

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 088**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

C07K 5/02 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2005 E 05821102 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1838355**

54 Título: **Procedimientos de interrupción mejorados para un proceso de inactivación de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

29.10.2004 US 623177 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.11.2013

73 Titular/es:

**CERUS CORPORATION (100.0%)
2411 STANWELL DRIVE
CONCORD, CA 94520, US**

72 Inventor/es:

STASSINOPOULOS, ADONIS

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 088 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

Procedimientos de interrupción mejorados para un proceso de inactivación de glóbulos rojos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] El campo de esta invención se refiere a procedimientos para interrumpir compuestos electrófilos reactivos usados en el tratamiento de productos sanguíneos para inactivar posibles contaminantes patógenos. En particular, se usan compuestos nucleófilos, tales como tioles, para interrumpir los compuestos electrófilos reactivos en composiciones de glóbulos rojos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] La transmisión de enfermedades a través de productos sanguíneos y otros materiales biológicos permanece como un serio problema de la salud. Aunque han tenido lugar avances significativos en la clasificación de donadores de sangre y ensayos de sangre, los virus, tales como el virus de la hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC), y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) pueden escapar a la detección en productos sanguíneos durante las pruebas debido a los bajos niveles de virus o anticuerpos virales. Además del peligro vírico, actualmente no existen pruebas reguladas adecuadas para clasificar la presencia de microbios no virales, tales como bacterias o protozoos, en sangre prevista para su uso en transfusiones. El riesgo también existe en que un patógeno hasta ahora desconocido puede hacerse prevalente en el suministro sanguíneo y presentar una amenaza de transmisión de enfermedades, como el hecho ocurrido antes del reconocimiento del riesgo de la transmisión de VIH a través de las transfusiones sanguíneas.

25 [0003] Los agentes químicos se han introducido en la sangre o en el plasma sanguíneo para inactivar patógenos antes del uso clínico del producto sanguíneo. Típicamente, para productos sanguíneos que tienen poco o ningún contenido de glóbulos rojos, tales como plaquetas y plasma, se utilizan compuestos fotoquímicamente activados tales como psoralenos. Para productos sanguíneos que contienen glóbulos rojos, se han desarrollado compuestos para la inactivación del patógeno, que no requieren fotoactivación. Estos compuestos típicamente tienen grupos electrófilos que reaccionan con patógenos, más específicamente con ácido nucleico patógeno. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.055.485 describe la inactivación de virus en composiciones que contienen células y proteínas utilizando epóxidos de aril diol. Pueden usarse otros compuestos que generan electrófilos *in situ*. LoGrippe y col., evaluaron el uso de mostaza de nitrógeno, $\text{CH}_3\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C1})_2$, para la inactivación viral. LoGrippe y col., Proceedings of the Sixth Congress of the International Society of Blood Transfusion, Bibliotheca Haematologica (Hollander, ed.), 1958, págs. 225-230. Más significativamente, las patentes de Estados Unidos N° 6.410.219 y 5.691.132, describen el uso de compuestos que tienen un componente que se dirige al ácido nucleico, así como un componente electrófilo que reacciona con el ácido nucleico con el fin de inactivar el patógeno. La patente de Estados Unidos N° 6.514.987 describe compuestos similares, en la que el componente que se dirige al ácido nucleico del compuesto está enlazado al componente electrófilo reactivo a través de un enlazador hidrolizable. Las patentes de Estados Unidos N° 6.136.586 y 6.617.157 describen el uso de oligómeros de etilendiamina y compuestos relacionados para la inactivación de patógenos. Estos compuestos derivados de etilendiamina típicamente tienen un grupo aziridina, que proporciona el componente electrófilo reactivo, y un componente de poliamina, que proporciona la dirección al ácido nucleico del compuesto. La clase general de compuestos dirigidos al ácido nucleico que tienen un grupo reactivo electrófilo o similar con el ácido nucleico se utilizan para inactivar patógenos en la sangre, productos sanguíneos, y una variedad de muestras de origen biológico.

50 [0004] Existe una preocupación en que, mientras estos compuestos están diseñados para reaccionar específicamente con ácidos nucleicos, pueden reaccionar con otros compuestos de la sangre, tales como proteínas o membranas celulares. Estas reacciones secundarias son desfavorables y pueden causar efectos adversos, tales como modificaciones de proteínas y membranas celulares que pueden reconocerse por el sistema inmunitario. Cuando se usan repetidamente dichos productos sanguíneos, pueden dar como resultado una respuesta inmune del receptor para el producto sanguíneo tratado. La patente de Estados Unidos 6.709.810 describe métodos de interrupción de dichos compuestos inactivadores de patógenos con el fin de reducir el nivel de cualquier reacción secundaria adversa de este tipo.

55 El documento US 2003/0113704 A1 se refiere a procedimientos para la inactivación de patógenos en un material biológico mediante un procedimiento que comprende: (i) poner en contacto el material biológico con una solución de aditivos que comprende una concentración de cloruro de menos de aproximadamente 10 mM, (ii) poner en contacto el material biológico con un compuesto de inactivación de patógenos en una cantidad suficiente para inactivar al menos 1 log de la bacteria, y (iii) incubar el material biológico en contacto con la solución de aditivos y el compuesto de inactivación de patógenos durante un tiempo suficiente para inactivar al menos 1 log de la bacteria. Opcionalmente, el procedimiento puede incluir el uso de un interruptor que reduce reacciones secundarias no deseadas de los agentes de inactivación de patógenos en materiales biológicos.

65 Sin embargo, aunque dichos procedimientos reducen significativamente las reacciones secundarias no deseadas, es

deseable una reacción adicional de las respuestas inmunes no deseadas. Ensayos clínicos recientes usando dichos compuestos para el tratamiento de los glóbulos rojos han indicado la posibilidad de dichos acontecimientos adversos. En un comunicado de prensa de V.I. Technologies, Inc. con fecha del 17 de noviembre de 2003, se recomendó que su ensayo crónico de la Fase III del sistema de reducción de patógenos INACTINE™ para glóbulos rojos se detuviera debido a una preocupación acerca de las respuestas del anticuerpo para los glóbulos rojos tratados con INACTINE™. En un comunicado de prensa de Cerus Corporation con fecha del 4 de septiembre de 2003, se indicó que detuvieron voluntariamente un ensayo de Fase III para su programa de glóbulos rojos de patógenos inactivados después de que dos pacientes del estudio desarrollasen anticuerpos para los glóbulos rojos tratados con S-303, el compuesto usado en su sistema de inactivación de patógenos para los glóbulos rojos. Dichos anticuerpos se detectan típicamente con el uso de un ensayo de anti-globulina indirecto que puede realizarse sin un conocimiento detallado de la naturaleza u homogeneidad del anticuerpo real. Dichos ensayos se conocen bien por los expertos en la técnica y son muy sensibles, permitiendo la detección de hasta 500 moléculas por GR. El procedimiento más común de detección de estos anticuerpos es a través de la mezcla del suero del paciente con la preparación de GR que es una candidata para infusión y detectando si tiene lugar una reacción de aglutinación: Esto se denomina una correspondencia cruzada de la unidad de GR con respecto al suero del paciente. Se proporciona más sensibilidad por la inclusión de una inmunoglobulina anti-humana que reacciona de forma cruzada con el anticuerpo. Esto mejora la reactividad entre IgG u otros anticuerpos sobre la superficie de los GR. Finalmente, puede obtenerse incluso más sensibilidad de detección mediante la inclusión de potenciadores en el medio de reacción que mejoran la tasa de anticuerpos con otro diferente (AABB manual 13ª edición). Dichos ensayos son más sensibles que, por ejemplo, los ensayos de citometría de flujo, y pueden observarse incluso cuando otros procedimientos indican la ausencia de cualquier anticuerpo potencial. Dichos fenómenos tienen lugar en ensayos clínicos y muchas veces se asocian con poblaciones de pacientes específicas que pueden tener una mayor tendencia a desarrollar estos anticuerpos.

[0005] Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos para reducir reacciones secundarias electrófilas no deseadas de compuestos inactivadores de patógenos que reaccionan con patógenos a través de un grupo electrófilo, mientras se conserva la habilidad del compuesto inactivador de patógenos para inactivar patógenos dañinos. Específicamente, existe la necesidad de procedimientos mejorados para interrumpir los compuestos inactivadores de patógeno en los glóbulos rojos. Se necesita un nuevo procedimiento de este tipo para reducir de forma significativa el riesgo de una respuesta inmune adversa para los glóbulos rojos debido al tratamiento con un compuesto inactivador de patógenos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención proporciona una diversidad de procedimientos de tratamiento de composiciones de glóbulos rojos con compuestos inactivadores de patógenos en condiciones mejoradas para interrumpir una reacción secundaria no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la interrupción se mejora mediante el ajuste del pH y/o aumenta en la concentración del interruptor.

[0007] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos como se describe en la reivindicación 1. En una realización adicional, el procedimiento incluye la etapa de c) ajustar el pH de la composición que comprende glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado la inactivación de al menos 1 log, también al menos 2 log, o al menos 3 log de un contaminante patógeno. En algunos ejemplos, la composición de glóbulos rojos contiene leucocitos, y el tratamiento da como resultado la inactivación de al menos 1 log, también al menos 2 log, o al menos 3 log de los leucocitos. En algunas realizaciones, el interruptor se mezcla con la composición que comprende glóbulos rojos antes de ajustar el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta antes de la mezcla con el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. En algunas realizaciones, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta después de la adición del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición del interruptor. En algunos ejemplos, la mezcla del interruptor, el compuesto inactivador de patógenos y la composición que comprende glóbulos rojos tiene un pH a temperatura ambiente en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0 una vez que los tres componentes se han mezclado. En algunos ejemplos, la mezcla del interruptor, el compuesto inactivador de patógenos y la composición que comprende glóbulos rojos se incuba durante un intervalo de tiempo adecuado, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 24 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas. En un ejemplo adicional, la incubación está en un intervalo de temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la concentración de interruptor, una vez que los tres componentes se han mezclado, está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, también de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, también de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración del interruptor en la mezcla resultante es mayor de aproximadamente 2 mM, al menos aproximadamente 4 mM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, o al menos

aproximadamente 15 mM. En algunos ejemplos, la proporción molar de interruptor con respecto al compuesto de inactivación de patógenos, una vez que los tres componentes se han mezclado, es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 400:1, también de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 100:1. En algunos ejemplos, el interruptor comprende cisteína o un derivado de cisteína. En algunos ejemplos, el interruptor es un péptido que comprende al menos una cisteína o un derivado de cisteína. En el procedimiento de la invención, el interruptor es glutatión. En algunas realizaciones, el interruptor se neutraliza y la adición del interruptor neutralizado realiza el ajuste del pH de la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el interruptor neutralizado comprende cisteína o un derivado de cisteína. En algunos ejemplos, el interruptor neutralizado es un péptido que comprende cisteína o un derivado de cisteína. En algunos ejemplos, el compuesto inactivador de patógenos comprende un grupo de unión a ácido nucleico. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es un intercalador, tal como un grupo acridina. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es una poliamina. En algunos ejemplos, el compuesto inactivador de patógenos comprende un grupo de unión a ácido nucleico unido al grupo electrófilo reactivo a través de un enlace hidrolizable. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es un intercalador, y el grupo electrófilo reactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. En una realización preferida, el interruptor es glutatión neutralizado, en la que el glutatión protonado se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de una base adecuada, y el compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster.

[0008] En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de una composición de glóbulos rojos de acuerdo con la reivindicación 18. En algunos ejemplos, la composición de glóbulos rojos contiene leucocitos, y el tratamiento da como resultado la inactivación de al menos 1 log, también al menos 2 log, o al menos 3 log de los leucocitos. En algunos ejemplos, el interruptor se mezcla con la composición que comprende glóbulos rojos antes de la mezcla con el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, el interruptor se mezcla con la composición que comprende glóbulos rojos posteriormente a la mezcla con el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, el interruptor y el compuesto inactivador de patógenos se mezclan con la composición que comprende glóbulos rojos simultáneamente, o básicamente de forma simultánea, tal como en aproximadamente 1 minuto el uno del otro. En algunos ejemplos, la mezcla del interruptor y la composición que comprende glóbulos rojos se incuba durante aproximadamente 1 a 30 minutos antes de la mezcla con el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, esta incubación está a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, la mezcla del interruptor, el compuesto inactivador de patógenos y la composición que comprende glóbulos rojos se incuba durante un intervalo de tiempo adecuado, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 24 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas. En un ejemplo adicional, la incubación está en un intervalo de temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, un pH adecuado tras la mezcla del interruptor con la composición que comprende glóbulos rojos está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0, como se mide a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, una vez que los tres componentes se han mezclado, el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0, como se mide a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, la concentración de interruptor, una vez que los tres componentes se han mezclado, está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, también de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, también de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, también de aproximadamente 20 mM. En algunos ejemplos, la proporción molar de interruptor con respecto al compuesto de inactivación de patógenos, una vez que los tres componentes se han mezclado, es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 400:1, también de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 100:1. En algunos ejemplos, el interruptor es un péptido que comprende al menos una cisteína o un derivado de cisteína. En el procedimiento, el interruptor es glutatión. En algunos ejemplos, el interruptor se neutraliza o está en una forma que realiza el ajuste deseado en el pH de la composición. En algunos ejemplos, el interruptor se neutraliza mediante la adición de 1 equivalente, también de aproximadamente 2 equivalentes de base al interruptor. En algunos ejemplos, el interruptor está en una forma neutralizada, tal como una sal adecuada. En algunos ejemplos, el interruptor está neutralizado. En algunos ejemplos, el interruptor neutralizado es un péptido neutralizado que comprende cisteína o un derivado de cisteína. En el procedimiento, el péptido neutralizado es glutatión neutralizado. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico del compuesto inactivador de patógenos es un intercalador, tal como un grupo acridina. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es una poliamina. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico se une al grupo electrófilo reactivo a través de un enlace hidrolizable. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es un intercalador, y el grupo electrófilo reactivo se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. En algunos ejemplos, el grupo de unión a ácido nucleico es una poliamina, y el grupo electrófilo es un grupo aziridina o un grupo aziridinio. En un ejemplo preferido, el interruptor es glutatión neutralizado y el compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-

il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster.

[0009] En el presente documento se desvela un procedimiento para el tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende, en el siguiente orden, a) proporcionar i) β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, ii) glutatión neutralizado, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, en la que existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno, b) mezclar el glutatión neutralizado con la composición que comprende glóbulos rojos, c) incubar la mezcla durante un intervalo de tiempo apropiado, y d) mezclar el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster con la mezcla de glutatión neutralizado y la composición que comprende glóbulos rojos, en la que un patógeno, si está presente en la composición que comprende glóbulos rojos, está inactivado por al menos 1 log, también al menos 2 log, también al menos 3 log. En algunos ejemplos, la composición de glóbulos rojos contiene leucocitos, y el tratamiento da como resultado la inactivación de al menos 1 log, también al menos 2 log, o al menos 3 log de los leucocitos. En algunos ejemplos, el glutatión neutralizado se proporciona en forma de una sal adecuada. En algunos ejemplos, el glutatión neutralizado se proporciona neutralizando glutatión protonado con aproximadamente 1 equivalente de base, también de aproximadamente 2 equivalentes de base. En algunas realizaciones ejemplares, el glutatión neutralizado está en solución. En algunos ejemplos, el glutatión neutralizado es un sólido, tal como un polvo liofilizado, es una sal adecuada. En algunos ejemplos, el intervalo de tiempo para la incubación de los glóbulos rojos mezclados con glutatión es de aproximadamente 1 a 30 minutos, también de aproximadamente 5 a 20 minutos, donde la incubación está a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, después de la mezcla con el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, la mezcla se incuba durante un intervalo de tiempo adecuado, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 24 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas. En un ejemplo adicional, la incubación está en un intervalo de temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. En algunos ejemplos, tras la mezcla del β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, la concentración de glutatión en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, y la concentración de β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,5 mM. En algunos ejemplos, tras la mezcla del β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, la concentración de glutatión en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, y la concentración de β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,3 mM. En algunos ejemplos, tras la mezcla del β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, la concentración de glutatión en la mezcla es de aproximadamente 20 mM, y la concentración de β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster es de aproximadamente 0,2 mM.

[0010] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: (a) proporcionar i) un compuesto inactivador de patógenos que comprende un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo reactivo, ii) un interruptor que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, en la que existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno; y (b) mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor con la composición que comprende glóbulos rojos, en la que la concentración del interruptor en la mezcla resultante es mayor de 2 mM, en la que el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente está en el intervalo de aproximadamente 6,7 o superior. En algunos ejemplos, el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,5.

[0011] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos, que comprende mezclar los siguientes con la composición de glóbulos rojos: (a) un compuesto inactivador de patógenos, en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo capaz de reaccionar con ácidos nucleicos; (b) un interruptor que comprende un tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo; y (c) una cantidad suficiente de una base adecuada para reducir el nivel de una reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con glóbulos rojos en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base, con respecto a la mezcla sin la base. En algunos ejemplos, la reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos.

[0012] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos, que comprende mezclar los siguientes con la composición de glóbulos rojos: (a) un compuesto inactivador de patógenos, en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo capaz de reaccionar con ácidos nucleicos; (b) un interruptor que comprende un tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo; y (c) una cantidad suficiente de una base adecuada para aumentar el pH de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base, con respecto a la mezcla sin la base. En algunos ejemplos (por ejemplo, en algunos ejemplos, donde el interruptor es un compuesto ácido), se añade una cantidad

suficiente de la base adecuada para aumentar el pH de la mezcla hasta al menos aproximadamente el pH de la mezcla sin la base o el interruptor.

5 **[0013]** En el presente documento se desvela un procedimiento para mejorar la interrupción de una reacción secundaria no deseada de un compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos durante el tratamiento de una composición que comprende los glóbulos rojos con el compuesto inactivador de patógenos en presencia de un interruptor, en el que el interruptor comprende un tiol, y en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un grupo funcional que es, o que forma, un reactivo electrófilo con el tiol del interruptor, en el que el procedimiento comprende aumentar el pH de la mezcla de reacción que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de aumentar la concentración del interruptor en la mezcla de reacción. En algunos ejemplos, la reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos.

15 **[0014]** En algunos ejemplos de cada uno de los procedimientos que se han mencionado anteriormente, así como otros procedimientos descritos en el presente documento, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de reducir la concentración de compuesto inactivador de patógenos en la mezcla.

20 **[0015]** En algunos ejemplos de cada uno de los procedimientos que se han mencionado anteriormente, así como otros procedimientos descritos en el presente documento, la composición de glóbulos rojos se trata *ex vivo*. En algunas otras realizaciones de cada uno de los procedimientos que se han mencionado anteriormente, así como otros procedimientos descritos en el presente documento, la composición de glóbulos rojos se trata *in vitro*.

25 **[0016]** También se proporcionan composiciones de glóbulos rojos producidas por cada uno de los procedimientos que se han mencionado anteriormente, así como otros procedimientos descritos en el presente documento.

30 **[0017]** En un aspecto adicional, la invención proporciona kits, tales como kits desechables para su uso en el procesamiento de una composición de glóbulos rojos. Estos kits pueden usarse para un procesamiento manual, un procesamiento automático, o tanto un procesamiento manual como automático. En algunos ejemplos, el kit comprende un compuesto inactivador de patógenos que comprende un grupo electrófilo reactivo, incluyendo cualquier sal del mismo, un interruptor que comprende un grupo tiol, incluyendo cualquier sal del mismo, y 1 ó 2 equivalentes de una base adecuada, donde un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en el kit. En una realización preferida, el kit comprende β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil) amino]etil éster, incluyendo cualquier sal del mismo, glutatión, incluyendo cualquier sal del mismo, y 1 ó 2 equivalentes de una base adecuada, donde un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de glutatión en el kit. En algunos ejemplos, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, o cualquier sal del mismo, está en forma sólida. En algunos ejemplos, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, o cualquier sal del mismo, está en solución. En algunos ejemplos, el glutatión, o cualquier sal del mismo, está en forma sólida. En algunos ejemplos, el glutatión, o cualquier sal del mismo, y el 1 ó 2 equivalentes de base están en forma sólida. En algunos ejemplos, el 1 ó 2 equivalentes de base están en solución. En algunos ejemplos, el glutatión, o cualquier sal del mismo, y el 1 ó 2 equivalentes de base están presentes en forma de una mezcla. En algunos ejemplos, la mezcla de glutatión, o cualquier sal del mismo, y 1 ó 2 equivalentes de base es una mezcla homogénea. En algunos ejemplos, esta mezcla homogénea está en forma sólida. En algunas realizaciones, esta mezcla homogénea está en solución. En algunos ejemplos, el kit comprende una solución para disolver el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, o cualquier sal del mismo, que está en forma sólida. En algunos ejemplos, el kit comprende una solución para disolver el glutatión, o cualquier sal del mismo, que está en forma sólida. En algunos ejemplos, el kit comprende una solución para disolver el 1 ó 2 equivalentes de base, que está en forma sólida. En algunos ejemplos, el kit comprende una solución para disolver tanto el interruptor, o cualquier sal del mismo, como el 1 ó 2 equivalentes de base, que están en forma sólida. En algunos ejemplos el kit comprende una solución para disolver la mezcla del interruptor y 1 ó 2 equivalentes de base. En algunos ejemplos, los sólidos o soluciones del kit comprenden adicionalmente excipientes, adyuvantes, diluyentes o estabilizadores aceptables.

55 **[0018]** En el presente documento se desvela un kit útil, por ejemplo, para el tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un compuesto inactivador de patógenos que comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo (incluyendo cualquier sal del mismo), un interruptor que comprende un grupo tiol (incluyendo cualquier sal del mismo), y al menos aproximadamente 1 equivalente de base, en el que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en el kit. En algunos ejemplos, el kit comprende aproximadamente 1 o aproximadamente 2 equivalentes de una base adecuada.

60 **[0019]** En el presente documento se desvela un kit para el tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo (por ejemplo, PIC-1), incluyendo cualquier sal del mismo, y un interruptor neutralizado que comprende un grupo tiol (por ejemplo, glutatión neutralizado), incluyendo cualquier sal del mismo.

[0020] En aún aspectos adicionales, la invención incluye una composición de acuerdo con la reivindicación 19. En algunos ejemplos, el compuesto inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y el interruptor comprende un grupo tiol. Una realización preferida incluye una composición que comprende glóbulos rojos, β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil) amino]etil éster, y glutatión a una concentración en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 40 mM, en la que el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunos ejemplos, la composición tiene un hematocrito de glóbulos rojos en el intervalo de aproximadamente el 1 al 100%, también de aproximadamente el 10 al 90%, también de aproximadamente el 35 al 80%, o de aproximadamente el 40 al 70%. En algunos ejemplos, la concentración de β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mM a 4 mM, también de aproximadamente 0,05 mM a 2 mM, también de aproximadamente 0,05 mM a 0,5 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a 0,3 mM, y el glutatión está en el intervalo de aproximadamente 5 mM a 40 mM, también de aproximadamente 5 mM a 30 mM, o de aproximadamente 10 mM a 30 mM.

[0021] En el presente documento se desvela una composición que comprende glóbulos rojos, un compuesto inactivador de patógenos que comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo electrófilo reactivo, y un interruptor que comprende un grupo tiol que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo, en la que el interruptor está a una concentración mayor de 2 mM, y el pH de la composición está a aproximadamente 6,7 o superior. En algunos ejemplos, la composición tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5 y de aproximadamente 7,2 a 8,0. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,5. En algunos ejemplos, la composición comprende al menos aproximadamente 4 mM de interruptor o al menos aproximadamente 10 mM de interruptor. En algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 4 a 40 mM o de aproximadamente 10 a 30 mM. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 4 mM a 40 mM, y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5. En algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración de al menos aproximadamente 4 mM, y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5.

BREVES DESCRIPCIONES DE LOS DIBUJOS

[0022] La figura 1 muestra una titulación de anticuerpos en suero durante una transfusión repetida en la Fase 1 del Ejemplo 12. Para mayor claridad, se muestran barras de error sólo para inmunizaciones de KLH-Acridina. Las barras de error para los grupos de infusión de GR eran aproximadamente ± 1 .

[0023] La figura 2 muestra la vida útil de los GR Originales S-220 en los Grupos 4A, 4B y 6 en la Fase 2 del Ejemplo 12. La vida útil se determinó extrapolando puntos de tiempo tempranos al 100% el día 0. Los animales del Grupo 1 recibieron GR de Control biotinilados. Se muestran barras de error únicamente para los Grupos 4A, 4B y 6, con fines de claridad.

[0024] La figura 3 muestra la vida útil de los GR Originales S-303 (PIC-1) en los Grupos 2A, 2B y 5 en la Fase 2 del Ejemplo 12. La vida útil se determinó extrapolando puntos de tiempo tempranos al 100% el día 0. Los animales del Grupo 1 recibieron GR de Control biotinilados. Se muestran barras de error únicamente para los Grupos 2B y 5, con fines de claridad.

[0025] La figura 4 muestra la vida útil de GR Modificados S-220 en los Grupos 4A, 4B y 6 en la Fase 2 del Ejemplo 12. La vida útil se determinó extrapolando puntos de tiempo tempranos al 100% el día 0. Los animales del Grupo 1 recibieron GR de Control biotinilados. Se muestran barras de error únicamente para los Grupos 1, 4B y 6, con fines de claridad.

[0026] La figura 5 muestra la vida útil de GR Modificados S-303 en los Grupos 2A, 2B y 5 en la Fase 2 del Ejemplo 12. La vida útil se determinó extrapolando puntos de tiempo tempranos al 100% el día 0. Los animales del Grupo 1 recibieron GR de Control biotinilados. Se muestran barras de error únicamente para los Grupos 2B y 5, con fines de claridad.

