

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 059**

51 Int. Cl.:
A61K 41/00 (2006.01)
A61L 2/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10001518 .9**
96 Fecha de presentación: **21.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2198886**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN SANGRE DE DONANTES, EN PLASMA SANGUÍNEO O EN CONCENTRADOS DE ERITROCITOS EN RECIPIENTES FLEXIBLES BAJO AGITACIÓN.**

30 Prioridad:
23.12.2005 DE 102005062634

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
**BLUTSPENDEDIENST DER LANDESVERBANDE
DES DRK NIEDERSACHSEN, SACHSEN-ANHALT,
THURINGEN, OLDENBURG UN
ELDAGSENER STRASSE 38
31830 SPRINGE, DE**

72 Inventor/es:
Mohr, Harald

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 369 059 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la inactivación de patógenos en sangre de donantes, en plasma sanguíneo o en concentrados de eritrocitos en recipientes flexibles bajo agitación.

5 El objeto de la invención es un procedimiento para llevar a cabo la inactivación de patógenos tales como bacterias y virus en sangre de donantes (sangre), en plasma sanguíneo (plasma) y/o en concentrados de eritrocitos (EKs) por medio de un tratamiento fotodinámico y/o por medio de una irradiación con luz ultravioleta.

10 Se sabe que la aplicación terapéutica de sangre y de preparaciones de sangre conlleva el riesgo de que el receptor sea infectado con virus y con bacterias. Pueden citarse, por ejemplo, los virus de la hepatitis-B (HBV) y de la hepatitis-C (HCV) así como los patógenos del SIDA HIV-1 y HIV-2. El riesgo existe siempre que no tenga aplicación ninguna etapa para llevar a cabo la inactivación o bien la eliminación de patógenos a la hora de llevar a cabo la obtención de los preparados correspondientes.

15 Existía o bien existe una pluralidad de esfuerzos para descontaminar las preparaciones de sangre por medio de métodos fotodinámicos. El principio está basado en que el producto correspondiente es expuesto a la luz en presencia de una substancia fotoactiva (de un fotosensibilizador). La luz irradiada debe contener un intervalo de longitudes de onda, que sea absorbido por el fotosensibilizador y con el cual éste pueda ser activado. La energía absorbida es transferida bien directamente hasta la estructura diana correspondiente (por ejemplo los ácidos nucleicos o las proteínas superficiales de un virus), que es destruida por este motivo, o bien es transferida a las moléculas de oxígeno disueltas, que son activadas por este motivo. Se forma oxígeno singulete, que tiene una marcada actividad virucida y bactericida.

20 En el caso ideal, el fotosensibilizador empleado tiene una elevada afinidad para los componentes esenciales de los virus y de otros patógenos, por ejemplo para sus ácidos nucleicos y únicamente tiene una baja afinidad o incluso no tiene en absoluto afinidad para los componentes del preparado, que debe ser descontaminado. Como resultado del tratamiento fotodinámico se inactivan en este caso los patógenos, mientras que se mantiene la actividad del producto. Se ha descrito como un fotosensibilizador adecuado para el tratamiento de plasma, por ejemplo, el colorante de fenotiazina constituido por el azul de metileno; para la descontaminación de los concentrados de trombocitos se emplea riboflavina (vitamina B2) y para la descontaminación de los EKs se han ensayado las ftalocianinas. Desde luego los procedimientos para la inactivación fotodinámica de patógenos en EKs no pasan hasta ahora de la escala de laboratorio.

30 Esto es aún más válido para la propia sangre. Un motivo fundamental a este respecto podría ser considerado en que la luz irradiada tiene que tener una intensidad determinada, con objeto de poder activar al fotosensibilizador empleado, y en que la sangre y los EKs tienen únicamente una permeabilidad muy pequeña para la luz de cualquier longitud de onda. El problema se presenta naturalmente también en el caso del plasma, aún cuando no lo hace en la misma cuantía.

