4, 5). Dextrose ist ebenfalls die bevorzugte Quelle für Kohlenhydrate bei der parenteralen Ernährung (4, 5). Bei allen obigen Anwendungen muss die Dextrose vor der Anwendung sterilisiert werden. Die Sterilisation von dextrosehaltigen Produkten wird allgemein durch Wärmesterilisation oder Autoklavieren durchgeführt. Unglücklicherweise wurde von diesen Verfahren berichtet, dass diese dextrosehaltige Lösungen abbauen oder karamellisieren, was zu einer Farbänderung in der Lösung führt (5). Von der Gammabestrahlung von Glucose wurde ebenfalls berichtet, dass diese glucosehaltige Lösungen zersetzt (6). Daher besteht ein Bedarf für ein Verfahren, das dextrosehaltige Produkte sterilisieren kann, welches das Produkt selbst nicht abbaut. In Anbetracht der Probleme nach dem Stand der Technik wurde eine Dextroselösung gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wie folgt behandelt.

[0019] Eine 5%ige Dextroselösung wurde für 24 Stunden bei einer Rate von ungefähr 1 kGy/h bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Produkt getestet, und es wurde gefunden, dass es im Vergleich mit der nicht bestrahlten Kontrolle keine Änderung im Spektrum des sichtbaren Lichts gab. Daher kann das vorliegende Verfahren nützlich sein, um Produkte zu sterilisieren, die Dextrose enthalten.

[0020] Anschließend an das obige Experiment wurden frische Lösungen mit 5 und 50% Dextrose bis auf 25 kGy über 36 Stunden hinweg bei Umgebungstemperatur bestrahlt. Die Ergebnisse waren ähnlich zu den oben beschriebenen. Zusätzlich wurden UV/VIS-Scans erhalten, und diese zeigten ein vollständiges Fehlen der Spitze bei 283,4 nm für "Furturale", die im U.S.P. vorlag. Im Gegensatz dazu enthalten Dextroseproben, die unter Verwendung eines Autoklaven sterilisiert wurden, die Furfuralspitze bei 283,4.

BEISPIEL 3

Sterilisation von menschlichem Serumalbumin

[0021] Normales menschliches Serumalbumin wurde als 25%ige Salzlösung bis zu einer Gesamtdosis von 25 kGy über 36 Stunden hinweg unter Verwendung einer Gammazelle 220 bestrahlt. Die Temperatur wurde während der Bestrahlung nicht kontrolliert, es wird aber geschätzt, dass der Behälter, welcher die Albuminlösung enthielt, ungefähr 23°C aufwies. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse sind in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2

PARAMETER	KONTROLLE (%)	BESTRAHLT (%)
Polymer	2	3
Dimer	7	8
Monomer	90	86
Niedriges Molekulargewicht	1	3
pH	7,05	6,97
NTU (muss > 20 sein)	11,4	11,4

[0022] Wie die Ergebnisse zeigen, kann normales menschliches Serumalbumin sicher bis auf 25 kGy bei Raumtemperatur bestrahlt werden, ohne die wesentlichen Eigenschaften des Proteins nachteilig zu beeinflussen. Dieses wurde vorher nicht gezeigt. Alle anderen Versuche bei der Bestrahlung von Serumalbumin erfordern, dass dieses im gefrorenen Zustand bestrahlt wird. Dieses trägt zu den Kosten und den Schwierigkeiten bei der Durchführung der Bestrahlung bei.

BEISPIEL 4

[0023] Normales menschliches Blut von einem gesunden Spender wurde in ein heparinisiertes Röhrchen entnommen, dreimal mit einer Standard-CPD-Lösung gewaschen, dann 1 : 20 mit CPD, das 0,01% v/v Ethanol enthielt, verdünnt. Diese letztere Lösung von CPD mit 0,01% v/v Ethanol wird SCPD genannt. 2 ml-Aliquots wurden dann in 10 ml-Plastiktesröhrchen gegeben und mit unterschiedlichen Dosen bis auf 26 kGy über 36 Stunden hinweg bei Raumtemperatur bestrahlt. Es gab keine Hämolyse, und die Zellen schienen intakt zu sein, wenn sie auch etwas größer und leicht unregelmäßig in der Form waren. Die Ergebnisse von drei getrennten Experimenten werden in Tabelle 3 angegeben.