[0027] La figura 6 muestra los resultados del Análisis FACScan de GR S-303 Tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0028] Se proporcionan los procedimientos existentes para la interrupción de especies electrófilas reactivas en las composiciones de glóbulos rojos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos número 6.709.810. Como un ejemplo no limitante de estos procedimientos, se usa glutatión en combinación con β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster (en lo sucesivo en el presente documento denominada, como alternativa, como "compuesto inactivador de patógenos 1", "PIC-1", o "S-303"). El glutatión se aísla típicamente en forma ácida (es decir, protonado), y ésta es la forma usada en estos procedimientos conocidos. Como tal, cuando se hace referencia a procedimientos de interrupción conocidos, el glutatión se denominará como glutatión ácido o protonado. Como se

usa en el presente documento, la condición convencional para la inactivación de patógenos en los glóbulos rojos implica el tratamiento de una composición de glóbulos rojos con glutatión protonado a 2 mM y PIC-1 a 0,2 mM. La concentración de glutatión protonado puede aumentar, proporcionando una proporción mayor de interruptor con respecto al compuesto inactivador de patógenos, en un intento de proporcionar una interrupción mejor de las reacciones secundarias no deseadas. Sin embargo, según aumenta la concentración de glutatión protonado, el pH total de la composición de glóbulos rojos disminuye debido a la acidez del glutatión. Se ha determinado que este pH inferior da como resultado una interrupción insuficiente de la reacción del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos, particularmente la superficie de los glóbulos rojos. También se ha determinado que la condición convencional no proporciona una interrupción adecuada de la modificación de la superficie de los glóbulos rojos. Como tal, la presente invención proporciona procedimientos de interrupción mejorados, en los que el pH de una composición de glóbulos rojos que comprende un compuesto inactivador de patógenos y un interruptor se ajusta a un intervalo adecuado para proporcionar una interrupción mejorada, en el que la concentración de interruptor usada es mayor de 2 mM, tal como de aproximadamente 5 a 40 mM, también de aproximadamente 10 a 30 mM, o aproximadamente 20 mM. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos de tal forma que tras la mezcla de una composición que comprende glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos y un interruptor, el pH esté en un intervalo adecuado, tal como un pH de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0, donde la concentración de interruptor esté en el intervalo de aproximadamente 5 a 40 mM.

[0029] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento, se reduce una reacción secundaria no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la reacción secundaria no deseada que se reduce es una modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el nivel de reacción secundaria se reduce en al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 90%. La reducción de la reacción secundaria (con respecto a un segundo procedimiento) puede ser evidente, por ejemplo, midiendo la cantidad de unión a los glóbulos rojos tratados de anticuerpos específicos para el compuesto inactivador de patógenos y/o midiendo la vida útil de los glóbulos rojos tratados *in vivo*, y comparando estas mediciones con los glóbulos rojos tratados por un segundo procedimiento diferente. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los procedimientos mejorados, el nivel de unión del anticuerpo del compuesto inactivador de anti-patógenos a los glóbulos rojos tratados se reduce en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a un procedimiento sin mejoras.

[0030] En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos de la invención descrita en el presente documento, el intervalo de pH adecuado para proporcionar una interrupción adecuada de la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos es el intervalo de pH que proporciona una interrupción mejorada de la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos con respecto al tratamiento convencional de una composición de glóbulos rojos con glutatión protonado a 2 mM y PIC-1 a 0,2 mM. En algunas realizaciones, la mejora de la interrupción es evidente por un descenso de la inmunogenicidad de los glóbulos rojos tratados con respecto a los tratados mediante el procedimiento convencional. En algunas realizaciones, la mejora en la interrupción proporcionada por un procedimiento determinado con respecto al procedimiento convencional es evidente por un descenso de la cantidad de unión de anticuerpos específicos para el compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos tratados *in vitro* y/o por el aumento de la vida útil de los glóbulos rojos tratados *in vivo*.

[0031] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar i) un compuesto inactivador de patógenos que comprende un grupo electrófilo reactivo, ii) un interruptor que comprende un grupo tiol, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, donde existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno; y b) mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor con la composición que comprende glóbulos rojos, donde la mezcla resultante está en un intervalo de pH adecuado para proporcionar una interrupción adecuada de la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de ajustar el pH de la composición que comprende glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta antes de la mezcla con el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. En algunas realizaciones, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición del interruptor. En algunos ejemplos, el interruptor se neutraliza con al menos aproximadamente un equivalente de una base adecuada anterior a la adición del interruptor a la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el interruptor se mezcla con la composición que comprende glóbulos rojos antes de añadir el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos desvelados en el presente documento, el intervalo de pH adecuado a temperatura ambiente es de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunos ejemplos, la concentración de interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM. En algunos ejemplos del

procedimiento, la concentración de interruptor en la mezcla resultante es al menos aproximadamente 4 mM o al menos aproximadamente 10 mM. En algunos ejemplos, el interruptor usado en el procedimiento comprende cisteína o un derivado de cisteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el interruptor es glutatión. El grupo electrófilo reactivo ejemplar, en algunos ejemplos, se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. En algunos ejemplos, el compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. En algunos ejemplos, el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos.

[0032] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: (a) proporcionar i) un compuesto inactivador de patógenos que comprende un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo reactivo, ii) un interruptor que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, en la que existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno; y (b) mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor con la composición que comprende glóbulos rojos, donde la concentración del interruptor en la mezcla resultante es mayor de 2 mM, en la que el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente está en el intervalo de aproximadamente 6,7 o superior. En algunos ejemplos, la mezcla resultante tiene un pH a temperatura ambiente de aproximadamente 7,0 o superior, o de aproximadamente 7,2 o superior. En algunos ejemplos, el pH de la mezcla resultante está en un intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,5. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de (c) ajustar el pH de la composición que comprende glóbulos rojos de manera que el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente esté en el intervalo indicado (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,5). En algunos ejemplos, el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición de al menos aproximadamente 0,5 equivalentes, al menos aproximadamente 1 equivalente, o al menos aproximadamente 2 equivalentes de base a la composición de glóbulos rojos, en la que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en la mezcla. En algunos ejemplos, el interruptor se neutraliza con al menos aproximadamente un equivalente de una base adecuada anterior a la adición del interruptor a la composición de glóbulos rojos, y el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición del interruptor neutralizado. En algunos ejemplos, la concentración de interruptor en la mezcla resultante es al menos aproximadamente 4 mM o al menos aproximadamente 10 mM. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante es de aproximadamente 4 a 40 mM, o de aproximadamente 10 a 30 mM. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la concentración del interruptor es al menos aproximadamente 4 mM, donde la mezcla tiene un pH a temperatura ambiente en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor es de aproximadamente 4 a 40 mM, y el pH a temperatura ambiente está en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,5. En algunos ejemplos, el interruptor se neutraliza con al menos aproximadamente un equivalente de una base adecuada anterior a la adición del interruptor a la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el interruptor se mezcla con la composición que comprende glóbulos rojos antes de la adición del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el compuesto del interruptor es ácido. En algunos ejemplos, el interruptor comprende cisteína o un derivado de cisteína. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el interruptor es glutatión. En algunos ejemplos, el grupo funcional se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. En algunos ejemplos, el compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. En algunos ejemplos, el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log, al menos aproximadamente 2 log, o al menos aproximadamente 3 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos.

[0033] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos, que comprende mezclar los siguientes con la composición de glóbulos rojos: (a) un compuesto inactivador de patógenos, en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo capaz de reaccionar con ácidos nucleicos; (b) un interruptor que comprende un tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo; y (c) una cantidad suficiente de una base adecuada para reducir el nivel de una reacción secundaria no deseada del compuesto inactivador de patógenos con glóbulos rojos en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base, con respecto a la mezcla sin la base (es decir, una segunda mezcla que comprende los mismos componentes que la primera, con la excepción de que la base de (c) no se ha añadido). En algunos ejemplos, la reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se combinan con la composición de glóbulos rojos antes de, al mismo tiempo, o no más de aproximadamente una hora, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 2 minutos, o aproximadamente 1 minuto después de combinar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se mezclan entre sí

antes de mezclar la base o el interruptor con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, una sal básica que comprende el interruptor proporciona tanto el interruptor como la base, ambos proporcionados por una sal básica que comprende el interruptor. En algunos ejemplos, la base es NaOH. En algunos ejemplos, la base es un tampón básico. En algunos ejemplos, se añaden al menos aproximadamente 0,5 equivalentes, al menos aproximadamente 1,0, o al menos aproximadamente 2 equivalentes de base, en los que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en la mezcla. En algunos ejemplos, la base comprende al menos aproximadamente 1 equivalente de base. En algunos ejemplos de los procedimientos, el intervalo de pH adecuado a temperatura ambiente es de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunos ejemplos, la mezcla resultante tiene un pH a temperatura ambiente de aproximadamente 7,0 a 8,5. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante es mayor de 2 mM, mayor de aproximadamente 4 mM, o mayor de aproximadamente 10 mM. En algunos ejemplos, la concentración de interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a 30 mM. En algunos ejemplos, el interruptor es ácido. En algunos ejemplos, el interruptor comprende cisteína o un derivado de cisteína, tal como glutatión. En algunos ejemplos, el grupo funcional se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. El compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. En algunos ejemplos, el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos.

[0034] En el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos, que comprende mezclar los siguientes con la composición de glóbulos rojos: (a) un compuesto inactivador de patógenos, en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo capaz de reaccionar con ácidos nucleicos; (b) un interruptor que comprende un tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo; y (c) una cantidad suficiente de una base adecuada para aumentar el pH de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base, con respecto a la mezcla sin la base (es decir, una segunda mezcla que comprende los mismos componentes que la primera con la excepción de que la base de (c) no se añade a la mezcla). En algunos ejemplos (por ejemplo, en algunos ejemplos, donde el interruptor es un compuesto ácido), se añade una cantidad suficiente de la base adecuada para aumentar el pH de la mezcla hasta al menos aproximadamente el pH de la mezcla sin la base o el interruptor. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se combinan con la composición de glóbulos rojos antes de, al mismo tiempo, o no más de aproximadamente una hora, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 2 minutos, o aproximadamente 1 minuto después de combinar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, la base y el interruptor se mezclan entre sí antes de mezclar la base o el interruptor con la composición de glóbulos rojos. En algunos ejemplos, una sal básica que comprende el interruptor proporciona tanto el interruptor como la base, ambos proporcionados por una sal básica que comprende el interruptor. En algunos ejemplos, la base es NaOH. En algunos ejemplos, la base es un tampón básico. En algunos ejemplos, se añaden al menos aproximadamente 0,5 equivalentes, al menos aproximadamente 1,0, o al menos aproximadamente 2 equivalentes de base, en los que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en la mezcla. En algunos ejemplos, la base comprende al menos aproximadamente 1 equivalente de base. En algunos ejemplos de los procedimientos, el intervalo de pH adecuado a temperatura ambiente es de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunos ejemplos, la mezcla resultante tiene un pH a temperatura ambiente de aproximadamente 7,0 a 8,5. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante es mayor de 2 mM, mayor de aproximadamente 4 mM, o mayor de aproximadamente 10 mM. En algunos ejemplos, la concentración de interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM. En algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la concentración del interruptor en la mezcla resultante está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a 30 mM. En algunos ejemplos, el interruptor es ácido. En algunos ejemplos, el interruptor comprende cisteína o un derivado de cisteína, tal como glutatión. En algunos ejemplos, el grupo funcional se selecciona entre el grupo que consiste en una mostaza, un intermedio de mostaza y un equivalente de mostaza. El compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. En algunos ejemplos, el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos.

[0035] En el presente documento se desvela un procedimiento para mejorar la interrupción de una reacción secundaria no deseada de un compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos durante el tratamiento de una composición que comprende los glóbulos rojos con el compuesto inactivador de patógenos en presencia de un interruptor, en el que el interruptor comprende un tiol, y en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende

un grupo funcional que es, o que forma, un reactivo electrófilo con el tiol del interruptor, en el que el procedimiento comprende aumentar el pH de la mezcla de reacción que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, y el interruptor. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de aumentar la concentración del interruptor en la mezcla de reacción. En algunos ejemplos, el interruptor es ácido. En algunos ejemplos, la reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos.

[0036] En el presente documento se desvela un procedimiento para el tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende, en el siguiente orden: a) proporcionar i) β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, ii) glutatión neutralizado, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, en la que existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno; b) mezclar el glutatión neutralizado con la composición que comprende glóbulos rojos; c) incubar la mezcla durante un intervalo de tiempo apropiado; y d) mezclar el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster con la mezcla de glutatión neutralizado y la composición que comprende glóbulos rojos, en la que un patógeno, si está presente en la composición que comprende glóbulos rojos, está inactivado por al menos 1 log. En algunos ejemplos, el glutatión neutralizado comprende glutatión al que se ha añadido al menos aproximadamente un equivalente de base, en los que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor. En algunos ejemplos, el glutatión neutralizado comprende glutatión (por ejemplo, el ácido libre de glutatión) al que se han añadido aproximadamente dos equivalentes de base.

[0037] También se desvelan composiciones de glóbulos rojos producidas por cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, las composiciones de glóbulos rojos comprenden niveles reducidos de modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos, con respecto a los glóbulos rojos producidos por otros procedimientos que implican tratamiento con el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, las composiciones de glóbulos rojos producidas por el tratamiento de los procedimientos comprenden productos de degradación del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, el producto de reacción del interruptor con el compuesto inactivador de patógenos). En algunos ejemplos, las composiciones de glóbulos rojos producidas por los tratamientos de los procedimientos descritos en el presente documento comprenden una cantidad reducida de compuesto inactivador de patógenos que comprende el grupo electrófilo reactivo después de la finalización del tratamiento, con respecto a una composición de glóbulos rojos producida por otro procedimiento que implica tratamiento con el compuesto inactivador de patógenos. En algunos ejemplos, la cantidad de compuesto inactivador de patógenos que comprende el grupo electrófilo reactivo en la composición se ha reducido en aproximadamente el 10%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 99%, con respecto a una composición tratada por otro procedimiento que implica el compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, un procedimiento en el que no se añade interruptor y/o la base a la mezcla de reacción o un tratamiento a un pH inferior).

[0038] En el presente documento se desvela una composición que comprende glóbulos rojos, un compuesto inactivador de patógenos que comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo electrófilo reactivo, y un interruptor que comprende un grupo tiol que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo, en la que el interruptor está a una concentración mayor de 2 mM, y el pH de la composición está a aproximadamente 6,7 o superior. En algunos ejemplos, la composición tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, y de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunos ejemplos, la composición comprende al menos aproximadamente 4 mM de interruptor o al menos aproximadamente 10 mM de interruptor. En algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 4 a 40 mM o de aproximadamente 10 a 30 mM. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 4 mM a 40 mM, y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5. En algunos ejemplos, el interruptor está a una concentración de al menos aproximadamente 4 mM, y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5.

[0039] Con respecto a las secuencias en el presente documento que comprenden sustituyentes aminoácidos, como es evidente para un experto en la técnica, cada sustituyente aminoácido puede seleccionarse independientemente. En el presente documento se desvelan secuencias que comprenden sustituyentes aminoácidos en los que se eliminan uno o más de los sustituyentes aminoácidos.

[0040] Un contaminante patógeno que se inactivará en los procedimientos de la invención incluye cualquier agente que contiene ácido nucleico capaz de provocar una enfermedad en un ser humano, otros mamíferos, o vertebrados. El agente patogénico puede ser unicelular o multicelular. Ejemplos de patógenos son bacterias, virus, protozoos, hongos, levaduras, moldes, y micoplasmas que causan enfermedades en seres humanos, otros mamíferos, o vertebrados. El material genético del patógeno puede ser ADN o ARN, y el material genético puede estar presente en forma de ácido nucleico monocatenario o de cadena doble. La Tabla 1 enumera ejemplos de virus, y no pretende limitar la invención de ningún modo.

Tabla 1. Ejemplos no limitantes de virus

Familia:	Virus:
Adeno	Adenovirus 2
	Hepatitis Canina
Arena	Pichinde
	Lassa
Bunya	Turlock
	Encefalitis de California
Herpes	Herpes simple 1
	Herpes simple 2
	Citomegalovirus
	Pseudorabies
Orothomyxo	Influenza
Papova	SV-40
Paramyxo	Sarampión
	Paperas
	Parainfluenza 2 y 3
Picorna	Poliovirus 1 y 2
	Coxsackie A-9
	Echo 11
Pox	Vaccinia
	Viruela aviar
Reo	Lengua azul
	Fiebre por garrapatas de Colorado
Retro	VIH
	Sarcoma aviar
	Sarcoma murino
	Leucemia murina
Rhabdo	Virus de la estomatitis vesicular
Toga	Encefalitis equina del Oeste
	Dengue 2
	Dengue 4
	Encefalitis de San Luis
Hepadna	Hepatitis B
Bacteriófago	Lambda
	R17
	T2
(Rickettsia)	R. akari (rickettsialpox)

5 **[0041]** Además de inactivar posibles contaminantes patógenos, los procedimientos de la presente invención también inactivan leucocitos que pueden estar presentes en la composición de glóbulos rojos. Se usan procedimientos de leucorreducción para eliminar preferiblemente la mayoría de los leucocitos de las composiciones de glóbulos rojos diseñadas para infusión, puesto que pueden dar como resultado respuestas inmunes no deseadas en el receptor. Sin embargo, no toda la sangre se leucorreduce, o los procedimientos de leucorreducción no eliminan todos los leucocitos. Por lo tanto, la inactivación de cualquier leucocito residual mediante los procedimientos de la invención pueden reducir adicionalmente el riesgo de dichas respuestas inmunes.

10 **[0042]** Los procedimientos de la invención incluyen el uso *ex vivo* de un compuesto inactivador de patógenos y un

interruptor. El uso *ex vivo* implicar usar los compuestos para el tratamiento de una composición de glóbulos rojos, fuera de un ser humano, mamífero o vertebrado vivo, donde el material biológico tratado se pretende para su uso en el interior de un ser humano, mamífero o vertebrado vivo. Por ejemplo, la extracción de sangre de un ser humano, y la introducción de un compuesto en esa sangre para inactivar patógenos, se define como un uso *ex vivo* del compuesto si la sangre se pretende introducir de nuevo en ese ser humano u otro ser humano. La reintroducción de la sangre humana en este ser humano u otro ser humano será un uso *in vivo* de la sangre, a diferencia del uso *ex vivo* del compuesto. Si el compuesto aún está presente en la sangre cuando se introduce de nuevo en el ser humano, entonces el compuesto, además de un uso *ex vivo*, también se introduce *in vivo*. Algunas realizaciones de la presente invención implican el uso *ex vivo* de un interruptor, donde la composición de glóbulos rojos se pretende para su uso *in vivo*. En algunos casos, algo de nivel del interruptor permanece en la composición de glóbulos rojos de tal forma que el interruptor también se introduce *in vivo*. El uso *in vitro* de un material o compuesto implica un uso del material o compuesto fuera de un ser humano, mamífero o vertebrado vivo, donde el material o el compuesto no se pretende reintroducir en un ser humano, mamífero o vertebrado vivo. Un ejemplo de un uso *in vitro* será el análisis diagnóstico de componentes de una muestra de glóbulos rojos. Los procedimientos de la invención pueden aplicarse al uso *in vitro* de las composiciones de glóbulos rojos, ya que la modificación de los glóbulos rojos u otros constituyentes pueden realizar el análisis *in vitro* de los componentes de la muestra de sangre. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden proporcionar seguridad en el manejo de dichas muestras *in vitro* con una interrupción adecuada de las modificaciones de la muestra que, de otro modo, pueden interferir con el ensayo diagnóstico de la muestra.

[0043] Las composiciones de glóbulos rojos de la invención incluyen, pero sin limitación, cualquier producto sanguíneo que comprende glóbulos rojos, en las que el producto sanguíneo proporciona, o se procesa para proporcionar, glóbulos rojos adecuados para su uso humano, tal como para infusión. Las composiciones de glóbulos rojos incluyen, por ejemplo, sangre entera y concentrados de glóbulos rojos, tal como glóbulos rojos empaquetados. Las composiciones de glóbulos rojos pueden describirse por su hematocrito, un medida de la concentración de glóbulos rojos en la composición. Las composiciones de glóbulos rojos pueden tener un hematocrito en el intervalo de aproximadamente el 1 al 100%, más probablemente de aproximadamente el 10 al 90%, también de aproximadamente el 35 al 80%, o de aproximadamente el 40 al 70%. Dichas composiciones de glóbulos rojos pueden incluir productos químicos, tales como compuestos inactivadores de patógenos e interruptores. También pueden incluir tampones u otras soluciones, tales como soluciones de aditivos de glóbulos rojos, incluyendo sales o soluciones tamponadas. Cualquier composición de glóbulos rojos que entrará en contacto con, o se introducirá en, un ser humano, mamífero o vertebrado vivo, donde dicho contacto acarree el riesgo de transmitir una enfermedad debido a patógenos contaminantes, puede tratarse como se desvela en el presente documento.

[0044] La inactivación de patógenos implica transformar los patógenos en un material incapaz de reproducirse. La inactivación se expresa como el logaritmo negativo de la fracción de patógenos restantes capaces de reproducirse. Por lo tanto, si un compuesto a una determinada concentración transforma el 90% de los patógenos en un material incapaz de reproducirse, el 10% o un décimo (0,1) de los patógenos permanecerá capaz de reproducirse. El logaritmo negativo de 0,1 es 1, y se dice que esta concentración de compuesto tiene inactivados los patógenos presentes en 1 log. Como alternativa, se dice que el compuesto tiene 1 log de inactivación o reducción a esta concentración. La inactivación de casi el 1% o el 0,1% de los patógenos corresponderá a una reducción de 2 log o 3 log, respectivamente, de patógeno a esta concentración del compuesto. Se conocen bien procedimientos para determinar el nivel de un patógeno particular en un material tal como una composición que comprende glóbulos rojos, y se proporcionan ejemplos de dichos procedimientos en los ejemplos.

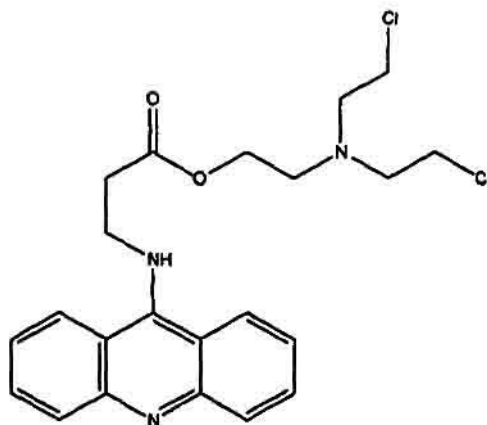
[0045] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, el tratamiento de la composición de glóbulos rojos dará como resultado una inactivación de al menos aproximadamente 1 log, al menos aproximadamente 2 log, o al menos aproximadamente 3 log de un contaminante patógeno, si está presente, en la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el patógeno es una bacteria, tal como *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens* o *Yersinia enterocolitica*. En algunas otras realizaciones, el patógeno es un virus, tal como el virus de la estomatitis vesicular. En otras realizaciones, el tratamiento de la composición de glóbulos rojos da como resultado una inactivación de al menos aproximadamente 1 log, al menos aproximadamente 2 log, o al menos aproximadamente 3 log de un contaminante patógeno en la composición.

[0046] La inactivación del patógeno en las composiciones de glóbulos rojos se realiza poniendo en contacto el patógeno en la composición de glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos. Los compuestos inactivadores de patógenos que pueden interrumpirse por los procedimientos de la invención incluyen compuestos que comprenden un grupo funcional que es, o que es capaz de formar y tiene formado, por ejemplo *in situ*, un grupo reactivo, tal como un grupo electrófilo. Los compuestos inactivadores de patógenos de la presente invención no requieren fotoactivación para ser reactivos. Por ejemplo, el grupo funcional puede ser un grupo de mostaza, un intermedio del grupo de mostaza, o un equivalente del grupo de mostaza, un epóxido, un formaldehído o un sintón de formaldehído. Dichos grupos funcionales son capaces de formar *in situ* un grupo reactivo, tal como una aziridina electrófila, aziridinio, tiirano o tiirano hierro. Un grupo de mostaza puede ser un grupo mono- o bis-(haloetil)amina o un grupo mono (haloetil)sulfuro. Un equivalente de mostaza es un grupo que reacciona mediante un mecanismo

similar a las mostazas, por ejemplo, formando intermedios reactivos, tales como aziridinio y grupos de aziridina o tiirano y grupos de tiirano. Los ejemplos incluyen derivados de aziridina, grupos mono o bis-(mesiletil)amina, grupos mono-(mesiletil)sulfuro, grupos mono o bis-(tosiletil)amina y grupo mono-(tosiletil)sulfuro. Un sintón de formaldehído es cualquier compuesto que se descompone en un formaldehído, que incluye una hidroxilamina, tal como hidroximetilglicina. El grupo reactivo del compuesto inactivador de patógenos es capaz de reaccionar con los ácidos nucleicos de los patógenos, por ejemplo, con grupos nucleófilos en el ácido nucleico. El grupo reactivo también es capaz de reaccionar con un grupo nucleófilo del interruptor. Los compuestos inactivadores de patógenos también pueden incluir un componente que dirige el compuesto a ácidos nucleicos, tal como una porción de anclaje. La porción de anclaje comprende un resto que es capaz de unirse no covalentemente a un biopolímero de ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y también se denomina como un ligando de unión a ácido nucleico, un grupo de unión a ácido nucleico, o un resto de unión a ácido nucleico. Se describen ejemplos de dichos componentes en las patentes de Estados Unidos 5.691.132, 6.410.219, 6.136.586, 6.617.157 y 6.709.810. Otra clase de compuestos inactivadores de patógenos que pueden interrumpirse mediante los procedimientos de la invención comprenden los grupos reactivos que se han mencionado anteriormente unidos a un grupo de unión a ácido nucleico a través de un enlazador hidrolizable, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.514.987. La porción de anclaje de los compuestos inactivadores de patógenos tiene una afinidad para ácidos nucleicos. Esta afinidad puede deberse a cualquiera de varios modos de unión al ácido nucleico no covalentemente, incluyendo, pero sin limitación, intercalación, unión de surco menor, unión de surco mayor, unión electrostática (es decir, unión de estructura de fosfato), y unión específica de secuencia. Pueden encontrarse ejemplos detallados de dichos restos de unión a ácido nucleico en las patentes que se han mencionado anteriormente.

[0047] En algunos ejemplos de cada uno de los procedimientos, composiciones y kits que se describen en el presente documento, el compuesto inactivador de patógenos comprende un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo reactivo que reacciona con el nucleófilo del interruptor seleccionado. En algunos ejemplos, el grupo inactivador de patógenos comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma un grupo electrófilo.

[0048] El compuesto inactivador de patógenos para su uso en la presente invención es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster (como alternativa, también denominado en el presente documento como "PIC-1" o "S-303"), cuya estructura es como se indica a continuación, incluyendo sales del mismo.