35 De la misma manera se sabe que pueden ser inactivados también los patógenos por medio de la simple irradiación con luz ultravioleta de onda corta (UV), es decir en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre aproximadamente 200 y 320 nm, de manera especial comprendido entre 200 hasta por debajo de 300 nm (UVB y UVC). Por encima de los 320 nm la energía de la irradiación es demasiado baja como para llevar a cabo la inactivación de los microorganismos y de los virus. Frente a los métodos químicos, fotoquímicos y fotodinámicos para llevar a cabo la inactivación de los patógenos, la simple irradiación con luz UV tiene fundamentalmente la ventaja de que es activa por sí misma y no requiere la adición de productos químicos reactivos ni de substancias fotoactivas.

45 La irradiación UVC es la más efectiva para llevar a cabo la inactivación directa de los patógenos. Esta irradiación tiene desde luego, el inconveniente de que únicamente atraviesa a las soluciones que contienen proteínas tales como el plasma o bien a las suspensiones turbias (por ejemplo sangre y EKs) únicamente hasta una profundidad de penetración muy pequeña. La irradiación UVC fue empleada durante la Segunda Guerra Mundial y brevemente después de la misma con objeto de esterilizar plasma y soluciones de albúmina, ante todo para llevar a cabo la inactivación de los virus de la hepatitis. Entonces se procedió de tal manera, que la solución se hacía pasar a través de una instalación de flujo en forma de película delgada por delante de una fuente de luz UVC. El método se reveló como insuficientemente seguro y fue abandonado (Kallenbach NR, Cornelius PA, Negus D, et al. Inactivación de virus por medio de la luz ultravioleta -Inactivation of viruses by ultraviolet light-. Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus. 1989, 56, 70-82).

55 Actualmente se emplean procedimientos más desarrollados, que trabajan según el mismo principio con objeto de esterilizar preparaciones terapéuticas de proteínas plasmáticas. En cualquier caso se pretendía, o bien se pretende, tratar grandes volúmenes; es decir conjuntos de plasma o bien soluciones proteicas de hasta algunos cientos de litros inclusive e incluso en cantidades mayores (Hart H, Reid K, Hart W. Inactivación de virus durante el tratamiento

5 con luz ultravioleta de inmunoglobulina y de albúmina humana -Inactivation of viruses during ultraviolet light treatment of human intravenous immunoglobulin and albumin-. Vox Sang 1993; 64(2):82-88. y Chin S, Williams B, Gottlieb P, et al. Tratamiento virucida con luz ultravioleta de longitud de onda corta de concentrados de plasma y del factor VIII: protección de proteínas por medio de antioxidantes -Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants-; Blood 1995; 86(11):4331-4336).

Con objeto de llevar a cabo la esterilización de una pluralidad de unidades individuales de donaciones de sangre, de plasma o de EKs, con volúmenes que toman un valor, en todo caso, de algunos cientos de ml inclusive, no son adecuadas las citadas instalaciones de flujo. Sin embargo, en la práctica diaria de un banco de sangre esto es precisamente necesario.

10 La irradiación UVB es igualmente microbicida y virucida, aún cuando no lo es en la misma cuantía que la irradiación UVC. La irradiación UVB penetra a través de las soluciones que contienen proteínas y a través de las suspensiones turbias algo mejor que la irradiación UVC, desde luego su profundidad de penetración, por ejemplo en plasma, sólo puede determinarse en el intervalo de algunos milímetros.

15 El plasma y los EKs son aislados en la mayoría de las ocasiones a partir de una sola donación de sangre, o bien se obtienen por medio de una aféresis mecánica de donaciones individuales. El volumen de los preparados está situado, en general, entre aproximadamente 200 y 350 ml. El volumen de donaciones de sangre se encuentra en la mayoría de las ocasiones comprendido entre 450 y 500 ml. Los preparados son sometidos, en general, en bolsas planas de material sintético, a una liofilización (plasma) o son almacenados aproximadamente a 4°C (donaciones de sangre, EKs).

