

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 745**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01) **C12N 7/06** (2006.01)

A61K 35/16 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00988518 .7**

96 Fecha de presentación: **28.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1242099**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54

Título: **MÉTODO PARA INACTIVAR AGENTES INFECCIOSOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.**

30

Prioridad:
23.12.1999 AU PQ486699

73

Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2012

72

Inventor/es:
CHAM, Bill, Elliott

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 372 745 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).

DESCRIPCION

Método para inactivar agentes infecciosos en fluidos biológicos

5 La presente invención se refiere a un método para inactivar un agente infeccioso, tal como un microorganismo o un virus, que tiene una envoltura lipídica que puede estar presente en un fluido biológico incluyendo sangre o productos sanguíneos tal como plasma. En particular, la presente invención está dirigida hacia un método para inactivar virus de VIH, hepatitis B o C.

La presente invención será descrita con referencia particular al virus de VIH; sin embargo, podrá apreciarse que los métodos aquí descritos también pueden ser empleados para el tratamiento e inactivación de otros agentes infecciosos que tienen una envoltura o membrana lipídica y sin que ello suponga limitación alguna de la invención.

10 Antecedentes de la invención

Se cree que la enfermedad conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es causada por un virus llamado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

15 El VIH es un virus de ARN. El virus libre de VIH o virión que circula por la sangre comprende un núcleo de nucleoproteína rodeado por una envoltura lipídica protectora. De forma resumida, el ciclo de vida del virus de VIH comienza con la unión del virus de VIH a la membrana de una célula diana que habitualmente es un linfocito T4 o macrófago humano.

20 La envoltura lipídica tiene glicoproteínas virales que reconocen y se unen a receptores CD4 en una superficie de la célula diana. Después de la unión, el virus se desprende de su envoltura lipídica y penetra en la célula hospedante. La transcripción inversa genera una copia lineal de ADN del genoma de ARN viral. El ADN viral se integra entonces en el ADN cromosómico de la célula hospedante. La expresión del ADN integrado genera mARN viral que codifica proteínas virales reguladoras y estructurales. Estas proteínas virales se instalan en la superficie de la célula hospedante. A medida que las mismas se abren camino a través de la membrana de la célula hospedante, las partículas del virus adquieren una envoltura lipídica de su hospedante que contiene la glicoproteína de la envoltura necesaria para el reconocimiento y la unión a una célula no infectada.

25 La cantidad de VIH que circula por la sangre se conoce como la carga viral. La carga viral proporciona una indicación de la forma en la cual un paciente está respondiendo a la enfermedad y evalúa el riesgo de progresar hacia SIDA. Se cree que la carga viral tiene una relación directa con las fases de la enfermedad y se ha comprobado que la reducción de la carga viral reduce el grado de progresión de la enfermedad. Los regímenes de tratamiento actuales están destinados a reducir la carga viral mediante el reconocimiento del ciclo reproductivo del virus que porta la célula. Estas terapias son ineficaces contra el virus maduro que circula por la sangre.

30 Los fármacos antivirales para su uso en el tratamiento de VIH han sido diseñados para prevenir o inhibir la réplica viral y generalmente reconocer la unión inicial del virus al linfocito o macrófago T-4, la transcripción del ARN viral a ADN viral y el ensamblaje del nuevo virus durante la reproducción.

35 Una dificultad grande que surge con los tratamientos de VIH existentes es la elevada velocidad de mutación del virus. Un individuo puede portar un número de cepas de VIH diferentes, algunas de las cuales pueden ser resistentes a determinados fármacos antivirales. Durante el tratamiento pueden generarse cepas resistentes. Se ha intentado enfocar las dificultades asociadas con diferentes mutaciones del virus de VIH mediante el uso de una combinación de fármacos que deben tomarse de acuerdo con protocolos estrictos con el fin de que resulten eficaces. Esto introduce dificultades en cuanto a la compatibilidad y la complacencia. Aun más, muchos fármacos presentan efectos secundarios indeseables.

40 Ya se conoce la inactivación de virus que tienen una envoltura lipídica mediante tratamiento con agentes químicos. La sensibilidad de dichos virus a disolventes orgánicos ha sido utilizada como criterio para la clasificación del virus. Se ha observado que el cloroformo es un agente particularmente eficaz a la hora de inactivar virus revestidos con lípidos. Sin embargo, el cloroformo también desnaturaliza las proteínas del plasma y, por tanto, es muy inadecuado para emplearse con fluidos que han de ser administrados a un animal. Las proteínas del plasma incluyen factores de coagulación II, VII, IX, X, plasmina, fibrinógeno (Factor I), IgM, hemoglobina e interferón. La pérdida de estas proteínas tendrá efectos adversos sobre la salud del paciente y puede incluso conducir a la muerte del paciente. La β -propiolactona es otro disolvente, que aunque inactiva virus revestidos con lípidos también inactiva hasta el 75% del factor proteínico VIII de la sangre, una proteína crítica para la coagulación.

50 Por tanto, se apreciará que la inactivación de virus en fluidos biológicos que han de ser administrados a un animal es muy diferente respecto de la simple esterilización de fluidos y superficies. Esto es debido a la presencia de componentes proteicos deseables en fluidos biológicos. Un importante uso del plasma reside en el tratamiento de

pacientes con deficiencias en factores de coagulación. El plasma con bajos niveles de factor VIII es inadecuado para dicho tratamiento terapéutico. Además, la administración de grandes cantidades de proteínas desnaturalizadas a un paciente puede iniciar una respuesta inmunológica que a su vez puede conducir a enfermedades autoinmunes o anticuerpos al propio factor VIII desnaturalizado.

5 El éter dietílico también ha sido propuesto como un disolvente adecuado para la inactivación de virus que tienen una envoltura lipídica. Una de las razones para elegir el éter dietílico es que desde su primer uso como anestésico general se sabe que es normalmente no tóxico. Sin embargo, el éter dietílico es un disolvente de lípidos relativamente pobre, especialmente para moléculas anfífilas tales como fosfolípidos que forman parte de la envoltura lipídica viral. Se ha comprobado que algunos virus tales como poxvirus son potencialmente resistentes al éter dietílico. Además, el éter dietílico tiene un punto de ebullición de 34° C el cual es inferior a la temperatura de la sangre humana. Por tanto, el contacto del éter dietílico con un producto sanguíneo recientemente extraído se traducirá en una vaporización indeseable del éter.

15 En un esfuerzo para mejorar las propiedades solubilizantes de lípidos del éter dietílico, se ha propuesto combinar el éter dietílico con un detergente no iónico. En particular se ha preferido un detergente disponible con el nombre comercial TWEEN 80. El detergente incrementa el contacto entre el éter y los lípidos.

También han sido propuestos los di o trialquilfosfatos como agentes inactivadores de virus y se ha comprobado que a este respecto son superiores al éter dietílico. Un inconveniente de los fosfatos es su baja solubilidad en agua (menor del 0,4%). De este modo, con el fin de que estos agentes funcionen de manera eficaz, es necesario utilizar detergentes no iónicos tal como el TWEEN 80 antes mencionado. Sin embargo, el uso de un detergente necesita procedimientos tediosos para su separación.

Los procedimientos que han sido propuestos para separar detergentes no iónicos incluyen la diafiltración empleando membranas microporosas que retienen proteínas del plasma, la absorción de componentes deseados del plasma sobre soportes cromatográficos o soportes cromatográficos por afinidad, y la precipitación de proteínas del plasma.

25 El sistema disolvente a base de alquilfosfato/detergente (SD) ha conseguido una amplia aceptación desde su desarrollo en la mitad de la década de 1980 y es utilizado por la American Red Cross en el tratamiento de plasma para inactivar VIH, hepatitis B y C.

Las indicaciones para el uso de plasma tratado por el método SD son limitadas e incluyen el tratamiento de pacientes con deficiencias en factores de coagulación para los cuales no se encuentran disponibles preparados concentrados, las deficiencias adquiridas de múltiples factores de coagulación, la inversión del efecto de warfarina y el tratamiento de pacientes con púrpura trombótica trombocitopénica.

35 En el método del proceso SD, el plasma reciente congelado (FFP) es descongelado y filtrado antes de su elección y tratamiento con detergente constituido por 1% de fosfato de tri(n-butilo) y 1% de Triton X-100 durante 4 horas a 30° C. El sistema disolvente/detergente es separado mediante extracción con agente de soja y cromatografía en fase inversa sobre resina C18. El agua se separa por ultrafiltración y el plasma finalmente se filtra en condiciones estériles.

Puede apreciarse que la separación del disolvente/detergente es un procedimiento discontinuo largo y tedioso y, al objeto de que pueda funcionar eficazmente a escala comercial, debe ser realizado a gran escala con volúmenes relativamente grandes de plasma reunido. El método SD podría no ser utilizado para el tratamiento continuo de plasma de un solo paciente para su retorno final al mismo paciente. Por otro lado, el factor económico del tratamiento de pequeñas unidades de plasma en un solo paciente sería prohibitivo.

45 Como se ha mencionado anteriormente, el principal uso de plasma tratado por el método SD reside en el tratamiento de pacientes que tienen deficiencias en diversos factores de coagulación y que no pueden ser administrados en otras formas. De esta manera, aunque resulta crítico que exista una desnaturalización mínima de factores de coagulación, puede tolerarse la desnaturalización de otras proteínas de la sangre. Sin embargo, la desnaturalización de estas otras proteínas de la sangre no resulta aceptable para sustituciones de plasma a gran escala.

Como se ha expuesto anteriormente, la reintroducción de plasma en donde las proteínas del plasma han sido desnaturalizadas, puede resultar tóxica para un paciente y, en algunos casos, puede incluso conducir a la muerte del paciente. Por estos motivos, no se ha adoptado el tratamiento de un paciente infectado por inactivación viral de fluidos tal como plasma, aunque procesados, presumiblemente a la vista de los riesgos de muerte del paciente.

50 En US 5484396 se ha descrito una propuesta para reintroducir en un paciente plasma inactivado en cuanto a virus. En este método, se extrae sangre del paciente y se separa en un primer componente que incluye células rojas y plaquetas y en un segundo componente infectado que incluye plasma, células blancas y virus libre de células. El componente infectado se expone entonces a éter dietílico durante 5 o 10 minutos. El éter se separa por destilación a

50-52° C y se retorna al paciente el plasma tratado con virus muertos libres de células y células infectadas muertas.

Esta patente también sugiere el uso de otros disolventes incluyendo cloroformo. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente el cloroformo es inaceptable debido a que desnaturaliza proteínas del plasma.

Existe un número de dificultades asociadas con el método descrito en US 5484396. En primer lugar, el método implica la muerte de todas las células blancas separadas y el retorno de las células muertas al paciente. Estos fragmentos celulares muertos pueden ser tóxicos. Cualquier toxicidad puede ser particularmente peligrosa para pacientes en una fase avanzada de la enfermedad. En segundo lugar, el éter se separa por destilación. Esto significa que cualesquiera lípidos disueltos en el éter permanecen en el plasma. Los lípidos del plasma están normalmente asociados con proteínas. El contacto con disolventes orgánicos rompe esta asociación. Una vez rota, los lípidos y las proteínas no se volverán a asociar. Así, en este método también se retornan al paciente lípidos desasociados. Surgen de nuevo problemas respecto a la toxicidad potencial de lípidos de plasma desasociados.

Aún más, el éter se separa por destilación a 50-52° C aproximadamente, si bien la patente no describe el periodo de tiempo durante el cual el plasma se somete a calentamiento. Se sabe que el virus de VIH es sensible al calor. De este modo, no queda claro si es el éter, el calentamiento o una combinación de ambos los responsables de la inactivación observada del virus. Además, generalmente se reconoce que la temperatura máxima a la cual puede exponerse la sangre y el plasma es de 40° C aproximadamente. A temperaturas más elevadas puede presentarse la desnaturalización de las proteínas del plasma.

Se ha propuesto inactivar VIH en la sangre por tratamiento térmico. Sin embargo, este método no ha sido adoptado debido a las dificultades asociadas con los efectos adversos de una alta temperatura sobre los constituyentes de la sangre.