[0049] En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos, tal como PIC-1, en la mezcla con la composición de glóbulos rojos y el interruptor está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mM a 4 mM, de aproximadamente 0,05 mM a 2 mM, de aproximadamente 0,05 mM a 0,5 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a 0,3 mM. La proporción molar de interruptor con respecto al compuesto de inactivación de patógenos, una vez que ambos componentes se han mezclado con la composición de glóbulos rojos, es de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 200:1, también de aproximadamente 100:1.

[0050] Los interruptores para su uso en los procedimientos de la presente invención presenten reducir reacciones secundarias no deseadas de las especies electrófilas reactivas usadas para inactivar patógenos. Los interruptores adecuados comprenden un grupo nucleófilo que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo del compuesto inactivador de patógenos, y se describen en detalle en la patente de Estados Unidos número 6.709.810. Los interruptores son capaces de reducir de forma significativa las reacciones secundarias no deseadas en una composición de glóbulos rojos al mismo tiempo que permiten que el compuesto inactivador de patógenos inactive suficientemente un patógeno que pueda estar contaminando la composición de glóbulos rojos. Los procedimientos mejorados de la presente invención proporcionan una cantidad eficaz de interruptor en combinación con una cantidad eficaz de compuesto inactivador de patógenos en condiciones que proporcionan una reducción óptima de las reacciones secundarias no deseadas combinada con una inactivación suficiente de patógenos. Puede reducirse

una diversidad de reacciones secundarias no deseadas, tal como una reacción con proteínas y componentes de los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el interruptor proporciona una reducción óptima de la modificación de los glóbulos rojos, tal como la unión de IgG a los glóbulos rojos o la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos. Aunque los procedimientos de la invención implican el tratamiento *ex vivo* de las composiciones de glóbulos rojos, una pequeña cantidad de interruptor permanece en la composición tras la introducción en un individuo. Como tales, los interruptores de la invención tienen que ser adecuados para infusión. Los interruptores adecuados, incluyen, pero sin limitación, compuestos que comprenden un grupo tiol, tales como interruptores que comprenden la cisteína aminoacídica o un derivado adecuado de cisteína, tal como N-acetil cisteína. Los ejemplos de dichos interruptores incluyen cisteína y péptidos que comprenden al menos una cisteína, tal como glutatión. En algunas realizaciones, los interruptores adecuados comprenden un derivado de cisteína que puede formar un grupo tiol *in situ*, con o sin el uso de productos químicos adicionales o enzimas añadidas, tal como S-acetil cisteína u otro tiol adecuado derivado de profármacos de cisteína, o péptidos que comprenden S-acetil cisteína u otro tiol adecuado derivado de profármacos de cisteína. Los derivados adecuados de cisteína son aquellos que comprenden; o son capaces de formar *in situ*, un cisteinil tiol que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo del compuesto inactivador de patógenos.

[0051] Generalmente, debido a la dirección del compuesto inactivador de patógenos a los ácidos nucleicos, una cantidad suficiente de compuesto inactivador de patógenos es capaz de penetrar en el patógeno y reaccionar con el ácido nucleico patogénico antes de que se interrumpa. Sin embargo, el compuesto inactivador de patógenos que queda en el entorno extracelular se interrumpe de forma adecuada para reducir las reacciones secundarias no deseadas. Por lo tanto, se proporciona una cantidad eficaz de interruptor en combinación con una cantidad eficaz de compuesto inactivador de patógenos mediante los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, el interruptor es capaz de interrumpir reacciones secundarias no deseadas en el entorno extracelular de la composición de glóbulos rojos, pero no entra de forma significativa en las células, tal como los glóbulos rojos, virus y bacterias. Como tal, la cantidad eficaz de compuesto inactivador de patógenos puede proporcionarse de manera que suficiente compuesto inactivador de patógenos penetre en el patógeno antes de que este se interrumpa en el entorno extracelular. En algunas realizaciones, el interruptor comprende cisteína o un derivado adecuado de cisteína y no penetra de forma significativa en un patógeno, tal como un virus o una bacteria. Dichos interruptores incluyen péptidos en los que al menos uno de los aminoácidos es cisteína, N-acetil cisteína, S-acetil cisteína, u otro derivado adecuado de cisteína. En algunas realizaciones, el interruptor comprende un péptido (por ejemplo, 2-10 aminoácidos) que comprende cisteína.

[0052] El interruptor es glutatión (también conocido como L-glutatión y γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina).

[0053] En algunas realizaciones, el interruptor es glutatión en su forma reducida. También puede usarse disulfuro de glutatión, la forma oxidada de glutatión, siempre que el disulfuro de glutatión se reduzca lo suficiente en la solución antes de la adición de la solución a la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, o se reduzca lo suficiente después de la adición a la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos.

[0054] En algunas realizaciones, el interruptor es un derivado de glutatión, tal como un éster monoalquílico o éster dialquílico de glutatión, en el que el grupo alquilo es un grupo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo, un grupo neopentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo 1-metilbutilo, un grupo hexilo, un grupo isohexilo, un grupo 2-metilpentilo, un grupo 1-etilbutilo, un grupo heptilo, un grupo octilo, un grupo nonilo y un grupo decilo. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de derivados de glutatión incluyen éster metílico de glutatión, éster monoetilico de glutatión y éster monoisopropílico de glutatión. En algunas realizaciones, se usa éter dietílico de glutatión oxidado (GSSG-(glicil)-dietil-éster). En algunas realizaciones, se hidroliza un tioéster de glutatión después de la adición a las composiciones de glóbulos rojos para formar el tiol.

[0055] Se entiende que en algunas realizaciones, el interruptor se proporcionará en forma de un ácido o base libre, mientras que, en otras realizaciones, el interruptor se proporcionará en forma de una sal. Si el interruptor está en forma de una sal, la sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos (en forma de productos solubles en agua o aceite o dispersables) incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forma, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicas u orgánicas. Los ejemplos de dichas sales de adición de ácidos incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanesulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales sódicas y potásicas, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales cálcicas y magnésicas, sales con bases orgánicas, tales como sales dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina, y así sucesivamente. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con dichos agentes en forma de haluros de alquilo inferior, tales

como cloruro, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluye la sal sulfato etanolato y sales sulfato.

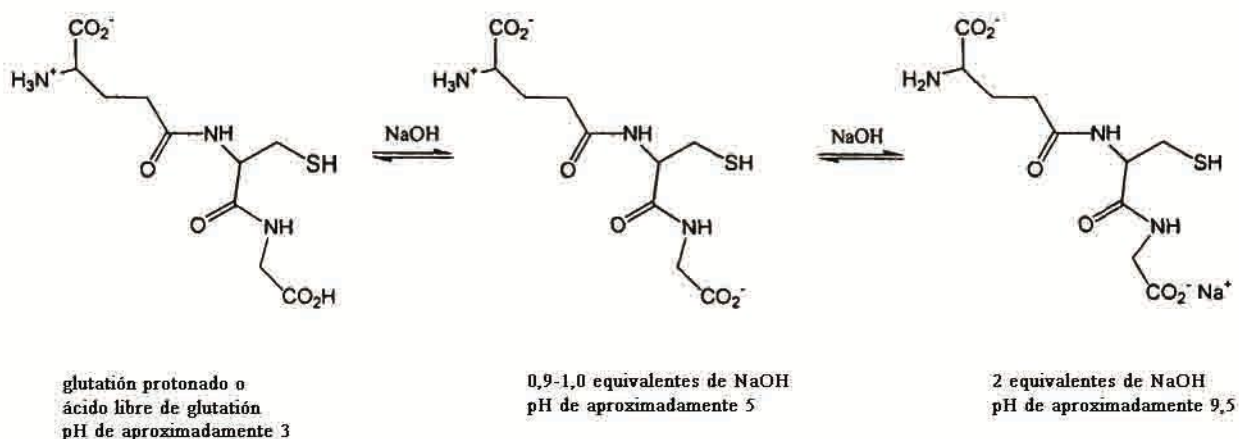
[0056] Por ejemplo, en algunas realizaciones, el interruptor está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable formada de glutatión. En algunas realizaciones, el interruptor está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable formada de glutatión y uno o más cationes, tales como sodio, aluminio, calcio, litio, magnesio, cinc o tetrametilamonio. En algunas realizaciones, el interruptor es glutatión (reducido) y se proporciona en forma de sal monosódica de glutatión (disponible, por ejemplo, en Biomedica Foscama, Italia). En algunas otras realizaciones, el glutatión (reducido) se proporciona en forma de sal clorhidrato de glutatión. En algunas otras realizaciones, el glutatión se proporciona en forma de una sal disódica de glutatión (reducido). En realizaciones adicionales, se usa un sulfato de éster monoalquílico de glutatión. En algunas realizaciones, se proporciona el glutatión en forma de la sal disódica de glutatión oxidada.

[0057] En algunas realizaciones, el interruptor se mezcla con la composición de glóbulos rojos y/o el compuesto inactivador de patógenos en forma pura. En algunas realizaciones, el interruptor que se mezcla con la composición de glóbulos rojos y/o el compuesto inactivador de patógenos está en una solución acuosa. En algunas realizaciones, el interruptor es un interruptor neutralizado en solución acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el interruptor puede ser un compuesto ácido en solución acuosa al que se le ha añadido al menos un equivalente (por ejemplo, aproximadamente uno o dos equivalentes) de base.

[0058] Los procedimientos de interrupción de la presente invención implican la combinación de una composición de glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos y un interruptor en condiciones en las que, tras la mezcla de la composición con el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor, el pH de la composiciones resultante está en un intervalo adecuado para proporcionar una inactivación patogénica adecuada con una reducción mejorada de las reacciones secundarias no deseadas, tal como la modificación de los glóbulos rojos. Los procedimientos mejorados incluyen tres características que pueden ser importante para los procedimientos de interrupción. La primera característica es el grupo tiol, u otro grupo nucleófilo adecuado. La segunda es el ajuste del pH de la solución. Es posible proporcionar algo de nivel de interrupción tan solo ajustando de forma adecuada el pH de la solución. Como tal, los interruptores de la invención proporcionan alguna capacidad tamponante a la composición que comprende glóbulos rojos, donde la propia capacidad tamponante proporciona una interrupción mejorada. Por ejemplo, usando un análogo de cisteína, tal como metionina como un interruptor, cuando se modifica apropiadamente para proporcionar un cambio de pH adecuado en la composición de glóbulos rojos, dará como resultado algo de nivel de interrupción de la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos. Puesto que el átomo de azufre en la metionina no es nucleófilo, la metionina no proporciona interrupción alguna distinta de proporcionar el pH necesario de la solución. Por lo tanto, la combinación del ajuste de pH y un grupo tiol proporciona una mejora adicional para los procedimientos de interrupción de la invención. Una tercera característica que puede ser importante para proporcionar una interrupción mejorada en algunas realizaciones son los interruptores preferidos que no penetran sustancialmente en el interior de los patógenos, tales como virus o bacterias. Dichos interruptores proporcionan una interrupción adecuada en el entorno extracelular, donde se produce reacciones perjudiciales, tales como la unión a la superficie de los glóbulos rojos, sin la interrupción adicional del compuesto inactivador de patógenos una vez que ha penetrado en el interior del patógeno.

[0059] Con respecto a la característica de ajustar el pH de la composición de glóbulos rojos, los procedimientos existentes de interrupción de dichos compuestos inactivadores de patógenos no reconocen la importancia del pH de la mezcla resultante. Aunque se ha demostrado en los procedimientos conocidos que una cantidad mayor de interruptor proporciona una inactivación patogénica adecuada, estos procedimientos no describen de forma adecuada los efectos en la modificación de los glóbulos rojos cuando se usa una cantidad mayor de interruptores, tal como glutatión protonado. Como demuestran los ejemplos en el presente documento, el uso de mayores cantidades de interruptores, tales como glutatión ácido, no reducen de forma adecuada el nivel de modificación de los glóbulos rojos. Puesto que el glutatión es ácido, los niveles más altos llevan al pH de la composición de glóbulos rojos a niveles inaceptablemente bajos, en los que la interrupción de las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos es ineficaz. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención implica asegurar que el pH de la composición de glóbulos rojos se mantiene a un nivel adecuado tras la adición del compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. En algunas realizaciones, tras mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor con la composición de glóbulos rojos, el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. Aunque el pH en una composición de glóbulos rojos puede cambiar con el tiempo, es deseable que el pH esté en un intervalo deseado cuando el interruptor se añade a la composición de glóbulos rojos, contenga ya o no el compuesto inactivador de patógenos. Los procedimientos de la presente invención implican añadir el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor a una composición de glóbulos rojos. El intervalo de pH deseado es necesario tras la adición de tanto el compuesto inactivador de patógenos como del interruptor independientemente del orden de adición del compuesto inactivador de patógenos y/o el interruptor a la composición de glóbulos rojos. En otras palabras, una vez que los tres componentes se han mezclado, el pH está dentro del

intervalo deseado. En algunas realizaciones, interruptor se añade antes del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos se añade antes del interruptor. En algunas realizaciones, el interruptor y el compuesto inactivador de patógenos se añaden básicamente de forma simultánea. Por lo tanto, tras la adición del compuesto inactivador de patógenos y el interruptor se refiere al momento en el que tanto el interruptor como el compuesto inactivador de patógenos se han mezclado con la composición de glóbulos rojos. El pH deseado puede conseguirse mediante varios medios, y no se limita a cuando el pH de la composición de glóbulos rojos se ajusta, o en algunas realizaciones no se ajusta significativamente a partir del pH natural del producto sanguíneo. Por ejemplo, el pH deseado de la composición de glóbulos rojos puede conseguirse ajustando el pH. El ajuste del pH puede hacerse, por ejemplo, mediante la adición de una solución de aditivos adecuada, tal como una solución tamponante, antes de añadir el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. En algunas realizaciones, la composición de glóbulos rojos puede lavarse una o más veces con un tampón adecuado antes de la suspensión en el mismo u otro tampón adecuado. Como alternativa, el pH de la composición de glóbulos rojos puede ajustarse de forma simultánea con la adición del compuesto inactivador de patógenos, el interruptor, o ambos. En algunas realizaciones, el pH se ajusta simultáneamente con la adición del interruptor. En una realización preferida, el interruptor está neutralizado, de tal forma que la adición del interruptor neutralizado proporciona el intervalo de pH deseado en la composición de glóbulos rojos. Como un ejemplo, la neutralización de glutatión puede usarse para realizar los ajustes del pH necesarios. Puesto que el glutatión comprende ácido glutámico, el pH de la forma protonada el ácido. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la neutralización probable del glutatión protonado se muestra en el siguiente esquema:



Como tal, puede usarse un nivel apropiado de neutralización del glutatión, por ejemplo mediante la adición de 2 equivalentes de base, para proporcionar un interruptor que, tras la adición a una composición de glóbulos rojos, proporcionará el ajuste del pH necesario de la composición. La neutralización apropiada dependerá del interruptor usado. Por ejemplo, cuando se usa un péptido, dependerá de los componentes aminoácidos del péptido. En algunas realizaciones, puede usarse un interruptor que no afecte de forma significativa al pH de la composición de glóbulos rojos. Por ejemplo, el uso de un péptido que comprende una cisteína que puede comprender adicionalmente uno o más aminoácidos que dan como resultado un pH más neutro para una solución del péptido aislado de forma natural. En algunas realizaciones, el péptido comprende adicionalmente al menos un aminoácido básico, tal como arginina o lisina.

[0060] En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento donde una base se mezcla con la composición de glóbulos rojos junto con el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor para aumentar el pH de la mezcla a un nivel deseado y/o para mejorar la interrupción de las reacciones secundarias no deseadas, la base es una sal básica. En primer lugar, la sal básica puede disolverse en una solución acuosa antes de mezclarla con la composición de glóbulos rojos, o puede añadirse directamente a la composición de glóbulos rojos en forma sólida. En algunas realizaciones, la sal básica comprende el interruptor y proporciona tanto el interruptor como la base a la mezcla. En algunas realizaciones, la base usada en el procedimiento es una base fuerte, tal como NaOH. Típicamente, una base fuerte como NaOH se disolverá en primer lugar en una solución acuosa antes de la mezcla con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base fuerte (en solución o en forma sólida) se mezcla con el interruptor antes de mezclar el interruptor con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base es un tampón básico (añadido en cantidad suficiente y que tiene un pKa apropiado para llevar la mezcla hasta el intervalo de pH deseado). Si se usa un tampón básico, el tampón, en algunas realizaciones, será un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el tampón tendrá un protón determinado por titulación con un pKa en el intervalo de aproximadamente 7 a 8. Los ejemplos de tampones que pueden usarse como tampones básicos incluyen, pero sin limitación, ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), solución salina tamponada con fosfato (PBS), y tampón fosfato sódico. Otros tampones básicos adecuados podrán identificarse fácilmente por un experto en la técnica.

5 [0061] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el interruptor, el compuesto inactivador de patógenos, y cualquier base añadida es mayor de aproximadamente 6,7, mayor de aproximadamente 7,0, o mayor de aproximadamente 7,2. En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el interruptor, el compuesto inactivador de patógenos y la base (si se añade cualquiera) está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunas realizaciones preferidas, el pH indicado es el pH a temperatura ambiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición que comprende los glóbulos rojos se trata con el compuesto inactivador de patógenos en presencia del interruptor y cualquier base añadida, donde el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 8,0.

15 [0062] En algunas realizaciones, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el interruptor y la base (si la base se añade como parte del procedimiento) está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, de aproximadamente 7,0 a 8,5, de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0, antes de la mezcla del compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunas otras realizaciones, el pH se consigue al mismo tiempo que o en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 30 minutos, en aproximadamente 20 minutos, en aproximadamente 10 minutos, en aproximadamente 5 minutos, o en aproximadamente 2 minutos de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición que comprende los glóbulos rojos. En algunas realizaciones de los procedimientos en los que se ajusta el pH, el pH se ajusta al intervalo de pH deseado antes de, al mismo tiempo que, en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 30 minutos, en aproximadamente 20 minutos, en aproximadamente 10 minutos, en aproximadamente 5 minutos, o en aproximadamente 2 minutos de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición que comprende los glóbulos rojos. En aquellas realizaciones, en las que el interruptor es glutatión y el compuesto inactivador de patógenos es PIC-1, el pH de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos y el interruptor se ajusta preferiblemente al intervalo de pH deseado (por ejemplo pH 7,2 a 8,0) antes de mezclar el PIC-1 con la composición de glóbulos rojos.

30 [0063] En algunas realizaciones, el pH resultante de la composición final no es necesariamente un ajuste del pH de la composición de glóbulos rojos de partida. Por ejemplo, una composición de glóbulos rojos puede tener un pH en el intervalo deseado de 6,8-8,5, y el pH de la composición no cambia significativamente en la adición del interruptor, y posteriormente el compuesto inactivador de patógenos. En dichas realizaciones, el interruptor proporciona de forma natural el pH deseado, o se neutraliza de la forma correspondiente para proporcionar el pH deseado. Es la combinación de añadir altas cantidades de interruptor, tal como aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, con un pH resultante en el intervalo deseado que es importante. Los procedimientos conocidos que usan dichas concentraciones de glutatión, por ejemplo, no se han usado con el intervalo de pH deseado de la presente invención. Por lo tanto, para los péptidos, independientemente del interruptor peptídico, puede neutralizarse de forma eficaz según sea necesario para proporcionar un intervalo de pH adecuado cuando se añade a una composición de glóbulos rojos, y adicionalmente puede seleccionarse para proporcionar una cantidad adecuada de tamponante en el intervalo de pH deseado. Como tal, un interruptor neutralizado significa que el interruptor se titula adecuadamente con ácido o base según sea necesario, de tal forma que en la adición a una composición de glóbulos rojos, la mezcla resultante tenga un pH que proporcione una mejor interrupción de las reacciones secundarias no deseadas, tal como un pH en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunas realizaciones, el péptido en forma aislada de forma natural se neutraliza adecuadamente, es decir, no requiere la adición de ácido o base para proporcionar el pH deseado en la mezcla final. Adicionalmente, los interruptores preferidos proporcionarán una capacidad tamponante para mantener el pH en el intervalo deseado durante el tiempo necesario para interrumpir las reacciones secundarias no deseadas.

50 [0064] El interruptor se neutraliza. Se dice que un interruptor está "neutralizado" por una base, si se ha combinado una cantidad suficiente de la base con el interruptor, de tal forma que la interrupción de una reacción secundaria no deseada entre el compuesto inactivador de patógenos y los glóbulos rojos se mejora en una mezcla que comprende la composición que comprende los glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. Un "interruptor neutralizado" no tiene necesariamente un pH neutro. En algunas realizaciones, cuando el interruptor es muy ácido, el pH del interruptor neutralizado todavía puede ser menor de 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la solución del interruptor neutralizado puede ser mayor de 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la solución del interruptor neutralizado será detectablemente mayor que el del interruptor antes de la adición de la base. El interruptor se neutraliza con al menos aproximadamente 0,5 equivalentes, de una base. En algunas realizaciones, el interruptor se neutraliza con aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes de base. En algunas realizaciones, el interruptor se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de base. En otras realizaciones, el interruptor se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de base. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, el glutatión se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de una base adecuada, tal como hidróxido sódico. En este caso, una solución del glutatión protonado tiene un pH de aproximadamente 3, mientras que la solución neutralizada con 2 equivalentes de hidróxido sódico tiene un pH de aproximadamente 9,5. Cualquier interruptor peptídico apropiado que comprende al menos una cisteína puede ajustarse de forma adecuada para proporcionar el pH deseado tras la adición a la composición de glóbulos rojos. Además de proporcionar un

interruptor que tenga un pH ajustado de forma adecuada o esté neutralizado, en algunas realizaciones, los interruptores preferidos no son capaces de entrar de forma significativa en los patógenos, de tal forma que interrumpen de forma óptima las reacciones no deseadas en el entorno extracelular, pero no interfieren con la inactivación patogénica una vez que el compuesto inactivador de patógenos ha entrado en el interior del patógeno.

5
[0065] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento, el interruptor es un compuesto ácido. En algunas realizaciones, el interruptor se proporciona en la forma de ácido libre. En algunas realizaciones, el interruptor es ácido y se añade al menos aproximadamente 1 equivalente de base para neutralizar el interruptor. Una solución que comprende un interruptor neutralizado de este tipo, en algunos casos, puede ser básico, neutro o incluso ácido. En algunas realizaciones, se añade aproximadamente 1 equivalente de base para neutralizar el interruptor. En algunas realizaciones, se añaden aproximadamente 2 equivalentes de base. En algunas realizaciones, el interruptor es ácido y se usan de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes de base para neutralizar el interruptor. En algunas realizaciones, se usan aproximadamente 1 o aproximadamente 2 equivalentes de base.

15
[0066] En algunas realizaciones, el interruptor se neutraliza antes de la adición a la composición de glóbulos rojos y/o el compuesto inactivador de patógenos. En otras realizaciones, el interruptor se neutraliza después de combinar el interruptor con la composición de glóbulos rojos y/o el compuesto inactivador de patógenos.

20
[0067] En algunas realizaciones, el interruptor es glutatión y se proporciona en forma de sal monosódica de glutatión y se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de base. En algunas otras realizaciones, el interruptor es glutatión y se proporciona en forma de sal clorhidrato de glutatión y se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de base.

25
[0068] En algunas realizaciones, la concentración del interruptor en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el interruptor, el compuesto inactivador de patógenos, y cualquier base añadida es mayor de 2 mM, mayor de aproximadamente 4 mM, o mayor de aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de interruptor en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 100 mM, de aproximadamente 2 mM a 40 mM, de aproximadamente 4 mM a 40 mM, de aproximadamente 5 mM a 40 mM, de aproximadamente 5 mM a 30 mM, o de aproximadamente 10 mM a 30 mM. En algunas realizaciones, la concentración de interruptor en la mezcla es de aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, la concentración de interruptor en la mezcla es mayor de 2 mM, mayor de aproximadamente 4 mM, o mayor de aproximadamente 10 mM, y el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el interruptor y la concentración del compuesto inactivador de patógenos es mayor de aproximadamente 6,7, mayor de aproximadamente 7,0, o mayor de aproximadamente 7,2. En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, en algunas realizaciones, la concentración del interruptor en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 40 mM, de aproximadamente 4 mM a 40 mM, de aproximadamente 5 mM a 40 mM, de aproximadamente 5 mM a 30 mM, o de aproximadamente 10 mM a 30 mM, y el pH de la mezcla de glóbulos rojos, interruptor, y el compuesto inactivador de patógenos está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, la concentración de interruptor en la mezcla es mayor de 2 mM, mayor de aproximadamente 4 mM, o mayor de aproximadamente 10 mM, y el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el interruptor y el compuesto inactivador de patógenos está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5, también de aproximadamente 7,0 a 8,5, también de aproximadamente 7,2 a 8,5, o de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunas realizaciones, la concentración de interruptor (por ejemplo glutatión) en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 40 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0. En algunas realizaciones, la concentración de interruptor en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,8 a 8,5.

50
[0069] El interruptor es glutatión neutralizado. El glutatión tiene muchas propiedades que lo hacen particularmente útil como un interruptor. Normalmente está presente en todos los tipos de células. No se cree que sea capaz de penetrar pasivamente en un patógeno, tal como pasando a través de las membranas celulares o recubrimientos lipídicos, de bacterias y virus con envoltura lipídica, o pasando a través de la cápside vírica de virus sin envoltura. A un pH de 7, el glutatión se carga y en ausencia de transporte activo no penetra en las bicapas lipídicas a una medida significativa. Esto es coherente con la inactivación de virus con envoltura lipídica, tales como el VIH y el VSV que no se ven afectados sustancialmente por el glutatión, incluyendo el uso de concentraciones de glutatión neutralizado mayores de 2 mM. El uso de glutatión tiene algún efecto en la inactivación de *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus epidermidis* y *Serratia marcescens*. Sin embargo, esto puede manejarse mediante el uso de cantidades eficaces de glutatión neutralizado y el compuesto inactivador de patógenos. Como tal, los procedimientos preferidos de interrupción se proporcionan cuando la contaminación de una composición de glóbulos rojos por un patógeno vírico o bacteriano se inactiva en al menos 2 log, preferiblemente al menos 3 log. En algunas realizaciones, *Staphylococcus epidermidis* puede inactivarse en hasta al menos 3 log, también aproximadamente 4 log, o aproximadamente 5 log y el VSV puede inactivarse en hasta al menos 4 log, también aproximadamente 5 log, o

aproximadamente 6 log. Además, la inactivación es de aproximadamente 3 log, también de aproximadamente 2 log, preferiblemente aproximadamente 1 log la del tratamiento convencional de la composición de glóbulos rojos con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM. En algunas realizaciones, la inactivación de *Staphylococcus epidermidis* con PIC-1 está dentro de aproximadamente 3 log, también aproximadamente 2 log, o aproximadamente 1 log la de una composición similar inactivada con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM. En algunas realizaciones, la inactivación del VSV con PIC-1 está dentro de aproximadamente 2 log, o aproximadamente 1 log, o básicamente igual a la de una composición similar inactivada con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM. El glutatión también es compatible con el almacenamiento *in vitro* de glóbulos rojos y la composición de glóbulos rojos resultante es adecuada para introducción *in vivo*.