TABELLE 3

PARAMETER	RBC[1]	HGB[2]	HCT[3]	MCV[4]	MCH[5]	MCHC[6]	RDW[7]	FLAGS
1*	1,08	41	0,097	89,5	38,3	427	17,7	Nahezu normal
Kontrolle	0,99	33	0,089	90,2	33,0	366	15,3	
2 *				95,0	32,3	339	12,0	
12 kGy 1	1,22	45	0,166	135,8	36,5	269	27,3	1+Anisozytose
	1,38	45	0,199	144,7	33,0	228	24,9	3+Macrozytose
1	1,04	32	0,169	163,0	31,3	192	18,8	1+Anisozytose
16 kGy	0,54	29	0,088	162,6	54,5	335	18,8	3+Macrozytose
2	0,82	27	0,128	156,5	32,8	209	19,8	2+Anisozytose
	0,81	26	0,124	152,6	32,4	212	20,2	3+Macrozytose
1	0,79	244	0,125	158,4	30,8	194	19,4	1+Anisozytose
20 kGy	1,26	28	0,203	161,5	22,1	137	19,0	3+Macrozytose
2	0,93	30	0,141	151,5	32,3	213	20,1	2+Anisozytose
	0,92	30	0,143	155,5	32,1	207	20,5	3+Macrozytose
26 kGy 1	1,15	34	0,180	155,9	29,4	189	19,3	1+Anisozytose
	1,15	34	0,176	153,0	29,9	195	23,4	3+Macrozytose

* Experiment 1 und Experiment 2

[1] Erythrozytenzahl: Zellen × 1012/Liter
[2] Hämoglobin: Gramm/Liter
[3] Hämatokrit
[4] Mittleres korpuskuläres Volumen: Femtoliter
[5] Mittleres korpuskuläres Hämoglobin: Pikogramm
[6] Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration: Gramm/Liter

[0024] Es gab keine Hämolyse, und die Zellen schienen intakt zu sein, wenn sie auch etwas groß und leicht unregelmäßig in der Form waren. Die Zellen wurden leicht in Suspension gebracht und in frischem Puffer rekonstituiert.

[0025] Die folgenden drei Experimente (Beispiele 5, 6 und 7) wurden durchgeführt, um die Effizienz des Verfahrens festzustellen, wenn HIV-haltiges Blut behandelt wurde. In jedem Beispiel wurden die Zellen in ähnlicher Weise behandelt. Die Analyse wurde durch ein zweites unabhängiges Labor durchgeführt. Das zweite Labor wurde ebenfalls ausgewählt, da es das AIDS-Virus handhaben konnte. In diesen Experimenten wurden die Zellen nach 12, 16 und 24 Stunden leicht geschüttelt. Weiterhin wurden die Zellen in dem dritten Experiment (Beispiel 7) in T25-Kolben gegeben, um einen größeren Oberflächenbereich bereitzustellen und die Konzentration aufgrund des Absetzens am Boden der Zentrifugenröhrchen zu verringern.

BEISPIEL 5

Sterilisation von HIV-haltigem Blut

[0026] Das folgende Experiment wurde mit den folgenden bestimmten Zielen durchgeführt:

1. Die Toxizität des Verfahrens für Erythrozyten (RBCs) auszuwerten.
2. Die antiretrovirale Aktivität des Verfahrens auszuwerten.

PROZEDUR

[0027] Anfangs wurden 2 ml antikoaguliertes Blut von einem HIV-seronegativen Spender erhalten. Das Blut wurde zentrifugiert, und das Plasma wurde entfernt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 10 ml des CPD-Puffers resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das endgültige Pellet wurde in 40 ml des SCPD-Puffers resuspendiert und in 2 ml-Aliquots auf Plastikröhrchen verteilt, wobei 16 getrennte Aliquots für eine weitere Verarbeitung zurückgehalten wurden. Bei 8 dieser Röhrchen wurde ein Aliquot HTLV-IIIB zugegeben. Dieses ist ein Laborstamm des HIV-Virus, und es wurden 100 Gewebekultur-infizierende Dosen (TCID) zu jedem der Röhrchen, die infiziert werden sollten, zugegeben. Bei den verbleibenden 8 Röhrchen wurde eine "Schein"infektion durchgeführt, indem eine kleine Menge eines nicht infektiösen Laborpuffers, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), zugegeben wurde. 4 infizierte und 4 nicht infizierte Röhrchen wurden dem Verfahren unterzogen. Zum Vergleich wurden die verbleibenden 8 Röhren (4 infizierte und 4 nicht infizierte) in einer identischen Weise gehandhabt, außer dass diese nicht dem Verfahren unterzogen wurden.