20 Sería deseable poder llevar a cabo la esterilización de los preparados que han sido citados en las bolsas de este tipo. Desde luego, en este caso se presenta el problema citado de que son prácticamente impermeables para la luz UV, siendo la sangre y los EKs además prácticamente impermeables para la luz visible.

25 De manera sorprendente, se ha encontrado que se resuelve el problema, anteriormente citado, por medio de un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1. Formas preferentes de realización constituyen el objeto de las reivindicaciones dependientes o son citadas a continuación.

30 De conformidad con la presente invención, los preparados, es decir la sangre de donantes (sangre), el plasma sanguíneo (plasma) y/o los concentrados de eritrocitos (EKs) se ponen en movimiento, en una forma adecuada, en sus bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz de tal manera, que se lleva a cabo un balanceo constante de las muestras en el recipiente. En este caso se lleva a cabo el movimiento de una manera tan vigorosa, que se forman en el interior del líquido o bien de la suspensión capas en forma de bandas que son tan delgadas, que pueden ser atravesadas por la luz incidente. El movimiento debe ser al mismo tiempo de tal naturaleza, que el líquido o bien que la suspensión se mezcle activamente en la bolsa. Ambas cosas se llevan a cabo cuando se dan las siguientes condiciones previas:

35 1. Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz son muy flexibles y no se fijan durante la exposición a la luz, por ejemplo no se pegan entre la placa de vidrio o la placa de cuarzo. Por consiguiente, las bolsas se adaptan a las modificaciones de la forma del plasma o bien de la suspensión (sangre, EK), que se producen cuando se mueve la bolsa.

2. Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz están rellenas en un 30 % como máximo, de manera especial están rellenas en un 15 % como máximo, del volumen máximo disponible para el llenado.

40 3. Las bolsas se someten a un movimiento vigoroso, por ejemplo bien en posición horizontal (linealmente en el sentido de vaivén o bien en forma de círculo o en forma de elipse) o bien posición vertical (basculamiento).

En este caso, se entiende por movimiento vigoroso (de manera individual o conjunta) lo siguiente:

1. que sobrepasa a un simple movimiento, por medio del cual provoca una mezcla de los líquidos o bien de las suspensiones.

45 2. que dentro de los líquidos o bien de las suspensiones, que se mueven de manera vigorosa, se forman, al menos de manera temporal, incluso en diversos puntos, zonas que son tan delgadas que pueden ser atravesadas por la luz UV o bien por la luz visible (esto último es válido para los líquidos o bien para las suspensiones turbias o bien coloreadas, por ejemplo los EKs).

50 3. que, en el caso de un movimiento vigoroso, la inversión del sentido del movimiento es tan abrupta, que la mayor parte del preparado, que se encuentra en la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz, sigue moviéndose en el sentido original como consecuencia de su inercia y, por consiguiente, el resto remanente puede formar una capa

delgada, que puede ser atravesada por la luz empleada.

En combinación con el remezclado permanente, que tiene lugar al mismo tiempo, se expone a la luz, por último, al conjunto del preparado (y a los patógenos que están contenidos en el mismo) y, por consiguiente, es esterilizado.

5 La bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz tiene en estado llenado, en posición horizontal, un espesor de tan sólo algunos mm, por ejemplo menor que 10 mm, de manera preferente menor que 5 mm y está destinada a alojar volúmenes de muestras comprendidos, por ejemplo, entre 200 y 500 ml. Sin embargo, la capacidad máxima (volumen) de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz es mayor, al menos alrededor de un factor de 3, por regla general es, al menos, alrededor de 6,66 veces mayor, de manera preferente es, al menos, 10 veces mayor o incluso es, al menos, 20 veces mayor que el volumen real de la muestra a ser tratada, que está contenida en la bolsa.