[0070] Serán evidentes procedimientos apropiados para neutralizar glutatión y otros interruptores para los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se usa hidróxido sódico para neutralizar el interruptor. En algunas realizaciones, en primer lugar se disuelven gránulos sólidos de NaOH en agua para generar una solución concentrada de la base, tal como una solución de NaOH 1 N, 5 N, 10 N o 20 N. En algunas realizaciones, después se añade una cantidad apropiada de esa solución de NaOH al interruptor antes de, al mismo tiempo que, o después de la adición del interruptor a la mezcla. Como alternativa, el NaOH se añade a la composición de glóbulos rojos o el compuesto inactivador de patógenos, o la combinación de los dos, antes de la adición del interruptor a la mezcla.

[0071] El interruptor y/o la base añadida (o el interruptor neutralizado) usados en los procedimientos descritos en el presente documento, pueden mezclarse con la composición de glóbulos rojos antes de, al mismo tiempo que, o después de la adición del compuesto inactivador de patógenos a la composición de glóbulos rojos. Si el interruptor y la base (o el interruptor neutralizado) se mezclan con la composición de glóbulos rojos después de que la solución de inactivación de patógenos se mezcle con la composición de glóbulos rojos, el interruptor y/o la base (o el interruptor neutralizado) se añaden preferiblemente a la composición de glóbulos rojos antes de que tenga lugar una cantidad significativa de reacción secundaria del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos, de manera que pueda conseguirse una interrupción adecuada de la reacción secundaria no deseada. En algunas realizaciones, el interruptor y/o la base (o el interruptor neutralizado) se mezclan con la composición de glóbulos rojos en aproximadamente una hora, en aproximadamente 30 minutos, en aproximadamente 20 minutos, en aproximadamente 10 minutos, en aproximadamente 5 minutos, en aproximadamente 2 minutos, o en aproximadamente 1 minuto después de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el interruptor y/o la base (o el interruptor neutralizado) se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando se usan glutatión neutralizado y PIC-1 en los procedimientos, el glutatión neutralizado se mezcla con los glóbulos rojos antes de, al mismo tiempo que, o en aproximadamente 10 minutos después de mezclar el PIC-1 con la composición de glóbulos rojos.

[0072] En algunas realizaciones, el interruptor y/o la base (o el interruptor neutralizado) se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos.

[0073] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento, el interruptor y la base añadida (o el interruptor neutralizado) se incuban con la composición de glóbulos rojos durante un intervalo de tiempo adecuado antes de la adición del compuesto inactivador de patógenos, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 24 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas. En algunas realizaciones adicionales, la incubación está en un intervalo de temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente.

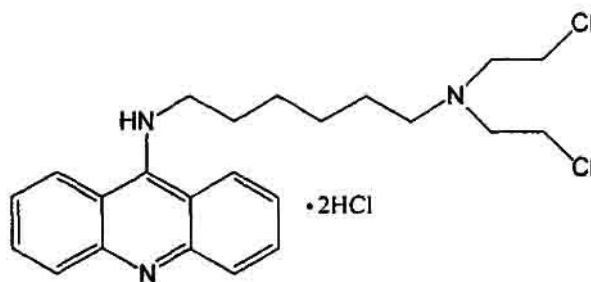
[0074] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento, el compuesto inactivador de patógenos se incuban con la composición de glóbulos rojos en presencia del interruptor y la base añadida (o el interruptor neutralizado) durante un intervalo de tiempo adecuado, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 24 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas. En algunas realizaciones adicionales, la incubación está en un intervalo de temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente.

[0075] Además de comparar la inactivación logarítmica como se ha analizado anteriormente, la eficacia de los procedimientos de interrupción mejorados puede evaluarse mediante varios procedimientos diferentes. Los procedimientos de interrupción pueden examinarse evaluando la modificación de la composición de glóbulos rojos, tanto en cuanto la función de los glóbulos rojos, como en cuanto a la reactividad de los glóbulos rojos tratados con el sistema inmune, tal como con anticuerpos. Si la composición de glóbulos rojos tratados está prevista para su uso en humanos, tal como infusión, los procedimientos de interrupción no deben dañar sustancialmente la función de los glóbulos rojos. La carencia de un efecto sustancialmente dañino en la función de los glóbulos rojos puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica para ensayar la función de los glóbulos rojos. Por ejemplo, los niveles de indicadores, tales como el ATP intracelular (adenosina 5'-trifosfato), 2,3-DPG intracelular (2,3-

difosfoglicerol) o el potasio extracelular pueden medirse y compararse con un control no tratado. Adicionalmente, pueden medirse la hemólisis, el pH intracelular y extracelular, el hematocrito, la hemoglobina, la fragilidad osmótica, el consumo de glucosa y la producción de lactato. Los procedimientos mejorados de la presente invención pueden compararse con la condición convencional del glutatión ácido 2 mM en combinación con PIC-1 0,2 mM, así como condiciones con glutatión en aumento, donde los procedimientos conocidos utilizan glutatión ácido, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.709.810. Aunque el aumento de la concentración de glutatión en los procedimientos de la invención puede dar como resultado una ligera reducción del nivel de inactivación de algunos patógenos, todavía se obtienen niveles adecuados de inactivación, y la reducción mejorada de la modificación de los glóbulos rojos, al mismo tiempo que mantiene una función adecuada de los glóbulos rojos, da como resultado un mejor producto total.

[0076] Están disponibles en la técnica procedimientos para determinar el ATP, 2,3-DPG, glucosa, hemoglobina, hemólisis y potasio. Véase, por ejemplo, Davey y col., *Transfusion*, 32: 525-528 (1992). También se describen procedimientos para determinar la función de los glóbulos rojos en Greenwalt y col., *Vox Sang*, 58: 94-99 (1990); Hogman y col., *Vox Sang*, 65: 271-278 (1993); y Beutler y col., *Blood*, Vol. 59 (1982). Por ejemplo, el ATP intracelular y el 2,3-DPG intracelular se miden usando un kit de ATP de Sigma o un kit de 2,3-DPG (Sigma, St. Louis, Mo.). El kit de ATP se usa siguiendo el procedimiento Sigma N° 366-JV. Los niveles de potasio extracelular pueden medirse usando un analizador Ciba Coming modelo 614 K^+/Na^+ (Ciba Coming Diagnostics Corp., Medford, MA). El pH extracelular se mide centrifugando las células a 4 °C durante 15 minutos a 12.000 x g y eliminando el sobrenadante, para lo cual el pH se mide usando un medidor de pH convencional a temperatura ambiente (por ejemplo, Beckman, electrodo de calomelanos de epoxi (*Epoxy Calomel electrode*)). Para el pH intracelular, el gránulo restante se tapa en el tubo de centrifuga y se almacena a aproximadamente -80 °C durante al menos 2 horas. Después, se lisa mediante la adición de agua desionizada. La muestra lisada se mezcla bien y el pH de la solución se mide a temperatura ambiente usando un medidor de pH convencional o a temperatura ambiente usando un analizador de gases en sangre Ciba Coming Modelo 238 (Ciba Coming Diagnostics Corp., Medford, MA). Las mediciones pueden realizarse poco después del tratamiento y en función del almacenamiento después del tratamiento, por ejemplo un almacenamiento de hasta 42 días. Los procedimientos de la presente invención proporcionan una composición de glóbulos rojos en la que la hemólisis de los glóbulos rojos tratados es menor del 3% después de 28 días de almacenamiento, más preferiblemente menor del 2% después de 42 días de almacenamiento, y mucho más preferiblemente menor del 0,1% a aproximadamente el 1% después de 42 días de almacenamiento a 4 °C. Los procedimientos preferidos proporcionan una composición de glóbulos rojos en la que el nivel de ATP intracelular es mayor que el de una composición similar tratada con la condición convencional del glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM. En algunas realizaciones, los procedimientos de interrupción de la presente invención proporcionan niveles de ATP que son aproximadamente el 20%, también el 30%, también el 40% o aproximadamente el 50% mayores que una composición tratada con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM, en la que el nivel más alto de ATP se mantiene después de 7, 14, 21, 28, 35 ó 42 días de almacenamiento.

[0077] La reducción en la modificación de los glóbulos rojos en los procedimientos de la presente invención puede evaluarse mediante varios ensayos. En un ensayo, se produce suero policlonal de conejo que es reactivo con acridina, inyectando conejos blancos New Zealand con un compuesto de acridina conjugado con KLH. Se usó el compuesto de acridina S-197 y tiene la siguiente estructura:



Éste se conjuga con KLH añadiendo 10 µl del compuesto (10 mM en agua desionizada) a 990 µl de una solución tamponada de KLH (10 mg/ml en fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, PBS pH = 7,2 con estabilizador del propietario, Pierce N° Cat. 77600) y mediante incubación a temperatura ambiente durante más de 20 horas. Tras esta incubación, el KLH conjugado se aísla de los subproductos S-197 sin reaccionar y S-197 pasando a través de una columna de desalado (por ejemplo, columnas D-salt, Pierce) y eluyendo el tampón PBS. Después, las fracciones de color de las soluciones se combinan y los conjugados de KLH se caracterizan por la relación de absorbancia a 210 y 410 nm. Las soluciones de conjugado de acridina-KLH se mezclan con adyuvante completo de Freund para inyección intramuscular en los conejos en múltiples sitios para inmunizar a los conejos. El suero de conejo resultante tendrá una alta titulación del anticuerpo policlonal que es reactivo con la estructura de acridina. El suero de conejo puede incubarse con composiciones de glóbulos rojos que se han tratado con, por ejemplo, PIC-1 y glutatión. El

anticuerpo de conejo no unido se lava y la solución se hace reaccionar con un anticuerpo anti-conejo de cabra. La solución resultante puede ensayarse para su aglutinación pasando a través de una tarjeta de gel tamponada (Micro Typing Systems, Pompano Beach, Florida). Las tarjetas de gel están diseñadas para permitir que los glóbulos rojos no aglutinados pasen a través, mientras que las células aglutinadas por la reacción con el suero de conejo y la reacción cruzada con el anticuerpo anti-conejo permanecerán en la parte superior del gel. Las tarjetas se puntúan como 0, 1+, 2+, 3+ o 4+, donde 0 indica que todas las células están intactas y están en el fondo del gel, mientras que 4+ indica una aglutinación completa, con todas las células en la parte superior del gel. Los procedimientos de interrupción de la presente invención darán como resultado una puntuación de 1+ o menor, preferiblemente 0, cuando se ensayan usando una dilución 1:100 del suero de conejo, mientras que una composición similar tratada con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM da como resultado puntuaciones de 2+ o superior.

[0078] Adicionalmente, los procedimientos de interrupción de la presente invención darán como resultado puntuaciones inferiores cuando se comparan con una composición similar tratada con glutatión ácido a la misma concentración del interruptor que el procedimiento de interrupción preferido y la misma concentración del compuesto inactivador de patógenos. Por ejemplo, una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión neutralizado 10 mM y PIC-1 0,2 mM dará como resultado una puntuación menor, preferiblemente una puntuación de 1+ o 0, que una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión ácido 10 mM y PIC-1 0,2 mM.

[0079] En otro ensayo, el suero policlonal de conejo puede hacerse reaccionar con glóbulos rojos tratados. Después del lavado del anticuerpo no ligado, se añade un fragmento Fab'₂ anti-conejo de cabra marcado con FITC (cadenas anti H + L, Caltag). La unión de la etiqueta de FITC a los glóbulos rojos se correlaciona con la cantidad de acridina ligada a la superficie de los glóbulos rojos, y se evalúa mediante el análisis FACScan™ (Becton, Dickinson and Co., NJ). La modificación relativa de los glóbulos rojos se determina a partir del valor de fluorescencia media del FACScan™. Los procedimientos de interrupción de la presente invención, cuando se comparan con el tratamiento usando el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM, darán como resultado una reducción de la fluorescencia media en al menos 50%, también al menos el 75%, o al menos el 90%. Además, los procedimientos de interrupción de la presente invención darán como resultado un nivel inferior de la fluorescencia media en comparación con una composición similar tratada con glutatión ácido a la misma concentración del interruptor que el procedimiento de interrupción preferido y la misma concentración del compuesto inactivador de patógenos. Por ejemplo, una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión neutralizado 10 mM y PIC-1 0,2 mM dará como resultado un nivel inferior de fluorescencia media que una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión ácido 10 mM y PIC-1 0,2 mM. Los procedimientos de interrupción de la presente invención, cuando se comparan con dicho tratamiento similar con glutatión ácido, darán como resultado una reducción de la fluorescencia media en al menos el 10%, también al menos el 25%, también al menos el 50%, también al menos el 75%, o al menos el 90% en comparación con el tratamiento de glutatión ácido.

[0080] Finalmente, las muestras de suero de pacientes infundidos con glóbulos rojos que se han tratado con glutatión 2 mM y PIC-1 0,2 mM que parecen haber desarrollado un anticuerpo anti-PIC-1 pueden usarse para evaluar una reactividad cruzada con composiciones de glóbulos rojos tratadas de la presente invención. Este ensayo es similar al ensayo de Tarjeta de Gel usando suero policlonal de conejo. En este ensayo, el gel contiene IgG anti-humano de conejo, de tal forma que los glóbulos rojos reactivos con el suero del paciente se aglutinarán en la parte superior del gel. Las tarjetas se puntúan como se ha indicado anteriormente. Los procedimientos de interrupción de la presente invención darán como resultado puntuaciones de 1+ o menor, preferiblemente 0, para este ensayo, mientras que una composición similar tratada con el glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM da como resultado puntuaciones de 2+ o mayores. Adicionalmente, los procedimientos de interrupción de la presente invención darán como resultado puntuaciones inferiores cuando se comparan con una composición similar tratada con glutatión ácido a la misma concentración del interruptor que el procedimiento de interrupción preferido y la misma concentración del compuesto inactivador de patógenos. Por ejemplo, una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión neutralizado 10 mM y PIC-1 0,2 mM dará como resultado una puntuación menor, preferiblemente una puntuación de 1+ o 0, que una composición de glóbulos rojos tratada con glutatión ácido 10 mM y PIC-1 0,2 mM.

[0081] Los procedimientos de interrupción de la invención también pueden compararse con los procedimientos existentes determinando el nivel de modificación de los ácidos nucleicos en una muestra. Típicamente, una composición de glóbulos rojos puede contener leucocitos, y el ácido nucleico de los leucocitos puede aislarse. Un compuesto inactivador de patógenos que tiene un isótopo radiactivo que, tras la reacción del compuesto con ácido nucleico, permanecerá unido al ácido nucleico. Esto puede usarse para evaluar la cantidad de compuesto que reacciona con el ácido nucleico para una diversidad de procedimientos de interrupción, y proporciona una medida que puede correlacionarse directamente con la inactivación de leucocitos esperada. El número de aductos formados por 1.000 pares de bases de ácidos nucleicos puede usarse como un modelo para evaluar el impacto esperado de los diversos procedimientos en la inactivación patogénica. Como alternativa, puede añadirse una cantidad adecuada de un patógeno a una composición de glóbulos rojos, y el ácido nucleico del patógeno puede aislarse después del tratamiento. Sin embargo, en este caso, la muestra tiene que leucorreducirse de tal forma que los niveles de cualquier leucocito residual no interferirán con la medición del ácido nucleico patogénico.

[0082] Además de proporcionar una inactivación patogénica adecuada al mismo tiempo que reducen los niveles

de reacciones secundarias no deseadas, los procedimientos de interrupción de la presente invención también proporcionan, en al menos algunas realizaciones, una reducción de la concentración de especies electrófilas reactivas después de la inactivación patogénica. Si las composiciones de glóbulos rojos están diseñadas para infusión, es importante que el nivel de las especies electrófilas reactivas sea lo más bajo posible, preferiblemente básicamente no detectable. La presencia de las especies electrófilas reactivas puede determinarse usando procedimientos disponibles en la técnica, tales como procedimientos cromatográficos que incluyen cromatografía líquida-espectroscopia de masas (CL-EM). Además, la actividad residual de una muestra puede evaluarse evaluando su capacidad para reaccionar con un residuo de guanina de un ácido nucleico, tal como usando el ensayo de alquilación general descrito por Matties (Matties, WR, Anal. Biochem. octubre de 1992; 206(1): 161-7). En este ensayo, los GR se extraen después de un tiempo de incubación adecuado con el compuesto inactivador de patógenos y el interruptor. Cualquier compuesto inactivador de patógenos residual, así como el interruptor y otras especies pequeñas, se separan de las proteínas. Después, estas especies se incuban con ADN ds sintetizado con residuos de 8-³H guanina. El compuesto inactivador de patógenos residual reacciona con ADN ds en la posición N7 de la guanina, que acidifica el residuo 8-H y libera el ³H en la solución, donde puede aislarse y medirse. La cantidad de tritio liberada puede cuantificarse, y tiene una correlación 1:1 con la cantidad de alquilador residual presente en las muestras extraídas ensayadas. El nivel de especies electrófilas, como se determina por estos procedimientos, puede evaluarse usando los procedimientos mejorados de la invención y mediante comparación con procedimientos conocidos.

[0083] En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de reducir la concentración de un compuesto en la mezcla, donde el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en el compuesto inactivador de patógenos o un producto de degradación del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la etapa de reducir la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la etapa de reducir la concentración de las especies electrófilas en la mezcla. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la etapa de reducir la concentración del interruptor en la mezcla. La concentración del compuesto inactivador de patógenos y/o el interruptor (y productos relacionados) en un material biológico, tal como un producto sanguíneo, puede reducirse después del tratamiento, por ejemplo, mediante adsorción en un proceso de eliminación por lotes o de flujo. Se describen procedimientos y dispositivos que pueden usarse en las patentes de Estados Unidos N° 6.544.727 y 6,331,387 y las publicaciones de patentes de Estados Unidos N° 2002/0192632, 2005/0142542, 2004/0185544 y 2001/0009756. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos se reduce poniendo en contacto la mezcla con un medio de adsorción que comprende partículas adsorbentes que tienen una afinidad para el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el sistema de adsorción se configurará para eliminar el compuesto inactivador de patógenos en un proceso por lotes. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla se reduce lavando los glóbulos rojos.

[0084] Los procedimientos de la invención dan como resultado una inactivación adecuada de posibles contaminantes patógenos en las composiciones de glóbulos rojos con una interrupción mejorada en comparación con procedimientos conocidos. El compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, y sales del mismo, y el interruptor es glutatión neutralizado con 2 equivalentes de base. El interruptor puede añadirse a la composición de glóbulos rojos antes, después, o simultáneamente con el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el interruptor se añade en el intervalo de tiempo de aproximadamente 30 minutos antes del compuesto inactivador de patógenos hasta aproximadamente 10 minutos tras el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el interruptor y el compuesto inactivador de patógenos pueden añadirse básicamente de forma simultánea pero por separado. Por ejemplo, cuando el compuesto inactivador de patógenos es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster y el interruptor es glutatión neutralizado, estos no pueden formarse fácilmente en solución juntos para su adición a la composición de glóbulos rojos. Debido a la alta concentración de glutatión requerida para una interrupción adecuada, el compuesto inactivador de patógenos precipita cuando están en la misma solución en altas concentraciones. Una vez añadidos a la composición de glóbulos rojos, se diluyen suficientemente y se tamponan para que ambos sean completamente solubles.

[0085] En una realización preferida de la invención, una composición de glóbulos rojos se mezcla con β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster y glutatión neutralizado con 2 equivalentes de base. En una realización adicional, el glutatión neutralizado se mezcla con la composición de glóbulos rojos y el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster se añade posteriormente en aproximadamente 30 minutos del glutatión, preferiblemente en aproximadamente 10 minutos. En otra realización, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster y el glutatión neutralizado se mezclan con la composición de glóbulos rojos básicamente de forma simultánea, o en aproximadamente 1 minuto el uno del otro. En otra realización, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster se añade a la composición de glóbulos rojos en primer lugar, con el glutatión neutralizado añadido en aproximadamente 30 minutos, también en aproximadamente 10 minutos, también en aproximadamente 5 minutos, también en aproximadamente 1 minutos. En algunas realizaciones, tras la mezcla de los tres componentes, por ejemplo en aproximadamente 1 a 5 minutos de la mezcla, el glutatión está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 5 mM a 30 mM, preferiblemente de aproximadamente 10 mM a

30 mM, preferiblemente de aproximadamente 20 mM, y el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil) amino]etil éster está a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,05 mM a 0,5 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mM a 0,3 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0.

5 **[0086]** En el presente documento se desvelan composiciones de glóbulos rojos resultantes de cada uno de los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento.

10 **[0087]** En algunas realizaciones de cada uno de los procedimientos y composiciones que se describen en el presente documento, los glóbulos rojos en la composición de glóbulos rojos son glóbulos rojos mamíferos. Por ejemplo, los glóbulos rojos pueden ser glóbulos rojos de roedor (por ejemplo ratón, rata o conejo), simio (por ejemplo chimpancé) o de ser humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los glóbulos rojos son humanos. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos se han leucorreducido. En algunas otras realizaciones, los glóbulos rojos no se han leucorreducido. En algunas realizaciones, existe la posibilidad de que la composición que comprende glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno. En algunas realizaciones, la composición de glóbulos rojos está contaminada con un patógeno.

15 **[0088]** Además de los procedimientos mejorados de interrupción, la presente invención proporciona kits desechables para el procesamiento de una composición de glóbulos rojos, donde el procesamiento puede hacerse de forma manual o automática. La presente invención proporciona kits que comprenden el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y/o la base usados en cada uno de los procedimientos descritos en el presente documento.

20 **[0089]** El kit comprende β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, incluyendo cualquier sal del mismo, y glutatión neutralizado, incluyendo cualquier sal del mismo. El β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster puede estar en forma sólida o en solución. De forma análoga, el glutatión neutralizado puede estar en forma sólida o en solución. Estos sólidos o soluciones pueden comprender adicionalmente excipientes, adyuvantes, diluyentes o estabilizadores aceptables. En algunas realizaciones, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster es la sal clorhidrato, y el glutatión neutralizado se neutraliza con aproximadamente 2 equivalentes de hidróxido sódico. En algunas realizaciones, el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster y el glutatión neutralizado están en forma sólida, y el kit comprende adicionalmente una solución adecuada para disolver la β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, y una solución adecuada para disolver el glutatión neutralizado. En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende un compuesto inactivador de patógenos, un interruptor y una solución para disolver el interruptor, donde la solución neutraliza al interruptor. Los procedimientos y kits analizados en el presente documento incluyen cualquier formulación farmacéutica adecuada del compuesto inactivador de patógenos y el interruptor, que puede formarse como una mezcla o por separado. Se conocen formulaciones farmacéuticamente aceptables por los expertos en la técnica, y pueden encontrarse ejemplos de excipientes, adyuvantes, diluyentes o estabilizadores adecuados, por ejemplo, en Gennaro, ed., Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Lippincott Williams & Wilkins. La invención también incluye las composiciones resultantes de los procedimientos que se han descrito anteriormente, que comprenden glóbulos rojos, un compuesto inactivador de patógenos y el interruptor como se ha descrito anteriormente, donde la composición está en un intervalo de pH adecuado para realizar una interrupción mejorada del compuesto inactivador de patógenos.

25 **[0090]** En el presente documento se desvela un kit útil, por ejemplo, para el tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un compuesto inactivador de patógenos que comprende un ligando de unión de ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo (incluyendo cualquier sal del mismo), un interruptor que comprende un grupo tiol (incluyendo cualquier sal del mismo), y al menos aproximadamente 1 equivalente de base, en el que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en el kit. En algunas realizaciones, el kit comprende aproximadamente 1 o aproximadamente 2 equivalentes de una base adecuada.

30 **[0091]** En el presente documento se desvela un kit para el tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un ligando de unión a ácido nucleico y un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo (por ejemplo, PIC-1), incluyendo cualquier sal del mismo, y un interruptor neutralizado que comprende un grupo tiol (por ejemplo, glutatión neutralizado), incluyendo cualquier sal del mismo.

35 **[0092]** La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. En estos ejemplos, todas las bacterias y virus se obtuvieron de la Asociación Americana de Cultivos Tipo (ATCC, *American Type Cell Culture*), Rockville, MD, o son aislados clínicos.

60 Ejemplo 1

Comparación de la inactivación de *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* y *Yersinia enterocolitica* en condiciones convencionales.