[0028] Es soll angegeben werden, dass zu Beginn der Studie ein separates Aliquot an Blut von dem Spender erhalten wurde. Dieses wurde in dem klinischen Hämatologielabor verarbeitet, und es wurde ein vollständiges Hämogramm erstellt. Diese Grundlinienergebnisse wurden verglichen mit wiederholten Tests der Aliquots der Studie, was die Auswertung von 4 bearbeiteten und 4 nicht bearbeiteten Proben einschloss, welche alle nicht mit HIV infiziert waren.

[0029] Ein Aliquot mit 0,5 ml von jeder der infizierten Proben der Studie wurde auf mononuklearen Zellen (MCs) inokuliert, welche 3 Tage früher erhalten wurden. Diese Zellen waren in RPMI-Kulturmedium, mit 10% fötalem Kalbserum und anderen Zusätzen (Penicillin, Streptomycin, Glutamin, HEPES-Puffer) zusammen mit 1 µg/ml PHA-P, suspendiert worden. Zur gleichen Zeit wie diese Inokulierung wurden die Zellen in frischem Medium mit rIL-2 (20 U/ml) resuspendiert. Die Kulturen wurden, für 7 Tage aufrechterhalten. Zweimal in der Woche wurde ein Teil des Kulturmediums für die Messung der HIV p24-Antigenspiegel (kommerzielles ELISA-Kit, Coulter Electronics, Hialeah, FL) zur Messung des Virenwachstums geerntet.

[0030] Ein separates Aliqout der 8 infizierten Proben der Studie wurde für Virentitrationsexperimente verwendet. Kurz gesagt, wurden vierfache Reihenverdünnungen der virenhaltigen Flüssigkeiten (die von 1 : 16 bis 1 : 65.536 reichten) dreifach in Gewebekulturplatten mit flachem Boden und 96 Vertiefungen inokuliert. PHA-stimulierte MCs wurden zu jeder Vertiefung zugegeben (4 Millionen Zellen in 2 ml Kulturmedium, mit IL-2). Ein Aliquot des Überstands aus jeder Kulturvertiefung wurde zweimal wöchentlich. zur Messung der HIV p24-Antigenspiegel geerntet. Eine Vertiefung wurde als "positiv" bewertet, wenn der Wert des HIV p24-Antigens > 30 pg/ml war. Der Virentiter wurde gemäß dem Spearman-Karber-Verfahren (siehe ACTG virology protocol manual) unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet:

$$M = xk + d[0{,}5 - (1/n)r]$$

M: Titer (in log 4),
xk: Dosis der höchsten Verdünnung
d: Abstand zwischen den Verdünnungen
n: Anzahl der Vertiefungen pro Verdünnung

r: Summe der Gesamtzahl der Vertiefungen

ERGEBNISSE

[0031] Die Parameter der Erythrozyten für die Grundlinienprobe wie auch für die nicht bearbeiteten und bearbeiteten Proben der Studie sind in Tabelle 4 gezeigt.

TABELLE 4

Probe/Nummer	MCV	MCH	MCHC
Grundlinie	94,5	32,0	339
Nicht bearbeitet-1	91,4	34,4	376
Nicht bearbeitet-2	90,2	37,9	420
Nicht bearbeitet-3	92,1	40,0	433
Nicht bearbeitet-4	91,0	40,2	442
Bearbeitet-1	133,4	37,8	284
Bearbeitet-2	131,5	45,0	342
Bearbeitet-3	128,5	38,9	303
Bearbeitet-4	131,1	39,4	301

[0032] Die Abkürzungen, die in Tabelle 4 verwendet werden, sind unter Tabelle 3 erklärt.

