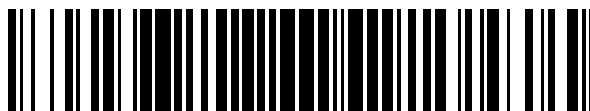


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 778**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06840890 .5**

96 Fecha de presentación: **21.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1968652**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Procedimiento para la irradiación de concentrados de trombocitos en recipientes flexibles con luz ultravioleta**

30 Prioridad:
23.12.2005 DE 102005062410

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT DER DRK
BLUTSPENDEDIENSTE E.V. (50.0%)
SANDHOFSTRASSE 1
60528 FRANKFURT, DE y
MACO PHARMA S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:
**MOHR, HARALD y
WALKER, WOLFRAM H.**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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).

ES 2 389 778 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la irradiación de concentrados de trombocitos en recipientes flexibles con luz ultravioleta

El objeto de la invención es un procedimiento para la inactivación de patógenos, tales como bacterias y virus, y/o de leucocitos en concentrados de trombocitos (TK) mediante irradiación con luz ultravioleta.

5 El documento US 4.952.812 enseña irradiar concentrados de trombocitos contaminados con leucocitos con longitudes de onda de desde 280 hasta 320 nm. Los glóbulos blancos de la sangre pierden en este caso esencialmente su capacidad para provocar una reacción inmunitaria. Para ello se sujetan y se irradian en un aparato bolsas flexibles planas con los concentrados de trombocitos, para formar grosores de capa uniformes.

10 El documento WO 20051089816 A1 da a conocer un procedimiento y un dispositivo para el tratamiento de líquidos biológicos en recipientes o aparatos de flujo que contiene sustancias fotoactivas con radiación electromagnética para reducir los patógenos. No se enseñan longitudes de onda inferiores a 280 nm, ni bolsas de sangre llenas ligeramente.

15 Se conoce que la aplicación terapéutica de preparaciones sanguíneas conlleva el riesgo de que los receptores de la preparación sanguínea se infecten con virus y bacterias. Se mencionan por ejemplo los virus de la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC) así como los agentes patógenos del SIDA VIH-1 y VIH-2. Siempre existe riesgo cuando durante la producción de la preparación no se aplica ninguna etapa para la inactivación o eliminación de dichos patógenos.

20 La luz ultravioleta (UV) se diferencia según la longitud de onda. En el sentido de esta solicitud se realiza la siguiente definición: UVA: de menos de 400 a 320 nm, UVB: de menos de 320 a 280 nm y UVC de menos de 280 a 200 nm. Se conoce que mediante irradiación con luz ultravioleta (UV) de onda corta, es decir en la banda de ondas por debajo de aproximadamente 320 nm (UVB y UVC), pueden inactivarse tanto virus como bacterias, por ejemplo en el plasma sanguíneo o en preparaciones sanguíneas celulares. Por encima de 320 nm la energía de la radiación es demasiado reducida como para inactivar microorganismos y virus. Con respecto a los métodos químicos, fotoquímicos y fotodinámicos para la inactivación de patógenos, la mera irradiación con luz UV tiene básicamente la
25 ventaja de ser eficaz por sí sola y no requerir la adición de productos químicos reactivos o sustancias fotoactivas.

30 Los aditivos de este tipo o sus productos de descomposición o fotoproductos requieren a menudo una eliminación posterior, puesto que son tóxicos o mutagénicos. Además pueden provocar en la preparación tratada la aparición de estructuras neoantigénicas, cuando se unen a proteínas plasmáticas y superficies celulares. Por regla general los aditivos de este tipo no pueden eliminarse completamente, al menos su eliminación requiere un esfuerzo adicional. Las etapas de trabajo adicionales de este tipo pueden perjudicar además la calidad de las preparaciones esterilizadas. La más eficaz para la inactivación de patógenos directa es la UVC. Sin embargo tiene la desventaja de que sólo penetra en disoluciones que contienen proteínas, tales como plasma sanguíneo o suspensiones turbias (por ejemplo TK) hasta una profundidad de penetración muy reducida.

35 La UVC se utilizó durante la Segunda Guerra Mundial y aún poco después para esterilizar plasma sanguíneo y disoluciones de albúmina, sobre todo para inactivar los virus de la hepatitis. Por aquel entonces se conducía la disolución por un aparato de flujo como una película delgada pasando por una fuente de luz UVC. El método demostró no ser suficientemente seguro y se abandonó (Kallenbach NR, Cornelius PA, Negus D, *et al.* Inactivation of viruses by ultraviolet light. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1989, 56,70-82).

40 Hoy en día se utilizan procedimientos que funcionan según el mismo principio desarrollados adicionalmente, para esterilizar preparaciones de proteínas plasmáticas terapéuticas. En todos los casos se pretendía o se pretende tratar volúmenes más grandes, es decir mezclas de plasmas o disoluciones de proteínas de hasta algunos cientos de litros e incluso más (Hart H, Reid K, Hart W. Inactivation of viruses during ultraviolet light treatment of human intravenous immunoglobulin and albumin. *Vox Sang* 1993;64(2):82-8. y Chin S, Williams B, Gottlieb P, *et al.* Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants; *Blood* 1995;86(11):4331-6).

45 Para esterilizar una pluralidad de unidades individuales de TK, que se obtienen a partir de donaciones de sangre o mediante aféresis mecánica, con un volumen de en todo caso hasta algunos cientos de ml, dichos aparatos de flujo no son adecuados. Pero precisamente esto es lo que se necesita en la práctica diaria en un banco de sangre.

50 La UVB es igualmente microbicida y virucida, aunque no en la misma medida que la UVC. Penetra algo mejor en disoluciones que contienen proteínas y suspensiones turbias que la UVC, pero sin embargo su profundidad de penetración, por ejemplo en plasma o TK, también se establece sólo en el intervalo de pocos milímetros. Se sometió a prueba la irradiación con UVB, para inactivar en TK linfocitos T, que son considerablemente más sensibles a UV que los virus o bacterias. Con esto pretendía evitarse una aloinmunización frente a antígenos de HLA extraños para

el organismo en los receptores de las preparaciones, lo que puede provocar que los receptores se vuelvan resistentes a transfusiones adicionales de TK (Andreu G, Boccaccio C, Lecrubier C, *et al.* Ultraviolet irradiation of platelet concentrates: feasibility in transfusion practice. *Transfusion* 1990;30 (5):401-6 y Pamphilon DH. The rationale and use of platelet concentrates irradiated with ultraviolet-B light. *Transfus Med Rev* 1999;13(4):323-33).

5 Sin embargo, el método no se impuso porque la filtración de leucocitos desarrollada casi al mismo tiempo representa una alternativa con una eficacia similar pero más favorable desde el punto de vista del esfuerzo económico y de trabajo (Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337(26):1861-9).

10 Igualmente se describió que los virus en suspensiones de trombocitos pueden inactivarse mediante la irradiación con luz UVB monocromática (longitud de onda 308 nm). A este respecto se utilizó un láser Excimer; el volumen de muestra ascendió a algunos ml (Prodouz KN, Fratantoni JC, Boone EJ, Bonner RF. Use of laser-UV for inactivation of virus in blood products. *Blood* 1987;70(2):589-92). Aparentemente no pudo superarse esta escala. Verdaderamente no se conoce ningún procedimiento de la bibliografía, con el que puedan descontaminarse virus o bacterias en TK completos de manera exclusiva mediante la irradiación con luz UV (es decir UVB o UVC).