65

[0093] La bacteria *S. marcescens* se cultivó durante una noche mediante la adición de una sola colonia de una placa maestra a 500 ml de medio LB a 37 °C. El cultivo se diluyó durante una noche 1:1000 en medio recién preparado. El crecimiento a 37 °C se supervisó por la DO de la suspensión a 600 nm. La preparación se usó cuando la suspensión alcanzó 0,5 de DO. Se usó sangre entera (Blood Source, Sacramento, CA) para preparar una composición de glóbulos rojos (GR) mediante centrifugación para proporcionar una composición de GR empaquetados (34 ml de hematocrito aproximadamente al 90%), después añadiendo 17 ml de Eritrosol a un hematocrito de aproximadamente el 60%. Eritrosol es un aditivo de glóbulos rojos (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) que puede prepararse combinando citrato sódico dihidrato (7,82 g); fosfato ácido sódico dihidrato (0,73 g); fosfato sódico dihidrato (3,03 g); adenina (0,22 g); manitol (7,74 g); y glucosa (9 g) en 1 litro de agua destilada. Después, se añadió la preparación bacteriana (1/100^o de volumen total) a la composición de GR/Eritrosol para proporcionar una composición de GR contaminados. La composición de GR contaminados se dividió en varias muestras y se trató de acuerdo con la Tabla 2, donde PIC-1 es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. El PIC-1 y el glutatión (Aldrich, St. Louis, Mo) se disolvieron en una solución de dextrosa monohidrato al 8% a aproximadamente 15 x la concentración deseada en la composición de glóbulos rojos final cuando se añaden juntos, o 30 x cuando se añaden por separado. Además, el glutatión se neutralizó con los equivalentes indicados de hidróxido sódico, preparado añadiendo una cantidad apropiada de NaOH 5 N al glutatión. Para cada muestra, se mezclaron 4,67 ml de GR con 330 μ l de PIC-1/glutatión o 165 μ l de cada uno de PIC-1 y glutatión por separado. Por ejemplo, un tratamiento convencional de glutatión 2 mM y PIC-1 0,2 mM se preparó disolviendo 7,6 mg de PIC-1 y 46 mg de glutatión en 5 ml de dextrosa al 8% y añadiendo 330 μ l de ésta a 4,67 ml de GR. Una muestra en glutatión neutralizado 20 mM y PIC-1 0,2 mM se preparó disolviendo 7,6 mg de PIC-1 y 460 mg de glutatión en 4,4 ml de dextrosa al 8% y mezclándolos con 0,6 ml de NaOH 5 N, después añadiendo 330 μ l de ésta a 4,67 ml de GR. Para la adición separada usando glutatión neutralizado 20 mM, se preparó PIC-1 disolviendo 7,6 mg en 2,5 ml de dextrosa al 8%, se preparó glutatión disolviendo 460 mg en 1,9 ml de dextrosa al 8% y mezclándolo con 0,6 ml de NaOH 5 N, después añadiendo 165 μ l de cada solución a 4,67 ml de GR en el orden apropiado. Por consiguiente, los volúmenes de los diversos componentes se ajustan para proporcionar las muestras apropiadas indicadas por las tablas. Tras el tratamiento, las muestras se incubaron durante 2 horas, y se diluyeron en serie 100 μ l de cada una y se pusieron en placas LB. Se incubaron durante una noche a 37 °C para evaluar el crecimiento bacteriano. La titulación bacteriana se determinó contando las colonias en las placas, y en base a la dilución de la placa se determinó la titulación. Por ejemplo, con 10 diluciones seriadas, 30 colonias contadas en la 5^a dilución de la solución original, donde se pusieron en placas 0,1 ml, indicarán una titulación inicial de $(30 \times 10^5)/0,1 = 3 \times 10^7$, o 7,47 log. Se usó una muestra de control no tratada (es decir, sin añadir PIC-1 ni glutatión) como la medida inicial para evaluar la reducción logarítmica en la titulación después del tratamiento. La Tabla 2A y la Tabla 2B indican tanto la titulación logarítmica como la reducción logarítmica para las diversas muestras. Obsérvese que para la mayoría de las muestras en la Tabla 2^a, el PIC-1 y el glutatión se formularon juntos. Para las muestras 4-6, donde el glutatión se neutralizó con cantidades variables de hidróxido sódico, el PIC-1 se retiró por precipitación de la solución, con un precipitado en aumento como la cantidad de base añadida aumentada. Como tal, estos resultados no proporcionan una buena indicación del nivel de inactivación puesto que no se conoce la concentración real de PIC-1 en la solución. El estudio se repitió con la adición secuencial de los dos componentes, como se indica en la Tabla 2B (un tiempo de retardo de 0 indica que se añadieron en la misma solución). Para la comparación con la condición convencional en la Tabla 2A (muestras 1 y 10), únicamente la muestra 7, en la que los componentes se añadieron por separado, proporciona una comparación razonable. En este caso, también se muestra en la Tabla 2B, la interrupción con glutatión 20 mM neutralizado con 2 equivalentes de base da como resultado menos reducción logarítmica en aproximadamente 1-1,5 log en comparación con la condición convencional (glutatión ácido 2 mM y PIC-1 0,2 mM).

[0094] Se hicieron estudios adicionales usando *S. epidermidis*, donde el cultivo durante una noche se usó sin dilución. En estos estudios, el PIC-1 y el glutatión se añadieron en la secuencia indicada en la Tabla 3, con los resultados mostrados en la tabla. La inactivación de *S. epidermidis* no se reduce significativamente cuando se usa glutatión neutralizado 20 mM como interruptor. El PIC-1 es de 0,2 mM en todas las muestras.

[0095] Se hizo un estudio similar usando *Y. enterocolitica*, donde, además de glutatión neutralizado, se usó cisteína neutralizada como interruptor, donde la cisteína (Aldrich) se neutralizó con 1 ó 2 equivalentes de hidróxido sódico. En este estudio, el glutatión ácido 2 mM se compara con el glutatión neutralizado 20 mM, o cisteína neutralizada 20 mM, con PIC-1 0,2 mM en todas las muestras. Los resultados se indican en la Tabla 4. Los resultados indican que la cisteína apropiadamente neutralizada es tan eficaz como el glutatión neutralizado, con una reducción de aproximadamente 2,5 log de inactivación con respecto a la condición convencional.

Tabla 2A. Inactivación de *Serratia marcescens* en GR en diversas condiciones de interrupción.

Muestra	mM de PIC-1	Glutación		S. marcescens log	
		mM	Equiv. de base añadida	Titulación	Reducción
Control	0	0	0	7,0	NA
1	0,2	2	0	2,9	4,14
2	0,2	2	0,9	2,8	4,27
3	0,2	20	0	4,6	2,40
4	0,2	20	0,9	4,8	2,26
5	0,2	20	1,5	5,4	1,66
6	0,2	20	2	6,3	0,76
7 (secuencial)*	0,2	20	2	4,0	3,02
8	0	20	0	7,0	0,02
9	0	20	2	7,4	0,31
10	0,2	2	0	2,5	4,50

*Para esta muestra, en primer lugar se añadió PIC-1, con glutación añadido poco después, Para todas las demás muestras, el PIC-1 y el glutación se formularon juntos y se añaden a los GR,

- 5 Tabla 2B Inactivación de *Serratia marcescens* en GR que incluyen la adición secuencial de PIC-1 y glutación. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Glutación		Tiempo de retardo (minutos)	S. marcescens Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
control	NA	0	0	0	6,76	NA
1	PIC-1/glutación	20	2	1	3,40	3,36
2	PIC-1/glutación	20	2	5	2,87	3,89
3	PIC-1/glutación	20	2	10	1,80	4,96
4	PIC-1/glutación	20	2	20	0,00	6,76
5	Glutación/PIC-1	20	2	1	3,10	3,66
6	Glutación/PIC-1	20	2	10	3,08	3,68
7	simultánea	2	0	0	1,51	5,25
8	simultánea	20	0	0	6,05	0,71

- 10 Tabla 3 Inactivación de *Staphylococcus epidermidis* en GR que incluyen la adición secuencial de PIC-1 y glutación. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Glutación		Tiempo de retardo (minutos)	S. epidermidis Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
control	NA	0	0	0	6,62	NA
1	PIC-1/glutación	20	2	1	-0,08	6,70
2	PIC-1/glutación	20	2	5	-0,08	6,70
3	PIC-1/glutación	20	2	10	-0,08	6,70
4	PIC-1/glutación	20	2	20	-0,08	6,70
5	Glutación/PIC-1	20	2	1	0,52	6,10
6	Glutación/PIC-1	20	2	10	0,70	5,92
7	simultánea	2	0	0	-0,08	6,70
8	simultánea	20	0	0	6,40	0,22

Tabla 4 Inactivación de *Yersinia enterocolitica* en GR que incluyen la adición secuencial de PIC-1 y glutatión. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	<i>Y. enterocolitica</i> Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
control	NA	0	0	0	8,49	NA
1	NA	2	0	0	0,00	8,49
2	Glutatión/PIC-1	20	2	10	2,54	5,95
3	Cisteína/PIC-1	20	1	10	4,45	4,04
4	Cisteína/PIC-1	20	2	10	2,70	5,79

5 [0096] Se hicieron estudios adicionales usando cisteína como el interruptor. Se prepararon y se evaluaron muestras como se ha descrito anteriormente, con cisteína (Cys) neutralizada con 1 ó 2 equivalentes de hidróxido
 10 sódico. Para estas muestras, la reserva de NaOH se preparó a 10 N y se usaron volúmenes apropiados de los diversos componentes siguiendo los procedimientos anteriores. Las condiciones convencionales y/o el glutatión neutralizado 20 mM (GSH) se usaron para fines de comparación. En el estudio mostrado en la Tabla 5A, también se
 15 usó una combinación de cisteína y glutatión. Los resultados se muestran en las Tablas 5A, 5B y 5C mostrando al menos aproximadamente 3 log de inactivación en todas las condiciones. Generalmente, la cisteína y el glutatión dan como resultado una reducción similar en la inactivación de patógenos con respecto a la condición convencional, donde la inactivación está dentro de aproximadamente 1-1,5 log de la condición convencional. La combinación de los dos es de interés puesto que la cisteína es capaz de entrar en las células, mientras que el glutatión no entra en las células en ninguna cantidad sustancial. Esto demuestra que en las condiciones apropiadas de interrupción, tanto dentro como fuera de las células, se observan resultados de inactivación similares.

Tabla 5A Inactivación de *Serratia marcescens* en GR con PIC-1 y glutatión o cisteína o una combinación de los dos. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	<i>S. marcescens</i> Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
GR	sin tratar	NA	NA	NA	7,5	NA
1	PIC-1/GSH	20	2	1	4,8	2,7
2	GSH/PIC-1	20	2	10	4,1	3,4
3	Cys/PIC-1	20	2	10	4,4	3,1
5	Cys, GSH/PIC-1	10,10	2,2	10	4,5	3,0
6	Cys, GSH/PIC-1	15,5	2,2	10	3,8	3,7

Tabla 5B Inactivación de *Serratia marcescens* en GR con PIC-1 y glutatión o cisteína. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	<i>S. marcescens</i> Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
GR	sin tratar	NA	NA	NA	7,6	NA
1	PIC-1 + GSH	2	0	0	3,5	4,1
2	GSH/PIC-1	20	2	10	4,4	3,2
3	Cys/PIC-1	2,5	2	10	3,9	3,7
4	Cys/PIC-1	5	2	5	4,4	3,2
5	Cys/PIC-1	5	2	10	4,4	3,2
6	Cys/PIC-1	5	2	20	4,7	2,9
7	Cys/PIC-1	10	2	10	4,9	2,7
8	Cys/PIC-1	15	2	10	4,5	3,1
9	Cys/PIC-1	20	2	5	4,4	3,2
10	Cys/PIC-1	20	2	10	4,6	3,0
11	Sólo Cys	20	2	NA	7,3	0,3

25

Tabla 5C Inactivación de *Staphylococcus epidermidis* en GR con PIC-1 y glutatión o cisteína. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	<i>S. epidermidis</i> Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
GR	sin tratar	NA	NA	NA	7,2	NA
1	PIC-1 + GSH	2	0	0	0	7,2
2	GSH/PIC-1	20	2	10	0	7,2
4	Cys/PIC-1	2,5	1	10	0	7,2
5	Cys/PIC-1	5	1	10	0	7,2
6	Cys/PIC-1	10	1	10	2,3	4,9
3	Cys/PIC-1	20	1	10	3,2	4,0
7	Sólo cisteína	20	1	NA	7,1	0,1

5 **Ejemplo 2**

Comparación de la inactivación del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en condiciones convencionales.

10 **[0097]** Se usó una reserva 100 x del VSV (aproximadamente $1,78 \times 10^8$ de titulación) para contaminar una composición de glóbulos rojos preparada como por el Ejemplo 1. Los GR contaminados se trataron como se indica en la Tabla 5A-B, mediante incubación durante 2 horas. Los componentes se añadieron como se ha mostrado para los experimentos similares que se han descrito anteriormente. Para cada muestra se trató un volumen de 5 ml de GR contaminados. Los GR se congelaron en N₂ líquido después del final de la incubación y se analizaron posteriormente. La titulación del VSV restante se determinó mediante ensayo de placa en células de mono verde Africano Vero 76, se cultivaron en EMEM suplementado con suero fetal de ternera al 10% y otros elementos esenciales. La titulación se calculó por la determinación del número de placas obtenidas tras la aplicación de muestras diluidas en preparaciones confluentes de células como se ha publicado previamente (Hsiung GD y Melnick JL, Journal of Immunology 78, 128-136, 1957). Los resultados se muestran en la Tabla 6A, indicando que todos los procedimientos de interrupción proporcionan una inactivación básicamente completa de una alta titulación del. Se hizo un estudio adicional usando cisteína como interruptor, con o sin neutralización con 2 equivalentes de hidróxido sódico. Los resultados se muestran en la Tabla 6B, con una condición convencional y glutatión neutralizado 20 mM para fines de comparación. La cisteína a 20 mM, ácida o neutralizada, reduce el nivel de inactivación en aproximadamente 2-3 log, mostrando la muestra neutralizada el menor nivel de inactivación. La muestra de glutatión a 20 mM también redujo el nivel de inactivación, en aproximadamente 2 log. Todos los resultados indican que la inactivación del virus extracelular VSV no es muy sensible a las condiciones de interrupción.

Tabla 6A Inactivación de VSV en GR que incluyen la adición secuencial de PIC-1 y glutatión. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Glutatión		Tiempo de retardo (minutos)	VSV Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
GR	sin tratar	0	0	NA	7,58	NA
1	PIC-1 + glutatión	2	0	0	<-0,11	>6,32
2	PIC-1 + glutatión	20	2	0	5,68	0,54*
3	PIC-1 + glutatión	20	0	0	<-0,11	>6,32
4	PIC-1/glutatión	20	0	1	<-0,11	>6,32
5	PIC-1/glutatión	20	2	1	-0,11	6,32
6	PIC-1/glutatión	20	2	5	<-0,11	>6,32
7	PIC-1/glutatión	20	2	10	<-0,11	>6,32
8	Glutatión/PIC-1	20	2	10	<-0,11	>6,32
9	Glutatión/PIC-1	20	0	10	<-0,11	>6,32
10	Sólo glutatión	20	2	NA	6,25	-0,04
11	Control sin tratar	0	0	NA	6,22	NA

*La co-adición con glutatión neutralizado precipita PIC-1 en la solución

30

Tabla 6B Inactivación de VSV en GR con PIC-1 y glutatión o cisteína. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	Glutatión		Tiempo de retardo (minutos)	VSV Log	
		mM	Equiv. de base		titulación	reducción
GR	sin tratar	0	0	NA	6,56	NA
1	PIC-1 + glutatión	2	0	0	-0,3	>6,86
2	Glutatión/PIC-1	20	2	10	1,41	4,99
3	Cisteína/PIC-1	2	2	10	<-0,3	>6,86
4	Cisteína/PIC-1	2	0	10	<-0,3	>6,86
5	Cisteína/PIC-1	5	2	5	0,7	5,86
6	Cisteína/PIC-1	5	0	5	<-0,3	>6,86
7	Cisteína/PIC-1	5	2	10	<-0,3	>6,86
8	Cisteína/PIC-1	5	0	10	<-0,3	>6,86
9	Cisteína/PIC-1	20	2	10	2,75	3,8
10	Cisteína/PIC-1	20	0	10	1,95	4,61

Ejemplo 3

5 **Determinación de la frecuencia de aducto de PIC-1 en ADN genómico de leucocitos humanos después del tratamiento de GR con PIC-1 y glutatión o cisteína.**

10 **[0098]** Se usó sangre entera que no se había leucorreducido para preparar GR en Eritrosol como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se trataron alícuotas de 20 ml cada una con PIC-1 0,2 mM, PIC-1 0,2 mM y glutatión ácido 2 mM, glutatión neutralizado 20 mM (2 equivalentes de base), con PIC-1 añadido a 0,2 mM 10 minutos después, o 20 mM cada una de glutatión neutralizado (2 equivalentes de NaOH) y cisteína neutralizada (1 equivalente de NaOH), con PIC-1 añadido a 0,2 mM 10 minutos más tarde. El PIC-1 usado incluía PIC-1 radiomarcado, donde el grupo reactivo incluía un marcador ¹⁴C (ViTrax, Inc., Placentia, CA). La actividad específica del PIC-1 usado fue 1,08 μ Ci/ μ mol.

15 Todas las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 horas. Después de la incubación, se diluyeron 20 ml de GR con un volumen de 20 ml de PBS y se añadieron 20 ml de la mezcla a cada uno de los dos tubos que contenía 10 ml de Ficoll. Después, la suspensión se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos. La porción de glóbulos blancos se separó y la etapa de centrifugación se repitió después de añadir 20 ml más de PBS. Los gránulos obtenidos se combinaron y el gránulo combinado se suspendió de nuevo en 5 ml de tampón de lisis (NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS al 5%, 0,1 mg/ml de Proteinasa K, Sigma, St. Louis, Mo) y se incubó a 50 °C

20 durante al menos dos horas. Después, la solución resultante se extrajo con 5 ml de 24:25:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguido de 5 ml de cloroformo, y después 5 ml de éter. El ADN genómico se aisló en la fase acuosa y se precipitó mediante la adición de 0,5 ml de NaOAc 3 M, 10 ml de etanol al 100% seguido de incubación de la mezcla final en un baño de hielo seco/etanol. El ADN se aisló por centrifugación a 6.000 x g

25 durante 10'. El sobrenadante se eliminó, y el gránulo secado al aire y resuspendido en 1 ml de tampón TE (Tris HCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4). La cantidad de ADN aislada se cuantificó por absorción UV a 260 nm y la cantidad de aductos de PIC-1 se cuantificó por conteo de escintilación líquida (Perkin Elmer-Wallac, Winspectral 1414 Liquid Scintillation Counter, Shelton, CT) de la solución de ADN, usando la actividad específica del PIC-1 para evaluar la

30 proporción molar de PIC-1 con respecto a pares de bases de ADN. El número de aductos por 1000 pb (kpb) se muestran en la Tabla 7 que se indica a continuación, indicando que la modificación de ácido nucleico de leucocitos es comparable en las muestras interrumpidas con glutatión neutralizado 20 mM en comparación con la condición convencional o la muestra no interrumpida. Glutatión se indica como "GSH" y cisteína como "Cys" en la tabla, así como en cualquier parte en el presente documento. La determinación de la frecuencia de aductos se usó como una

35 medida sustituta para la inactivación de leucocitos. Se sabe que en las condiciones de inactivación de patógenos convencionales, los leucocitos se inactivan al nivel de detección de un ensayo de dilución limitante, que corresponde a 5,3 log de inactivación. El mecanismo de inactivación es a través de la formación de aductos en los ácidos nucleicos genómicos. Por lo tanto, los resultados indican que los procedimientos de interrupción mejorados no deben afectar significativamente a la inactivación de leucocitos. Pueden hacerse estudios similares con un patógeno adecuado usando glóbulos rojos leucorreducidos para evaluar la unión al ácido nucleico patogénico en diversas

40 condiciones.

Tabla 7 Frecuencia de aductos de PIC-1 en ADN genómico después de diversas condiciones de tratamiento

Muestra	Interruptor	CPM	ADN recuperado (ug)	Aductos por kpb	Frecuencia de aductos*
1	Ninguno	39321	487	28	36
2	Ninguno	46293	547,5	28	35
3	GSH ácido 2 mM	46181	502	34	29

4	GSH ácido 2 mM	47204	692,5	23	44
5	GSH neut.** 20 mM	89836	872	37	27
6	GSH neut. 20 mM	60829	527,5	36	28
7	20 mM de cada uno de GSH neut. y Cys	83392	952,5	30	33

*Número medio de pares de bases entre aductos.
**neutralizado con 2 equivalentes

Ejemplo 4

5 Efecto del ajuste del pH de GR en la interrupción como se evalúa por la unión de anticuerpos anti-acridina a glóbulos rojos.

[0099] Es posible ajustar el pH de la composición de GR antes de la adición de glutatión, como se demuestra en este ejemplo mediante el lavado de los GR usando diversas soluciones de diferente pH. Una muestra de 20 ml de sangre entera leucorreducida (Blood Source, Sacramento, CA) se centrifugó a 4.100 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente en cada una de cuatro tubos de centrifuga de 50 ml. El sobrenadante se eliminó de cada tubo para proporcionar un concentrado de glóbulos rojos (RCC). Para la muestra 1, se añadieron 5 ml de Eritrosol (pH 7,3) a 10 ml del RCC. Para las muestras 2-4, el RCC se lavó tres veces con 10 ml de la solución indicada, centrifugando como anteriormente y eliminando el sobrenadante después de cada lavado. Para cada RCC lavado, las células se suspendieron de nuevo en 5 ml de la solución usada para el lavado. Esto ahora se denomina como muestra de ensayo de GR. Las soluciones usadas en las muestras 2-4 eran Eritrosol (pH 7,3), PBS pH 8 (fosfato 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) y CHES pH 9 (CHES 50 mM (Aldrich), NaCl 100 mM, pH 9,0), respectivamente. Para cada muestra de ensayo de GR, se mezclaron 1,5 ml con 100 µl de PIC-1 más glutatión (ácido 2 mM o neutralizado 20 mM con 0,9, 1,5 ó 2 equivalentes de hidróxido sódico) para dar las concentraciones finales de PIC-1 0,2 mM y glutatión 2 mM o 20 mM. Estas muestras se incubaron durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, los GR se lavaron en BBS (solución salina de banco de sangre, solución salina al 0,9%, no tamponada, Fisher Scientific) y se diluyeron a un hematocrito final del 4%. Una alícuota de 25 µl de cada una se mezcló con 15 µl de suero anti-acridina policlonal de conejo diluido en 1:100 de BBS, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron posteriormente con 1,5 ml de BBS. Después de que el lavado se completara, las células se mezclaron con 50 µl de fragmento de Fab₂ anti-conejo de cabra marcado con FITC (dilución 1:64 en BBS) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron de nuevo con 3 x 1,5 ml de BBS. Después, los glóbulos rojos se analizaron por FACScan, y la fluorescencia media observada para cada muestra se proporciona en la Tabla 8. Este valor se correlaciona con la unión de PIC-1 acridina a la superficie de los glóbulos rojos, de tal forma que un valor inferior indica la interrupción mejorada de la reacción secundaria de PIC-1 con GR. La unión de PIC-1 a GR se redujo significativamente lavando sólo las células en tampón de pH superior, proporcionando el glutatión neutralizado incluso una mejor interrupción. Obsérvese que la interrupción mejora según el glutatión se neutraliza con cantidades en aumento de hidróxido sódico. Este ejemplo demuestra la importancia de ajustar el pH de la composición de glóbulos rojos para proporcionar una interrupción mejorada. El lavado con CHES pH 9 en combinación con glutatión neutralizado con 1,5 ó 2 equivalentes de hidróxido sódico reduce la unión de PIC-1 a casi niveles de fondo.

35 Tabla 8 Tratamiento de GR con PIC-1 0,2 mM en diversas condiciones de interrupción, análisis FACScan de la unión de anticuerpo anti-acridina.

Muestra	Prep. de GR	Intensidad de la fluorescencia media				
		control sin tratar	GSH 2 mM	GSH 20 mM + NaOH		
				0,9 equiv.	1,5 equiv.	2 equiv.
1	Eritrosol (pH 7,3) sin lavado	1,67	108	17,0	8,1	6,0
2	Eritrosol (pH 7,3) 3 lavados	1,69	199	26,7	4,9	3,4
3	PBS pH 8 3 lavados	1,70	25	7,2	5,1	5,1
4	CHES pH 9 3 lavados	1,62	12,1	3,9	1,9	1,9

40 Ejemplo 5

Comparación de diversas condiciones de interrupción con respecto a la unión de anticuerpo anti-acridina a glóbulos rojos.

45 [0100] El análisis FACScan de la unión de suero anti-acridina de conejo a glóbulos rojos tratados se usó para

5 evaluar una diversidad de condiciones de interrupción. Se prepararon muestras de GR como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se prepararon interruptores como se ha descrito en los ejemplos anteriores. La secuencia de adición de componentes y las concentraciones de compuesto finales tras la mezcla con los GR se indican en las Tablas 9A y 9B. Las tablas representan datos de dos experimentos diferentes, cada uno con muestras tratadas en condiciones convencionales o con glutatión neutralizado 20 mM. PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras. Los datos en un experimento proporcionan la eficacia relativa de los diversos tratamientos. Puesto que el ensayo puede depender del conjunto de glóbulos rojos usados, los valores absolutos de la fluorescencia media pueden variar de un estudio al siguiente, de tal forma que los valores relativos únicamente deben compararse dentro un experimento determinado. Por ejemplo, obsérvese que la condición convencional da como resultado una fluorescencia media de 114 en la 10 Tabla 9A y 151-182 en la Tabla 9B. La cisteína neutralizada interrumpe de forma eficaz una señal básicamente de fondo (es decir, básicamente sin unión) a 15 ó 20 mM. El glutatión neutralizado en 20 mM da como resultado casi niveles de fondo. A partir de la Tabla 9B, los resultados para la cisteína indican que, mientras que el aumento de la concentración de interruptor proporciona una mejor interrupción de la reacción con GR, puesto que la concentración de cisteína aumenta, la neutralización de la cisteína proporciona la interrupción óptica de la reacción secundaria no deseada. Obsérvese que en 2,5 mM de cisteína, hay poca diferencia entre la cisteína neutralizada y la ácida, mientras que en 5 mM o mayor, 1 equivalente de NaOH reduce adicionalmente la señal en comparación con la 15 muestra de cisteína ácida a la misma concentración.

20 Tabla 9A Unión relativa del anticuerpo anti-acridina a GR tratados medida como la fluorescencia media por FACScan. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	mM	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	Fluorescencia media
				Equiv. de NaOH		
1	PIC-1 + GSH	2		0	0	114
2	GSH/PIC-1	20		2	10	2,6
3	Sólo Cys de Control	20		2	NA	1,9
4	Cys/PIC-1	2,5		2	10	37
5	Cys/PIC-1	5		2	5	8
6	Cys/PIC-1	5		2	10	10,8
7	Cys/PIC-1	5		2	20	8
8	Cys/PIC-1	10		2	10	2,9
9	Cys/PIC-1	15		2	10	1,9
10	Cys/PIC-1	20		2	5	1,9
11	Cys/PIC-1	20		2	10	1,9
12	Cys/PIC-1	20		2	20	2

25 Tabla 9B Unión relativa de anticuerpo anti-acridina a GR tratados medida como la fluorescencia media por FACScan. (PIC-1 está en 0,2 mM en todas las muestras).