[0033] Wie oben beschrieben wurde, wurden HIV-Kulturen etabliert, indem 0,5 ml-Aliquots von nicht bearbeiteten und bearbeiteten Proben aus der Studie verwendet wurden. Die P24-Antigenspiegel (pg/ml) aus den Proben der Studie an Tag 4 und Tag 7 der Kultivierung sind in Tabelle 5 gezeigt.

TABELLE 5

Probe/Nummer	p24 - Tag 4	p24 - Tag 7
Nicht bearbeitet-1	1360	464
Nicht bearbeitet-2	1180	418
Nicht bearbeitet-3	1230	516
Nicht bearbeitet-4	1080	563
Bearbeitet-1	579	241
Bearbeitet-2	760	303
Bearbeitet-3	590	276
Bearbeitet-4	622	203

[0034] Schließlich wurde eine nicht bearbeitete Probe und eine bearbeitete Probe für die Durchführung der direkten Virentitration ohne Kultivierung ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt.

TABELLE 6

Probe/Nummer	Titer (log 10 ml)
Nicht bearbeitet-1	1,5
Bearbeitet-1	0,0

[0035] Die Erythrozyten wurden durch die Bearbeitung minimal beeinträchtigt, auch wenn eine gewisse reproduzierbare Makrozytose beobachtet wurde. Auch wenn beidem Cokultivieren von bearbeiteten Proben einige restliche lebende Viren vorzuliegen schienen, wurde dieses durch direkte Titrationsexperimente nicht bestätigt.

BEISPIEL 6

[0036] Das Ziel dieses Experiments war es, die Toxizität des Verfahrens gegenüber Erythrozyten in einer umfassenden Weise auszuwerten.

METHODEN

[0037] Für dieses Experiment wurde 1 ml antikoaguliertes Blut von demselben HIV-seronegativen Spender wie im ersten Experiment erhalten. Das Blut wurde zentrifugiert, und das Plasma wurde entfernt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 10 ml des CPD-Puffers resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das endgültige Pellet wurde in 20 ml des SCPD-Puffers resuspendiert und in 2 ml-Aliquots auf Plastikröhrchen verteilt, wobei alle 10 Aliquots für eine weitere Verarbeitung zurückgehalten wurden. 8 Röhrchen wurden dem Verfahren unterzogen, während die letzten 2 Röhrchen als Kontrollen, nicht bearbeitete Röhrchen, zurückgehalten wurden. Nach der Bearbeitung wurden alle 10 Röhrchen zentrifugiert, und das resultierende Pellet wurde in 100 µl Puffer resuspendiert. Ein vollständiges Hämogramm wurde mit diesen erneut konzentrierten Proben der Studie durchgeführt.

[0038] Wie in dem ersten Experiment wurde ein separates Aliquot an Blut von dem Donor erhalten, wenn die Probe für die Studie entnommen wurde. Ein vollständiges Hämogramm wurde mit dieser Grundlinienprobe erstellt. Da die Proben der Studie auf 33– 50% ihres ursprünglichen Zustands zurück konzentriert wurden, konnten direktere Vergleiche mit der Grundlinienprobe angestellt werden, als dieses in unserem früheren Experiment möglich war.

ERGEBNISSE

[0039] Die Parameter der Erythrozyten für die Grundlinienprobe wie auch für die nicht bearbeiteten und bearbeiteten Proben der Studie sind in Tabelle 7 gezeigt. Die Abkürzungen, die in Tabelle 7 verwendet werden, sind in Tabelle 3 definiert.

TABELLE 7

Probe/Nummer	RBC	HGB	MCV	MCH	MCHC
Grundlinie	4,76	152	94,9	31,9	336
Nicht bearbeitet-1	0,99	33	90,2	33,0	366
Nicht bearbeitet-2	1,08	41	89,5	38,3	427
Bearbeitet-1	1,15	34	153,0	29,9	195
Bearbeitet-2	1,15	34	155,9	29,4	189
Bearbeitet-3	1,26	28	161,5	22,1	137
Bearbeitet-4	0,79	24	158,4	30,8	194
Bearbeitet-5	0,54	29	162,5	54,5	335
Bearbeitet-6	1,04	32	163,0	31,3	192
Bearbeitet-7	1,35	45	144,7	33,0	228
Bearbeitet-8	1,22	45	135,8	36,5	269

[0040] Es gab eine Makrozytose der Zellen, welche in all den bearbeiteten Proben vorlag. Vergleichbare Hämoglobinwerte wurden bei den nicht bearbeiten und bearbeiteten Proben gemessen. Die Absolutwerte waren für die restliche Verdünnung geeignet. Die Erythrozyten wurden konserviert.