Como ya se mencionó anteriormente, se ha propuesto el éter como un agente para la inactivación de virus revestidos con lípidos en plasma. Sin embargo, este disolvente no fue adoptado ya que se comprobó que la velocidad de inactivación del virus resultó ser superior con el fosfato de tri(n-butilo) (TNBP). La US 4540573 aporta algunos datos comparativos respecto a la inactivación viral por éter dietílico y por TNBP. Los virus estudiados fueron virus Sinbis, Sendai y VSV que son virus típicos que contienen lípidos. Estos resultados demuestran que el tratamiento con éter dietílico a 4° C necesitó muchas horas para inactivar dichos virus. La US 4481189 describe la inactivación del virus de hepatitis B poniendo en contacto plasma con éter dietílico durante 16 horas a 4° C. La US 4540573 también incluye estudios de inactivación de virus mediante TNBP a temperatura ambiente. El tiempo mínimo para la inactivación de los virus es de 2 horas. Igualmente, se observa que el procedimiento de esterilización de plasma comercial empleando TNBP se efectúa durante más de 4 horas.

Se sabe que los estudios anteriores con éter dietílico fueron realizados a 4° C mientras que los estudios de US 5484396 fueron realizados a temperatura ambiente. No obstante, aunque la comparación directa entre los experimentos con éter dietílico no es posible, resulta notable que la US 5484396 reivindica la inactivación completa del virus de VIH después de 5 minutos de contacto con éter dietílico. Existen dos posibles conclusiones que pueden derivarse de esta observación. La primera, que el virus de VIH es significativamente más sensible al éter dietílico que otros virus. En este caso, el método como se describe en US 5484396 no sería adecuado para el tratamiento de pacientes infectados con otros virus que contienen lípidos tales como hepatitis B o C. Esto resulta insatisfactorio ya que suele suceder que un paciente esté co-infectado con virus de hepatitis C y de VIH y no sería conveniente poder tratar el paciente para ambos estados. Además, el método de US 5484396 sería muy inadecuado para la esterilización de productos sanguíneos ya que resultaría ineficaz contra virus que no sean de VIH.

Alternativamente, el éter dietílico puede no ser responsable de la activación del virus y el virus se inactiva durante la etapa de destilación cuando el plasma se calienta a 50-52° C aproximadamente. En este caso, el calentamiento podría aparecer como una característica esencial del método. Sin embargo, la exposición prolongada de productos sanguíneos a temperaturas por encima de 40° C puede afectar de manera adversa a los componentes de la sangre.

Otro método para el tratamiento e introducción de plasma en un paciente es la plasmaféresis (terapia de intercambio de plasma) en donde el plasma de un paciente se reemplaza por plasma de un donante o más normalmente por una fracción proteica del plasma. Este tratamiento puede resultar en posibles complicaciones como consecuencia de la posible introducción de proteínas foráneas y transmisiones de enfermedades infecciosas. Esto puede ser muy importante para pacientes con un sistema inmunológico comprometido tales como pacientes con VIH. Aún más, la plasmaféresis también separará elementos deseables en el plasma de los pacientes incluyendo anticuerpos, y cualesquiera fármacos anti-virales que circulan en el plasma.

La US-A-5484396 describe un aparato y un método para la eliminación de virus de la envoltura a partir de plasma poniendo en contacto dicho plasma con un disolvente que comprende un éter a una concentración de 10% o más.

La US-A-4895558 describe un método para deslipidar plasma y en donde el disolvente orgánico que contiene los

lípidos extraídos se separa de la fase acuosa mediante extracción con un disolvente orgánico.

Cham et al. (Lipid research, vol. 17, no. 2, 1976, páginas 176-181) describen un método para deslipidar plasma o suero que implica el uso de mezclas de éter isopropílico y butanol/DIPE en proporciones de 25:75, 35:65 o 40:60.

5 La US-A-4597505 describe un sistema disolvente para inactivar virus de hepatitis B en plasma sanguíneo de mamíferos.

Resumen de la invención

La presente invención queda definida por el conjunto anexo de reivindicaciones. Igualmente, la presente invención describe un método de inactivación

10 De agentes infecciosos que tienen una envoltura o membrana lipídica y que pueden solucionar al menos parcialmente los inconvenientes anteriores.

De acuerdo con un primer aspecto amplio de la invención, se proporciona un método de tratamiento de fluidos biológicos que contienen un agente infeccioso que tiene una envoltura o membrana lipídica, que se puede ejemplificar mediante la separación de células sanguíneas del plasma, puesta en contacto del plasma con un sistema disolvente que comprende un disolvente en donde los lípidos son solubles y en donde los constituyentes hematológicos y bioquímicos son sustancialmente estables, durante un tiempo suficiente para reducir niveles activos del agente infeccioso en el plasma, y la separación del plasma del sistema disolvente, con lo cual se separan los lípidos disueltos que permanecen en el sistema disolvente.

El plasma tratado puede ser mezclado de nuevo con las células sanguíneas aunque, en algunos casos, esto puede no ser deseable o necesario.

20 Los agentes infecciosos virales que pueden ser inactivados por el sistema anterior incluyen virus codificados por lípidos de los siguientes géneros:

Alphavirus (alfavirus), Rubivirus (virus de la rubéola), Flavivirus (Flavivirus), Pestivirus (virus de enfermedades mucosales), (virus de hepatitis C, sin nombre), Coronavirus (coronavirus), Torovirus (torovirus), Arterivirus (arterivirus), Pararnyxovirus (Pararnixovirus), Rubulavirus (rubulavirus), Morbillivirus (morbillivirus), Pneumovirinae (los pneumovirus), Pneumovirus (pneumovirus), vesiculovirus (vesiculovirus), Lyssavirus (lisavirus), Ephemerovirus (efemerovirus), Cytorhabdovirus (rhabdovirus de las plantas del grupo A), Nucleorhabdovirus (rhabdovirus de las plantas del grupo B), Filovirus (fitovirus), influenzavirus A, B (virus de influenza A and B), influenzavirus C (virus de influenza C), (virus de tipo Thogoto sin nombre), Bunyavirus. (buniavirus), Phlebovirus (flebovirus), Nairovirus (nairovirus), Hantavirus (hantavirus), Tospovirus (tospovirus), Arenavirus (arenavirus), retrovirus tipo B de mamíferos, sin nombre, retrovirus tipo C de mamíferos y reptiles, sin nombre, retrovirus tipo D, Lentivirus (lentivirus), Spumavirus (espumavirus), Orthohepadnavirus (hepadnavirus de mamíferos), Avihepadnavirus (hepadnavirus de aves), Simplexvirus (simplexvirus), Varicellovirus (varicelovirus), betaherpesvirinae (los citomegalovirus), Cytomegalovirus (citomegalovirus), Muromegalovirus (citomegalovirus murínicos), Roseolovirus (virus de herpes humano 6), Gammaherpesvirinae (los virus de herpes asociados con linfocitos), Lymphocryptovirus (virus tipo Epstein-Bar), Rhadinovirus (virus de herpes tipo saimiri-ateles), Orthopoxvirus (ortopoxvirus), Parapoxvirus (parapoxvirus), Avipoxvirus (virus fowlpox), Capripoxvirus (virus tipo sheeppox), Leporipoxvirus (mixomavirus), Suipoxvirus (virus swine-pox), Molluscipoxvirus (virus molluscum contagiosum), Yatapoxvirus (virus yabapox y tanapox), virus tipo fiebre porcina africana, sin nombre, iridovirus (virus de pequeños insectos iridiscentes), Ranavirus (iridovirus frontal), Lymphocystivirus (virus de linfocistis en peces).

40 Estos virus incluyen los siguientes patógenos humanos y animales:

Virus Ross River, virus de la fiebre, virus del dengue, virus de encefalitis Murray Valley, virus de encefalitis portados por garrapatas (incluyendo virus de encefalitis portados por garrapatas tanto europeos como del lejano oriente, virus de hepatitis C, coronavirus humanos 229-E y OC43 y otros (causantes del resfriado común, infecciones del tracto respiratorio superior, probablemente neumonía y posiblemente gastroenteritis), virus de parainfluenza humana 1-3, virus de las paperas, virus de parainfluenza humana 2, 4a y 4b, virus del sarampión, virus sincitiales respiratorios humanos, virus de la rabia, virus Marburg, virus Ebola, virus de influenza A y virus de influenza B, Arenavirus: virus de coriomeningitis linfocítica (LCM); virus Lassa, virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2, virus de la hepatitis B, virus de herpes humano de las subfamilias 1 y 2, virus de herpes B, virus de Epstein-Barr, virus (smallpox), virus cowpox, virus molluscum contagiosum.

50 El método anterior es particularmente adecuado para reducir la carga viral de VIH, hepatitis B o C.

Una ventaja del presente método es que el mismo es no específico y puede separar o inactivar cualquier virus revestido con lípidos, incluyendo cepas resistentes a los fármacos. El método de la presente invención puede encontrar una aplicación particular para cepas de VIH resistentes.

Los sistemas disolventes adecuados comprenden al menos un alcohol, éter, amina, éster o una mezcla de tales compuestos. Los disolventes preferidos son éteres o mezclas de alcoholes con éteres. Los alcoholes incluyen adecuadamente aquellos que no son apreciablemente miscibles con plasma u otros fluidos biológicos y dichos alcoholes pueden incluir alcoholes inferiores, incluyendo alcoholes C4 a C8. Preferidos son los butanoles (butan-1-ol y butan-2-ol). También se prefieren los éteres C2-5 y estos pueden incluir los propiléteres (di-isopropiléter (DIPE), etilpropiléter propil éter), dietiléter o una mezcla de los mismos. Otros disolventes que pueden ser aplicables pueden incluir aminas, ésteres, hidrocarburos tales como hexanos y mezclas. Disolventes especialmente preferidos son aquellos que (1) rompen fácilmente la envoltura lipídica viral o desnaturalizan de manera irreversible los otros constituyentes virales, (2) son sustancialmente inmiscibles con plasma u otros fluidos biológicos, (3) pueden separarse rápidamente del plasma u otros fluidos biológicos (si es necesario) y (4) no desnaturalizan constituyentes hematológicos o bioquímicos del plasma en un grado que pueda ser tóxico para un animal en el que puede introducirse el plasma. Los sistemas disolventes preferidos incluyen butanol, diisopropiléter, dietiléter o una mezcla de los mismos y estas mezclas pueden contener una proporción de 0% a 60% aproximadamente del alcohol con 40% a 100% aproximadamente del éter. Con preferencia, el sistema disolvente comprende entre 0 y 50% aproximadamente del alcohol y entre 50 y 100% aproximadamente de éter.

El tiempo durante el cual se pone en contacto el plasma con el sistema disolvente es el mismo dependiendo de la eficacia del sistema disolvente. Normalmente, el tiempo de contacto está comprendido entre 5 segundos y 2 horas aproximadamente, con preferencia entre 30 segundos y 1 hora aproximadamente y con suma preferencia desde 5 o 10 minutos a 30 minutos aproximadamente.

Sistemas disolventes particularmente adecuados para inactivar un agente infeccioso que tiene una envoltura o membrana lipídica comprenden entre 40 y 100% aproximadamente de diisopropiléter o dietiléter y entre 0 y 60% aproximadamente de butanol.

De acuerdo con otro aspecto amplio de la invención, se proporciona un método para reducir la actividad de un agente infeccioso que tiene una envoltura o membrana lipídica en un fluido o producto sanguíneo, comprendiendo el método poner en contacto el fluido o producto sanguíneo con un sistema disolvente que comprende un disolvente en el cual son solubles los lípidos y en donde los constituyentes hematológicos y bioquímicos son sustancialmente estables y que es inmisible con el fluido o producto sanguíneo, durante el tiempo suficiente para reducir niveles activos del agente infeccioso, y separar el fluido del sistema disolvente, con lo que los lípidos disueltos se separan con y permanecen en el sistema disolvente, caracterizado porque el sistema disolvente comprende al menos un alcohol, éter, hidrocarburo, amina, éster o una mezcla de estos compuestos.

Podrá apreciarse que los fluidos tratados de esta manera no quedan limitados a plasma. El método se puede emplear para reducir niveles virales activos en cualquier fluido o composición que porte agentes infecciosos activos que tienen una envoltura o membrana lipídica. Fluidos habituales incluyen plasma sanguíneo de mamíferos, plasma recolectado, plasma sanguíneo avarian, fracciones de plasma sanguíneo, derivados de células sanguíneas tales como hemoglobina, α interferón, Factor de crecimiento celular C, Factor de crecimiento derivado de plaquetas y similares, activador de plasminógeno, precipitados de plasma sanguíneo incluyendo crioprecipitado, precipitado de etanol y precipitado de polietilenglicol, o sobrenadantes tales como criosobrenadante, sobrenadante de etanol y sobrenadante de polietilenglicol, semen y suero de mamíferos.