Muestra	Secuencia de adición	mM	Interruptor		Tiempo de retardo (minutos)	Fluorescencia media
				Equiv. de NaOH		
1a	PIC-1 + GSH	2		0	0	151
1b	PIC-1 + GSH	2		0	0	182
1c	PIC-1 + GSH	2		0	0	160
2a	GSH/PIC-1	20		2	10	6,06
2b	GSH/PIC-1	20		2	10	5,62
2c	GSH/PIC-1	20		2	10	5,6
3	Sólo Cys de Control	20		2	NA	1,99
4	Cys/PIC-1	2,5		0	10	44
5	Cys/PIC-1	2,5		1	10	49,5
6	Cys/PIC-1	2,5		2	10	49
7	Cys/PIC-1	5		0	10	49
8	Cys/PIC-1	5		1	10	19,28
9	Cys/PIC-1	5		2	10	14,1
10	Cys/PIC-1	10		0	10	11,6
11	Cys/PIC-1	10		1	10	5,1
12	Cys/PIC-1	10		2	10	3,6
13	Cys/PIC-1	20		0	10	4,3
14	Cys/PIC-1	20		1	10	2,5
15	Cys/PIC-1	20		2	10	ND

Ejemplo 6**Evaluación del pH de una composición de glóbulos rojos tras la adición de PIC-1 y diversos interruptores.**

5 **[0101]** El efecto de diversas condiciones de interrupción en el pH de una composición de glóbulos rojos se determinó para diversas condiciones de tratamiento. Las soluciones de interruptor se prepararon a una concentración de 600 mM en dextrosa monohidrato al 8%. Para cisteína, una porción de la solución se mezcló con 1 ó 2 equivalentes de hidróxido sódico. El glutatión se evaluó a 2 mM (ácido) o 20 mM (2 equiv. de base). También se evaluaron N-acetil cisteína, metionina y el dímero peptídico cisteína-glicina (CysGly), donde N-acetil cisteína se neutralizó con 1 equivalente de hidróxido sódico, la metionina se neutralizó con 1 ó 2 equivalentes de hidróxido sódico y CysGly se neutralizó con 2 equivalentes de hidróxido sódico. El pH de la solución de interruptor, sin modificar o neutralizado, se midió usando un electrodo de colomelanos de epoxi convencional (Beckman Instruments) a temperatura ambiente. Una solución de PIC-1 se preparó a 6 mM en dextrosa monohidrato al 8%. Una composición de glóbulos rojos se preparó como en el Ejemplo 1. Para cada muestra, se añadieron secuencialmente 167 μ l de interruptor y 167 μ l de PIC-1 a 4,67 ml de GR, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos después de la adición del interruptor, y después añadiendo PIC-1. Las muestras se mezclaron y el pH a temperatura ambiente se midió usando el mismo electrodo que se ha descrito anteriormente. Los resultados de diversos estudios se muestran en la Tabla 10.

20 Tabla 10 Medidas de pH que usando diversas condiciones del interruptor con PIC-1 0,2 mM en GR.

Muestra	Condiciones del Interruptor	pH del interruptor de reserva	pH de la mezcla final
1	GR sin control de tratamiento*	NA	6,96
2	glutatión ácido 2 mM*	2,82	6,9
3	glutatión 20 mM + 2 equiv. de base*	9,5	7,7
4	cisteína 20 mM	5	6,5
5	cisteína 20 mM + 1 equiv. de base	9,9	7,4
6	cisteína 20 mM + 2 equiv. de base	11,5	7,8
7	N-acetil cys 20 mM + 1 equiv. de base	6	6,7
8	CysGly 20 mM + 2 equiv. de base	8,5	ND
9	metionina 20 mM + 2 equiv. de base	13,1	8
10	metionina 20 mM + 1 equiv. de base	11,2	7,5

Ejemplo 7

25 **Interrupción en función de la concentración y neutralización de glutatión; evaluación de la unión del anticuerpo anti-acridina y la inactivación de *S. epidermidis*.**

30 **[0102]** En estos, se añadió la cantidad apropiada de 600 mM de reserva, se mezcló con un volumen apropiado de dextrosa al 8% para proporcionar la misma adición de volumen a cada muestra de GR donde en un estudio, con concentraciones de glutatión variadas, el pH se midió después de añadir glutatión y después de añadir PIC-1. Obsérvese que la adición de PIC-1 reduce el pH de algunas de las soluciones con valores de pH superiores después de la adición del interruptor, pero el pH final todavía está en un intervalo preferido para una interrupción mejorada, y están muy por encima de los valores de pH de la misma concentración de glutatión sin neutralización. Las muestras preparadas de forma similar al Ejemplo 6 con diversas concentraciones de glutatión (Tabla 11A) se evaluaron para comprobar la unión a suero anti-acridina de conejo, por análisis por tarjeta de gel o por análisis FACScan. También se evaluaron muestras similares para la inactivación de *S. epidermidis*. Cada muestra de GR se trató con glutatión seguido 10 minutos más tarde con PIC-1, después se incubó a temperatura ambiente durante 20 horas tras la mezcla del PIC-1. Para el análisis por tarjeta de gel, después de la incubación, los GR se lavaron en BBS y se diluyeron en BBS a un hematocrito final del 4%. Una alícuota de 25 μ l de cada una se mezcló con 15 μ l de suero anti-acridina policlonal de conejo diluido 1:4 ó 1:100 en BBS, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron posteriormente con 1,5 ml de BBS. Después de que se completara el lavado, las células se mezclaron con cadenas anti H+ L de un fragmento Fab₂ anti-conejo de cabra (dilución 1:4 en PBS) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron de nuevo con 3 x 1,5 ml de BBS y se cargaron sobre una tarjeta de gel, y las tarjetas se centrifugaron durante 10 minutos a 900 x g según la configuración del fabricante en una MTS Centrifuge™ (Ortho System, Pompano Beach, F1). Las tarjetas se puntuaron en una escala de 0, 1+, 2+, 3+, 4+, calificando la cantidad relativa de aglutinación, donde 0 indica sin aglutinación, todas las células pasan a través del gel, y 4+ indica aglutinación completa, todas las células en la parte superior del gel. Estos resultados indican que según la concentración de glutatión aumenta, es necesario ajustar el pH de la composición de GR, tal como usando glutatión neutralizado. Incluso a 5 mM, el glutatión neutralizado con 2 equivalentes de base proporciona una mejor interrupción que 5 mM con 1 ó 0 equivalentes de base. El glutatión neutralizado muestra una reducción de la unión de anticuerpo según la concentración aumenta, mientras que el glutatión ácido muestra poca mejora, si la hubiera, a concentraciones superiores en comparación con la condición convencional de 2 mM. La

sensibilidad de este ensayo es tal que, en este estudio, es necesaria una dilución 1:100 del suero de conejo para observar las diferencias en los procedimientos de interrupción, ya que la dilución 1:4 muestra una aglutinación completa en todas las muestras (el control no tratado no muestra aglutinación). Como tal, únicamente las muestras diluidas 1:100 se muestran en la Tabla 11B. Los resultados entre estudios varían dependiendo de la muestra de sangre usada. Por ejemplo, mientras que en este estudio, el suero anti-acridina de conejo diluido 1:4 dio como resultado puntuaciones de 4+ para todas las muestras, se hizo otro estudio con 10, 15 y 20 mM de glutatión neutralizado (2 equiv. de base) donde las diferencias se observaron en las muestras diluidas 1:4, mientras que todas las muestras diluidas 1:100 mostraron una puntuación de 0. Estas muestras ensayadas en una dilución 1:4 del suero de conejo mostraron puntuaciones de 4+, 4+, 3+ y 1+ para una condición convencional, 10 mM, 15 mM y 20 mM de glutatión neutralizado (2 equiv. de base), respectivamente. También se usó una combinación de glutatión neutralizado (2 equiv. de base) y cisteína neutralizada (1 equiv. de base), donde la concentración del interruptor total fue de 20 mM, y todas estas muestras dieron como resultado puntuaciones de 1 + o 0 (es decir, fueron al menos tan eficaces como el glutatión neutralizado 20 mM).

5

10

15

Tabla 11A Medidas de pH usando diversas condiciones del interruptor con PIC-1 0,2 mM en GR.

Muestra	Condiciones del Interruptor	pH del interruptor de reserva	pH de la mezcla	
			Post-Interruptor	Final
1	GR sin control de tratamiento*	NA	ND	6,8
2	glutatión ácido 20 mM		6,1	6,1
3	glutatión ácido 10 mM	3,0	6,4	6,4
4	glutatión ácido 5 mM		6,6	6,6
5	glutatión ácido 2 mM*		6,7	6,7
6	glutatión 20 mM + 1 equiv. de base		6,7	6,7
7	glutatión 10 mM + 1 equiv. de base	6,1	6,7	6,7
8	glutatión 5 mM + 1 equiv. de base		6,7	6,7
9	glutatión 2 mM + 1 equiv. de base		6,8	6,8
10	glutatión 20 mM + 2 equiv. de base*		7,4	7,2
11	glutatión 10 mM + 2 equiv. de base	9,2	7,2	7,0
12	glutatión 5 mM + 2 equiv. de base		6,9	6,9
13	glutatión 2 mM + 2 equiv. de base		6,8	6,8

Tabla 11B Unión del anticuerpo anti-acridina en GR tratados con concentraciones variables de glutatión y PIC-1 0,2 mM. Puntuación de la tarjeta de gel para una dilución 1:100 de suero anti-acridina de conejo y dilución 1:4 se IgG anti-conejo secundario.

20

Muestra	Sin base añadida	Puntuación de tarjeta de gel	
		1 equiv. de base	2 equiv. de base
GSH 2 mM	3+	4+	3+
GSH 5 mM	3+/MX*	3+	2+
GSH 10 mM	3+/MX*	2+	1+
GSH 20 mM	3+	1+	0

*MX = Campo mezclado

[0103] Otro conjunto de muestras como se muestra en la Tabla 11A se prepararon como anteriormente usando una unidad diferente de GR y se evaluaron mediante análisis FACScan. Estas muestras, tras la incubación de 20 horas, se trataron como en el Ejemplo 4 y se analizaron por FACScan. También se evaluaron una muestra de control no tratada, así como una muestra convencional (co-adición del glutatión ácido 2 mM con PIC-1 0,2 mM). Los resultados se muestran en la Tabla 11C.

25

Tabla 11C Unión del anticuerpo anti-acridina (policlonal de conejo; dilución 1:100) en GR tratados con concentraciones variables de glutatión y PIC-1 0,2 mM. Evaluación por análisis de FACScan usando Fab'₂ anti-conejo marcado con FITC (dilución 1:64).

5

Muestra	Sin base añadida	Fluorescencia media	
		1 equiv. de base	2 equiv. de base
Control sin tratar	4,62	NA	NA
Co-adición conv.	144,33	NA	NA
GSH 2 mM	179,17	208,05	160,37
GSH 5 mM	95,57	87,6	67,56
GSH 10 mM	88,21	47,18	27,45
GSH 20 mM	187,74	29,97	13,37

10 **[0104]** Otro conjunto de muestras como se muestra en la Tabla 11A se prepararon como anteriormente usando la misma unidad de GR y se añadieron con *S. epidermidis* y se evaluaron para titulación como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 11D. Los resultados combinados de unión de anticuerpo e inactivación de *S. epidermidis* demuestran la interrupción mejorada usando glutatión neutralizado a concentraciones superiores.

Tabla 11D Inactivación de *S. epidermidis* en GR tratados con concentraciones variables de glutatión y PIC-1 0,2 mM.

Muestra	Cambio en la titulación Log (titulación inicial de GR = 6,5)		
	Sin base añadida	1 equiv. de base	2 equiv. de base
Control sin tratar	0	NA	NA
GSH 2 mM	6,5	6,5	6,5
GSH 5 mM	6,5	6,5	6,5
GSH 10 mM	2,9	6,5	6,5
GSH 20 mM	2,5	6,5	6,5

15 Ejemplo 8

Evaluación de la unión del anticuerpo anti-acridina mediante análisis por tarjeta de gel en muestras interrumpidas con diversos interruptores.

20 **[0105]** Se hicieron estudios similares usando el ensayo por tarjeta de gel con otras condiciones de interrupción, tal como con cisteína, dipéptido de cisteína-glicina, o una combinación de cisteína y glutatión. Las muestras también se ensayaron con la dilución 1:4 ó 1:100 del suero de conejo y sin anticuerpo secundario, lo que dio como resultado algo de aglutinación para las muestras tratadas con la condición convencional de glutatión 2 mM y PIC-1 0,2 mM, o con PIC-1 sin interruptor. Se cree que la aglutinación observada en casi todas las muestras usando la dilución

25 concentrada 1:4 de suero de conejo con un anticuerpo anti-conejo secundario (Tablas 12 y 13) se debe, en parte, a reacciones heterófilas. Los anticuerpos heterófilos son anticuerpos de origen natural que reconocen GR de otras especies de una forma no específica. Las Tablas 12-13 muestran los resultados de diversos experimentos para una dilución 1:4 ó 1:100 de suero de conejo y una dilución 1:4 de anticuerpo anti-conejo. No se muestran los datos para controles no tratados, ya que estos dieron una puntuación de 0 para todas las muestras. Todas las muestras se

30 mezclaron en primer lugar con interruptor, después con PIC-1 a 0,2 mM. La identidad del interruptor, la concentración y los equivalentes de base se indican en las tablas. Estos resultados sugieren que una combinación de glutatión y cisteína, o cisteína sola, pueden proporcionar una interrupción algo mejor de la unión de PIC-1 a los GR.

Tabla 12 Unión de anticuerpo anti-acridina en GR tratados con concentraciones variables de glutatión y cisteína y 0,2 mM PIC-1.

Muestra	Condiciones del Interruptor	Puntuación de la tarjeta de ge			
		Sin Ab secundario		Ab secundario 1:4	
		Dilución de suero de conejo: 1:4	1:100	1:4	1:100
1	GSH ácido 2 mM	3+	0	4+	4
2	2 equiv. de GSH 20 mM	0	0	3+	0
3	1 equiv. de Cys 2,5 mM	2+	0	4+	3
4	1 equiv. de Cys 5 mM	1+	0	4+	1*
5	5 mM de Cys 10 mM	0	0	3+	0
6	10 mM de Cys 15 mM	0	0	1*	0
7	15 mM de Cys 20 mM	0	0	0	0

*color muy ligero en la parte superior del gel.

5

Tabla 13 Unión del anticuerpo anti-acridina en GR tratados con concentraciones variables de glutatión y cisteína y PIC-1 0,2 mM.

Muestra	Condiciones del Interruptor	Puntuación de la tarjeta de ge			
		Muestra de sangre 1		Muestra de sangre 2	
		Dilución de suero de conejo: 1:4	1:100	1:4	1:100
1	PIC-1 sin interruptor	4+	4+	4+	4+
2	GSH ácido 2 mM	4+	4+	4+	4+
3	GSH 20 mM de 2 equiv.	4	0	4	0
4	GSH 15 mM de 2 equiv./Cys 5 mM de 1 equiv.	4	0	3	0
5	GSH 10 mM de 2 equiv./Cys 10 mM de 1 equiv.	3	0	3	0
6	GSH 5 mM de 2 equiv./Cys 15 mM de 1 equiv.	2	0	3	0
7	Cys 20 mM 1 equiv.	0	0	3	0
8	GSH 15 mM de 2 equiv./Cys 5 mM 2 equiv.	4	0	3	0
9	GSH 10 mM de 2 equiv./Cys 10 mM 2 equiv.	2	0	2	0
10	GSH 5 mM de 2 equiv./Cys 15 mM de 2 equiv.	1	0	1	0
11	Cys 20 mM de 2 equiv.	0	0	1	0

10 **[0106]** El dipéptido cisteína-glicina (CysGly) también se usó como un interruptor. La condición convencional, así como la cisteína neutralizada 20 mM (2 equiv. de base) se compararon con concentraciones variables del CysGly con y sin 1 equivalente de base. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Los resultados coinciden con los observados tanto para el glutatión como la cisteína, que según la cantidad de interruptor aumenta, se requiere el ajuste del pH, por ejemplo mediante neutralización del interruptor, para una interrupción mejorada.

15

Tabla 14 Comparación de la interrupción con CysGly con y sin neutralización para dar cisteína neutralizada 20 mM, o condiciones convencionales. Análisis de tarjeta de gel de la unión del anticuerpo anti-acridina.

Muestra	Condiciones del Interruptor	Puntuación de la tarjeta de gel	
		dilución 1:4 de suero	dilución 1:100 de suero
1	GSH ácido 2 mM	4	4
2	CysGly 2.5 mM	4	3
3	CysGly 2,5 mM de 1 equiv. de base	4	4
4	CysGly 5 mM	4	0
5	CysGly 5 mM de 1 equiv. de base	4	2
6	CysGly 10 mM	4	0
7	CysGly 10 mM de 1 equiv. de base	4	0
8	CysGly 20 mM	4	0
9	CysGly 20 mM de 1 equiv. de base	4	0
10	Cys 20 mM de 2 equiv. de base	4	0
11	Sólo dextrosa, sin control de tratamiento	2	0

5 Ejemplo 9

Eliminación de la reactividad cruzada observada con los glóbulos rojos tratados convencionales mediante el tratamiento de procedimientos de la presente invención.

10 **[0107]** El suero de pacientes que han desarrollado anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con GR que se han tratado con glutatión 2 mM y PIC-1 0,2 mM se usó para evaluar la reactividad cruzada con procedimientos mejorados. Se prepararon muestras usando sangre 0 negativo (Blood Source, Sacramento, CA) como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se trataron con glutatión 2 mM y PIC-1 0,2 mM, PIC-1 0,2 mM seguido 1 minuto después de glutatión neutralizado 20 mM (2 equiv. de base) o glutatión neutralizado 20 mM seguido 10 minutos más tarde de PIC-1 0,2 mM. También se preparó una muestra de GR de control sin tratar. Cada muestra se lavó tres veces con BBS, después se suspendió para dar un hematocrito del 8% en una solución salina de baja fuerza iónica (AABB manual, 14^a edición). Una alícuota de 50 µl de cada una se añadió a una tarjeta de gel junto con 25 µl del suero del paciente, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La tarjeta de gel contiene IgG anti-humano de conejo, que aglutinará los GR que unen anticuerpos del suero del paciente. Las tarjetas se centrifugaron como en el Ejemplo 7. Las tarjetas se leen mediante la misma escala como se ha descrito en el Ejemplo 7. Las muestras ensayadas con tres sueros diferentes mostraron una puntuación de 3+ con los GR tratados convencionales y 0 con el control sin tratar o las muestras tratadas de glutatión neutralizado 20 mM (2 equivalentes).

25 Ejemplo 10

Uso de metionina como modelo para evaluar la interrupción debido a un ajuste del pH independientemente de la interrupción de tiol.

30 **[0108]** Puesto que la metionina (Met) tiene un sustituyente de metilo en el átomo de azufre pero, por otra parte, es muy similar a la cisteína, se usó como un modelo de aminoácido para evaluar el efecto del ajuste del pH solo en la interrupción. La presencia del grupo metilo elimina la naturaleza nucleófila del átomo de azufre, de tal forma que cualquier interrupción puede deberse al aumento del pH de la solución (por ejemplo, la concentración superior de hidróxido puede proporcionar algo de interrupción). La metionina (Aldrich) se usó a 20 mM con 1 ó 2 equivalentes de base añadida, y se comparó con cisteína (1 ó 2 equiv.) y glutatión (2 equiv.), todos con PIC-1 0,2 mM, añadido 10 minutos después del interruptor. La condición convencional se incluyó, es decir, PIC-1 0,2 mM y glutatión ácido 2 mM añadidos juntos. Las muestras se evaluaron mediante análisis por tarjeta de gel de la unión del suero anti-acridina de conejo como en el Ejemplo 7, con la excepción de que las muestras para el análisis de tarjeta de gel se incubaron a 37 °C o a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Los resultados muestran que la metionina neutralizada con 2 equivalentes de base proporciona una interrupción mejorada en comparación con la condición convencional.

Tabla 15. Interrupción con metionina, cisteína o glutatión como se evaluó por el análisis por tarjeta de gel de la unión de suero anti-acridina de conejo

Muestra	Temp. de incubación: Dilución de suero de conejo: Tratamiento	Puntuación de tarjeta de gel			
		37 °C		TA	
		1:4	1:100	1:4	1:100
1	Sin tratar	0	0	0	0
2	PIC-1 0,2 mM/GSH 2 mM	4	3	4	3
3	GSH 20 mM + 2 equiv./PIC-1 0,2 mM	3	0	3	0
4	Cys 20 mM + 1 equiv./PIC-1 0,2 mM	1	0	2	0
5	Cys 20 mM + 2 equiv./PIC-1 0,2 mM	0	0	1	0
6	Met 20 mM + 1 equiv./PIC-1 0,2 mM	4	3	4	3
7	Met 20 mM + 2 equiv./PIC-1 0,2 mM	3	0	3	0

5 **Ejemplo 11**

Estudios funcionales *in vitro* sobre unidades enteras tratadas con glutatión neutralizado 20 mM y PIC-1 0,2 mM.

10 **[0109]** Las unidades completas de concentrados de glóbulos rojos (Interstate Blood Bank, Inc., Memphis, TN) se leucorredujeron. Un volumen de 200 ml de este RCC (hematocrito al 80%) se mezcló con 94 ml de Eritrosol o 100 ml de Adsol (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) como control (unidad 1). Se usó un volumen de 20 ml de dextrosa al 8% para disolver PIC-1 (mg) y glutatión ácido (mg) y se añadió a una unidad para proporcionar PIC-1 0,2 mM y glutatión 2 mM (unidad 2). Para las unidades 3 y 4, se disolvieron por separado PIC-1 (mg) y glutatión (mg) en 10 ml u 8,8 ml de dextrosa al 8%, respectivamente. Para el glutatión, se añadieron 1,2 ml de NaOH 10 N (2 equivalentes). El PIC-1 se mezcló con la unidad seguido 1 minuto más tarde (unidad 3) o 5 minutos más tarde (unidad 4) de glutatión. Para la unidad 5, se en primer lugar se mezcló el glutatión neutralizado seguido 10 minutos más tarde del PIC-1. Para la unidad 6, se disolvió el glutatión en 18,8 ml de dextrosa al 8% y se mezcló con 1,2 ml de NaOH 10 N, después se mezcló con los GR (sin PIC-1). Todas las unidades se mezclaron sujetando los extremos de la bolsa de sangre y mediante mezcla en un movimiento de la figura 8 30 veces. Después, estas se incubaron a temperatura ambiente durante un total de 20 horas. Se usó un dispositivo de adsorción de compuesto (CAD), que comprende una resina polimérica contenida dentro de una bolsa de malla, para todos excepto la muestra de control. Este dispositivo está diseñado para eliminar el PIC-1 residual, productos de descomposición de PIC-1, y glutatión de las muestras. Las muestras se incubaron durante 8 horas, después se transfirieron a una segunda bolsa de sangre que contenía el CAD y se incubaron durante 12 horas más. Tras la incubación a temperatura ambiente, las muestras se transfirieron a un frigorífico (4 °C) y se almacenaron hasta 43 días. Las alícuotas se eliminaron de cada unidad 12 horas y 20 horas después de la mezcla, y cada semana después de ésta. Las alícuotas se analizaron para obtener la hemoglobina total, el pH, el ATP intracelular, la hemoglobina en plasma, potasio, la glucosa extracelular y el lactato extracelular. La unión del suero anti-conejo también se evaluó mediante el análisis FACScan como se ha descrito en el Ejemplo 4. El estudio se repitió, con unidades tratadas con PIC-1 tratadas con o sin el CAD. Los resultados para el ATP, la hemólisis y la unión del suero anti-conejo se muestran en las Tablas 16A-C y 17A-C. Identidades de las muestras de la Tabla 16A-C:

35 1: Control Sin Tratar

2: Tratamiento Convencional PIC 1 0,2 mM + GSH 2 mM

3: PIC-1 0,2 mM, 1' de retraso, GSH 20 mM + 2 equivalentes de base

40 4: PIC-1 0,2 mM, 5' de retraso, GSH 20 mM + 2 equivalentes de base

5: GSH 20 mM + 2 equivalentes de base, 10' de retraso, PIC-1 0,2 mM

45 6: GSH 0,2 mM+ 2 equivalentes de base

Tabla 16A. Datos de ATP durante 42 días de almacenamiento

Días	ATP de muestra de GR $\mu\text{mol/g Hb}$					
	1	2	3	4	5	6
0	3,66	3,62	4,20	4,16	4,11	4,30
0,5	3,79	3,85	2,02	5,08	5,17	5,56
0,8	3,77	3,55	5,05	5,38	5,21	5,56
7	3,63	3,59	5,24	5,11	5,58	5,64
14	2,84	2,58	4,20	4,06	4,22	4,93
22	2,69	2,30	3,86	3,66	3,90	4,20
28	2,24	1,61	3,10	2,72	3,27	3,68
35	1,99	1,46	2,71	2,47	2,68	3,30
43	1,65	1,21	2,28	2,06	2,28	2,61

Tabla 16B. Porcentaje de hemólisis durante 42 días de almacenamiento.

5

Días	Porcentaje de hemólisis de la muestra de GR					
	1	2	3	4	5	6
0	0,16	0,22	0,19	0,19	0,19	0,15
0,5	0,18	0,24	0,16	0,25	0,24	0,19
0,8	0,18	0,46	0,40	0,48	0,47	0,51
7	0,27	0,62	0,35	0,52	0,57	0,58
14	0,37	0,69	0,50	0,52	0,55	0,61
22	0,46	0,87	0,59	0,62	0,63	0,60
28	0,62	0,86	0,63	0,64	0,65	0,71
35	0,73	0,99	0,74	0,76	0,71	0,70
43	0,84	1,17	0,82	0,90	0,83	0,75

Tabla 16C. Modificación de GR medida por la unión de anticuerpo anti-acridina (FACScan) durante 42 días de almacenamiento.

Días	Fluorescencia media de la unidad de GR					
	1	2	3	4	5	6
0,8	1,67	284	20,1	46,0	20,0	2,16
2	1,84	193,5	14,58	34,07	12,31	1,78
7	1,72	142,1	4,96	18,84	5,34	1,58
14	1,56	135,7	4,09	8,41	3,29	1,48
22	1,61	90,8	2,61	4,46	2,12	1,58
28	1,95	128,7	2,6	5,69	2,83	2,02
35	2,71	153,4	2,74	6,71	2,58	1,62
43	1,63	136,1	2,43	4,51	2,46	1,8

10

Identidades de las muestras de la Tabla 17A-C:

1: Tratamiento Convencional, PIC-1 0,2 mM, GSH 2 mM + CAD

15

2: Tratamiento Convencional, PIC-1 0,2 mM, GSH 2 mM

3: PIC-1 0,2 mM, 1' de retraso, GSH neutralizado 20 mM + CAD

4: PIC-1 0,2 mM, 1' de retraso, GSH neutralizado 20 mM

20

5: GSH neutralizado 20 mM, 10' de retraso, PIC-1 0,2 mM + CAD

6: GSH n. 20 mM, 10' de retraso, PIC-1 0,2 mM

25

7: GSH neutralizado 20 mM

8: Control Sin Tratar

Tabla 17A Valores de ATP intracelular durante 42 días de almacenamiento.

Días	ATP de la muestra de GR $\mu\text{mol/g Hb}$							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	4,02	4,38	5,21	4,86	4,93	4,82	5,17	4,46
0,5	4,63	4,78	6,78	6,60	6,92	6,56	6,54	4,28
0,8	4,58	4,69	6,37	6,31	6,58	6,45	6,41	4,55
7	3,55	3,77	5,21	5,80	6,04	6,12	6,15	3,59
14	2,38	2,54	4,24	4,36	4,44	4,62	4,86	2,74
28	1,51	1,67	3,00	3,11	3,16	3,44	3,21	2,15
35	0,79	0,76	1,37	1,50	1,53	1,65	1,64	1,04
42	1,01	1,12	2,01	2,14	2,13	2,34	2,16	1,58

Tabla 17B Porcentaje de hemólisis durante 42 días de almacenamiento.

Días	Porcentaje de hemólisis de la unidad de GR							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	0,22	0,22	0,16	0,18	0,21	0,21	0,16	0,17
0,5	0,27	0,22	0,22	0,20	0,28	0,27	0,19	0,17
0,8	0,42	0,25	0,43	0,21	0,48	0,30	0,19	0,20
7	0,54	0,34	0,48	0,31	0,57	0,44	0,29	0,32
14	0,78	0,51	0,56	0,35	0,61	0,42	0,29	0,42
28	1,10	0,78	0,75	0,47	0,78	0,60	0,48	0,74
35	1,31	0,92	0,86	0,53	0,96	0,66	0,61	0,86
42	1,62	1,10	1,09	0,76	1,13	0,81	0,78	1,20

Tabla 17C Modificación de GR medida por la unión de anticuerpo anti-acridina (FACScan) durante 42 días de almacenamiento.

Días	Fluorescencia media de la unidad de GR							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4	148,1	62,6	11,3	5,24	5,33	4,56	1,94	1,55
7	181,6	81,4	9,03	4,12	6,01	4,05	1,47	1,45
14	115,9	46,7	3,73	3,09	2,77	3,74	1,95	1,49
21	133,0	48,6	3,00	3,40	2,65	3,51	1,73	1,65
28	134,4	46,7	4,59	4,94	2,72	5,16	1,96	2,61
35	143,3	44,51	2,8	3,98	2,22	4,51	1,86	1,85
42	132,4	44,1	3,32	5,00	2,66	5,28	2,02	2,04

Ejemplo 12

Evaluación *in vivo* de la inmunoreactividad de los glóbulos rojos tratados en el modelo de conejo.

[0110] La evaluación *in vivo* de la inmunoreactividad de los glóbulos rojos (GR) que se han tratado con S-303 usando un ejemplo no limitante de un procedimiento de interrupción mejorado, denominado en este ejemplo como los "GR Modificados S-303", se realizó usando un modelo de transfusión alogénica. (Véase a continuación para obtener la descripción del protocolo para los GR Modificados S-303). El modelo de transfusión alogénica usado se basó en un modelo de conejo descrito por Ness y col. (Trans Med Rev, 2001, 15: 305-17) para investigar los mecanismos para las reacciones hemolíticas transfusionales retardadas. En este modelo, se usaron glóbulos rojos *HgD*-positivos para inmunizar animales receptores de *HgD*-negativo. Sin embargo, coherente con la bibliografía de que los GR *HgD*-incompatibles sólo provocan la formación de anticuerpos infrecuentemente, Ness y col. recurrieron a la administración subcutánea de GR *HgD*-positivos combinados con adyuvante para generar titulaciones apreciables de anticuerpos anti-*HgD*.

[0111] La evaluación se realizó en dos fases: En la Fase 1, los conejos se transfundieron repetitivamente con GR alogénicos de conejo, incompatibles en el locus *HgD* y tratados con el proceso Original S-303 (véase la descripción que se muestra a continuación). El criterio de valoración de la Fase 1 fue determinar si podría generarse una respuesta de anticuerpo frente a los GR Originales S-303 en el contexto de las transfusiones alogénicas crónicas. En la Fase 2, los conejos se inmunizaron de forma convencional con un conjugado de KLH-Acridina en adyuvante para estimular la formación de anticuerpos anti-acridina. Después, estos animales inmunizados se transfundieron con GR S-303. El criterio de valoración de la Fase 2 fue comparar la recuperación y la vida útil de los GR preparados

mediante los procesos de GR Originales y Modificados S-303. Las muestras de control en los experimentos de la Fase 1 y la Fase 2 incluían GR S-220 preparados por los procesos originales y modificados. S-220 es una versión no inestable de S-303 que debe representar un caso menos favorable en cuando a la unión de acridina a los GR para cada proceso de tratamiento. Los resultados de estos estudios demuestran que los S-303 Modificados no se ven afectados por la presencia de un anticuerpo de alta titulación *in vivo*.

A. Materiales y Procedimientos

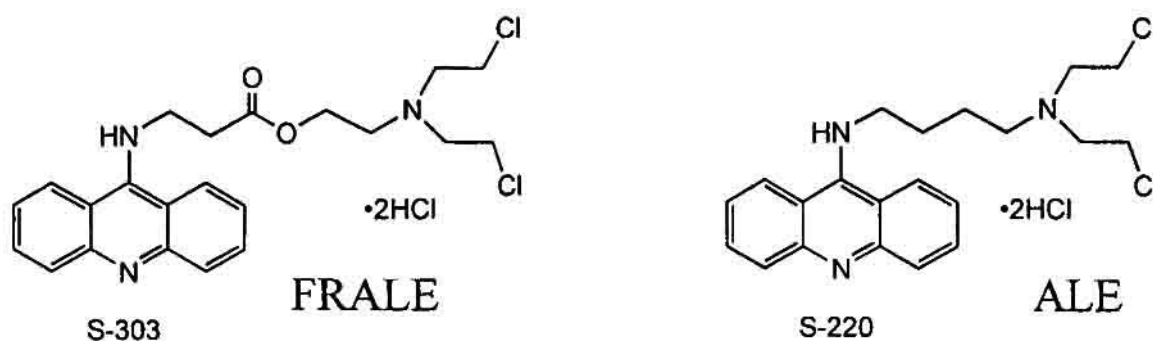
[0112] Cría de animales: Los conejos blancos New Zealand, machos y hembras, tenían aproximadamente de 5 a 7 meses de edad y pesaban entre 3,5 a 4,5 kg al inicio del estudio. Los animales donantes eran HgD-positivos; los receptores eran HgD-negativos.

[0113] Reactivos: El Eritrosol sin dextrosa se fabricó por Baxter Healthcare de acuerdo con la formulación en la Tabla 18. También se fabricó una solución de dextrosa monohidrato al 8% por Baxter.

Tabla 18. La composición de Eritrosol (sin dextrosa)

Ingrediente	Concentración (mg/100 ml)
Citrato sódico dihidrato	782
Adenina	21,5
Manitol	774
Fosfato diácido sódico dihidrato	73,4
Fosfato sódico dibásico, anhidro	242

[0114] El compuesto inactivador de patógenos usado en este ejemplo era PIC-1 que en este ejemplo se denomina S-303. S-303-2HCl se esterilizó por irradiación gamma. Se utilizó un análogo no hidrolizable de S-303, denominado S-220, como control. Las estructuras químicas de S-303 (también denominadas en el presente documento como "PIC-1") y S-220 son como se indican a continuación:



[0115] Los dos compuestos tienen estructuras muy similares con la excepción del enlace éster hidrolizable presente únicamente en S-303. A veces, S-303 se denomina en el presente documento como un compuesto de efector y anclaje unidos por un conector fácilmente hidrolizable (FRALE, *Frangible Anchor Linker Effector*) y S220 como un compuesto de efector y anclaje unidos por un conector (ALE, *Anchor Linker Effector*).

[0116] Se proporcionó GSH en una de dos formas: como un polvo pesado previamente de 184 mg esterilizado por irradiación gamma (Baxter Healthcare) o como una sustancia a granel (Aldrich, St. Louis MO) que se pesará y se formulará en el momento del tratamiento de GR.

[0117] Tratamiento de GR: Los GR se transfundieron a las 24-36 horas de la preparación. La sangre se recogió de forma aséptica de donantes HgD-positivos en ACD-A. Se agrupó aproximadamente de 410 a 500 ml de sangre entera en un recipiente de plástico y se centrifugó a 4200 x g durante 6 minutos. Después de eliminar el plasma, se añadieron 94 ml de Eritrosol sin dextrosa para producir una preparación de glóbulos rojos empaquetados con un hematocrito de aproximadamente el 60%. Los glóbulos rojos empaquetados se trataron en una de tres formas como se muestra en la figura 2 y se describe a continuación.

[0118] GR de Control: Se mezclaron los glóbulos rojos empaquetados con 20 ml de dextrosa al 8% y después se almacenaron a 4 °C antes de la infusión (hasta 2 días).

[0119] GR Originales S-303: El GSH (184 mg) se disolvió en 20 ml de dextrosa al 8%. Después, esta solución de GSH (pH 2,8-3,0) se usó para disolver S-303-2HCl (33 mg). La solución de S-303/GSH se añadió posteriormente a

los glóbulos rojos empaquetados y se mezclaron de forma manual. Los GR se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente, y después se expusieron en un dispositivo de adsorción de compuesto (CAD) durante 8 h más con la mezcla. Las concentraciones finales de S-303 y GSH en los procesos originales eran 0,2 mM y 2,0 mM, respectivamente. Después, los GR Originales S-303 se almacenaron a 4 °C antes de la infusión. Los tratamientos con el proceso original se realizaron usando el mismo kit desechable usado en los estudios clínicos humanos.

[0120] GR Modificados S-303: El GSH-HCl (2026 mg) se pesa en tubos de plástico estériles y se disuelve en 9,32 ml de dextrosa al 8%. Después, el GSH ácido se combina con 1,32 ml de NaOH 10 N, que representa 2 equivalentes de base. Se añaden 10 ml de GSH básico filtrado estéril en dextrosa (pH 9) a los glóbulos rojos empaquetados y se mezclan de forma manual. A los 10 min, el S-303-2HCl (33 mg) se disolvió por separado en 10 ml de dextrosa al 8%, se añadió a los glóbulos rojos empaquetados que contenían GSH, y se mezclaron de forma manual. Los GR Modificados S-303 se incubaron a temperatura ambiente y se expusieron a CAD de forma idéntica al proceso original. Las concentraciones finales de S-303 y GSH en el proceso modificado eran 0,2 mM y 20 mM, respectivamente.

[0121] GR S-220: S-220 es un análogo de S-303 que carece del éster inestable y, por lo tanto, la acridina no puede escindirarse por hidrólisis del resto de la molécula durante el tratamiento de los GR. Los GR S-220 se prepararon usando procedimientos análogos al proceso original o modificado descrito para S-303, y se usaron materiales desechables del proceso original siempre que fue posible. Para los GR Originales S-220, las concentraciones finales de S-220 y GSH fueron 0,2 mM y 2,0 mM, respectivamente. Para los GR Modificados S-220, las concentraciones finales de S-220 y GSH eran 0,2 mM y 20 mM, respectivamente.

[0122] Inmunización de Acridina: Para generar anticuerpos anti-acridina de alta titulación, los conejos se inmunizaron en la Fase 2 con un conjugado de KLH-Acridina. KLH-Acridina se preparó en una escala de 2-5 ml haciendo reaccionar cantidades equimolares (476 µM) de KLH (Pierce Biotechnology, IL) y S-220 en una solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente. Los productos de degradación de molécula pequeña de S-220 se separaron de KLH-Acridina pasando a través de una columna de desalado. El conjugado de KLH-Acridina se caracteriza por su absorción a 210 y 410 nm, y la relación de acridina con respecto a KLH se determinó usando el coeficiente de extinción de S-220. Típicamente, se formaron 200-400 aductos de acridina por molécula de KLH. La solución de KLH-Acridina se refrigeró hasta su uso. Los conejos se inmunizaron el día 1 con KLH-Acridina en adyuvante completo de Freund (0,5 mg/ml) por vía subcutánea en 10 sitios por encima de los nódulos linfáticos poplíteos, pre-escapulares y pre-femorales (aproximadamente 0,1 ml por sitio). Los días 8, 15, 36 y 64, los animales se estimularon con KLH-Acridina en adyuvante incompleto de Freund (0,25 mg/ml) en los mismos sitios (aproximadamente 0,1 ml por sitio). Las muestras de suero de conejo se ensayaron dos veces por semana para observar la formación de anticuerpos.

[0123] Detección del Anticuerpo para Acridina (Fase 1): El anticuerpo para acridina se detectó usando un ensayo de citometría de flujo. Se prepararon GR humanos S-303 como un reactivo de ensayo usando el proceso de tratamiento original. El suero de conejo se diluyó 1:4 y se mezclaron 25 µl del suero diluido con 50 µl de GR humanos S-303 a un hematocrito del 0,8%. Los sueros de pre-inmunización se ensayaron como controles negativos. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C y después se lavaron y se suspendieron de nuevo en 50 µl de solución salina de banco de sangre. El IgG anti-conejo de cabra marcado con FITC (proveedor) se diluyó 1:64 y se incubaron 25 µl con la muestra de GR durante 30 min a 37 °C. Las muestras se lavaron de nuevo y se analizaron por FACS usando el canal FL1 para detectar el completo de anticuerpo ligado. Una vez que se identificó un suero positivo, se realizó el mismo procedimiento con diluciones de suero de conejo para determinar la titulación del criterio de valoración.

[0124] Detección de Anticuerpo para Acridina (Fase 2): Se prepararon GR Humanos S-303 GR como un reactivo de ensayo usando el proceso de tratamiento original (S-303 0,2 µM, GSH 2 mM). Los GR se lavaron tres veces en solución salina de banco de sangre (BBS, Fisher Scientific) y se diluyeron, en BBS, para dar un hematocrito de aproximadamente el 4%. Los sueros de conejos del Grupo V y VI se diluyeron en serie en BBS. Se combinaron 25 µl de GR al 4% con 15 µl de suero de conejo y se dejaron incubar durante 30 min a 37 °C. Se usó BBS en lugar de suero para el control negativo. Después de la incubación, los GR se lavaron tres veces en BBS y después se resuspendieron en 50 µl de IgG F(ab')₂ anti-conejo de cabra conjugado con FITC (H&L) (Caltag) diluido 1:64 en BBS. Los GR se incubaron durante 30 min a 37 °C y se lavaron tres veces con BBS. Después, las muestras se resuspendieron en 1 ml de HaemaLine-2 (HL2, Sereno Diagnostics). Las muestras se analizaron por FACS usando el canal FL1 para detectar un complejo de anticuerpo ligado.

[0125] Medidas de las Infusiones de GR y Vida Útil de los GR: Los GR se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la oreja a 1 ml/min usando bombas de transfusión. En la Fase 1, a los conejos se les dio dosis con 10 ml de GR/kg, mientras que en la Fase 2, a los conejos se les dio dosis con 4 ml de GR/kg. La dosis de 10 ml/kg corresponde a la cantidad aproximada de sangre transfundida mensual en regímenes para pacientes de células falciformes y talasemia.

[0126] La biotilación de GR se realizó después del tratamiento con S-303 o S-220. Los GR (300 ml) se lavaron

dos veces con 200 ml de PBSG (fosfato 12 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 5 mM, pH 7,4) y se suspendieron de nuevo en el mismo medio. Después, se mezclaron con un volumen igual de PBSG que contenía 60 μ M de NHS-biotina (Aldrich, St Louis MO) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación, se lavaron tres veces con 200 ml de PBSG, finalmente se suspendieron de nuevo en PBSG a un hematocrito al 50% y se almacenaron refrigerados hasta la transfusión.

[0127] La vida útil de los GR se evaluó mediante un análisis FACScan. La sangre de conejo se obtuvo a intervalos regulares después de la transfusión (1, 3, 7, 15, 21 y 28 días) de todos los animales. Las muestras se pasaron a través de un filtro de 80 micrómetros para eliminar los micropuntos, se diluyeron para dar HCT al 0,07% en PBSG y se incubaron con estreptavidina marcada con ficoeritrina (dilución 1:100, Molecular Probes) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. El análisis por FACS se realizó en muestras que se diluyeron 5 veces, y se recogieron 50.000 eventos totales a una velocidad de 400 eventos/s para permitir una cuantificación celular precisa. La vida útil de los GR biotinilados se calculó mediante extrapolación para una recuperación del 100% en día 0. Después, los valores en los días posteriores se expresaron como un porcentaje del valor del día 0. Cuando fue apropiado, la significancia estadística de las diferentes de la vida útil se analizó usando el ensayo de t Student con un análisis heteroscedástica.

B. Fase 1: Infusiones Repetidas de GR Incompatibles

[0128] En la Fase 1, los animales se transfundieron dos veces por semana durante 24 semanas con 10 ml/kg de GR alógenos incompatibles en el locus *HgD* para determinar si puede detectarse una respuesta para GR S-303. Se describen cohortes de animales en la Tabla 19.

Tabla 19. Cohortes de animales en la Fase 1

Cohorte	Número	Régimen de Inmunización
Grupo 1	4	GR de control, intravenoso
Grupo 2	6	GR Originales del Proceso S-303, intravenoso
Grupo 3	2	Conjugado de KLH-Acridina, subcutáneo
Grupo 4	6	GR Originales del Proceso S-220, intravenoso

[0129] El suero se muestreó a intervalos semanales y se ensayó en un ensayo basado en citometría de flujo para observar la presencia de anticuerpo anti-acridina. En resumen, los GR humanos S-303 preparados por el proceso original (S-303 0,2 mM y GSH 2 mM) se incubaron con una dilución 1:4 de suero de conejo. Después del lavado, la presencia de anticuerpo de conejo ligado se detectó con un IgG anti-conejo de cabra marcado con FITC. El único resultado positivo se detectó en el grupo 3 en la dilución 1:4. Los resultados a lo largo de las 24 semanas de la infusión se muestran en la figura 1. Los animales inmunizados con KLH-Acridina demostraron una fuerte respuesta del anticuerpo anti-acridina. Por el contrario, no hubo una respuesta del anticuerpo significativa en los animales transfundidos repetidamente con los GR S-303 o S-220 preparados por el proceso original.

[0130] Los resultados mostrados en la figura 1 se confirmaron realizando ensayos de aglutinación con GR humanos S-303 tratados con el proceso original para la mayoría de las muestras de suero. Se mostraron únicamente sueros de animales del Grupo 3 inmunizados con KLH-Acridina para aglutinar los GR humanos S-303. Además, no se observó una respuesta anti-*HgD* en ningún animal receptor.

C. Fase 2: Determinación de la Vida Útil de los GR en Conejos Inmunizados con KLH-Acridina

[0131] Ya que las infusiones repetidas con preparaciones de GR tratados con S-303 o S-220, incompatibles con el antígeno no pudieron generar una respuesta inmune anti-acridina, en la Fase 2, se adoptó un enfoque más estricto para producir el anticuerpo anti-acridina. Los animales se inmunizaron con KLH-Acridina usando un régimen de estímulo primario convencional que incluye adyuvante y después se midió la vida útil *in vivo* de diversas preparaciones de GR tratados en conejos o un anticuerpo de alta titulación. Los resultados de la Fase 1 demostraron que esto era factible para inmunizar conejos a través de la inmunización subcutánea con KLH-Acridina y para conseguir altas titulaciones de anticuerpos.

[0132] También se utilizaron animales en los Grupos 1, 2 y 4 en la Fase 2. Estos grupos se subdividieron, y un subconjunto de animales se inmunizó con KLH-Acridina, mientras que los restantes se mantuvieron en su régimen de transfusión existente. A la Fase 2 se le añadieron dos cohortes adicionales de conejos *HgD*-negativos que estaban sin tratar para infusiones de GR de cualquier tipo. Se proporciona una descripción de las cohortes experimentales en la Fase 2 en la Tabla 20.

Tabla 20. Cohortes de Animales en la Fase 2

Grupo	Número	Fase 1 de la Inmunización	Fase 2 de la Inmunización
1A	2	GR de Control	GR de Control
1B	2	GR de Control	KLH-Acridina
2A	2	GR Originales S-303	GR Originales S-303
2B	4	GR Originales S-303	KLH-Acridina
4A	2	GR Originales S-220	GR Originales S-220
4B	4	GR Originales S-220	KLH-Acridina
5	6	Ninguno	KLH-Acridina
6	6	Ninguno	KLH-Acridina

5 **[0133]** Durante las inmunizaciones en la Fase 2, la producción de anticuerpos se siguió semanalmente de los mismos ensayos de FACS y aglutinación usados en la Fase 1. Después de aproximadamente 8 semanas, todos los conejos inmunizados con KLH-Acridina desarrollaron una fuerte respuesta a anticuerpo específica para los GR humanos S-303, mientras que el suero de animales inmunizados con las diversas preparaciones de GR continuó siendo no reactivo.

10 **[0134]** Se determinó la titulación del anticuerpo anti-acridina en suero de los Grupos V y VI. Se usó un análisis de citometría de flujo para titular muestras de suero de animales de la pre-transfusión 1 (GR Originales procesados) y de la pre-transfusión 2 (GR Modificados procesados) en los grupos V y VI. Los animales del Grupo V recibieron GR tratados con S-303, mientras que los animales del Grupo VI se transfundieron con GR tratados con S-220.

15 **[0135]** La titulación se definió como la dilución de suero en la que la fluorescencia media estaba por encima del fondo. Todos los conejos tenían anticuerpos anti-acridina de alta titulación. La titulación para el Grupo V era ligeramente menor en sueros tomados antes de la Transfusión 1 ("Pre-T1") en comparación con sueros de la pre-transfusión 2 ("Pre-T2". La titulación del Grupo VI era la misma antes de ambas transfusiones.

20 **Tabla 21. Promedio del título del criterio de valoración/grupo antes de la Transfusión 1 y la Transfusión 2**

	Pre-T1	Pre-T2
Grupo V	1:2048	1:4096
Grupo IV	1:4096	1:4096

25 **[0136]** Una vez que el anticuerpo de suero se estableció por inmunización de KLH-Acridina, cada animal se transfundió para determinar la vida útil *in vivo* de diversas preparaciones de GR. Se usó una etiqueta de biotina para seguir la circulación *in vivo* de los GR (Suzuki y Dale (1987) Blood 70: 791-5). La NHS-biotina forma una unión covalente a proteínas de membrana de los GR, y puede detectarse usando estreptavidina marcada por fluorescencia. Los conejos recibieron aproximadamente 4 ml de GR/kg de acuerdo con el esquema en la Tabla 22. Después de la transfusión el día 0, la sangre se extrajo los días 1, 3, 7, 15, 21 y 28 para medir el porcentaje de células marcadas con biotina en circulación con respecto al día 0. Los GR de prueba eran GR de Control sin tratar, GR S-303 preparados usando el procedimiento original o modificado, o GR S-220 preparados usando el procedimiento original o modificado como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Transfusiones para determinar la vida útil de los GR por cohorte de animales

Grupo	Anticuerpo de acridina	Transfusión 1*	Transfusión 2*
1A	No	GR de Control	GR de Control
1B	Sí	GR de Control	GR de Control
2A	No	GR Originales S-303	GR Modificados S-303
2B	Sí	GR Originales S-303	GR Modificados S-303
4A	No	GR Originales S-220	GR Modificados S-220
4B	Sí	GR Originales S-220	GR Modificados S-220
5	6	GR Originales S-303	GR Modificados S-303
6	6	GR Originales S-220	GR Modificados S-220

*Todas las preparaciones de GR se marcaron con biotina antes de la infusión.

35 **[0137]** **Vida útil de GR Preparados por el Proceso Original:** La supervivencia de los GR de Control se midió en conejos no inmunes e inmunes a acridina (subgrupos 1A y 1B, respectivamente, Tabla 21). Puesto que no hay diferencia en la vida útil de los GR entre estos subgrupos, los datos se presentan de forma gráfica a continuación como el porcentaje de recuperación media para los cuatro animales combinados. Se usaron animales que recibieron

GR de Control como un comparador para todos los demás grupos.

[0138] Los Grupos 4 y 6 recibieron GR S-220 preparados por el proceso original en la Transfusión 1. Se usó S-220 porque representa el "caso menos favorable" para la formación de hapteno. La acridina no puede hidrolizarse durante un tratamiento *in vitro* o posteriormente durante la circulación *in vivo*. El Grupo 4A y 4B se ha transfundido con GR Originales S-220 en la Fase 1 del estudio, mientras que el Grupo 6 estaba sin tratar para GR S-220 (Tabla 20). Había una diferencia llamativa en la vida útil de los GR Originales S-220 dependiendo del historial de inmunización de los animales (figura 2). Los animales del Grupo 1, que recibieron los GR de Control, tenían la vida útil de los GR más larga, y los GR biotinilados pueden detectarse en circulación el día 57. La eliminación de los GR de Control era aproximadamente lineal con el tiempo. Por el contrario, el Grupo 6, inmunizado con KLH-Acridina y que nunca se había transfundido con GR S-220, demostró una eliminación rápida de los GR Originales S-220. Básicamente, no se detectaron GR S-220 el día 20. Esto demuestra que los conejos del Grupo 4B, que se habían inmunizado por el procedimiento de KLH-Acridina, pero a diferencia del Grupo 6, también se habían transfundido de forma repetitiva con GR Originales S-220 en la Fase 1, mostraron una supervivencia de los GR significativamente mayor. Sin embargo, la vida útil de S-220 Original en el Grupo 4B se redujo en comparación con el Grupo 4A (que no se había inmunizado con KLH-Acridina). La vida útil de los GR medida en el Grupo 1 (que recibió los GR de control) y el Grupo 4A (que recibió los GR Originales S-220) era comparable, aunque circulaba un mayor porcentaje de GR de Control en el Grupo 1 pasadas tres semanas.