BEISPIEL 7

[0041] Das Ziel dieses Beispiels war es, die in Beispiel 6 erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und darauf aufzubauen.

METHODEN

[0042] Für dieses Experiment wurden 5 ml antikoaguliertes Blut von demselben HIV-seronegativen Spender wie in den ersten zwei Experimenten erhalten. Das Blut wurde zentrifugiert, und das Plasma wurde entfernt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 100 ml des CPD-Puffers resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das endgültige Pellet wurde in 100 ml des SCPD-Puffers resuspendiert und in 25 ml Aliquots in T25-Gewebekulturkolben verteilt, wobei alle 4 Aliquots zur weiteren Verarbeitung zurückgehalten wurden. 2 Kolben wurden dem Verfahren unterzogen, während die anderen 2 als Kontrollen, nicht bearbeitete Kolben, zurückgehalten wurden. Nachdem Bearbeiten wurde der Inhalt jedes Kolbens betrachtet, und eine visuelle Feststellung der Fähigkeit der Zellen, Sauerstoff zu absorbieren (was bei der Exposition an die umgebende Luft zu einem leuchtenderen Rot führte) wurde durchgeführt. Daran anschließend wurde der Inhalt der Kolben abgesaugt und zentrifugiert, wobei das restliche Pellet in einem kleinen Volumen an Puffer resuspendiert wurde. Ein vollständiges Hämogramm wurde mit diesen erneut konzentrierten Proben der Studie erstellt.

[0043] Wie in den Beispielen 5 und 6 wurde ein separates Aliquot an Blut von dem Spender erhalten, wenn die Probe der Studie entnommen wurde. Ein vollständiges Hämogramm wurde mit dieser Grundlinienprobe erstellt. Da die Proben der Studie auf 33– 50% ihres ursprünglichen Zustands zurück konzentriert wurden, wäre ein direkter Vergleich einer Anzahl spezifischer Parameter mit der Grundlinienprobe möglich.

ERGEBNISSE

[0044] Bei einer Sichtprüfung gab es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den bearbeiteten und nicht bearbeiteten Proben der Studie. Insbesondere schien eine gleichmäßige Verteilung von gut suspendierten Zellen vorzuliegen. Beim Aussetzen an die umgebende Luft wurde der Inhalt aller Kolben etwas leuchtender rot. Keine spezifischen quantitativen Messungen der Oxygenierung wurden durchgeführt.

[0045] Die Parameter der Erythrozyten für die Grundlinienprobe wie auch für die nicht bearbeiteten und bearbeiteten Proben der Studie sind in Tabelle 8 gezeigt. Die Abkürzungen, die in Tabelle 8 verwendet werden, sind unter Tabelle 3 definiert.

TABELLE 8

Probe/Nummer	RBC	HGB	MCV	MCH	MCHC
Grundlinie	4,75	153	95,0	32,3	339
Nicht bearbeitet-1	0,93	30	151,5	32,3	213
Nicht bearbeitet-2	0,92	30	155,5	32,1	207
Bearbeitet-1	0,82	27	156,5	32,8	209
Bearbeitet-2	0,81	26	152,6	32,4	212

[0046] Dieses Experiment wurde geplant, um den Bedingungen für Erythrozyten näher zu kommen, die in einen Patienten transfundiert werden sollen, und es wurde folglich mit höheren Volumina durchgeführt. Auf einer vorläufigen Basis scheint es nicht so, dass das Verfahren die Fähigkeit der Erythrozyten beeinträchtigt, Sauerstoff zu befördern, auch wenn dieses formaler gemessen werden sollte. Interessanterweise gab es bei diesem Experiment keinen Unterschied in der Zellgröße zwischen den bearbeiteten und nicht bearbeiteten Proben, wobei beide im Vergleich zu der Grundlinie, groß waren. Dieses sollte wiederholt werden. Vergleichbare Hämoglobinwerte wurden bei allen Proben der Studie gemessen.