Los sistemas disolventes preferidos son aquellos descritos anteriormente. El método es por tanto adecuado para reducir niveles de agentes infecciosos activos en sangre recolectada, plasma sanguíneo y fracciones de plasma y puede aportar una alternativa al tratamiento de plasma SD como se ha descrito anteriormente.

Otros usos incluyen la esterilización de fluidos empleados en cultivos de tejidos tal como suero vacuno fetal. El suero vacuno fetal (FCS) se emplea para cultivar células destinadas a la investigación y producción de vacunas. El FCS contaminado con pestivirus de ganado vacuno, cuando se emplea para la producción de vacunas para animales rumiantes, puede dar lugar a enfermedades reales en el campo. En la actualidad, el único medio de tratar el problema consiste en mantener un rebaño libre de pestivirus o realizar pruebas individuales en cada feto. Ambas medidas son muy costosas. Por tanto, existe la necesidad en la industria de disponer de un método económico y eficaz para la producción de FCS libre de pestivirus.

Fluidos adecuados para su tratamiento por el método anterior también incluyen productos procedentes de células cancerígenas o células normales o de procesos de fermentación que siguen a la inserción genética.

En ambos métodos anteriores, el sistema disolvente puede ser separado del fluido que está siendo tratado de cualquier manera adecuada y es preferible que la separación no afecte de manera adversa a ningún constituyente

bioquímico o hematológico del fluido. Dado que los disolventes son sustancialmente inmiscibles en el fluido acuoso, la separación se consigue habitualmente dejando separar las dos capas y retirando la capa relevante, dependiendo de si el sistema disolvente es más o menos denso que la fase acuosa. Una ventaja de efectuar la separación de esta manera es que los lípidos disueltos en la capa de disolvente pueden también ser separados. De este modo, los fragmentos lipídicos que pueden ser tóxicos pueden ser separados sustancialmente del fluido. La separación de las dos fases puede ser facilitada mediante centrifugado. Alternativamente, al menos parte del disolvente se puede separar por destilación, preferentemente bajo presión reducida.

El fluido, después de la separación, puede todavía contener algo de disolvente arrastrado que generalmente se encuentra en forma de una emulsión. Por tanto, el fluido puede ser tratado con un agente desémulsionante. El agente desémulsionante puede comprender éter u otro agente y un éter preferido es el dietiléter. El éter se puede añadir al fluido o, alternativamente, el fluido se dispersa en el éter. El éter puede ser separado por métodos similares a los descritos anteriormente con respecto a la separación del disolvente.

En el método de la presente invención, el plasma puede ser tratado de un modo continuo o discontinuo. Normalmente, en un método continuo la sangre de un animal puede ser extraída junto con una solución anticoagulante y centrifugada para separar células sanguíneas. El plasma se mezcla con un sistema disolvente de acuerdo con la invención que puede consistir en una solución de butanol-DIPE (40%-60%) V/V) o una solución de DIPE al 100%. El plasma y el disolvente se mezclan antes de pasarse a una unidad de separación plasma-disolventes en donde se separa del plasma (fase acuosa) la mayor parte del disolvente (fase orgánica). La unidad de separación puede ser una simple unidad que tiene una salida inferior a través de la cual puede pasar la fase acuosa más densa. Normalmente, se añade éter, que disgrega cualquier emulsión en el plasma, al plasma procedente de la unidad de separación. El plasma puede ser bombeado entonces a través de un segundo separador centrífugo en donde se separan el resto de los disolventes y el éter. El plasma tratado es arrastrado por una bomba de sustitución de fluido para mezclarse con las células sanguíneas, si ello es necesario. (Se puede añadir un fluido de sustitución de fluido, según se requiera, al plasma para contrarrestar cualquier pérdida de masa del plasma durante las etapas de tratamiento y separación).

En un método discontinuo de tratamiento, se trata habitualmente el plasma en un sitio distante del paciente; con el método discontinuo, se pueden realizar múltiples lavados con éter.

Podrá apreciarse que pueden efectuarse diversas modificaciones en las etapas de tratamiento y separación como las descritas anteriormente. Por ejemplo, el tratamiento del plasma con disolvente se puede facilitar dispersando el disolvente o el plasma en el otro del plasma o disolvente. Dicha dispersión puede ser efectuada por medio de una cámara de rotación. Un ejemplo de un aparato adecuado se describe en US 5744038.

Descripción detallada de una modalidad ejemplificativa de la invención

La invención no está dirigida al tratamiento de un paciente.

Experimento 1

Se estudió en animales la influencia del tratamiento de plasma sobre los constituyentes bioquímicos y hematológicos.

Se separó aproximadamente un cuarto de los volúmenes de sangre de los animales. Las células sanguíneas fueron separadas del plasma por centrifugado. El plasma se trató, se volvió a mezclar entonces con las células sanguíneas y se volvieron a introducir en el animal original mediante infusión intravenosa. Se recogieron muestras de sangre antes y después de este procedimiento para llevar a cabo análisis bioquímicos, hematológicos y de lípidos.

Durante el periodo experimental, no se produjeron cambios en los siguientes parámetros bioquímicos y hematológicos.

Bioquímicos	Hematológicos
Bilirrubina	WBC
Total proteína	RBC
Albúmina	Hemoglobina
Total globulina	Hct
Alfa ₁ , alfa ₂ , beta y gammaglobulinas	MCV MCH
Sodio	MCHC
Potasio	Polimorfos
Cloruro	Linfocitos

(continuación)

Bioquímicos	Hematológicos
Total dióxido de carbono	Monocitos
Calcio	Eosinófilos
Fosfato	Plaquetas
Urea	
Urato	
Creatina	
Fosfatasa alcalina	
Lactato dehidrogenasa	
Aspartato transaminasa	
Creatina hinasa	
Amilasa	
5'nucleotidasa	
Gamma-glutamyl transpeptidasa	
Espacio anión	
Alfa ₁ antitripsina	

- 5 También se efectuaron comparaciones en el pH del suero, proteína y actividades enzimáticas en suero humano cuando se trató este con butanol-DIPE (40%-60% VN). Los resultados se ilustran en la siguiente tabla.

		Control	Deslipidado
IgA	Mg/100ml	168	167
Igm	Mg/100ml	144	144
Ceruloplasmina	Mg/100ml	1402	1395
Transferrina	Mg/100ml	30	31
Albúmina	g/100ml	5,12	5,12
Total proteína	g/100ml	7,35	7,42
PH		7,37	7,37
GOT	IU	25	23
AP	IU	81	80
a-amilasa	IU	293	293

- 10 Puede verse que el tratamiento con el sistema disolvente de la presente invención no afecta de manera adversa a los constituyentes sanguíneos anteriores. De manera importante, parece ser que no se presenta desnaturalización de las proteínas de plasma ni cambio en la actividad enzimática, incluyendo la actividad de enzimas asociadas con lípidos tal como lecitina colesterol aciltransferasa y proteína de transferencia de éster de colesterol.

Experimento 2

Un sobrenadante de cultivo libre de células con suero conteniendo aproximadamente 100 dosis infecciosas se mezcló con butanol:diisopropiléter (40:60) en una relación de 1:2 y se mezcló en un sacudidor orbital a 30 rpm durante 1 hora.

- 15 La mezcla fue centrifugada a 400 x g durante 10 minutos y se separó la fase acuosa. Se mezcló entonces con dietiléter y se centrifugó como anteriormente, dos veces. El dietiléter residual fue separado por aplicación de vacío. Se incubó una línea de células de linfocitos T con virus tratado, sin tratar o con ningún virus durante 2 horas, tras lo cual las células se lavaron para separar virus y se hicieron crecer durante 2 semanas. Un ensayo ELISA para detectar antígeno p24 de virus mostró que no tuvo lugar ninguna réplica del virus en las células infectadas con suero tratado, mientras que si tuvo lugar réplica del virus en las células tratadas con suero infectado pero no tratado.
- 20

Estos resultados demuestran que el tratamiento de suero por el método y sistema disolvente de la presente invención puede desactivar y eliminar infectividad del virus de VIH. Aún más, esta desactivación se puede conseguir sin efectos adversos sobre los otros componentes del suero.

Experimento 3

Objetivo

5 Ensayo para comprobar si la deslipidación del suero se traduce en la inactivación del virus de hepatitis B del Pato (DHBV).

Se utilizó un depósito de suero estándar (Camden) conteniendo 10^6 ID₅₀ dosis de DHBV.

Se obtuvieron 21 patitos de una manada negativa al DHBV en el día de la eclosión. Los patitos se ensayaron en el momento de la adquisición y mostraron ser negativos a ADN de DHBV mediante hibridación por transferencia dot-blot.

10 Procedimiento de ensayo

El sistema disolvente orgánico se mezcló en la proporción de 40% de butanol a 60% de diisopropiléter. Se mezclaron 4 ml del sistema disolvente orgánico mezclado con 2 ml de un depósito de suero estándar y se hizo rotar solamente durante 1 hora. La mezcla se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos y se separó la fase acuosa. Luego se mezcló con un volumen igual de dietiléter y se centrifugó como anteriormente. Entonces se separó la fase acuosa y se mezcló con un volumen igual de dietiléter y se volvió a centrifugar. La fase acuosa se separó y el dietiléter residual se separó mediante aireación en un armario de humos.

Controles positivos y controles negativos

Los sueros de contacto positivos y negativos fueron diluidos en salina tamponada con fosfato (PBS).

20 Controles positivos: se mezclaron 2 ml de suero reunido conteniendo 10^6 ID₅₀ dosis de DHBV con 4 ml de PBS. Controles negativos: se mezclaron 2 ml de suero reunido negativo a DHBV con 4 ml de PBS.

La infectividad residual fue ensayada por inoculación de 100 µl de cualquiera de la muestra de ensayo (n=7), control negativo (n=7) o control positivo (n=7) en las cavidades peritoneales de patos de un día de edad.

Resultados

25 Uno de los patos de control positivos murió entre los 4 y 6 días de edad y fue excluido de un análisis adicional. Otros tres patos de control positivo murieron entre los 9 y 10 días de edad y dos en el tratamiento y uno de control positivo murió en el día 11. Se decidió dar por terminado el experimento. Los patitos restantes fueron sometidos a eutanasia en el día 12 y se extrajeron sus hígados para proceder al análisis de ADN de DHBV en la forma descrita por Deva et al (1995).

Controles negativos

30 La totalidad de los siete patos de control negativos permanecieron negativos a DHBV.

Controles positivos

La totalidad de los seis patos de control positivos resultaron ser positivos a DHBV en el hígado.

Patos de ensayo

La totalidad de los siete patos de ensayo permanecieron negativos respecto a ADN de DHBV en su hígado.

35 Conclusión

40 La deslipidación de suero empleando el sistema disolvente anterior se tradujo en la inactivación de DHBV sin que ninguno de los patitos que recibieron suero tratado llegaran a infectarse. Aunque el experimento había sido dado por terminado en el día 12 en lugar del día 14, todos los patos de control positivos fueron positivos a DHBV (3/3 fueron positivos a DHBV en el día 10). Esto sugiere que había transcurrido tiempo suficiente para que los patos tratados llegaran a ser positivos a DHBV en el hígado y que la finalización prematura del experimento no se había soportado en los resultados.

Experimento 4

Inactivación de pestivirus de ganado vacuno (virus de la diarrea viral bovina, BVDV), como un modelo para hepatitis C.

5 1. Virus

En estos experimentos se utilizó un aislado de pestivirus de ganado vacuno estándar (BVDV). El aislado, virus de BVD "Numerella" se aisló en 1987 a partir de una muestra de diagnóstico entregada de un caso típico de "Enfermedad Mucosal" en una granja en el distrito Bega de NSW. Este virus es no citopatógeno, al igual que el 95% de los aislados de BVDV ensayados en nuestro laboratorio durante un periodo de 30 años, y reacciona con todos los 12 de un panel de anticuerpos monoclonales comprobados en EMAI como reactivos. Por tanto, este virus representa una "cepa estándar" de virus BVD australianos.

El virus Numerella se hizo crecer en células MDBK bovinas ensayadas en condición libre de agentes virales adventicios, incluyendo BVDV. El medio usado para el crecimiento viral contenía 10% de Suero Bovino Adulto procedente de ganado EMAI, ensayado en su totalidad en condición libre de virus de BVDV y anticuerpos. Este suplemento de suero ha sido utilizado en nuestro laboratorio durante 30 años para excluir la posibilidad de contaminación por BVDV adventicio de sistemas de ensayo, una situación común en laboratorios de todo el mundo que no toman precauciones para asegurar que el virus de ensayo sea el único presente en el sistema de cultivo. Empleando estos sistemas de cultivo ensayados se aseguró una réplica de alto nivel del virus y un alto rendimiento de virus infeccioso. La valoración del rendimiento viral final después de 5 días de crecimiento en células MDBK mostró un título de $10^{6.8}$ partículas virales infecciosas por ml de medio de cultivo clarificado (centrifugado).

2. Inactivación de BVDV infeccioso

En un matraz de cultivo de tejido de 150 cm² se recogieron 100 ml de sobrenadante de cultivo de tejido, conteniendo $10^{6.8}$ partículas virales/ml. El sobrenadante fue clarificado por centrifugado (los restos celulares fueron pelletizados a 3.000 rpm, 10 minutos, 4° C) y se apartaron 10 ml como un control positivo para la inoculación del animal (virus no inactivado). Los restantes 90 ml (conteniendo $10^{7.75}$ virus infecciosos) fueron inactivados empleando el siguiente protocolo. De manera resumida, se añadieron y mezclaron mediante arremolinamiento 180 ml de butanol:diisopropiléter (2:1). La mezcla, en un matraz cónico de 500 ml, se sacudió entonces durante 30 minutos a 30 rpm a temperatura ambiente en un sacudidor orbital. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 400 x g y la fase orgánica fue separada y desechada. En etapas posteriores, la capa del fondo (fase acuosa) puede ser separada desde por debajo de la fase orgánica, mejorando el rendimiento considerablemente.

La fase acuosa, después del tratamiento con butanol:diisopropiléter, se lavó 4 veces con un volumen igual de dietiléter nuevo para separar todas las trazas contaminantes de butanol. Cada vez, el matraz fue arremolinado para asegurar una mezcla homogénea de las fases acuosa y disolvente antes del centrifugado como anteriormente (400 x g, 10 minutos, 4° C). Después de 4 lavados, la fase acuosa se colocó en un vaso de precipitados estéril en una campana de humos durante la noche (16 horas) y se cubrió con un pañuelo estéril para prevenir la contaminación. Se dejó en funcionamiento la campana de humos para separar la totalidad del residuo de éter volátil restante del preparado viral inactivado. Este se guardó entonces a 4° C bajo condiciones estériles hasta inocularse en cultivo de tejido o animales para verificar cualquier virus infeccioso que permanezca.

3. Ensayo del preparado de BVDV inactivado

3.1 Inoculación en cultivo de tejido

Se mezclaron 2 ml de preparado de virus inactivado con disolvente ($10^{7.1}$ equivalentes virales) con 8 ml de medio de cultivo de tejido y se adsorbió durante 60 minutos sobre una monocapa de células de MDBK en un matraz de cultivo de tejido de 25 cm². Como un control positivo, se adsorbieron similarmente 2 ml de virus no inactivado (conteniendo la misma cantidad de virus vivo infeccioso) sobre células de MDBK en un matraz de cultivo de tejido de 25 cm². Después de 60 minutos, se retiró el sobrenadante de ambos matraces y se sustituyó por medio de crecimiento normal (+10% ABS). Los matraces se hicieron crecer entonces durante 5 días bajo condiciones estándar antes que las células de MDBK fueran fijadas y teñidas empleando un protocolo de inmunoperoxidasa estándar con una mezcla de 6 anticuerpos monoclonales específicos a BVDV (panel EMAI, reactivos con 2 proteínas virales de BVD diferentes).

No existieron células infectadas en la monocapa de células de MDBK que fueron inoculadas con el virus tratado con disolvente orgánico (inactivado). En contraste, aproximadamente el 90% de las células en el matraz de control (que fue inoculado con virus de BVD no inactivado) eran positivas respecto al virus tal como se demostró mediante tñido con inmunoperoxidasa, específica, fuerte. Estos resultados demostraron que, bajo condiciones de ensayo in vitro, no

permaneció ningún virus infeccioso en el preparado de BVDV inactivado.

3.2 Inoculación en animales

Un ensayo in vivo incluso más sensible consiste en inocular el ganado vacuno naïve (negativo a anticuerpos) con el preparado de virus inactivado. Tan pronto como una partícula viral infecciosa inyectada subcutáneamente en dichos animales se considera que es una dosis infecciosa para el ganado, en poco tiempo, una partícula viral infecciosa inyectada subcutáneamente en dichos animales es considerada como una dosis infecciosa para el ganado, teniendo en cuenta que la entrada en células y la réplica del virus es extremadamente eficiente para BVDV.

Un grupo de 10 novillos negativos a anticuerpos (10-12 meses de edad) fueron asignados aleatoriamente a tres grupos. El primer grupo de 6 novillos se utilizó para comprobar si el virus de BVD había sido o no totalmente inactivado. Se inocularon 2 novillos con virus no inactivado para actuar como un control positivo mientras que los dos novillos restantes actuaron como animales "centinelas" negativos para asegurar que no se presentara una transmisión del pestivirus natural dentro del grupo inoculado de animales. Los animales de control positivo (inoculados con virus vivo infeccioso) se mantuvieron bajo condiciones de cuarentena separados para impedir que los mismos infectaran a cualesquiera otros animales cuando desarrollaran una viremia transitoria después de la infección (normalmente a los 4-7 días después de recibir el virus vivo de BVDV). Se midieron los niveles de anticuerpo en todos los 10 animales empleando un ensayo ELISA competitivo, validado, desarrollado en EMAI. Este ensayo ha sido validado de manera independiente por CSL Ltd y es comercializado por IDEXX Scandinavia en Europa.

Los 6 animales del primer grupo recibieron cada uno de ellos una inyección subcutánea de 4,5 ml del preparado de BVDV inactivado, incorporado en un adyuvante comercial. Dado que cada ml del preparado inactivado contenía $10^{6,8}$ equivalentes virales, la carga viral total antes de la inactivación fue de $10^{7,4}$ TCID₅₀. Los animales de control positivos recibieron 5 ml cada uno del preparado no inactivado, es decir, $10^{7,5}$ TCID₅₀ inyectados subcutáneamente en el mismo día que en el caso del primer grupo. Los 2 animales "centinela" restantes no fueron administrados con antígenos virales, comiendo forraje con el primer grupo de animales durante toda la prueba para asegurar que no existía ninguna actividad de pestivirus natural que se presentase en el grupo mientras tenía lugar la prueba.

No existió desarrollo de anticuerpos en ninguno de los novillos que recibieron el preparado de virus de BVD inactivado. A las 2 y 4 semanas después de una sola dosis, ninguno de los 6 novillos se sero-convirtieron demostrando ello que no quedó virus infeccioso en un volumen total de 27 ml del preparado de virus inactivado. Esto es el equivalente de una inactivación total de $10^{8,2}$ TCID₅₀. En contraste, existían altos niveles tanto de anticuerpos anti-E2 (anticuerpos neutralizantes) como de anticuerpos anti-NS3 tanto a las 2 semanas como a las 4 semanas después de la inoculación en los 2 animales que recibieron 5 ml cada uno de ellos del preparado viral antes de la inactivación. Esto confirmó la naturaleza infecciosa del virus antes de la inactivación. Estos resultados in vivo confirman los hallazgos del ensayo de cultivo de tejido in vitro. Los dos animales "centinela" permanecieron sero-negativos en todo momento demostrando que el rebaño permaneció libre de infecciones por pestivirus natural.

Experimento 5

Se llevó a cabo un estudio con microscopio electrónico con objeto de visionar partículas de virus antes y después de la inactivación.

La inactivación se efectuó con DIPE/butanol y con DIPE solo durante 60 minutos, 1 minuto y 30 segundos. No se detectaron por ME infectividad o partículas de virus visibles, incluso después del tratamiento durante 30 segundos. No se observaron en absoluto partículas de virus para las muestras inactivadas. Se cree que la destrucción de la envoltura líquida del virus ocurrió demasiado rápidamente para su observación.

Puede verse que los métodos y sistema disolvente de la presente invención puede inactivar rápida y eficientemente agentes infecciosos incluyendo el virión de VIH en fluidos biológicos.

Además, dicha inactivación ocurre sin destrucción apreciable de proteínas lo cual puede tener efectos adversos sobre la salud humana. Aún más, los lípidos disueltos son separados y no se introducen en el paciente.

La presente invención puede también inactivar rápida y eficientemente agentes infecciosos en fluidos biológicos y productos sanguíneos. El método es relativamente simple y no requiere procedimientos y equipos complejos para la separación del sistema disolvente, en comparación, por ejemplo, con el método de tratamiento de plasma SD actualmente utilizado, como se ha descrito anteriormente. Un método relativamente simple de inactivar un virus es deseable a nivel económico y también presenta un potencial más amplio en países en desarrollo y particularmente en aquellos en donde el VIH es prevalente.

En la presente descripción y reivindicaciones deberá entenderse que los términos "comprende" y "que comprende" no quedan limitados a un entero y enteros establecidos y no excluye uno o más otros enteros.

REIVINDICACIONES

1. Método para reducir la actividad de un agente infeccioso que tiene una envoltura o membrana lipídica, cuyo método comprende:
 - 5 poner en contacto un fluido biológico con un sistema disolvente que comprende un disolvente en el cual son solubles los lípidos y en donde los constituyentes hematológicos y bioquímicos son sustancialmente estables y que es inmiscible con el fluido biológico, durante un tiempo suficiente para reducir los niveles de actividad del agente infeccioso en el fluido; y
 - 10 separar el fluido del sistema disolvente, con lo que los lípidos disueltos son separados con y permanecen en el sistema disolvente, caracterizado porque el sistema disolvente comprende al menos un alcohol, éter, hidrocarburo, amina, éster o una mezcla de estos compuestos.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el fluido biológico es sangre, plasma sanguíneo, fracciones de plasma sanguíneo, derivados de células sanguíneas tales como hemoglobina, α -interferón, factores de crecimiento, factores de crecimiento de células T, plaquetas derivadas del factor de crecimiento, activador de plasminógeno, precipitados de plasma sanguíneo incluyendo crioprecipitado, precipitado de etanol y precipitado de polietilenglicol, o sobrenadantes tales como criosobrenadante, sobrenadante de etanol y sobrenadante polietilenglicol, semen y suero de mamíferos, en particular suero vacuno fetal.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sistema disolvente es sustancialmente inmiscible en el fluido o producto sanguíneo y la separación del sistema disolvente respecto del fluido o producto sanguíneo incluye dejar que el sistema disolvente y el fluido o producto sanguíneo sedimenten con el fin de formar una capa de disolvente que contiene lípidos y una capa acuosa de plasma, y separar las dos capas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente infeccioso es un virus.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente infeccioso se elige entre virus VIH, virus de hepatitis B o de hepatitis C, Alphavirus (alfavirus), Rubivirus (virus de la rubéola), Flavivirus (Flavivirus), Pestivirus (virus de enfermedades mucosales), virus de hepatitis C, sin nombre, Coronavirus (coronavirus), Torovirus (torovirus), Arterivirus (arterivirus), Pararnyxovirus (paramixovirus), Rubulavirus (ribulavirus), Morbillivirus (morbillivirus), Pneumovirinae (pneumovirus), Pneumovirus (pneumovirus), vesiculovirus (vesiculovirus), Lyssavirus (lisavirus), Ephemerovirus (efemerovirus), Cytorhabdovirus (rhabdovirus de las plantas del grupo A), Nucleorhabdovirus (rhabdovirus de las plantas del grupo B), Filovirus (filovirus), influenzavirus A, B (virus de influenza A y B), influenzavirus C (virus de influenza C), virus de tipo Thogoto sin nombre, Bunyavirus (bunyavirus), Phlebovirus (flebovirus), Nairovirus (nairovirus), Hantavirus (hantavirus), Tospovirus (tospovirus), Arenavirus (arenavirus), retrovirus tipo B de mamíferos, sin nombre, retrovirus tipo C de mamíferos y reptiles, sin nombre, retrovirus tipo D, Lentivirus (lentivirus), Spumavirus (espumavirus), Orthohepadnavirus (hepadnavirus de mamíferos), Avihepadnavirus (hepadnavirus de aves), Simplexvirus (simplexvirus), Varicellovirus (varicelovirus).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el alcohol es un alcohol C₁-C₈.
7. Método según la reivindicación 6, en donde el alcohol es butanol.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el éter se elige del grupo consistente en etilpropiléter, propiléter, diisopropiléter, dietiléter o una mezcla de los mismos.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el éter es diisopropil o dietiléter.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el sistema disolvente comprende de 0% a 60% aproximadamente de alcohol y entre 40 y 100% aproximadamente de éter.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la capa acuosa de plasma se lava con un éter para separar disolvente residual y/o para desmenujar la capa acuosa.