10 De conformidad con una configuración de la invención, el movimiento, de manera especial la amplitud del movimiento, se lleva a cabo de tal manera, que se formen dentro del preparado zonas en las que el espesor de la capa sea temporalmente menor que 0,05 mm por regla general.

15 Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz tienen, de manera especial, un volumen de hasta 5.000 ml inclusive.

20 Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz se mueven por ejemplo por medio de aplicación de sacudidas, de basculamiento y/o por medio de una rotación. Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz se mueven preferentemente durante al menos tres cuartos, de manera especial al menos durante un quinto/un sexto de la duración total de la exposición a la luz. El movimiento o bien la aplicación de sacudidas puede llevarse a cabo por medio de un dispositivo aplicador de sacudidas orbital, un dispositivo aplicador de sacudidas en forma de plataforma, un dispositivo aplicador de sacudidas con basculamiento o un dispositivo aplicador de sacudidas con cabeceo. Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz se mueven durante la exposición a la luz, por ejemplo, permanentemente con una amplitud mayor que 0,2 mm, de manera preferente mayor que 1 cm y, de manera especial, comprendida entre 1 y 15 cm o comprendida entre 2 y 8 cm, al menos en la dirección x y, en caso dado, también en la dirección y (la dirección y es perpendicular con respecto a la dirección x). Independientemente de esto, la frecuencia de la variación de la dirección del movimiento es mayor que 0,5 Hz, de manera preferente está comprendida entre 1 y 10 Hz.

25 De conformidad con otra configuración de la invención, los preparados proceden de una unidad de uno hasta 6 donantes, de manera preferente de un donante.

30 En el caso de un tratamiento fotodinámico en presencia de una sustancia fotoactiva, se lleva a cabo la irradiación preferentemente con longitudes de onda en el intervalo de absorción (+/- 20 nm) del o bien de los fotosensibilizadores empleados.

Investigaciones experimentales

35 Los ensayos descritos ilustran la actividad del procedimiento y no están limitados a la inactivación de los virus que han sido citados. Así mismo tampoco existen limitaciones sobre los plasmas o bien sobre los EKs, empleados en los ensayos descritos, que proceden de donaciones de sangre; el procedimiento, de conformidad con la invención, puede ser aplicado también en el caso de preparados que sean preparados por otra vía. Todos los ensayos descritos se llevaron a cabo entre tres y seis veces. Los resultados indicados representan respectivamente los valores medios de estos ensayos.

40 Unidades de plasma y concentrados de eritrocitos

45 Las unidades de plasma empleadas y los EKs empleados se prepararon a partir de donantes de sangre individuales por medio de los procedimientos usuales. Éstos tenían un volumen de aproximadamente 250 hasta 300 y respectivamente de hasta 350 ml inclusive y se conservaron en bolsas de material sintético usuales para preparados de sangre. Los leucocitos o bien los trombocitos restantes se separaron por medio de una filtración. Los EKs se suspendieron en medio estabilizante de suero salino-adenina-glucosa-manitol SAG-M. Los plasmas se almacenaron a temperaturas situadas por debajo de -30°C y se descongelaron en el baño de agua para los ensayos. Los EKs se almacenaron entre 4 y 8°C en el armario refrigerador.

Investigaciones virológicas

50 Se puntearon alícuotas de plasma o bien de EK con virus vesicular de estomatitis (VSV, cepa Indiana, ATCC VR 158) o bien con virus de Sinbis (ATCC VR-68) o bien con virus del herpes Suid (SHV-1, virus Pseudorabies, cepa Aujeszky, ATCC VR-135). Se determinaron los títulos de virus por medio del ensayo CPE (CPE = efecto citopático).

Estos títulos están indicados como TCID₅₀ (TCID = dosis infectiva del cultivo tisular -Tissue culture infective dose-). A título de células indicadoras sirvieron las células Vero. La concentración inicial en virus en los ensayos realizados estaba comprendida entre aproximadamente 10⁵ y 10⁷ TCID₅₀.

Instalaciones para llevar a cabo la exposición a la luz, bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz

5 Una de las instalaciones para llevar a cabo la exposición a la luz empleada estaba equipada con tubos, que emitían luz UVC (longitud de onda: 254 nm). La irradiación se llevó a cabo por ambos lados de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz, en posición horizontal, es decir desde arriba y desde abajo. Una segunda instalación para llevar a cabo la exposición a la luz estaba equipada con tubos, que emitían luz UVB (280-320 nm). La irradiación se llevó a cabo así mismo por ambos lados. Una tercera instalación para llevar a cabo la exposición a la luz estaba equipada con LEDs (diodos emisores de luz), que emitían luz roja intensa en el intervalo de longitudes de onda alrededor de 635 nm. Las tres instalaciones se colocaron en funcionamiento sobre un dispositivo aplicador de sacudidas orbital (fabricante firma Bühler, Tübingen; tipo SM 25) que llevó a cabo hasta 100 revoluciones por minuto inclusive. Las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz, empleadas, estaban constituidas por láminas de material sintético delgadas, permeables a la irradiación UV y altamente flexibles.

15 **Ejemplo de ensayo 1**

Inactivación de VSV en plasma por medio de UVC: influjo de la velocidad de aplicación de las sacudidas y de la movilidad libre del plasma durante la irradiación

20 Se picaron con VSV unidades de plasma en bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz y se irradiaron durante 2 minutos con UVC. Una muestra se sometió a sacudidas con 100 rpm y estaba extendida rígidamente entre dos placas de cuarzo durante la irradiación. Las otras muestras simplemente yacían sobre una placa de cuarzo de tal manera, que durante la aplicación de las sacudidas pudieron moverse dentro de la bolsa. El número de revoluciones del dispositivo aplicador de sacudidas se varió entre 30 y 100 revoluciones por minuto. Los resultados están reunidos en la tabla 1. En la muestra fijamente extendida se redujo el título en virus únicamente en un factor alrededor de aproximadamente 0,3 log₁₀.

25 **Tabla 1**

Frecuencia de la aplicación de sacudidas (rpm)	Título en virus (log ₁₀ TCID ₅₀)	Observaciones
0	6,21 ± 0,69	Controles
30	5,78 ± 0,27	Aplicado en estado libre
50	4,59 ± 0,04	Aplicado en estado libre
75	0,92 ± 0,24	Aplicado en estado libre
100	0,35 ± 0,52	Aplicado en estado libre
100	5,92 ± 0,11	Fijado

30 En el caso de las muestras aplicadas en estado libre, el número de revoluciones tenía un efecto directo sobre la magnitud de la inactivación del virus: mientras que a 30 o bien a 50 revoluciones por minuto los factores de inactivación fueron únicamente de 1,1 o bien de 2,4 log₁₀ aproximadamente, en comparación con los de las muestras de control no tratadas, en el caso de 75 revoluciones por minuto aumentó hasta aproximadamente 5,1 y en el caso de 100 revoluciones por minuto aumentó hasta aproximadamente 6,6 log₁₀. Los resultados de este ensayo demuestran que el plasma debe ser sometido a intensas sacudidas durante el tratamiento para que la irradiación con luz UV pueda ser efectiva. Sin embargo, con objeto de que tenga también una repercusión el efecto de aplicación de las sacudidas, las muestras tienen que colocarse de forma libre con el fin de que se formen durante la aplicación de las sacudidas capas delgadas, que puedan ser atravesadas por la radiación.

Ejemplo de ensayo 2**Inactivación de VSV, virus de Sindbis y de SHV-1 en plasma por medio de la irradiación con UVC: cinéticas de inactivación**

Se picaron unidades de plasma con VSV, con virus de Sindbis o bien con SHV-1 y se irradiaron durante 1 a 5 minutos. Las muestras colocadas de forma libre sobre el dispositivo aplicador de sacudidas orbital se movieron con 100 revoluciones por minuto. Las muestras de control se irradiaron durante 5 minutos pero no se sometieron a sacudidas. Los resultados de los ensayos están reunidos en la tabla 2. En las muestras sometidas a sacudidas se empobreció el título de VSV en el transcurso de 3 minutos alrededor de un factor mayor que $6,5 \log_{10}$, mientras que el factor de inactivación en las muestras de control, no sometidas a sacudidas, no sobrepasó de $1,5 \log_{10}$. Los virus de Sindbis se muestran más estables que los VSV; sin embargo la gran diferencia entre las muestras sometidas a sacudidas y las muestras no sometidas a sacudidas también se pone de manifiesto en este caso: al cabo de un tiempo de irradiación de 5 minutos el título en virus en las muestras sometidas a sacudidas se había reducido en alrededor de aproximadamente $5,1 \log_{10}$, por el contrario en las muestras no sometidas a sacudidas se había reducido sólo alrededor de $0,30 \log_{10}$.

15

Tabla 2

UVC (min)	Aplicación de sacudidas	Título en virus ($\log_{10}TCID_{50}$)		
		VSV	Sinbis	SHV-1
Controles	-	$6,74 \pm 0,32$	$7,01 \pm 0,24$	$4,95 \pm 0,23$
2	+	$0,95 \pm 0,31$	$4,68 \pm 0,21$	$2,56 \pm 0,25$
3	+	$\leq 0,24 \pm 0,00$	$3,27 \pm 0,16$	$1,67 \pm 0,37$
4	+	$\leq 0,24 \pm 0,00$	$2,10 \pm 0,12$	$0,66 \pm 0,29$
5	+	$\leq 0,24 \pm 0,00$	$1,86 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,21$
5	-	$5,69 \pm 0,18$	$6,73 \pm 0,16$	$4,65 \pm 0,16$

Se produjo un cuadro similar cuando se empleó el SHV-1: en las muestras sometidas a sacudidas se redujo el título en virus en el transcurso de 4 hasta 5 minutos alrededor de un factor de $4,3$ hasta $4,5 \log_{10}$; en las muestras no sometidas a sacudidas se había reducido al cabo de 5 minutos de irradiación únicamente alrededor de $0,3 \log_{10}$.

Ejemplo de ensayo 3**Inactivación de VSV en plasma por medio de la irradiación con UVB: cinética de inactivación**

Se picaron unidades de plasma con VSV y se irradiaron durante 1 hasta 5 minutos. Las muestras aplicadas en estado libre sobre el dispositivo aplicador de sacudidas orbital se movieron con 100 revoluciones por minuto. Una muestra de control se irradió durante 5 minutos pero no se sometió a sacudidas. Tal como se desprende de la tabla 3, en las muestras sometidas a sacudidas se empobreció el título en virus en el transcurso de 5 minutos alrededor de factor de $6,36 \log_{10}$, en las muestras de control, no sometidas a sacudidas, por el contrario se empobreció únicamente alrededor de aproximadamente $1,5 \log_{10}$. Los resultados muestran que el fenómeno descubierto - el aumento de la inactivación de los patógenos en muestras aplicadas en estado libre por medio de una intensa aplicación de sacudidas - no está limitado a los UVC.

30

Tabla 3

UVB (min)	Aplicación de sacudidas	Título en virus
		(log ₁₀ TCID ₅₀)
Controles	-	7,00 ± 016
2	+	4,70 ± 0,08
3	+	3,68 ± 0,12
4	+	2,23 ± 0,23
5	+	0,64 ± 0,08
5	-	5,52 ± 0,08

Ejemplo de ensayo 4

Inactivación de VSV en plasma por medio de un tratamiento fotodinámico con azul de metileno y luz.

- 5 Se picaron unidades de plasma con VSV, se combinaron con 0,25 µmol/L del fotosensibilizador constituido por el azul de metileno (MB) y se irradiaron sobre el dispositivo aplicador de sacudidas orbital con un número de revoluciones de 100 rpm durante un tiempo de hasta 30 minutos inclusive con luz LED roja. Las muestras de control se expusieron a la luz en presencia de la misma concentración de MB durante 20 minutos, pero no se movieron entretanto.
- 10 Tal como muestra la tabla 4, la magnitud de la inactivación del virus en las muestras sometidas a sacudidas fue mucho mayor que en las muestras no sometidas a sacudidas. En las primeras, el título en virus se había reducido al cabo de 20 minutos en alrededor de un factor de aproximadamente 4,4 log₁₀; al cabo de 30 minutos se había reducido alrededor de aproximadamente 5,8 log₁₀. En las muestras no sometidas a movimiento, el factor de reducción al cabo de 20 minutos, por el contrario, no era mayor que 2,7 log₁₀ aproximadamente.

15

Tabla 4

MB/Luz (min)	Aplicación de sacudidas	Título en virus
		(Log ₁₀ TCID ₅₀)
Controles	-	6,72 ± 0,24
10	+	4,95 ± 0,68
20	+	2,30 ± 0,88
30	+	0,94 ± 0,87
20	-	4,04 ± 0,54

Ejemplo de ensayo 5

Inactivación de VSV en EKs por medio de un tratamiento fotodinámico con azul de metileno y luz.

5 Se picaron con VSV alícuotas de EK, se combinaron con 5 µmol/L del fotosensibilizador constituido por el azul de metileno (MB) y se irradiaron sobre el dispositivo para la aplicación de sacudidas orbital con un número de revoluciones de 100 rpm durante 30 minutos inclusive con luz LED roja. Las muestras de control, por el contrario, no se movieron durante la exposición a la luz. La tabla 5 muestra el claro resultado del ensayo. Es evidente que la inactivación de los virus en las muestras de EK sometidas a sacudidas se desarrolla de una manera claramente más rápida que en el caso de las muestras de EK no sometidas a sacudidas. En las muestras, que se sometieron a movimiento durante el tratamiento, se había inactivado prácticamente por completo el virus al cabo de 30 minutos (factor de inactivación 6,7 log₁₀). Por el contrario, el factor de reducción en las muestras no sometidas a movimiento fue, al cabo de 30 minutos, únicamente de 2,7 log₁₀ aproximadamente.

10 Los resultados de los ejemplos de ensayo 4 y 5 demuestran que aumenta enormemente también la actividad del tratamiento fotodinámico del plasma o de los concentrados de eritrocitos cuando las muestras son sometidas a fuertes sacudidas durante la exposición a la luz.

15

Tabla 5

		Título en virus
MB/Licht	Aplicación de sacudidas	(Log₁₀TCID₅₀)
(min)		
Controles	-	7,04 ± 0,26
10	+	2,62 ± 0,31
20	+	0,89 ± 0,21
30	+	0,30 ± 0,12
10	-	5,07 ± 0,26
20	-	5,25 ± 0,31
30	-	4,35 ± 0,27

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la inactivación de patógenos en sangre de donantes, en plasma sanguíneo y/o en concentrados de eritrocitos, que comprende las etapas siguientes:

5 - proporcionar las donaciones de sangre o bien los preparados obtenidos a partir de la sangre de donantes y/o por medio de una aféresis mecánica,

(a) la adición de una substancia fotoactiva adecuada y el tratamiento fotodinámico por medio de una irradiación con luz que comprende, o que está constituida de manera exclusiva, por longitudes de onda en el intervalo de absorción de la substancia fotoactiva, en donde la sustancia fotoactiva es uno o más colorantes de fenotiazina, uno o más compuestos de ftalocianina y/o uno o más compuestos de porfirina,

10 o

(b) someter a los preparados a una irradiación con luz ultravioleta (UV) a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 320 nm, en donde la irradiación es aplicada con UVB de menos de 320 a 280 nm y una energía luminosa de 0.3 hasta 10 J/cm² y/o con UVC de menos de 280 nm a 200 nm,

15 - estando constituidos los preparados por numerosas unidades que pueden ser manipuladas de manera individual y que pueden ser conservadas de manera separada y

- encontrándose los preparados respectivamente en bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz flexibles, permeables a la luz (alternativa (a)) o bien permeable a los UV (alternativa (b)), dispuesta en posición horizontal,

caracterizado porque

20 - las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz están rellenas en una proporción menor que el 30 % en volumen del volumen máximo disponible para el llenado de las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz y

- las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz se mueven durante el tratamiento fotodinámico y/o durante la irradiación con luz UV, de tal manera que se hace balancear al contenido de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz y se forman zonas con espesores de la capa alternativos debido a este movimiento.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los patógenos son virus y/o bacterias.

25 3.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** por medio del movimiento las zonas presentan regiones que regularmente tienen espesores de la capa temporalmente por debajo de 1 mm, preferiblemente por debajo de 0,05 mm.

30 4.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la suma de las superficies del lado inferior y del lado superior de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz, que se encuentra, o bien que se encuentran, en contacto con el contenido de la bolsa, supone más del 90 por ciento superficial, de manera preferente supone más del 99 por ciento superficial de la superficie interna total del contenido de la bolsa.

35 5.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque**, en el caso de la forma de realización (b), la irradiación es o está comprendida por UVB y/o por debajo de 260 nm hasta 220 nm y, de manera preferente, está constituida de manera exclusiva por irradiación con longitudes de onda en los intervalos que han sido citados precedentemente.

6.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la irradiación es aplicada con UVB con una energía luminosa comprendida entre 0,5 y 5 J/cm².

40 7.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 hasta la 5, **caracterizado porque** la irradiación se aplica con UVC con una energía luminosa comprendida entre 0,01 y 5 J/cm², de manera especial comprendida entre 0,1 y 2 J/cm².

8.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz en la instalación, en la que son sometidas a movimiento e irradiadas, están sujetas de forma móvil y, de manera especial, no están sujetas entre dos superficies.

45 9.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** los preparados son plasmas y están constituidos en más de un 80 % en peso por plasma sanguíneo.

- 10.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 1 hasta la 8, en el que los preparados son preparados de concentrado de eritrocitos EK y presentan un hematocrito comprendido entre un 10 y un 75 % en peso, de manera preferente comprendido entre un 20 y un 60 % en peso.
- 5 11.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la substancia fotoactiva está constituida por uno o varios colorantes de fenotiacina, a saber tionina, azul de metileno, azul de toluidina y/o por los colorantes Azur A, B y/o C.
- 12.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz están rellenas como máximo en un 15 % del volumen máximo disponible para el llenado.
- 10 13.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se trata plasma sanguíneo de conformidad con la etapa (a) y en ausencia de un fotosensibilizador.
- 14.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz están apoyadas por un solo lado de tal manera, que se modifica constantemente durante y como consecuencia del movimiento o bien de la aplicación de sacudidas, la altura de las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz, con referencia a la distancia (normal a la superficie) comprendida entre la superficie, sobre la que yacen las bolsas para llevar a cabo la exposición a la luz y el punto de intersección con la superficie superior de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz, considerado a través de toda la superficie superior de la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz.
- 15 15.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la bolsa para llevar a cabo la exposición a la luz presenta un nivel de llenado medio menor que 5 mm y se generan permanentemente valles de ondulación como consecuencia del movimiento, que generan espesores de la capa menores que la mitad del nivel medio de llenado, preferentemente espesores de capa menores que 1 mm o incluso menores que 0,05 mm.
- 20