[0047] Während sich die Beispiele auf spezifische Ausführungsformen des Verfahrens der vorliegenden Erfindung beziehen, sollte anerkannt werden, dass das Verfahren verwendet werden kann, um eine extrem große Vielzahl von Produkten zu behandeln, die eine Sterilisation benötigen. Die Tatsache, dass sich das Verfah-

ren bei Blut, welches ein empfindliches biologisches Material ist, als wirksam erwiesen hat, lässt eine vernünftige Vorhersage zu, dass das Verfahren bei vielen ähnlich empfindlichen Produkten verwendet werden kann. Beispiele für andere Produkte, die behandelt werden können, umfassen Pharmazeutika, Proteine, Nukleinsäuren, Blutkomponenten, Körperflüssigkeiten (wie beispielsweise Zerebralspinalflüssigkeit, Speichel), Liposomen, glucosehaltige Produkte, Zellkulturen, fötales Rinderserum, Knochenmark, Organe, Nahrungsmittel und Kosmetika wie beispielsweise Shampoos, Lotionen und Cremes.

Literaturzitate

1. Van Duzer, John P.; Method for Destroying Microbial Contamination in Protein Materials; United States Patent Nr. 4,620,908; 4. November 1986.
2. Keathly, J. D. et al.; Is There Life after Irradiation? Teil 2; BioPharm Juli-August 1993.
3. Leitman, Susan F.; Use of Blood Cell Irradiation in the Prevention of Post Transfusion Graft-vs-Host Disease; Transfusion Science 10: 219–239, 1989.
4. The Merck Index, Elfte Ausgabe; Merck & Co. Inc. 1989.
5. Martindale's Extra Pharmacopecia S. 1.265.
6. Kawakishi et al.; Radiation-InducedDegradation of D-glucose in Anaerobic Condition. Agric. Biol. Chem. Juni 1977.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Sterilisieren eines Produkts, welches das Bestrahlen des Produkts mit Gammastrahlung bei einer Rate von 0,5 kGy/h bis 3,0 kGy/h für einen Zeitraum von nicht weniger als 10 Stunden umfasst.

2. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt, das sterilisiert werden soll, in einer Form mit einem Feststoffgehalt von weniger als 20 Gew.-% bestrahlt wird.

3. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Gesamtmenge der abgegebenen Strahlung in dem Bereich von ca. 20 bis ca. 32 kGy liegt.

4. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt für einen Zeitraum von 20 bis 40 Stunden bestrahlt wird.

5. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt für einen Zeitraum von 20 bis 30 Stunden bestrahlt wird.

6. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt ein organisches Produkt ist.

7. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt ein biologisches Produkt ist.

8. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt Blut oder ein Bestandteil von diesem ist.

9. Ein Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei das Produkt mit einer Citrat-Phosphat-Dextroselösung verdünnt ist.

10. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt Dextrose enthält.

11. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Produkt ein Protein ist.

12. Ein Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei das Produkt ein Antikörper ist.

13. Ein Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Produkt in Gegenwart einer Fängersubstanz bestrahlt wird.

14. Ein Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Fängersubstanz eine Fängersubstanz für freie Radikale ist.

15. Ein Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei die Fängersubstanz Ethanol ist.

16. Ein Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei das Ethanol in einer Endkonzentration von 0,01% vorliegt

und das Blut oder Blutprodukt vor der Bestrahlung in einem physiologisch verträglichen Verdünnungsmittel verdünnt wird, um eine Endverdünnung von wenigstens 1 : 10 zu erreichen.

17. Ein Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei das physiologisch verträgliche Verdünnungsmittel eine modifizierte-Citrat-Phosphat-Dextroselösung mit einem pH in dem Bereich von ca. 6,4 bis ca. 6,7 ist.

18. Ein Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei die Citrat-Phosphat-Dextroselösung ca. 0,01% v/v Ethanol enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen