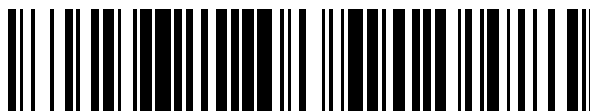


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 781**

51 Int. Cl.:
A61K 31/327 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
A61L 2/14 (2006.01)
C11D 3/39 (2006.01)
C11D 11/00 (2006.01)
A61L 2/18 (2006.01)
A61L 2/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02782119 .8**
96 Fecha de presentación: **04.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1432993**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Procedimiento de evaluación in vitro para tratamientos priocidaces (anti-priones)**

30 Prioridad:
05.10.2001 US 327460 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2012

73 Titular/es:
STERIS INC.
43425 BUSINESS PARK DRIVE
TEMECULA, CA 92590, US

72 Inventor/es:
ANTLOGA, Kathleen M. y
MCDONNELL, Gerald E.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 387 781 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 de evaluación *in vitro* para tratamientos priocidas (anti-priones)

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las enfermedades infecciosas. Encuentra aplicación concreta como procedimiento de evaluación de la respuesta de priones (agentes infecciosos proteináceos) a varios tratamientos y se describirán con referencia concreto al mismo. No obstante, se apreciará que la invención también es aplicable a otros estudios de la actividad de los priones.

10 El término "Prión" se usa para describir agentes infecciosos proteináceos que producen enfermedades cerebrales similares en seres humanos y/o en animales, que son, invariablemente, mortales. En general, estas enfermedades se denominan encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET). Las EST incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) y sus variantes CJD vCJD) en seres humanos, encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) en ganado vacuno, también conocida como "enfermedad de las vacas locas", scrapie en ovejas y caquexia en el alce. Todas estas enfermedades atacan a los órganos neurológicos del animal o animales que son susceptibles a la enfermedad concreta. Se caracterizan por tiempos de incubación inicialmente largos seguidos por un periodo corto de síntomas neurológicos, incluyendo demencia y pérdida de coordinación, y, en última instancia, muerte.

15 Se cree que el agente infeccioso responsable de estas enfermedades es una proteína simple, sin ácidos nucleicos asociados. Se ha propuesto que el mecanismo patógeno para tales enfermedades de priones implica una proteína codificada por el huésped normal inicial. La proteína experimenta un cambio conformacional a una forma anormal (un prión), que tiene la capacidad de auto-propagación. La causa exacta de este cambio es actualmente desconocida. La forma anormal de la proteína no se descompone eficazmente en el cuerpo y su acumulación en ciertos tejidos (en particular tejido neural) causa, en última instancia, daños en de tejidos, tal como muerte celular. Una vez que se ha producido daño de tejido neural significativo se observan los signos clínicos.

20 Por tanto, las enfermedades de priones pueden clasificarse como enfermedades de agregación de proteínas, que incluyen también otras varias enfermedades fatales, tales como la enfermedad de Alzheimer y la amiloidosis. En el caso de la CJD, la enfermedad de priones más frecuente en seres humanos (que se producen en aproximadamente 1:1.000.000 de la población), se piensa que aproximadamente el 85% de los casos surge esporádicamente, se cree que aproximadamente 10% es hereditario y aproximadamente el 5% surge iatrogénicamente.

25 En la actualidad no se conocen tratamientos eficaces para las enfermedades de priones en animales o seres humanos y, por tanto, tras el inicio de los síntomas neurológicos se produce la muerte. El progreso en la identificación de fármacos terapéuticos diana ha sido lento debido a la incapacidad para realizar pruebas *in vitro*. Hasta la fecha no se han desarrollado procedimientos para cultivar priones en medios en el laboratorio. Estudios *in vivo* implican la inoculación de priones en un animal de ensayo y analizar la respuesta del animal a un régimen terapéutico propuesto. Dado que la progresión de la enfermedad es lenta, estos estudios *in vivo* son, inevitablemente, largos y, por tanto, no es fácil la realización de la detección selectiva de un número elevado de posibles fármacos. Modelos de ratón o hámster *in vivo* se han sometido a ingeniería genética para que sean más susceptibles a los priones y, en general, se usan para evaluaciones. Además, dado que estas enfermedades tienden a ser específicas de animales, no se sabe si los ensayos realizados en animales se pueden aplicar fácilmente a seres humanos.

30 Algunos grupos de investigación se han sugerido usando un modelo de priones en levaduras para evaluación de fármacos y se han producido algunos informes de un modelo *in vitro* para estudiar el plegamiento de los priones. No obstante, no hay estudios que hayan establecido correlaciones entre el comportamiento de estos modelos propuestos y la actividad de los priones.

35 A principios de la década de 1980 se aisló un nuevo agente de replicación del tracto intestinal humano. (Burdon, J. Med. Micro., 29: 145-157 (1989) y Burdon; The Lancet, Vol. 353; April 10 (1999)). Este agente se aisló del fluido de ileostomía (filtrado a través de un filtro de 0,2 μ) de dos pacientes con enfermedad de Crohn y se pudo cultivar *in vitro*. Se le ha dado el nombre de Organismo dependiente de fluido ileal (IFDO), aunque después se ha descubierto que sobrevive en otros medios, como en presencia de pancreatina. Se observaron colonias marrones pequeñas sobre un medio de crecimiento específico selectivo. Al analizar este agente, no parecía tener naturaleza viral, bacteriana ni fúngica, pero sí parecía crecer logarítmicamente y tener una resistencia poco habitual a diversos antibióticos y agentes físicos y químicos. También se descubrió que el agente tenía una elevada resistencia al calor húmedo. Este agente no se había relacionado antes directamente con priones ni se había usado en investigación con priones.

40 Aunque, en general, las enfermedades de priones no se han considerado muy contagiosas, se pueden transmitir dentro de la misma especie y, en determinadas condiciones, de una especie a otra. Recientemente se ha demostrado que las enfermedades de priones se pueden transmitir a través de tejidos de riesgo, incluido el cerebro,

la médula espinal y los ojos. También se ha comunicado la transmisión iatrogénica, incluidos injerto de duramadre, trasplantes corneales, homoinjertos pericárdicos, y a través de contaminación de gonadotropina humana y de hormona del crecimiento humana. Se ha comunicado también la transmisión mediante dispositivos médicos, incluidos a través de la reutilización de instrumentos neuroquirúrgicos, electrodos de profundidad y otros dispositivos usados durante cirugías en estrecha proximidad con el sistema nervioso central.

Actualmente se ha especulado mucho sobre la eficacia de la descontaminación convencional y los procedimientos de esterilización para la destrucción de priones. Los priones son considerablemente muy fuertes y demuestran resistencia a procedimientos de rutina de descontaminación y esterilización. Algunos procedimientos recomendados incluyen incineración, esterilización con vapor en autoclave prolongada, tratamientos con hidróxido sódico e hipoclorito sódico a concentraciones elevadas (p. ej., NaOH 1M o NaHClO₃ al 2 % Cl disponible durante 1 horas). Estos tratamientos agresivos a menudo son incompatibles con los dispositivos médicos, endoscopios particularmente flexibles y otros dispositivos con partes de plástico, bronce o aluminio. Muchos dispositivos son dañados por la exposición a temperaturas elevadas. Los tratamientos químicos, como las bases fuertes, son dañinos para los materiales del dispositivo médico o las superficies en general. En general, se ha comunicado que el glutaraldehído, el formaldehído, el peróxido de hidrógeno, la mayoría de los fenólicos, los alcoholes y procedimientos tales como calor seco, ebullición, congelación, UV, ionización y radiación con microondas son ineficaces. Existe una clara necesidad de productos y procedimientos que sean eficaces contra los priones, además de compatibles con las superficies.

Un tratamiento menos agresivo que se ha investigado y demostrado que es eficaz contra los priones es la formulación de ácido peracético formulada por STERIS Corporation, Mentor, Ohio, con la marca STERIS 20™. La formulación contiene ácido peracético mezclado con tampones, anticorrosivos, tensioactivos y quelantes, preparada en una dilución de uso para procesamiento estéril a temperaturas superiores a la ambiente.

No obstante, actualmente no hay ningún medio fácil de evaluación de tratamientos anti-priones ("priocidas"), El cultivo de dispositivos tratados con priones tras los tratamientos priocidas propuestos implica inocular a los animales con lavados procedentes de los dispositivos y observar el desarrollo de la enfermedad si el tratamiento priocida es ineficaz. Este es un proceso prolongado y susceptible a errores, ya que el número de priones que quedan en los dispositivos puede ser relativamente pequeño. Adicionalmente existe el riesgo de que los priones que no se destruyan con el tratamiento priocida puedan suponer riesgos para los trabajadores.

Por tanto, existen cada vez más preocupaciones entre el personal médico sobre la atención adecuada de los pacientes en los que se ha identificado una enfermedad de priones. También se han suscitado preocupaciones de que las enfermedades se puedan transmitir por la reutilización de instrumentos y similares debido a un fallo en la detección del estado de la enfermedad antes de la muerte del paciente infectado. Adicionalmente, los riesgos asociados con tejidos de riesgo alto, medio y bajo todavía no se han establecido. Por ejemplo, se ha considerado que la amigdalectomía y los procedimientos dentales son procedimientos de bajo riesgo de posible infección por priones. No obstante, recientes pruebas sugieren que los riesgos pueden ser mayores debido al descubrimiento de que se están encontrando tejidos infectados con priones fuera del cerebro. También se ha sugerido que puede haber una relación entre enfermedades relacionadas con priones y estados de enfermedad similares, tales como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. El "Journal of Hospital Infection", (1990) Vol. 15, Nº 3, pág. 265-272 (D1) se refiere a un estudio de la resistencia de un agente de replicación (IFDO) que tiene similitudes con el agente de Creutzfeldt-Jacob (CJA). En la página 270, D1 indica que el IFDO puede proporcionar un modelo para priones y que los datos comunicados en el estudio pueden ser relevantes para la eliminación segura del material infectado con el agente de Creutzfeldt-Jacob. No obstante, no hay ninguna sugerencia en D1 de que el IFDO se use para evaluar un tratamiento que incluya limpiar un sustrato con una composición de limpieza que elimine proteínas y poner en contacto el sustrato limpio con un agente oxidante.

La presente invención proporciona un procedimiento nuevo y mejorado para la actividad de la actividad priocida, que supera los problemas a los que se ha hecho referencia anteriormente.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para evaluar la actividad de posibles tratamientos contra priones o enfermedades relacionadas con priones. El procedimiento incluye someter un modelo de priones a un tratamiento diseñado para atacar priones, en el que el tratamiento incluye:

limpiar el sustrato con una composición de limpieza alcalina que tiene una concentración de álcali de 0,02 a 0,1M y que elimina las proteínas, y poner en contacto el sustrato limpio con un agente oxidante que contiene ácido peracético; siendo le modelo de priones un organismo dependiente de fluidos ileales (IFDO), que se ha demostrado que exhibe una respuesta similar a la de los priones a un tratamiento diseñado para atacar priones y evaluar el efecto del tratamiento sobre el modelo de priones como indicador del efecto del tratamiento sobre el prión o la

enfermedad relacionada con priones.

El procedimiento es adecuado para seleccionar fármacos propuestos según su actividad contra enfermedades relacionadas con priones o procedimientos terapéuticos propuestos o productos químicos para determinar la actividad priocida. El procedimiento incluye exponer un modelo de priones al fármaco, producto químico o procedimiento propuesto y cultivar cualquier modelo de priones restante *in vitro*, habiéndose demostrado que el modelo de priones exhibe respuestas similares a los priones a un fármaco, producto químico o procedimiento.

Una ventaja de la presente invención es que los tratamientos, productos farmacéuticos y agentes priocidas propuestos para las enfermedades de priones se pueden someter a detección selectiva *in vitro* sin la necesidad de un extenso estudio *in vivo*.

Otra ventaja de la presente invención es que los tratamientos propuestos para las enfermedades con priones y los agentes priocidas se pueden evaluar rápidamente.

Otras ventajas más de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura y comprensión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede tomar forma en varios componentes y disposiciones de componentes, y en varias etapas y disposiciones de etapas. Las figuras son solo con fines ilustrativos de una realización preferida y no deben interpretarse como limitantes de la invención.

La FIGURA 1 es una vista lateral esquemática de un indicador biológico que contiene un modelo de priones de acuerdo con la presente invención;

La FIGURA 2 es una vista lateral esquemática de un indicador biológico de la FIGURA 1 tras cerrar una tapa para sellar el indicador y mezclar el modelo de priones con medio de crecimiento;

La FIGURA 3 es un gráfico de un recuento de modelo de priones frente al tiempo para procedimientos de tratamiento con ácido peracético a diferentes niveles de concentraciones iniciales de ácido peracético.

La FIGURA 4 es un gráfico que muestra el número total de glóbulos rojos en el tiempo para una primera muestra control (agua-glóbulos rojos), una segunda muestra control (pancreatina-Panc) y una muestra del modelo de priones (indicada como IFDO);

La FIGURA 5 es un gráfico del porcentaje de glóbulos rojos que tiene una estructura normal (es decir, sin estructura anormal ni aberraciones) en el tiempo para una primera muestra control (agua-glóbulos rojos), una segunda muestra control (pancreatina-Panc) y una muestra del modelo de priones (indicada como IFDO);

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Se ha descubierto una entidad proteínica infrecuente que se denominará en el presente documento la "proteína de ensayo" o "modelo de priones" que se correlaciona con la actividad de priones y, por tanto, es útil como modelo de priones simulado. El modelo de priones se ha desarrollado como indicador de la inhibición/inactivación de los priones y se ha demostrado correlación con la inactivación de los priones *in vitro* e *in vivo*.

La proteína de ensayo preferida fue aislada inicialmente por D.W. Burdon, Department of Microbiology, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, Inglaterra. Inicialmente se extrajo del fluido ileal de pacientes que sufren enfermedad de Crohn y tiene una naturaleza proteínica. Parece estar asociada con hierro y puede tener un componente de ARN. La exploración microscópica a 100 aumentos muestra que el modelo de priones comprende partículas pleomórficas de un tamaño o forma no uniforme. Posteriormente, los inventores han demostrado que este agente está presente en muestras de sangre y suero.

No obstante, se contempla que otras proteínas similares, que muestran la misma resistencia o similar a los tratamientos destructivos que el presente modelo de ensayo puede usarse como alternativa al modelo de priones.

La proteína de ensayo se cultiva fácilmente en un medio artificial, tal como medio basado en agar o medio líquido. Se puede usar en medio o suspender en agua u otro fluido. La proteína parece crecer de forma eficaz cuando hay glóbulos rojos lisados, por tanto es preferible que los medios contengan glóbulos rojos de seres humanos u otros animales o extractos de los mismos, tales como hemoglobina. Dado que se ha descubierto que el modelo de priones en una proporción considerable de muestras de sangre, es preferible que se realice detección selectiva de la sangre antes de usar en el medio de crecimiento para evitar cualquier reacción de competencia *in vitro* y la contaminación de las muestras que más tarde se van a cultivar *in vivo*.

- Hasta la fecha se han demostrado muy pocos principios activos que sean eficaces en la inhibición del crecimiento del modelo de priones en medios de cultivo. De aquéllos que tienen un efecto, se ha demostrado anteriormente que una serie de ellos tienen alguna actividad contra los priones, incluidos vCJD, que muestran la correlación del modelo con una actividad de priones real. Estas sustancias activas eficaces incluyen hidróxido sódico (NaOH
- 5 aproximadamente 1M) y una formulación basada en fenol comercializada con la marca LpH™ de STERIS Corporation, Mentor, Ohio. Anteriormente se ha descubierto que la formulación basada en ácido peracético, STERIS 20™, tiene actividad contra priones y ahora se ha descubierto que tiene actividad contra el modelo de priones. Otras sustancias activas con actividad mensurable que ahora se han identificado usando el modelo de priones incluyen nisina, sulfato de neomicina, nitrato de plata y manganeso.
- 10 Dadas las fuertes correlaciones que se han encontrado entre la respuesta de los priones a varios tratamientos y la correspondiente respuesta de la presente proteína de ensayo, la proteína de ensayo se puede usar *in Vitro* como modelo para la detección selectiva de posibles fármacos, agentes priocidas, procedimientos y similares (todos denominados, en general, "tratamientos"), por su posible efecto contra los priones y las enfermedades de priones. Los tratamientos que se han demostrado que son eficaces en estudios *in vitro* con el modelo de priones pueden
- 15 pasar a las pruebas *in vivo*, por ejemplo inoculando en un animal un príon y sometiendo al animal a un régimen de tratamiento (p. ej., e el caso de un fármaco propuesto para tratar una enfermedad de priones) o exponiendo una muestra de priones a un tratamiento seleccionado (tal como un agente priocida propuesto para uso en instrumentos médicos) y, después, cultivar la muestra expuesta *in vivo*, para determinar si el tratamiento seleccionado ha destruido los priones.
- 20 Usando el modelo de priones, se puede evaluar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos convencionales (p. ej., ácido peracético o peróxido de hidrógeno en vapor) contra los priones. Se pueden realizar modificaciones de los tratamientos antimicrobianos convencionales con la visión de optimizar el tratamiento antimicrobiano de modo que el tratamiento destruya o, de otro modo, inactive los priones y también destruya o, de otro modo, inactive otros microorganismos normalmente destruidos por dichos procedimientos. El procedimiento modificado se puede usar
- 25 después para tratar dispositivos contaminados tanto con priones como con microorganismos. También se pueden evaluar nuevas sustancias activas, diseñadas específicamente para tratar priones.
- Otro uso para el modelo de priones es desarrollar tratamientos para productos alimentarios, en general los que contienen un producto animal que puede estar contaminado con priones. Dichos productos incluyen, por ejemplo, carne cruda, incluidas carcasas de carne, carne picada o productos de carne triturada, y productos de carne
- 30 cocinada, tales como salchichas, jamones, productos cárnicos procesados y similares. Usando el modelo de priones se han identificado varios tratamientos. Por tanto, se ha desarrollado un procedimiento de tratar un producto alimentario para consumo animal o humano, que puede estar contaminado con priones. El procedimiento incluye tratar el producto alimentario con una composición que incluye al menos uno de nisina, manganeso y nitrato de plata en una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para reducir el nivel de priones sobre el
- 35 producto alimentario o para inactivar los priones presentes. Los productos animales que se obtienen o, de otro modo, preparan para usar como piensos animales también se pueden tratar con la composición, antes o después de la transformación.
- Se ha desarrollado un procedimiento de tratar elementos, tales como instrumentos médicos o dentales, que pueden estar contaminados con priones. El procedimiento incluye tratar los elementos con una composición que incluye al menos uno de nisina, manganeso y nitrato de plata, para reducir el nivel de priones sobre los elementos. La
- 40 concentración de la sustancia activa en la composición y la duración del tratamiento dependerán del tipo de sustancia activa y del grado de reducción buscado. El tratamiento se puede combinar con otros tratamientos conocidos que reducen los priones, tales como el tratamiento en autoclave con vapor y/o con hidróxido sódico o hipoclorito sódico.
- 45 La composición para tratamiento de animales o instrumentos está, preferentemente, en forma líquida, por ejemplo una solución acuosa de la sustancia activa, aunque también se contemplan composiciones secas y no acuosas. El tratamiento puede incluir, por ejemplo, inmersión de los elementos que se van a tratar en la solución de tratamiento, pulverización o, de otro modo, poner en contacto los elementos con la solución, o exponer los elementos a un vapor que contiene la sustancia activa.
- 50 Otro procedimiento de tratamiento que se ha desarrollado usando el modelo de priones es tratar los elementos que se han contaminado con priones con procesamiento gaseoso o líquido basado en un agente oxidante. Como ejemplo, se usa una solución a base de ácido peracético. El procedimiento es útil para tratamiento de instrumentos médicos y dentales, y similares, particularmente aquéllos que se han usado para cirugías cerebrales o relacionadas. Se ha descubierto que la temperatura tiene un efecto significativo sobre la actividad priocida. La
- 55 solución de ácido peracético está, preferentemente, a una temperatura de 45-60 °C, más preferentemente de 53-57 °C. Se ha postulado que una reducción de la actividad a temperaturas más altas puede deberse a la coagulación del proteína, convirtiéndola en menos accesible al ácido peracético. El intervalo de temperatura también es eficaz para la destrucción de otros contaminantes, tales como microorganismos. Esto permite usar el mismo

procedimiento para esterilización y para reducción o eliminación de priones. La solución de ácido peracético contiene, preferentemente, tampones, tensioactivos, quelantes, y también puede contener anticorrosivos para reducir los daños en los instrumentos o en el sistema de tratamiento. Se piensa que los tensioactivos son particularmente importantes en la formulación, ya que pueden afectar a la estructura conformacional de la proteína del modelo de priones y permiten que el ácido peracético sea más eficaz. Se prefiere una concentración de ácido peracético de al menos 2.000 ppm para un rápido tratamiento de los priones, más preferentemente de aproximadamente 2.500 ppm. Se ha descubierto que concentraciones de ácido peracético en el intervalo de 2.000 a 2.500 ppm degradan la proteína hasta una forma que sea inactiva (péptidos pequeños o aminoácidos). En general, las temperaturas y concentraciones menores son menos eficaces. Temperaturas más altas pueden ser dañinas para los dispositivos sensibles a la temperatura y también reducen la semivida del ácido peracético.

El tratamiento con ácido peracético se puede usar para sustituir los tratamientos de priones agresivos convencionales, tales como tratamientos con vapor/NaOH. O, el tratamiento con ácido peracético se puede usar en combinación con otros tratamientos. Un régimen terapéutico propuesto incluye:

1. Limpiar los instrumentos con un agente de limpieza que se ha descubierto que es eficaz en la eliminación de material proteináceo, particularmente priones;
2. Tratamiento térmico con vapor o a temperatura elevada (p. ej., 180 °C), aclarado térmico (opcional, o se puede llevar a cabo tras la etapa 3.);
3. Tratamiento de esterilización con, por ejemplo, una formulación de ácido peracético a 2.000 ppm o superior y a una temperatura de 57 °C durante 10-30 minutos.

El agente de limpieza es un agente de limpieza alcalino. Los ensayos con el modelo de priones han mostrado un incremento de la eficacia del proceso de tratamiento con la alcalinidad del producto de limpieza. Se ha descubierto que los productos muy alcalinos, tales como los productos basados en hidróxido sódico o potásico, por ejemplo CIP™ 100 (obtenido de STERIS Corp., Mentor, OH) son particularmente eficaces. Aunque se denominan "altamente alcalinos", estos productos tienen una concentración de álcali mucho menor (CIP™ 100 a 2 oz/gal contiene KOH 0,07 M) que el NaOH 1N que actualmente se recomienda como tratamiento de los priones. Por tanto, una combinación de un producto de limpieza alcalino a una concentración de álcali de 0,02M a 0,1M, seguido de un tratamiento con ácido peracético, es una alternativa eficaz a un tratamiento con NaOH 1N y menos dañino para los instrumentos médicos u otros elementos que se están tratando.

El procedimiento de detección selectiva de la actividad de fármacos propuestos contra enfermedades relacionadas con priones o de la actividad priocida de procedimientos de tratamiento o sustancias químicas propuestos incluye exponer un modelo de priones al fármaco, sustancia química o procedimiento propuesto y cultivar cualquier modelo de priones restante *in vitro*. El modelo de priones es uno que se ha demostrado que exhibe respuestas similares a los priones a otras sustancias activas y procedimientos.

El procedimiento para evaluar el efecto de un tratamiento, fármaco u otra sustancia activa propuestos contra priones implica exponer el modelo de priones al tratamiento, fármaco u otra sustancia activa propuesto. Tras la exposición, el modelo de priones (lo que quede viable) se cultiva en un medio de crecimiento adecuado.

Por ejemplo, en el caso de un procedimiento de tratamiento, tal como un procedimiento de esterilización, un cupón o instrumento se contamina con el modelo de priones y se expone a un tratamiento esterilizante o de limpieza. Una torunda, muestra o extracción se toma tras el tratamiento y se coloca en un medio de crecimiento. Si se observa crecimiento del modelo de priones, el tratamiento de esterilización o de limpieza no ha sido completamente eficaz en la destrucción o eliminación de los priones.

En el caso de una evaluación de una potencial sustancia activa, una solución del fármaco o de otra sustancia activa se mezcla con el modelo de priones. Después de un tiempo de exposición seleccionado, se toma una alícuota de la solución y se cultiva en el medio de crecimiento. Antes de cultivar, el alícuota se neutraliza, preferentemente, con un agente neutralizante adecuado para inactivar el fármaco u otra sustancia activa que se está analizando. Si se demuestra que el fármaco o sustancia activa es eficaz contra el modelo de priones, se puede usar en una cantidad eficaz para tratar un sujeto, tal como una superficie contaminada o una persona o animal que sufre una enfermedad relacionada con priones.

En una realización, los efectos sobre el medio de crecimiento se usan como indicador de la actividad residual del modelo de priones (y, por tanto, por deducción, de priones). Preferentemente, el medio de crecimiento contiene hemoglobina, bien en forma pura o relativamente pura, o está mezclado con otros productos hemoderivados. Por ejemplo, el medio de crecimiento puede contener leucocitos lisados o glóbulos rojos lisados. Si alguno de los modelos de priones ha sobrevivido al procedimiento de tratamiento o a la exposición a la sustancia activa seleccionada, el contenido en hemoglobina del medio de crecimiento se reduce a medida que el modelo de priones "crece". Esto se puede observar por una reducción en el color rojo oscuro del medio o por otras técnicas de

detección, tales como análisis químico, colorimetría, espectroscopia o similares. Si el medio es un medio sólido, por ejemplo un gel de agar, el cambio de color se puede observar como un anillo alrededor del modelo de priones que aumenta de tamaño con el tiempo. Por tanto, la destrucción/inactivación del modelo se puede medir en términos del tamaño del anillo de hemoglobina a un tiempo concreto tras el inicio del procedimiento de cultivo. O, como con los medios líquidos, un cambio de color del medio se puede usar como indicación de la cantidad del modelo de priones restante.

En una realización para analizar un procedimiento de tratamiento propuesto (tal como un procedimiento basado en agente oxidante, por ejemplo uno que use peróxido de hidrógeno o peróxido solo o en combinación, en forma líquida i vapor) para destruir priones sobre instrumentos médicos u otros dispositivos, un modelo de priones está contenido en un indicador biológico del tipo usado convencionalmente para analizar la actividad un procedimiento de esterilización o desinfección contra microorganismos seleccionados, habitualmente relativamente difíciles de matar. Uno de estos indicadores se pone de ejemplo en la **FIGURA 1**, aunque, como alternativa, se pueden usar otros diseños indicadores biológicos. El indicador incluye un vaso **10**, que contiene una muestra **12** del modelo de priones, preferentemente contenido dentro del vaso, de modo que no se lave fácilmente o, de otro modo, elimine del vaso durante el procedimiento de tratamiento. El modo de contención exacto dependerá del tipo de procedimiento de tratamiento. En el caso de los esterilizadores líquidos, tal como ácido peracético, el modelo de priones está contenido dentro de una barrera impermeable a la barrera, que es permeable al esterilizador líquido. Para esterilizadores gaseosos, tales como peróxido de hidrógeno en vapor, o ácido peracético en vapor, el modelo de priones puede depositarse simplemente sobre una superficie interior **14** de una pared del contenedor o con un vehículo **16** como soporte, tal como un disco de papel, acero inoxidable o poliflex. Se puede añadir un medio de crecimiento adecuado al indicador justo antes de someter el indicador al procedimiento de tratamiento propuesto. Más preferentemente, el modelo de priones se mezcla con un medio de crecimiento adecuado después de analizar. En una realización, un medio de crecimiento **18** está contenido en una porción penetrable o ampolla frágil **20** dentro del vaso y, después, se mezcla con el modelo de priones después de eliminar el indicador del procedimiento de tratamiento. Uno modo de mezclar el medio de crecimiento y el modelo de priones es romper la ampolla o penetra en una pared **22** de la porción mediante el movimiento de una tapa **24** desde una posición de abierto, mostrada en la **FIGURA 1**, en la que el esterilizador tiene acceso al vaso a través de aberturas **26**, a una posición de cerrado, mostrada en la **FIGURA 2**, en la que la tapa sella el vaso y evita la salida y la entrada de fluidos. En la realización de las **FIGURAS 1 y 2**, la tapa tiene una proyección **28** que perfora la pared **22**. El crecimiento del modelo de priones se observa por, por ejemplo, un cambio de color del medio u otro cambio detectable en una propiedad física o química del medio. El cambio de color puede deberse a, por ejemplo, la producción del modelo de priones (que aparece de color negruzco), la reducción del contenido de hemoglobina del medio, o puede ser un resultado de una interacción entre el modelo de priones y un indicador químico presente en el medio. Un cambio de color observado es indicativo de que el procedimiento de tratamiento propuesto no sería eficaz como procedimiento de tratamiento de dispositivo contaminado con priones u otros elementos.

En una realización, el indicador contiene tano una muestra del modelo de priones como una muestra de un microorganismo que se sabe que tiene una resistencia alta al tipo de procedimiento de tratamiento en investigación. Tras someter el indicador al procedimiento de tratamiento propuesto, el indicador se evalúa para detectar priones y/o microorganismos residuales. Por tanto, los procedimientos de tratamiento que son eficaces contra priones y microorganismos pueden desarrollarse u optimizarse.

Medios de Cultivo

Se ha desarrollado un medio de cultivo adecuado para cultivar el modelo de priones. El medio de cultivo contiene una base de agar o caldo, tal como base de agar o caldo Mycoplasma™, obtenida de Oxoid. También hay presente una fuente de hemoglobina, tal como glóbulos rojos lavados y lisados, de un ser humano u otro animal. Como se ha tratado anteriormente, los glóbulos rojos se analizan, preferentemente, para garantizar que no hay priones presentes en el medio de cultivo antes de usar. Preferentemente, el medio contiene una fuente de proteasas. La fuente de proteasas puede ser una proteasa aislada, un extracto enzimático, que también puede contener otras enzimas, tales como lipasas, o un tejido animal muy fragmentado, tal como pancreatina, que se obtiene mediante homogeneización de tejido de páncreas. Preferentemente, hay presente un agente dispersante, tal como Tween 80. El acetato de talio es un componente opcional para reducir la contaminación del medio. Los ingredientes se mezclan con agua, preferentemente agua destilada o purificada.

El siguiente ejemplo de medio de cultivo se ha desarrollado para usar con la proteína de ensayo:

Agua destilada	1000 ml
Base agar o caldo (p. ej., (Oxoid)Mycoplasma™)	
Oxoid)	0 – 100 g

Dispersante (p. ej., Tween 80).	0 – 5 ml
Glóbulos rojos de caballo lavados y lisados	10 - 40 ml
Suero de caballo	0 – 10 ml
0,1g/ml de pancreatina	10 – 40 ml
Acetato de talio al 2 %	2 – 20 ml

5 Para analizar la “viabilidad” del modelo de priones (p. ej., tras un procedimiento de tratamiento propuesto, un alícuota de un cultivo o dilución que contiene el modelo de priones en un volumen conocido del medio de cultivo anterior y se incubó a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 48-72 horas. Las proteínas de ensayo “crecerán” como un precipitado negro en el cultivo líquido o como “colonias” pequeñas bajo la superficie de una placa de medio de cultivo. Aunque el modelo de priones no es un organismo, como se entiende convencionalmente, el modelo de priones aumenta de cantidad al cultivar y, por tanto, el término “crecimiento” y términos similares se usan en el presente documento para indicar un incremento en el modelo de priones. El término “viabilidad” se usa para indicar un modelo de priones capaz de exhibir crecimiento, es decir no se ha destruido ni, de otro modo, inactivado.

Para preparar ensayos *in vitro*, los cultivos líquidos de la proteína de ensayo se centrifugan rápidamente a aproximadamente 5.000 g durante aproximadamente 5 minutos y se lavan en agua o medio fresco.

El análisis de la actividad priocida similar se puede realizar de un modo similar a los ensayos típicos con bacterias u hongos. Estos procedimientos incluyen:

15 1) Concentraciones mínimas inhibitoras (CMI): este procedimiento permite la evaluación rápida de una amplia variedad de sustancias activas que inhiben el cultivo de la proteína de ensayo. En una situación simple con una placa de micropocillos se realizan diluciones en serie de una sustancia activa y a cada dilución se añade una concentración estándar baja (p. ej., 10⁵ unidades formadoras de entidades (ufe)) del modelo de priones en medio de cultivo. Tras la incubación a 37 °C durante 48-72 horas, la presencia de crecimiento se indica por un precipitado negro en la base de un pocillo y la menor concentración de una sustancia activa para inhibir el crecimiento se registra como la CMI. Este procedimiento se puede usar para identificar posibles dianas de fármacos o biocidas para actividad anti-priones.

20 2) Experimentos de muertes en el tiempo: este procedimiento permite la determinación de sustancia activa o la eficacia de la formulación en el tiempo. Un material de ensayo (p. ej., una formulación líquida, producto o sustancia activa) se prepara a varias concentraciones y en varias condiciones ambientales (p. ej., pH, temperatura, presencia de una suciedad, y similares). El cultivo del modelo de priones, a una concentración conocida, se añade después directamente al líquido de ensayo y los alícuotas se eliminan en el tiempo para su evaluación. Preferentemente, los alícuotas se neutralizan para inhibidor también la actividad del material de ensayo. La evaluación puede incluir diluciones en serie del alícuota y sembrarlos en medio selectivo para determinar la reducción de la proteína de ensayo en el tiempo en las condiciones de ensayo seleccionadas. En otro ensayo, el cultivo que contiene la proteína de ensayo se puede inocular en un sustrato y exponer a una sustancia activa en fase líquida o gaseosa para determinadas exposiciones de tiempo. La proteína de ensayo recuperable se determina mediante dilución en serie y siembra en placas.

35 3) Estudios de degradación proteica. Los medios que contienen proteína (bien la proteína de ensayo u otra proteína, tal como una que tiene una proporción elevada de estructura en lámina β, similar a la proteína prión) se someten a un procedimiento de tratamiento, tal como un tratamiento con ácido peracético y, después, los alícuotas se evalúan mediante electroforesis en gel u otra técnica capaz de separar proteínas completas de fragmentos más pequeños. Se ha descubierto que varios agentes priocidas eficaces degradan la proteína prión en fragmentos más pequeños. Por tanto, los agentes que degradan la proteína de ensayo u otras proteínas se pueden ver como posibles agentes de tratamiento de priones.

45 Dichas pruebas son valiosas para optimizar la eficacia de una formulación, sustancia activa o procedimiento dado contra la proteína de ensayo. Esto es particularmente importante para entender los efectos de la formulación y los factores ambientales sobre la actividad de sustancias activas/biocidas contra priones. Preferentemente se realiza más de un ensayo, por ejemplo se llevan a cabo un estudio de destrucción en el tiempo y un estudio de degradación proteica para el tratamiento propuesto antes de proceder a evaluar el tratamiento propuesto sobre los propios priones.

Los ejemplos siguientes indican la eficacia del modelo de priones como modelo para los priones reales y sobre la eficacia de varios tratamientos priocidas propuestos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medios de Cultivo

Se preparó el siguiente medio de cultivo:

Agua destilada	1000 ml
Base agar o caldo Oxoid Mycoplasma TM	35,5 g
Tween 80	2 ml
Glóbulos rojos de caballo lavados y lisados	20 ml
Suero de caballo	1,4 ml
0,1 g/ml de pancreatina	20 ml
Acetato de talio al 2 %	7 ml

5 Cuando la proteína de ensayo se inocula en medio sembrado en placas de medio con base de caldo para micoplasma suplementado con la fórmula indicada anteriormente y se cultiva a 37 °C, los puntos inoculados dan colonias marrones pequeñas tras 48 horas en condiciones aeróbicas, microaerófilas y anaeróbicas. No se observó crecimiento a 4 °C.

Ejemplo 2: Composición de la proteína de ensayo

10 La proteína de ensayo se analizó y determinó que contenía aminoácidos, como se indica más adelante, y al menos dos péptidos.

Cuando se somete a ICP, se observó principalmente hierro (aunque se observaron niveles de fondo de calcio, posiblemente todos del medio).

Análisis de aminoácidos totales

15 Los cultivos del modelo de priones se cultivaron en caldo, se lavaron enérgicamente (en vórtex en solución salina 5 veces) y se secaron. Las muestras se sometieron a un análisis de aminoácidos totales. Las muestras se hidrolizaron durante 26 horas en HCl 6N a 110°C, se disolvieron en HCl 0,01N y se analizaron mediante cromatografía.

Los resultados mostraron la presencia de aminoácidos con los porcentajes siguientes:

ASP	8,30 %
THR	3,36 %
SER	9,08 %
GLU	7,38 %
PRO	5,24 %
GLY	10,96 %
ALA	7,11 %
VAL	5,97 %
ILE	2,41 %
LEU	12,14 %
TYR	1,61 %
PHE	3,60 %
LYS	5,84 %
HIS	11,26 %
ARG	5,70 %

20

Análisis de proteínas

La proteína del modelo de priones se solubilizó y el sobrenadante se pasó por geles de proteína. Se usó SDS-

PAGE para separar las proteínas. La presencia de una banda difusa de proteína se observó encima del frente del pigmento (<10kDa). Esta banda se transfirió a una membrana mediante transferencia Western y se sometió a CCF, Molecular Biology Core para análisis de la secuencia en N-terminal. La señal era leve pero indicaba dos secuencias peptídicas del siguiente modo:

5 K LL/D H/WQ S Q/L H K/MQ R F
I Q K H I L Q K/I M/L A L E

Ejemplo 3: Estudios de correlación

10 Para demostrar la eficacia de los ensayos de destrucción en el tiempo y establecer una correlación entre la respuesta de la proteína de ensayo con la de priones conocidos, la reducción log de la proteína de ensayo se determinó usando sustancias activas que se sabe que son eficaces contra los priones. La reducción log es la diferencia entre el log del número original de organismos presentes (en este caso, el número de proteínas de ensayo o, como alternativa, la concentración de la proteína de ensayo en la muestra) y el log del número restante. Se encontraron buenas correlaciones para dichas sustancias activas. A continuación se proporcionan ejemplos:

a) Estudios con ácido peracético

15 Se descubrió que formulaciones específicas de ácido peracético (STERIS 20™ obtenida de STERIS Corp., Mentor Ohio) propuestas anteriormente como agentes prionocidas eficaces eran eficaces contra el modelo de priones. STERIS 20™ es un esterilizador a base de ácido peracético que contiene tampones, tensioactivos, agentes quelantes y anticorrosivos. Los resultados de estos ensayos muestran que la temperatura de la formulación es un factor importante. Se descubrió que la temperatura y la concentración activa tienen un efecto sorprendente y
20 significativo sobre la inactivación de proteínas y de priones.

i) Estudios de degradación proteica

Los estudios de degradación proteica se llevaron a cabo exponiendo las muestras del modelo de priones a un esterilizador (tal como ácido peracético) y a diluciones control (p. ej., agua o solución salina tamponada con tris, TBS). Tras la exposición, el como ácido peracético se neutralizó inmediatamente con tiosulfato sódico (STS) y la
25 muestra se separa mediante electroforesis en gel. La electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es eficaz como medio separador de proteínas. Además, el análisis HLC ha demostrado que un componente principal del modelo es una estructura peptídica corta similar a la simple estructura de aminoácidos del colágeno. Las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa mediante el procedimiento de transferencia Western. La presencia de proteínas concretas, tales como el modelo de priones, se detectó mediante
30 inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales específicos de la proteína y se cuantificó mediante la intensidad porcentual de las proteínas inmunoteñidas. El ácido peracético, cuando se usa en las formulaciones concretas analizadas (STERIS 20™), redujo la cantidad de proteína total, creando péptidos más pequeños que se consideran inactivados para los fines del modelo de priones.

ii) Estudios de siembra en placas

35 La eficacia de las formulaciones de ácido peracético a diferentes temperaturas y concentraciones se estudió mediante análisis de suspensión usando el modelo de priones. Las formulaciones de ácido peracético se prepararon a 1000, 1500 y 2000 mg/l de ácido peracético y se mantuvieron a aproximadamente 50 °C. Un alícuota de la suspensión de proteína de ensayo se añadió directamente a cada formulación y las muestras se eliminaron y cuantificaron mediante dilución en suero y se sembraron en placas con agar para micoplasmas modificado.

40 Los experimentos de destrucción en el tiempo se llevaron a cabo para mostrar el efecto del tiempo y de la concentración de ácido peracético sobre el modelo de priones. Como ejemplo, se demostró que el efecto de la concentración de ácido peracético a 50 °C era significativo (**FIGURA 3**). Tras incubación a 37 °C durante 48 horas, las placas se contaron y se determinaron las reducciones log. La **FIGURA 3** muestra el efecto de la concentración de ácido peracético (en mg/ml) a 50 °C durante 12 minutos en la formulación STERIS 20™. A 2000 mg/litro se
45 observó una reducción log desde 9 log (concentración inicial) a 2 log tras 6 minutos.

Para estos ensayos el ácido peracético se combinó con el sistema tampón usado en la formulación STERIS 20™, siendo las únicas diferencias la cantidad de STERIS 20™ empleado.

Estos resultados son similares a una reducción comunicada de vCJD en las transferencias Western con la misma formulación de ácido peracético STERIS 20™ (Antloga, y col., Prion Diseases and Medical Devices, ASAIO J., S69-S72 (2000). Estos resultados se están confirmando *in vivo*.

50

b) Estudios de formulación fenólica

LpH™ es una formulación fenólica comercializada por STERIS Corporation, Mentor, OH. Anteriormente se ha descrito que la composición es eficaz contra la tembladera en un estudio *in vivo* (Ernst & Race, Comparative Analysis of Scrapie Agent Inactivation Methods, J. Virological Methods, 41, pág. 193-202 (1993)). Los autores describieron la pérdida de capacidad de infección de la tembladera sobre la concentración y el tiempo de exposición. Por ejemplo, a una concentración del 0,9 %, la capacidad de infección se eliminó, medida mediante reducción log, fue 5 log tras 0,5 horas y más de 7 log a las 16 horas. De un modo similar, al 9 % se observó una reducción mayor de 7 log a las 0,5 horas.

La actividad del producto LpH™ se analizó con las muestras de la proteína de ensayo a una concentración de LpH™ al 5 %. Los resultados indicaron una reducción de 5,2 log a 1 hora y una reducción de 5,8 log a las 3 horas. Además, se demostró que el producto era más eficaz que un producto LpHse™ similar. Las mismas diferencias entre LpH™ y LpHse™ que también ha demostrado Race para priones (resultados no publicados).

Ejemplo 4: Optimización del tratamiento con ácido peracético de las muestras con modelos de priones

El análisis usando degradación proteica como herramienta de detección selectiva ha demostrado que se prefiere una concentración de ácido peracético de aproximadamente 2.000 mg/l o superior para obtener eficacia contra la proteína de ensayo (FIGURA 3). Estos ensayos se llevaron a cabo usando STERIS 20™.

Se descubrió que el efecto de la temperatura sobre la formulación de la proteína de ensayo (estudiada a 1.000 mg/l de ácido peracético) era espectacular. Los resultados preliminares indican que la formulación de ácido peracético era muy eficaz en la degradación de proteínas en el intervalo de 50-57 °C a los tiempos analizados en este estudio. Se observó poca o ninguna degradación a temperaturas inferiores a 50 °C. A aproximadamente 60 °C o superior se observó una pérdida similar de actividad. Se ha descubierto que una temperatura de aproximadamente 55-57°C era particularmente eficaz.

Ejemplo 5: Investigaciones de CMI

Se estudiaron los efectos de diversas sustancias activas (muchas con informes previos de posibles efectos sobre priones) en ensayos de CMI (inhibición del crecimiento) sobre el modelo de priones.

Las siguientes sustancias activas mostraron al menos algún efecto sobre las características del crecimiento del modelo de priones (es decir, una reducción del crecimiento del modelo de priones):

nisina (~1000mg/l)

Klenzyme™(5%) (obtenida de STERIS Corp.)

Renuklenz™ (5%) (obtenida de STERIS Corp.)

NaOH (~0,01N)

HCl (~0,1N)

Ácido peracético (~600 mg/l)

Sulfato de neomicina (~125 mg/l)

LpH™ (obtenida de STERIS Corp., Mentor, OH) (1-5%)

LpHse™ (obtenida de STERIS Corp., Mentor, OH) (1-5%)

Manganeso (~100 mg/l)

Nitrato de plata (~30 mg/l)

Ejemplo 6: Ensayos de eliminación

Se evaluaron diversos agentes de limpieza. Se contaminó a los instrumentos con seroalbúmina bovina (proteína BSAa). Para hacer que la proteína fuera más difícil de eliminar se calentaron los instrumentos a 110 °C durante una hora para desnaturalizar la proteína. Después, los instrumentos se lavaron en una lavadora automática usando 1 oz./ gal de un agente de limpieza y a una temperatura de lavado alta (150 °C). Después del ciclo de lavado se llevó a cabo una exploración visual de la suciedad restante. Los agentes de limpieza evaluados se indican más adelante con el fin de disminuir la eficacia. Todos los productos de limpieza se obtuvieron de

STERIS Corp., Mentor, OH.

CIP 100™ (agente de limpieza a base de hidróxido sódico)- El más eficaz

CIP 150™ (agente de limpieza a base de hidróxido potásico)- Process Klenz™

Criti-Klenz™

5 Renu-Klenz™ (producto neutro)

CIP 220™ (agente de limpieza a base de ácido)

Agua- el menos eficaz

10 El orden de eficacia anterior también se sigue, en general, (con la excepción del agua) la alcalinidad del producto. El producto de limpieza más eficaz, CIP 100™, también tiene la alcalinidad más elevada. El menos eficaz CIP 220™, es ácido.

Se encontró el mismo orden de eficacia cuando se usó el modelo de priones en lugar de BSA.

Ejemplo 7: Ensayo de viabilidad con glóbulos rojos

15 Se encontró que el modelo de priones adsorbe/usa los componentes de hemoglobina o glóbulos rojos en el medio de cultivo. Se llevó a cabo un estudio del efecto del modelo de priones sobre los glóbulos rojos enteros. Los glóbulos rojos se lavaron en solución salina 3 veces y se resuspendieron a una concentración para contar las células en un Petroff Hauser a 40 aumentos (~100/campo). Los glóbulos rojos totales y el porcentaje de células que todavía estaban intactas (sin cambios en la morfología) se monitorizaron en el tiempo tras incubación con el modelo de priones (IFDO) o con agua (RBC) o pancreatinina (Panc-this, se había mostrado en los experimentos preliminares que lisaba los glóbulos rojos).

20 Los resultados, mostrados en las **FIGURAS 4y 5**, indican que el modelo de priones produjo daños celulares y lisis en el tiempo en comparación con los controles (RBC y Panc-this). Parece haber un retardo en el tiempo antes de que el modelo de priones lisara los glóbulos rojos.

Ejemplo 8: Experimentos de muertes en el tiempo

25 Experimentos preliminares de muertes en el tiempo se realizaron con el modelo de priones. Los resultados se expresan como números log (log 10), cuanto menor es el número log, menos priones quedan y, por tanto, más eficaz es el tratamiento.

Los experimentos de muertes en el tiempo se llevaron a cabo para demostrar el efecto del autoclave del modelo de priones a 121 °C en solución salina. El recuento de los priones descendió de 8,0 log inicialmente a 5,5 log tras 15 minutos.

30 Los estudios preliminares en un ciclo de drenaje por gravedad durante 1 hora a 134 °C mostraron que el tratamiento era eficaz.

Los experimentos de destrucción en el tiempo se llevaron a cabo para mostrar el efecto del óxido de etileno sobre los cupones tratados con el modelo de priones. Cupones expuestos a 600 mg/l durante 18 minutos.

	Recuento de priones en log
Recuento inicial	8,5
Exposición a 70 °C, HR del 100 %	5
Exposición a 54 °C, HR del 40%	4,7

35 Como con el ácido peracético se encontraron efectos similares de la temperatura, siendo el óxido de etileno más eficaz a 54 °C que a 70 °C.

40 Se evaluaron los desinfectantes /esterilizadores líquidos en los estudios de muerte en el tiempo para determinar su eficacia contra el modelo de priones. Todos los productos se obtuvieron en STERIS Corp. Las muestras del modelo de priones en suspensión líquida se inocularon directamente en cada producto. Los resultados se muestran a continuación.

Tratamiento	Tiempo de exposición (h)	Nº Log del modelo de priones
Recuento inicial	0	~6,6
10% CIP220 TM	1	>3,0
10% CIP220 TM	3	>3,0
LpH TM	1	1,4
LpH TM	3	0,8

Ejemplo 9: Investigación de la contaminación intrínseca

Se realizó detección selectiva de los productos sanguíneos para detectar contaminación con priones. Se encontraron los siguientes niveles de contaminación:

- 5 Sangre de caballo (1 lote) contaminada
- Suero de caballo (1 lote) contaminado
- Suero bovino (3 lotes) un lote contaminado
- Sangre de carnero (2 lotes), ninguno contaminado

10 Los resultados indican que la contaminación de productos sanguíneos es común y, por tanto, todos los productos sanguíneos que se van a usar en trabajos relacionados con priones deberán someterse a detección selectiva de priones antes de usar.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de evaluación de posibles tratamientos para determinar su actividad contra priones o enfermedades relacionadas con priones, que **se caracteriza por:**
 - 5 someter un modelo de priones a un tratamiento, aplicándose el modelo de priones a un sustrato, en el que el modelo de priones comprende un organismo dependiente de fluido ileal (IFDO) que se ha demostrado que exhibe una respuesta similar a la de los priones a un tratamiento diseñado para atacar priones, en el que el tratamiento incluye: limpiar el sustrato con una composición de limpieza alcalina que tiene una concentración de álcali de 0,02 a 0,1M y que elimina las proteínas, y poner en contacto el sustrato limpiado con un agente oxidante que contiene ácido peracético; y evaluar el efecto del tratamiento sobre el modelo de priones como
 - 10 indicador del efecto del tratamiento sobre el prión o la enfermedad relacionada con priones.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que además **se caracteriza porque:**
 - el tratamiento incluye tratar el modelo de priones con una solución de ácido peracético a una temperatura de 50-58 °C.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, que además **se caracteriza porque:**
 - 15 el modelo de priones contenido en un vaso incluye orificios a través de los cuales el descontaminante tiene acceso al vaso y un camino por el cual el descontaminante contacta con el modelo de priones.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además **se caracteriza porque:**
 - el tratamiento incluye someter al modelo de priones a un procedimiento conocido porque es eficaz en la destrucción de microorganismos.
- 20 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además **se caracteriza porque:**
 - el tratamiento incluye tratar un dispositivo médico o farmacéutico que se ha contaminado con el modelo de priones con una composición que incluye al menos uno de nisina, manganeso y nitrato de plata.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además **se caracteriza porque:**
 - la etapa de evaluación incluye:
 - 25 cultivar el modelo de priones restante en un medio de cultivo; y
 - detectar el crecimiento del modelo de priones.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa de evaluación incluye:
 - cultivar el modelo de priones restante en un medio que contiene hemoglobina, y
 - observar un cambio de color del medio como indicación de la cantidad del modelo de priones restante.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que la etapa de detectar incluye someter el modelo de priones cultivado a un procedimiento que detecta proteínas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la etapa de detección incluye detectar fragmentos de proteínas.

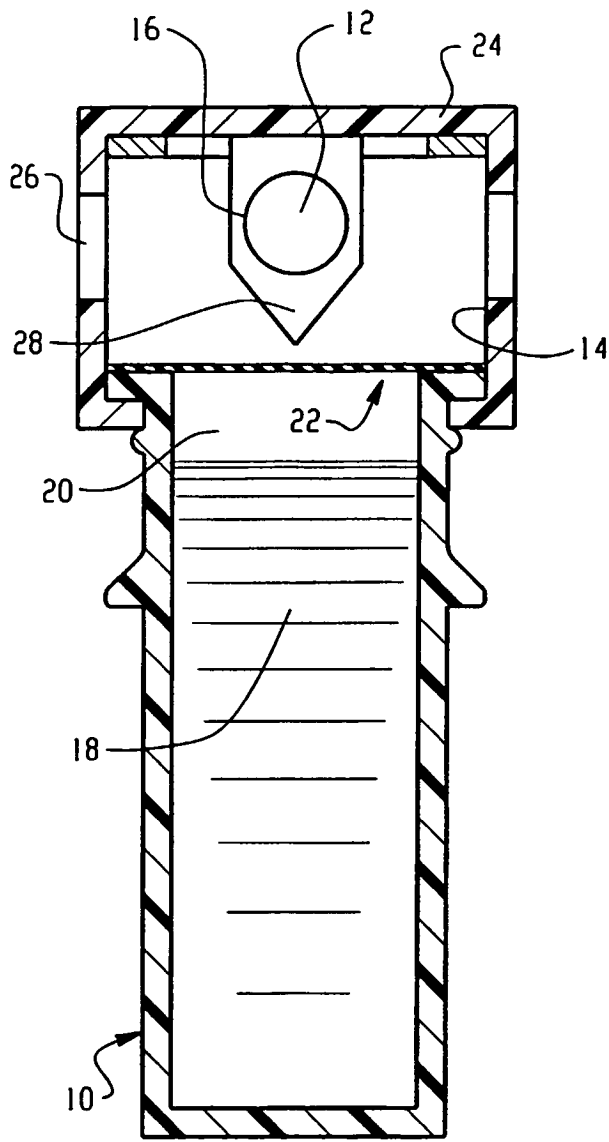


Fig. 1

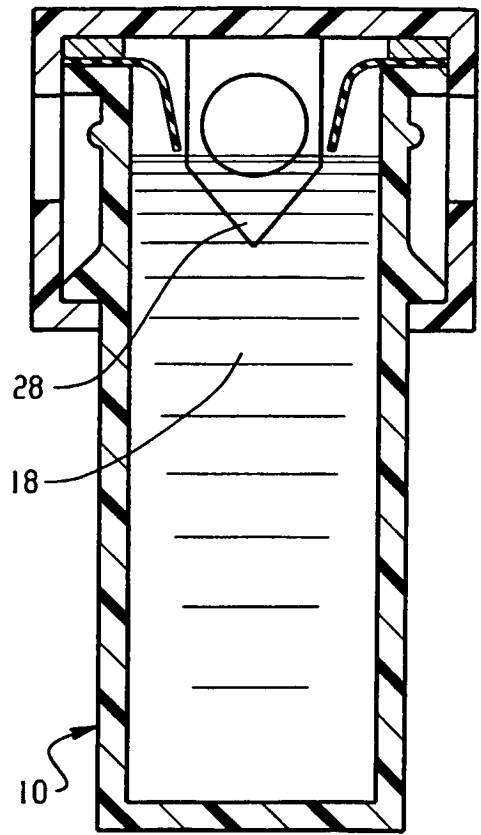


Fig. 2

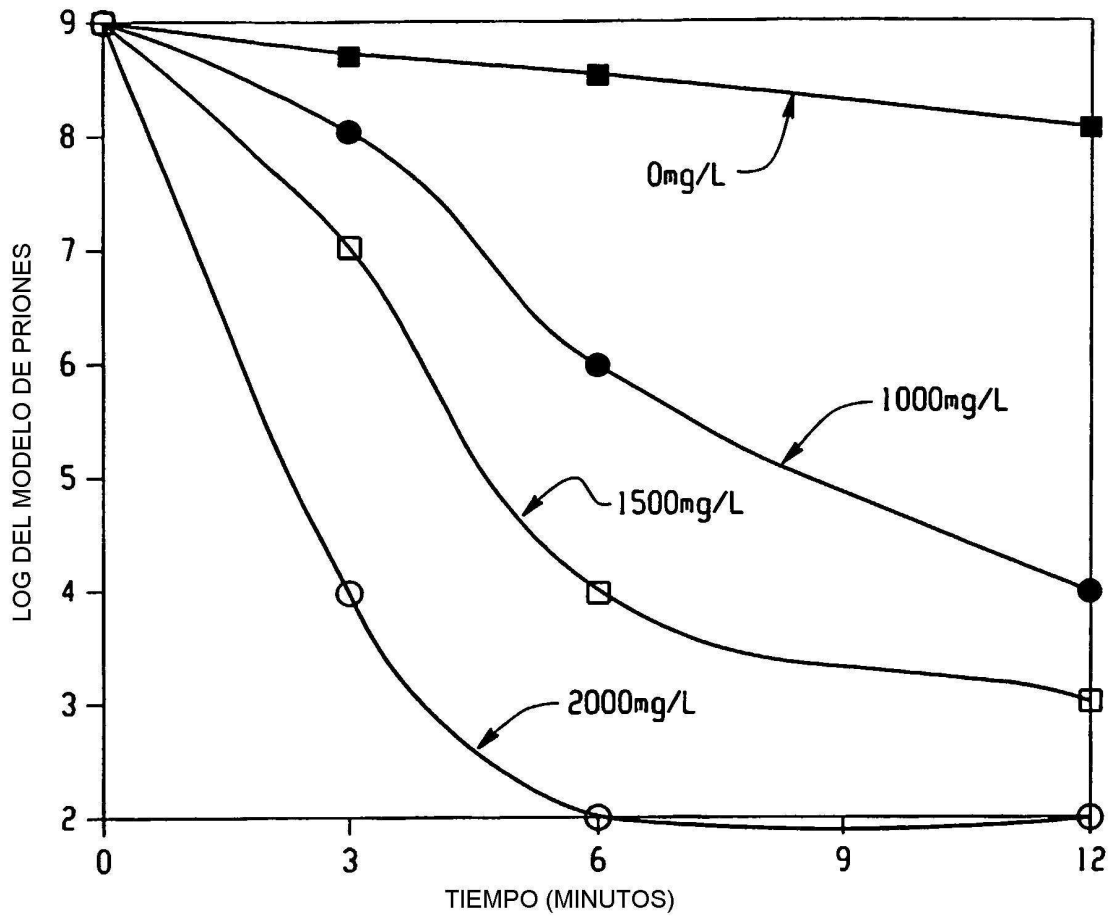


Fig. 3