15 Los TK se obtienen mediante tromboaféresis mecánica de donantes individuales o también a partir de donaciones de sangre, mezclándose los trombocitos de varias donaciones de sangre (en general de 4-6). El volumen de los TK que pueden obtenerse según esto se encuentra en general entre aproximadamente 200 y 350 ml. Pero también se preparan TK a partir de donaciones de sangre individuales, cuyo volumen es correspondientemente menor (entre aproximadamente 40 y 80 ml). Tanto en los TK mezclados como en los de aféresis los trombocitos están suspendidos o bien en plasma sanguíneo o en medios de almacenamiento especiales con un contenido en plasma residual de desde aproximadamente el 30 hasta el 40%. Los TK se almacenan en bolsas de plástico permeables al gas planas a 20-24°C.

25 Sería deseable esterilizar los TK en bolsas de este tipo con luz UV. Sin embargo existe a este respecto el problema mencionado de que las preparaciones son casi impermeables a la luz UV. Esto pretende ilustrarse mediante el siguiente ejemplo de cálculo: si se prevé UVB para la esterilización y se supone un volumen de TK de aproximadamente 300 ml, además de una profundidad de penetración de la radiación UVB de 1 mm así como la exposición de ambos lados de la bolsa, una bolsa de exposición adecuada debería tener una superficie de al menos 1500 cm².

30 En el caso de los patógenos se trata en particular de virus y/o bacterias.

Las bolsas de exposición pueden agitarse con un agitador orbital, agitador de plataforma, agitador de basculación o agitador oscilante y se mueven preferiblemente durante al menos tres cuartas partes de toda la duración de la exposición.

35 Las bolsas de exposición tienen normalmente un volumen de hasta 5000 ml. Cuando las bolsas de exposición se colocan sobre un lado, durante y debido al movimiento o la agitación, varía la altura de la bolsa de exposición constantemente por toda la superficie superior de la bolsa de exposición, que está en contacto con el contenido de la bolsa, con respecto a la distancia a lo largo de la normal de la superficie entre la superficie, sobre la que se apoya la bolsa de exposición, y el punto de corte con la superficie superior de la bolsa de exposición.

40 Parece difícil, si no imposible, procesar de manera rutinaria mayores números de bolsas dimensionadas de esta manera. El problema es aún mayor cuando en vez de con UVB se quiere esterilizar los TK con UVC, puesto que su profundidad de penetración es mucho más reducida.

Sorprendentemente se encontró que el problema anterior se soluciona mediante un procedimiento según la reivindicación 1. Formas de realización preferidas son objeto de las reivindicaciones dependientes o se exponen a continuación.

45 Según la presente invención los TK se mueven en sus bolsas de exposición de manera adecuada. El movimiento tiene lugar a este respecto de manera tan intensa, que dentro de los TK se forman capas por regiones, que son tan delgadas que podrían atravesarse por la radiación UV. El movimiento debe ser al mismo tiempo de tal manera que las suspensiones de TK se mezclen en las bolsas de manera eficaz. Ambas cosas pueden realizarse si se cumplen las siguientes condiciones previas:

50 1. Las bolsas de exposición son muy flexibles y no se fijan durante la exposición, por ejemplo se sujetan entre placas de cuarzo. Por consiguiente se adaptan a cualquier variación de forma de la suspensión de TK, que se produce cuando se mueven las bolsas.

2. El movimiento de las bolsas tiene lugar o bien en horizontal (de manera lineal en vaivén o en forma circular o elíptica) o bien en vertical (se bascula).

3. Las bolsas de exposición están llenas hasta como máximo el 30%, en particular hasta como máximo el 20% de su volumen de llenado máximo.

5 En cualquier caso, la inversión del sentido de movimiento debe ser tan abrupta que la mayor parte de la suspensión de TK siga moviéndose como consecuencia de su inercia en el sentido original y por tanto el resto que queda pueda formar una capa delgada, que puede atravesarse por la radiación UV. En relación con el mezclado constante como consecuencia del movimiento de las bolsas durante la exposición, todo el TK (y los virus y/o bacterias contenidos en el mismo) se exponen a radiación UV. Por tanto se esterilizan los TK.

10 Las bolsas de exposición están fabricadas de material de plástico transparente a UV. Plásticos adecuados son por ejemplo acetato de etilenvinilo y poliolefinas con grosores de lámina de 1 mm y menos, en particular grosores de lámina inferiores a 0,5 mm. Las bolsas de exposición están configuradas de manera plana y preferiblemente no presentan ningún máximo de absorción en el intervalo de desde 200 hasta 320 nm. Las bolsas de exposición tienen en el estado lleno tumbado sólo unos pocos mm de grosor, por ejemplo menos de 10 mm y en particular 5 mm,
15 preferiblemente incluso menos de 3 mm y están destinadas a alojar volúmenes de muestra de por ejemplo hasta 200 o hasta 300 ml. Sin embargo, la capacidad máxima (volumen) de la bolsa de exposición es al menos 3 veces, por regla general al menos 5 veces mayor, preferiblemente al menos 10 o incluso al menos 20 veces mayor que el volumen de muestra que debe tratarse contenido realmente en la misma.

Estudios experimentales

20 Los ensayos descritos ilustran la eficacia del procedimiento y no se limitan a la inactivación de las bacterias y/o los virus mencionados a continuación. Tampoco existe ninguna limitación a TK de "donantes aleatorios", que se usaron en los ensayos descritos, y el procedimiento según la invención también puede aplicarse a preparaciones de tromboaféresis. Todos los ensayos se realizaron de tres a seis veces. Los resultados indicados representan en cada caso los valores medios \pm desviación estándar.

25 Concentrados de trombocitos

Los TK se produjeron a partir de mezclas de en cada caso 5 capas leucocíticas, que a su vez procedían de donaciones de sangre regulares. Los TK tenían un volumen de desde aproximadamente 300 hasta 350 ml; la concentración de trombocitos ascendía a aproximadamente 10^9 /ml. Los trombocitos estaban suspendidos en el medio de almacenamiento SSP+ (producto de la empresa MacoPharma). El contenido en plasma residual ascendía
30 a aproximadamente del 30 al 40%.

Estudios bacteriológicos

En los ensayos de inactivación se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

Staphylococcus (S.) epidermis

Staphylococcus (S.) aureus

35 Bacillus (B.) cereus

Klebsiella (K.) pneumoniae.

Las concentraciones bacterianas se determinaron por medio de un ensayo de formación de colonia y se expresan como unidades formadoras de colonia (UFC)/ml. En los ensayos para la inactivación de bacterias se añadieron de manera conocida TK completos o alícuotas de TK con de 10^4 a 10^5 UFC/ml de una de las especies indicadas y luego
40 se irradiaron con luz UV.

Estudios virológicos

A alícuotas de TK se les añadió de manera conocida virus del herpes porcino (VHS-1, virus de la pseudorrabia, cepa Aujeszky) o virus de la estomatitis vesicular (VEV, cepa Indiana). Se determinaron los títulos virales por medio de un ensayo de CPE (CPE = efecto citopático). Se indican como TCID₅₀ (TCID = *Tissue culture infective dose*, dosis
45 infecciosa en cultivo de tejidos). Como células indicadoras sirvieron células Vero. La concentración de virus inicial en los ensayos realizados ascendía a de aproximadamente 10^5 a 10^7 TCID₅₀.

Instalaciones de exposición

5 Una de las dos instalaciones de exposición usadas estaba equipada con lámparas, que emitían la luz UVB. La irradiación tenía lugar desde ambos lados de las bolsas de exposición colocadas, es decir desde arriba y desde abajo. La instalación de exposición estaba dotada de un dispositivo de agitación, que realizaba movimientos de vaivén horizontales con una frecuencia de 60 cambios de sentido/min. Una segunda instalación de exposición estaba equipada igualmente con lámparas, que emitían luz UVB. La irradiación tenía lugar igualmente desde ambos lados. Una tercera instalación (del mismo tipo constructivo que la segunda) estaba dotada de lámparas, que emitían luz UVC (longitud de onda: 254 nm). Ambas instalaciones pudieron dotarse de 2 dispositivos de agitación diferentes: un agitador horizontal, que realizaba movimientos de vaivén elípticos, y un agitador de basculación.

10 Bolsas de exposición

Las bolsas de exposición usadas estaban compuestas por acetato de etilvinilo (EVA), que es permeable a UV. Se usaron dos tamaños de bolsa:

1. 14,5 x 18,5 cm (superficie de bolsa exterior de aproximadamente 268 cm²)

2. 22,5 x 38 cm (superficie de bolsa exterior de aproximadamente 855 cm²).

15 En los ensayos con las bolsas de EVA pequeñas el volumen de muestra ascendía a 80 ml, en aquéllos con las bolsas grandes a aproximadamente 300-350 ml (se trataron TK completos).

Ejemplo de ensayo 1:

Inactivación de *S. epidermidis* mediante UVB, con y sin movimiento libre de la suspensión de trombocitos durante la agitación

20 En el ensayo, el volumen de muestra ascendía a 80 ml. Se evitó la capacidad de movimiento libre de la suspensión de trombocitos durante la agitación y por tanto la formación de una capa delgada en una muestra sujetando las bolsas de exposición de manera firme entre dos placas de cuarzo. El grosor de capa resultante ascendía a aproximadamente 3 mm. En la segunda muestra se aumentó la separación entre las placas de cuarzo de tal manera que la suspensión de trombocitos podía moverse libremente en su mayor parte durante la agitación.

25 Ambas muestras se irradiaron con 1 J/cm².

Como muestra la tabla 1, el título bacteriano en las muestras fijas se redujo aproximadamente 2 log₁₀, por el contrario en las ubicadas de manera suelta más de 4 log₁₀.

Tabla 1

Denominación de la muestra	Título bacteriano (log ₁₀ UFC/ml)
Control sin tratar	4,1 ± 0,03
Muestra sujetada de manera firme	1,4 ± 1,29
Muestra ubicada de manera suelta	-0,40 + 0,35

Ejemplo de ensayo 2:

30 Inactivación de *S. epidermidis* mediante UVB en TK completos, bolsas de exposición sujetadas de manera firme o suelta, con agitación

El volumen de TK en este ensayo ascendía a 330 ml, el grosor de capa promedio en bolsas de EVA grandes por consiguiente a aproximadamente 3,9 mm. Los TK se irradiaron en las siguientes condiciones con 3 dosis de UVB (0,8, 1,0 y 1,2 J/cm²):

- 35
1. sin agitación, ubicados de manera suelta entre placas de cuarzo
 2. con agitación, comprimidos entre placas de cuarzo.

Como muestran los resultados del ensayo (tabla 2), en los TK, que estaban sujetos de manera firme durante la

agitación, se redujo mediante el tratamiento con UVB el título bacteriano aproximadamente hasta $2 \log_{10}$, por el contrario en las muestras ubicadas de manera suelta en función de la dosis de aproximadamente 3,4 hasta más de $4 \log_{10}$.

Tabla 2

Ubicación de la muestra	Dosis de UVB (J/cm^2)	Título bacteriano ($\log_{10}UFC/ml$)
Con agitación, sujeta de manera firme	0	$4,11 \pm 0,00$
Con agitación, sujeta de manera firme	0,8	$2,14 \pm 0,48$
Con agitación, sujeta de manera firme	1,0	$1,95 \pm 0,03$
Con agitación, sujeta de manera firme	1,2	$1,99 \pm 0,03$
Con agitación, suelta	0	$4,19 \pm 0,11$
Con agitación, suelta	0,8	$0,77 \pm 0,69$
Con agitación, suelta	1,0	$-0,14 \pm 0,05$
Con agitación, suelta	1,2	$-0,40 \pm 0,05$

5 **Ejemplo de ensayo 3:**

Inactivación de otras bacterias en alícuotas de TK móviles libremente o fijas mediante UVB

A partir de los dos primeros ejemplos de ensayo se deduce que *S. epidermidis* se inactiva de manera eficaz en TK con la condición de que la suspensión de TK pueda moverse libremente durante la irradiación de UV. En el siguiente ensayo se sometieron a prueba las siguientes cepas bacterianas adicionales: *S. aureus*, *B. cereus* y *K. pneumoniae*.

- 10 Las condiciones eran las mismas que las descritas en el ejemplo de ensayo 1. En los tres casos se obtuvo un resultado similar a con *S. epidermidis*: en las muestras de TK ubicadas de manera suelta se inactivaron las bacterias de aproximadamente $3,9$ a $4,25 \log_{10}$, mientras que los títulos en las muestras fijas sólo se redujeron de aproximadamente 2 a $3,4 \log_{10}$ (tabla 3).

Tabla 3

Cepa bacteriana	Denominación de la muestra	Título bacteriano ($\log_{10}UFC/ml$)
<i>S. aureus</i>	control sin tratar	$4,88 \pm 0,00$
<i>S. aureus</i>	sujeta de manera firme, con agitación	$1,49 \pm 1,30$
<i>S. aureus</i>	ubicada de manera suelta, con agitación	$0,97 \pm 0,86$
<i>B. cereus</i>	control sin tratar	$4,99 \pm 0,09$
<i>B. cereus</i>	sujeta de manera firme, con agitación	$2,99 \pm 0,13$
<i>B. cereus</i>	ubicada de manera suelta, con agitación	$0,74 \pm 0,68$
<i>K. pneumoniae</i>	control sin tratar	$4,94 \pm 0,08$
<i>K. pneumoniae</i>	sujeta de manera firme, con agitación	$2,34 \pm 0,24$
<i>K. pneumoniae</i>	ubicada de manera suelta, con agitación	$1,00 \pm 0,89$

Ejemplo de ensayo 4:

Inactivación de *S. epidermidis* en alícuotas de TK mediante UVB en diferentes condiciones de agitación

5 Se estudió si la inactivación de *S. epidermidis* en alícuotas de TK ubicadas de manera suelta también aumenta si se utilizan otros agitadores distintos al agitador horizontal usado en los ensayos 1 a 3, que tal como se mencionó realiza movimientos de vaivén. En los siguientes ensayos se utilizó un agitador orbital, que realizaba un movimiento circular (radio: 3 cm, número de revoluciones: 50/min.), además un dispositivo de basculación con 50 movimientos ascendentes y descendentes por minuto. De nuevo una de las dos muestras (80 ml) estaba sujeta de manera firme entre placas de cuarzo, la otra estaba ubicada de manera suelta. Como se deduce de los resultados mostrados en la tabla 4, en este caso el grado de inactivación bacteriana en las muestras de TK ubicadas de manera suelta era de 3 a 4 \log_{10} mayores que las sujetas de manera firme.

Tabla 4

Agitador	Denominación de la muestra	Título bacteriano (\log_{10} UFC/ml)
---	control sin tratar	4,94 \pm 0,16
Orbital	sujetada de manera firme	4,23 \pm 0,00
Orbital	ubicada de manera suelta	0,50 \pm 0,39
De basculación	sujetada de manera firme	4,02 \pm 0,17
De basculación	ubicada de manera suelta	0,87 \pm 0,78

Ejemplo de ensayo 5:

Inactivación de virus del herpes porcino mediante UVB, sin o con movimiento libre de las alícuotas de TK durante la agitación

15 Para comprobar si el aumento de la inactivación de patógenos en TK, que no se fijan durante la irradiación con luz UV, afecta no sólo a bacterias, sino también a virus, se realizó el siguiente ensayo: a alícuotas de TK de 80 ml se les añadieron de manera conocida virus del herpes porcino (VHS-1) y tal como se describe en el ejemplo de ensayo 1, se trataron con UVB. En las muestras ubicadas de manera libre se redujo el título viral casi 4 \log_{10} , en las sujetadas de manera firme por el contrario sólo 3 \log_{10} . Esto confirma que en las condiciones mencionadas también se mejora claramente la inactivación de virus.

Tabla 5

Denominación de la muestra	Título viral (\log_{10} TCID ₅₀)
Control sin tratar	4,4 \pm 0,2
Muestra sujetada de manera firme	1,41 \pm 0,18
Muestra ubicada de manera suelta	0,56 \pm 0,15

Ejemplo de ensayo 6:

Inactivación de virus de la estomatitis vesicular mediante UVB, sin o con movimiento libre de las alícuotas de TK durante la agitación

25 La realización tuvo lugar como se describió en el ejemplo de ensayo 5, sólo que a las alícuotas de TK se les añadió de manera conocida en lugar de VHS-1, VEV. De nuevo el grado de inactivación viral en las muestras ubicadas de manera suelta era más de 6,46 \log_{10} más intensa que en las muestras comparativas, que durante la exposición estaban fijadas entre placas de cuarzo (tabla 6). Sin embargo llama la atención que también en éstas el título viral se redujo de manera relativamente intensa (aproximadamente 5,4 \log_{10}). Aparentemente VEV es más sensible a UV que VHS-1.

Tabla 6

Denominación de la muestra	Título viral ($\log_{10}\text{TCID}_{50}$)
Control sin tratar	$6,7 \pm 1,05$
Muestra sujeta de manera firme	$1,29 \pm 1,05$
Muestra ubicada de manera suelta	$\leq 0,24 \pm 0,00$

Ejemplo de ensayo 7:

Inactivación de *S. epidermidis* mediante UVC, sin o con movimiento libre de las alícuotas de TK durante la agitación

5 En este ensayo tuvo lugar la irradiación con UVC en lugar de UVB. La dosis de UV ascendía a $0,3 \text{ J/cm}^2$ (tiempo de exposición: 60 s). Por lo demás las condiciones eran como las descritas en el ejemplo de ensayo 1. Como se deduce de la tabla 7, el título bacteriano en las muestras fijas se redujo sólo aproximadamente $1 \log_{10}$. Esto refleja aparentemente la profundidad de penetración reducida de UVC en la suspensión de trombocitos. En las muestras ubicadas de manera suelta ya no podían detectarse por el contrario bacterias; el factor de inactivación era de más de $4 \log_{10}$.

10

Tabla 7

Denominación de la muestra	Título bacteriano ($\log_{10}\text{UFC/ml}$)
Control sin tratar	$4,08 \pm 0,04$
Muestra sujeta de manera firme	$2,99 \pm 0,13$
Muestra ubicada de manera suelta	$\leq 0,24$

Ejemplo de ensayo 8:

Inactivación de VEV mediante UVC, sin o con movimiento libre de las alícuotas de TK durante la agitación

15 Como en el ejemplo de ensayo 6 se utilizó como virus de prueba VEV. Las condiciones eran las mismas que en el ejemplo de ensayo 7. Los resultados mostrados en la tabla 8 muestran que también en este caso el grado de inactivación de patógenos en las muestras ubicadas de manera suelta es mucho más marcado que en las fijas: mientras el título viral en éstas se redujo sólo aproximadamente $1,5 \log_{10}$, en las muestras no fijas era de aproximadamente $6,2 \log_{10}$.

Tabla 8

Denominación de la muestra	Título viral ($\log_{10}\text{TCID}_{50}$)
Control sin tratar	$6,92 \pm 0,22$
Muestra sujeta de manera firme	$5,47 \pm 0,21$
Muestra ubicada de manera suelta	$0,74 \pm 0,76$

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inactivación de patógenos y/o leucocitos en concentrados de trombocitos que comprende las etapas de:
- 5 - proporcionar concentrados de trombocitos obtenidos a partir de sangre de donante y/o mediante aféresis mecánica que se encuentran en cada caso en bolsas de exposición planas permeables a UV flexibles, que están compuestos por una pluralidad de unidades que pueden manipularse individualmente y almacenadas por separado (TK),
- someter los TK a una irradiación con luz ultravioleta (UV), caracterizado porque
- las bolsas de exposición se llenan hasta menos del 30% del volumen de llenado máximo de las bolsas de exposición y
- 10 - las bolsas de exposición se mueven durante la irradiación con luz UV, de modo que el contenido de la bolsa de exposición se hace circular y debido al movimiento se forman zonas de grosor de capa variable, comprendiendo la luz UV utilizada radiación UVC de desde menos de 280 nm hasta 200 nm.
2. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición, debido al movimiento, presentan zonas de regiones irradiadas, para las que resultan regularmente de manera temporal grosores de capa inferiores a 1 mm, moviéndose las bolsas de exposición mediante agitación, basculación o mediante rotación.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el movimiento, en particular la amplitud del movimiento, tiene lugar de modo que dentro de los TK se forman regiones irradiadas, en las que los grosores de capa son regularmente de manera temporal inferiores a 0,5 mm, moviéndose las bolsas de exposición mediante agitación, basculación o mediante rotación.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición presentan un lado inferior y un lado superior, y la suma de las superficies del lado inferior y del lado superior, que puede o pueden estar en contacto con el contenido de la bolsa, asciende a más del 90 por ciento en superficie, preferiblemente a más del 99 por ciento en superficie, de la superficie total interna del contenido de la bolsa.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la irradiación comprende además radiación UVB de desde menos de 320 nm hasta 280 nm y preferiblemente está compuesta de manera exclusiva por irradiación con longitudes de onda de desde menos de 280 nm hasta 200 nm y menos de 320 nm a 280 nm.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cada unidad se prepara a partir de muestras de hasta como máximo 8 donantes, preferiblemente de hasta como máximo 6 donantes y en particular cada unidad procede de un donante.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el TK contiene al menos 1×10^8 trombocitos por ml, preferiblemente al menos 5×10^8 trombocitos por ml.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la irradiación con UVB tiene lugar con una energía lumínica de desde 0,3 hasta 5 J/cm², preferiblemente de 0,5 a 2,5 J/cm².
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la irradiación con UVC tiene lugar con una energía lumínica de desde 0,01 hasta 2 J/cm², preferiblemente de 0,1 a 1 J/cm².
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los TK
- 40 (a) contienen plasma y un medio de almacenamiento adecuado, ascendiendo el contenido en plasma preferiblemente a más del 20% en peso y/o
- (b) contienen un medio de almacenamiento acuoso tamponado.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los TK están libres de sustancias fotoactivas.
- 45 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición se sostienen de manera móvil en un aparato, en el que se mueven y se irradian las bolsas de exposición, y en particular

no se sujetan entre dos superficies, por ejemplo placas de vidrio o plástico permeables a UV.

5 13. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición presentan una altura de llenado media de menos de 10 mm, preferiblemente menos de 5 mm, y, debido al movimiento, se generan constantemente valles de onda, que tienen grosores de capa de menos de la mitad de la altura de llenado media, preferiblemente grosores de capa de menos de 1 mm o incluso menos de 0,1 mm.

10 14. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición se mueven durante la irradiación constantemente con una amplitud de desde 0,2 hasta 8 cm al menos en la dirección x y dado el caso también en la dirección γ (dirección γ perpendicular a la dirección x) e independientemente de ello la frecuencia de la variación de la dirección del movimiento de agitación asciende a de 0,5 a 10 Hz.

15. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bolsas de exposición están llenas durante la irradiación hasta como máximo el 20% de su volumen de llenado máximo.