[0139] Se hizo una comparación similar midiendo la vida útil de los GR Originales S-303 en los Grupos 2A, 2B y 5 (figura 3). La vida útil más corta se observó para los GR S-303 en los conejos del Grupo 5, que se inmunizaron para KLH-Acridina y estaban sin tratar para GR S-303. Sin embargo, a diferencia del Grupo 6, los GR Originales S-303 no se eliminaron el día 20 y podían detectarse GR S-303 biotinilados hasta el día 57. De forma interesante, la vida útil de GR Originales S-303 en los conejos del Grupo 2B, que tenían un alto nivel de anticuerpo anti-acridina circulante, no era diferente de forma tangible del Grupo 1 que recibía los GR de Control. En la comparación de resultados para los conejos de los Grupos 2B y el Grupo 5, parece que la exposición previa a GR Originales S-303 mejoró los efectos del anticuerpo anti-acridina en la eliminación de GR. Este resultado inesperado es similar al que se observó para los Grupos 4B y 6 usando GR Originales S-220 (figura 2).

[0140] Vida útil de GR Preparados por el Proceso Modificado: El proceso modificado se desarrolló para mejorar la interrupción por GSH, cambiando múltiples parámetros. En primer lugar, la cantidad de GSH aumentó 10 veces. En segundo lugar, el GSH se tituló con NaOH antes de la adición a los GR; esto mejora la nucleofilicidad del grupo -SH. Estos cambios conducen a una reducción significativa de S-303 ligando a la superficie de los GR (véase, por ejemplo, el Ejemplo 5 y el Ejemplo 13). Se prepararon GR Modificados S-220 usando el mismo enfoque.

[0141] La vida útil de los GR Modificados S-220 se evaluó en los Grupos 4A, 4B y 6 (figura 4). Como se ha observado previamente para los GR S-220 preparados con el proceso original, la vida útil de los GR Modificados S-220 en los animales del Grupo 6 se redujo significativamente en comparación con los GR de control transfundidos en los animales del Grupo 1. Sin embargo, la reducción en la circulación de GR Modificados S-220 con el tiempo fue significativamente menor que la observada en los mismos animales con GR Originales S-220. Por ejemplo, una media del 18 por ciento de GR Modificados estaban circulando el día 14, mientras que únicamente se observaron el 1,4% de los GR Originales en el mismo punto de tiempo. Además, la vida útil de los GR Modificados S-220 en los Grupos 4A (sin anticuerpo) y 4B (anticuerpo inducido por KLH-Acridina) era equivalente a o mejor que los GR de Control en el Grupo 1. Coherente con los datos previos (figura 3), la exposición previa a GR Originales S-220 parece tener un aumento de la vida útil de GR S-220 incluso en presencia de un anticuerpo de alta titulación.

[0142] Por último, la vida útil de los GR Modificados S-303 en los Grupos 2A, 2B y 5 se presenta en la figura 5. En todos los casos, la vida útil de los GR Modificados S-303 era comparable con los GR de Control. Éste era el caso incluso para los animales del Grupo 5, que habían demostrado un aumento de la eliminación de los GR Originales S-303. Estos datos importantes sostienen el hallazgo *in vitro* de que los GR tratados con S-303 preparados por el Proceso Modificado no son *inmunoreactivos in vitro* con el anticuerpo anti-acridina obtenido a partir de varias fuentes. Esto incluye sueros de pacientes, un anticuerpo murino monoclonal, y antisueros policlonales de conejo.

Ejemplo 13

Análisis FACScan Adicional de GR Tratados con S-303

[0143] Para el ensayo por citometría de flujo de GR para la unión de S-303 (PIC-1), se lavaron tres veces 50 µl de sangre en 1,2 ml de solución salina al 0,9%, y después se suspendieron de nuevo en 0,75 ml de solución salina a un hematocrito aproximadamente al 4%. Se combinaron veinticinco µl de GR con 15 µl de suero anti-acridina de conejo que se había diluido 1:100. Después de la incubación durante 30 min a 37 °C, la muestra se lavó tres veces como anteriormente. Después, el gránulo de GR se suspendió de nuevo en un volumen de 50 µl de anticuerpo anti-conejo de cabra marcado con FITC (Caltag) que se había preparado a una dilución 1:64 en albúmina de suero bovino al 0,1%. Se incubaron muestras en la oscuridad durante 30 min a 37 °C. Después de tres lavados adicionales, los GR se suspendieron de nuevo en 1 ml de HaemaLine-2 (Serono Diagnostics). Después de la dilución para dar

hematocrito al 0,01%, se recogieron 20.000 eventos y se analizaron para observar su fluorescencia a 600 nm.

5 **[0144]** El proceso modificado da como resultado niveles significativamente bajos de la unión de S-303 a la
superficie de los GR, como se detecta usando un ensayo de citometría de flujo. Se detecto S-303 unido a los GR
usando un antisuero de conejo policlonal, hecho inmunizando conejos con un conjugado de KLH-Acridina en
adyuvante. Después, se detecto IgG enlazado de conejo usando IgG anti-conejo de cabra marcado con FITC. Se
muestran los resultados del análisis por FACScan para nueve agrupaciones separadas de GR preparadas usando el
proceso original y modificado de la figura 6. Para cada agrupación, se usó el ensayo FACScan para detectar la unión
10 de S-303 a C-GR, O-GR y M-GR. La unión de S-303 a la superficie de los GR se redujo entre 15 a 35 veces
mediante el proceso modificado con respecto al proceso original.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de una composición de glóbulos rojos para inactivar un patógeno, si está presente, que comprende mezclar los siguientes con la composición de glóbulos rojos:
- 5 (a) un compuesto inactivador de patógenos que es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster;
- (b) un interruptor que es glutatión, en el que la proporción molar de interruptor con respecto al compuesto inactivador de patógenos es de 20:1 a 200:1,
- 10 en el que el glutatión se neutraliza con 0,5 a 2 equivalentes de base, en el que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que tanto la base como el interruptor se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes de, al mismo tiempo, o no más de 30 minutos después de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la base y el interruptor se mezclan entre sí antes de mezclar la base o el interruptor con la composición de glóbulos rojos.
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que tanto el interruptor como la base se proporcionan por una sal básica que comprende el interruptor.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la base es NaOH.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la base es un tampón básico.
- 30 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la base comprende al menos 1 equivalente de base.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la concentración del interruptor en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base es mayor de 2 mM.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la concentración del interruptor en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base es mayor de 2 mM, y en el que el pH de la mezcla resultante a temperatura ambiente está en el intervalo de 7,0 a 8,5, comprendiendo adicionalmente el procedimiento la etapa de:
- 40 (c) ajustar el pH de la composición que comprende glóbulos rojos de manera que el pH de la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base a temperatura ambiente esté en el intervalo de 7,0 a 8,5.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición de al menos 1 equivalente de base.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el interruptor se neutraliza con al menos un equivalente de una base adecuada anterior a la adición del interruptor a la composición de glóbulos rojos, y el pH de la composición que comprende glóbulos rojos se ajusta mediante la adición del interruptor neutralizado.
- 55 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la concentración del interruptor en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base está en el intervalo de 4 mM a 40 mM.
- 60 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la concentración de glutatión en la mezcla resultante es de 5 mM a 30 mM, y la concentración del β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster es de 0,05 mM a 0,5 mM.
- 65 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la concentración de glutatión en la mezcla resultante es de 5 mM a 30 mM, y la concentración del β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster es de 0,1 mM a 0,3 mM.

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la proporción molar de interruptor con respecto al compuesto inactivador de patógenos es de 50:1 a 200:1.
- 5 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el tratamiento da como resultado una inactivación de al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos.
- 10 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende adicionalmente una etapa final de reducir la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base.
18. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende, en el siguiente orden:
- 15 (a) proporcionar i) β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, ii) glutatión neutralizado, y iii) una composición que comprende glóbulos rojos, en la que existe la posibilidad de que la composición de glóbulos rojos esté contaminada con un patógeno;
- (b) mezclar el glutatión neutralizado con la composición que comprende glóbulos rojos;
- (c) incubar la mezcla de glutatión neutralizado y la composición que comprende glóbulos rojos durante un intervalo de tiempo apropiado; y
- 20 (d) mezclar el β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster con la mezcla de glutatión neutralizado y la composición que comprende glóbulos rojos, en la que un patógeno, si está presente en la composición que comprende glóbulos rojos, está inactivado por al menos 1 log.
19. Una composición que comprende:
- 25 (a) glóbulos rojos;
- (b) β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster;
- (c) glutatión neutralizado como un interruptor, donde el interruptor está a una concentración mayor de 2 mM y la proporción de interruptor con respecto al compuesto inactivador de patógenos es de 20:1 a 200:1, y
- 30 en la que el glutatión se neutraliza con 0,5 a 2 equivalentes de base, donde un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el compuesto inactivador de patógenos, el interruptor y la base, y
- en la que el pH de la composición está en el intervalo de 6,8 a 8,5.
- 35 20. Un kit, que comprende un compuesto inactivador de patógenos que es β -alanina, N-(acridin-9-il), 2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster, un interruptor que es glutatión, y al menos de 0,5 a 2 equivalentes de base, en el que un equivalente se refiere a una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de interruptor en el kit.
- 40 21. El kit de la reivindicación 20, en el que la base comprende al menos 1 equivalente de base.

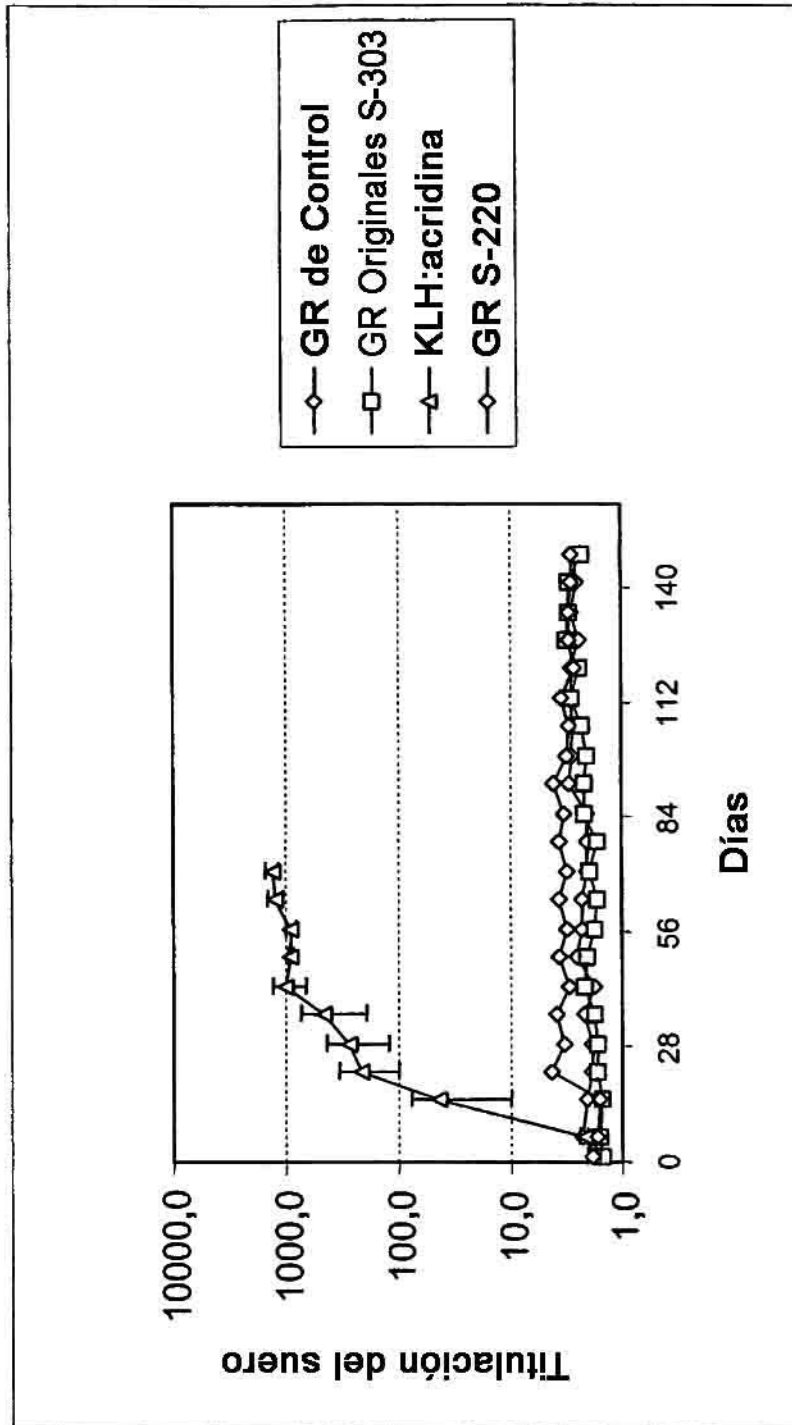


FIGURA 1

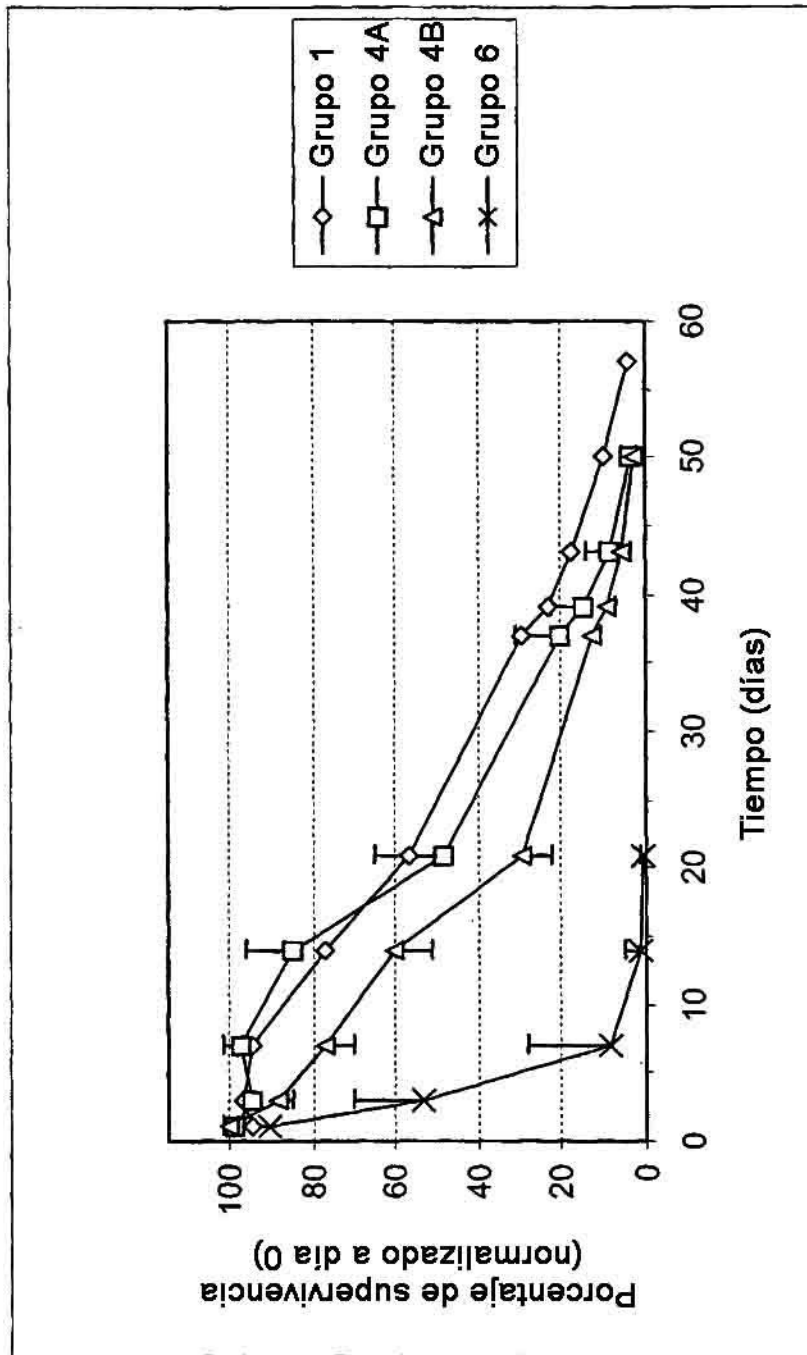


FIGURA 2

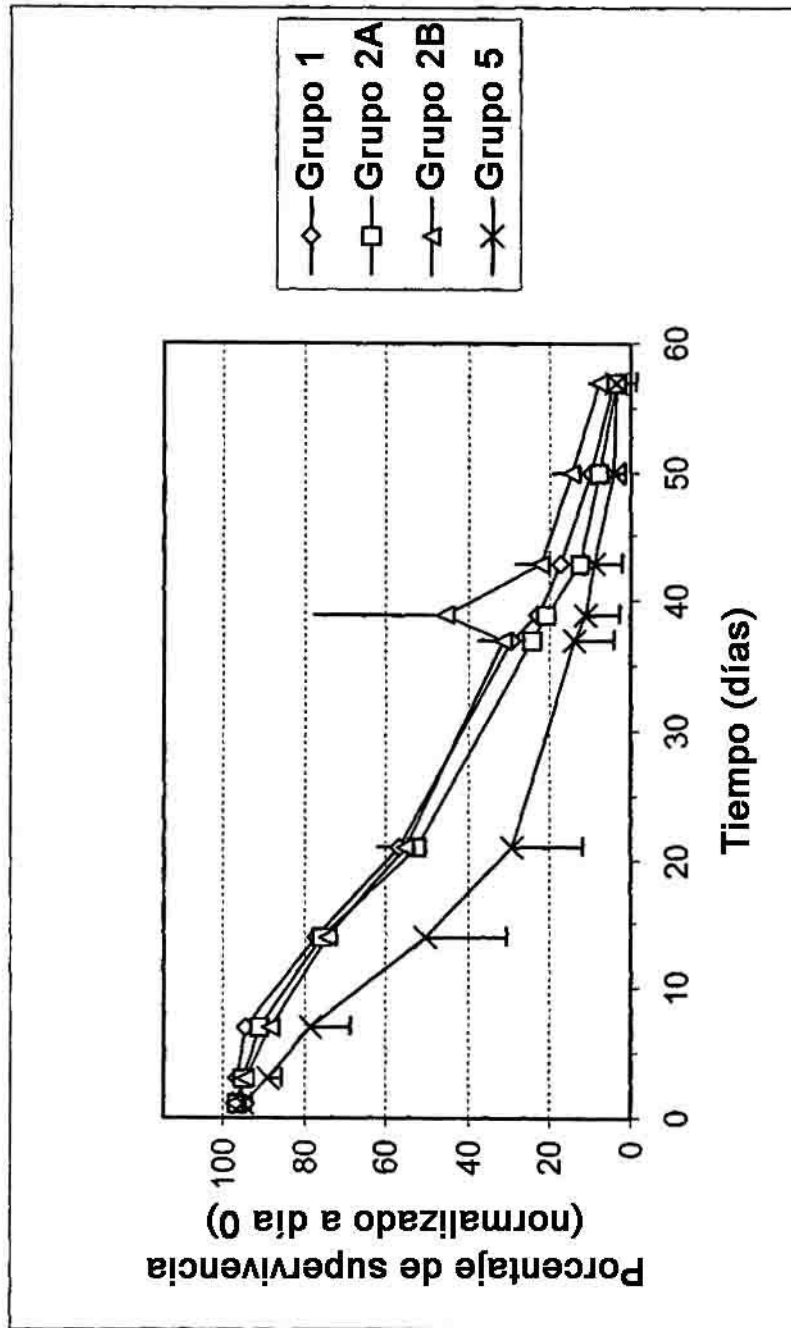


FIGURA 3

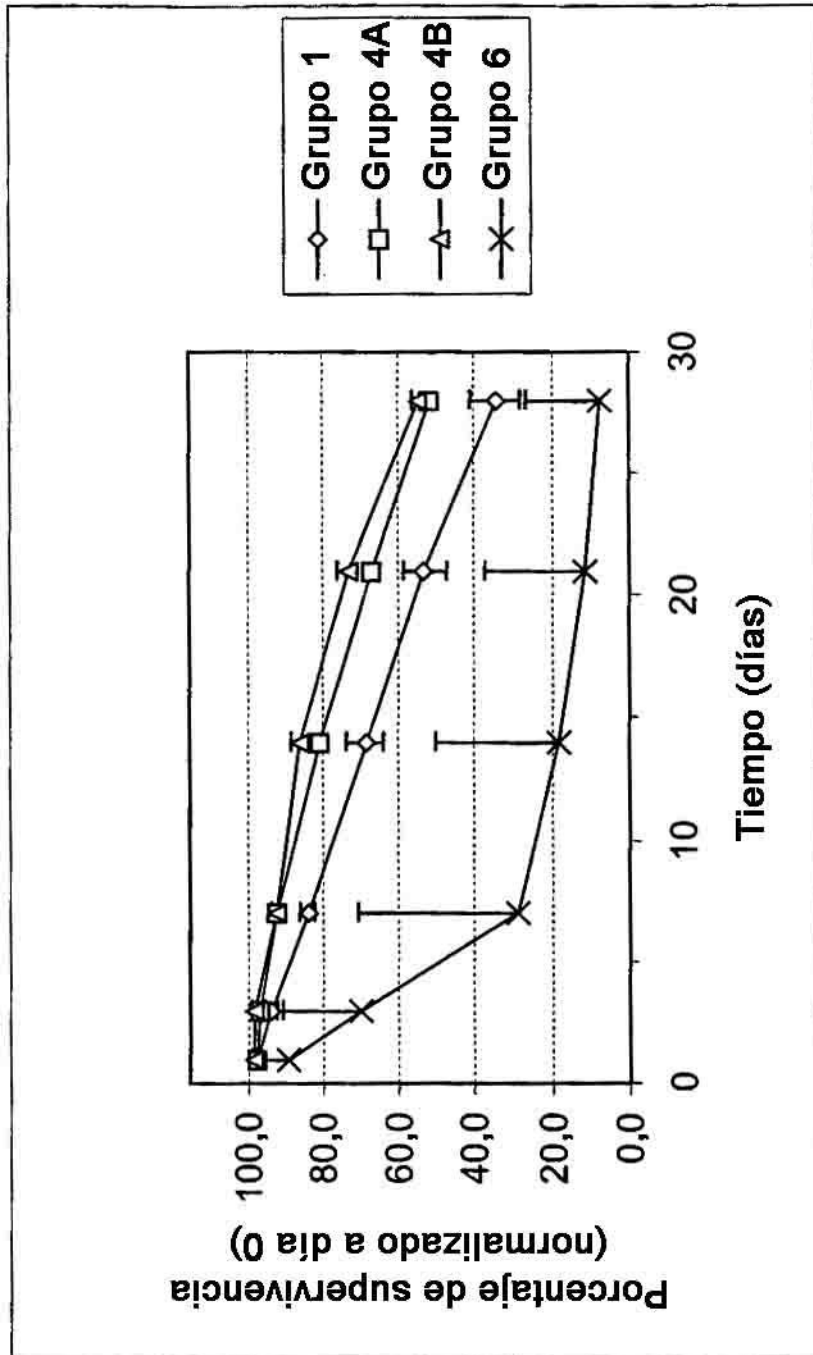


FIGURA 4

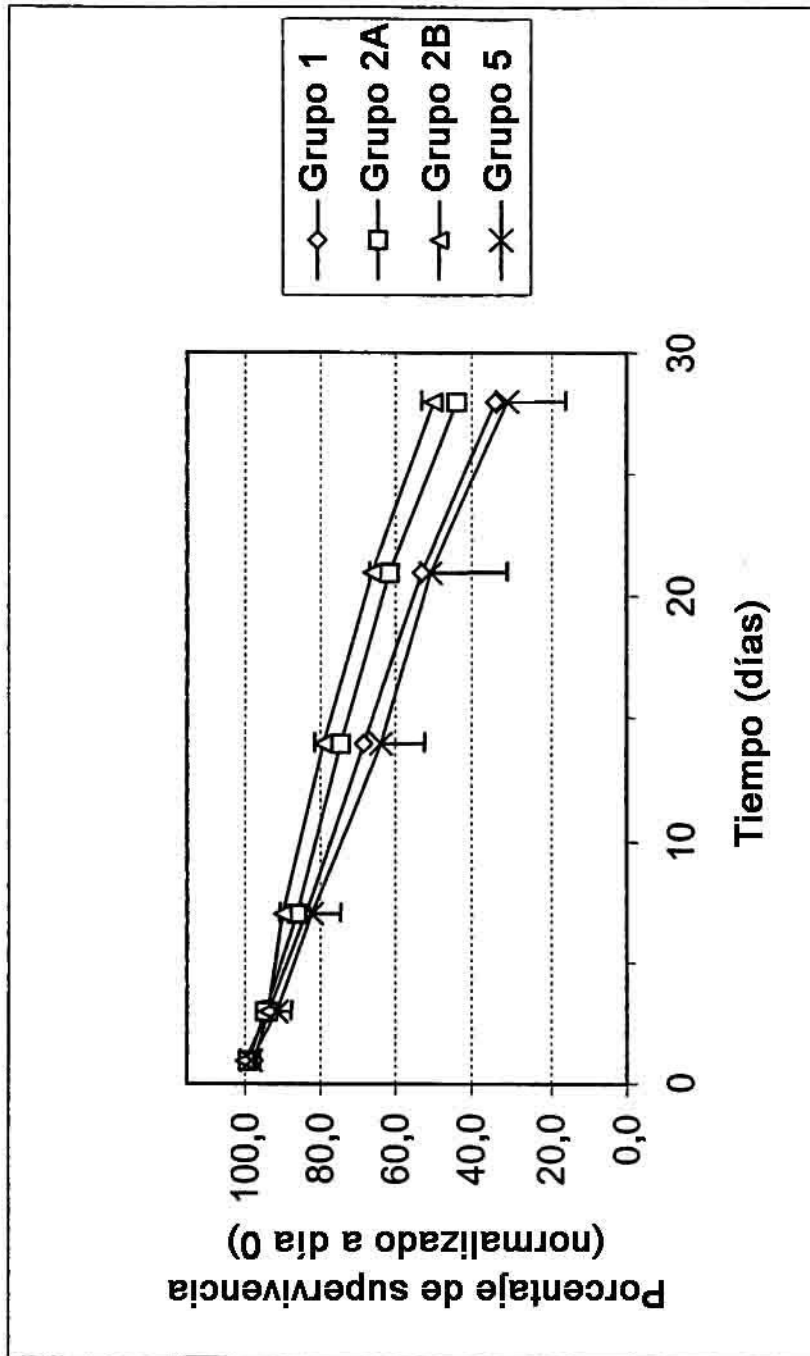


FIGURA 5

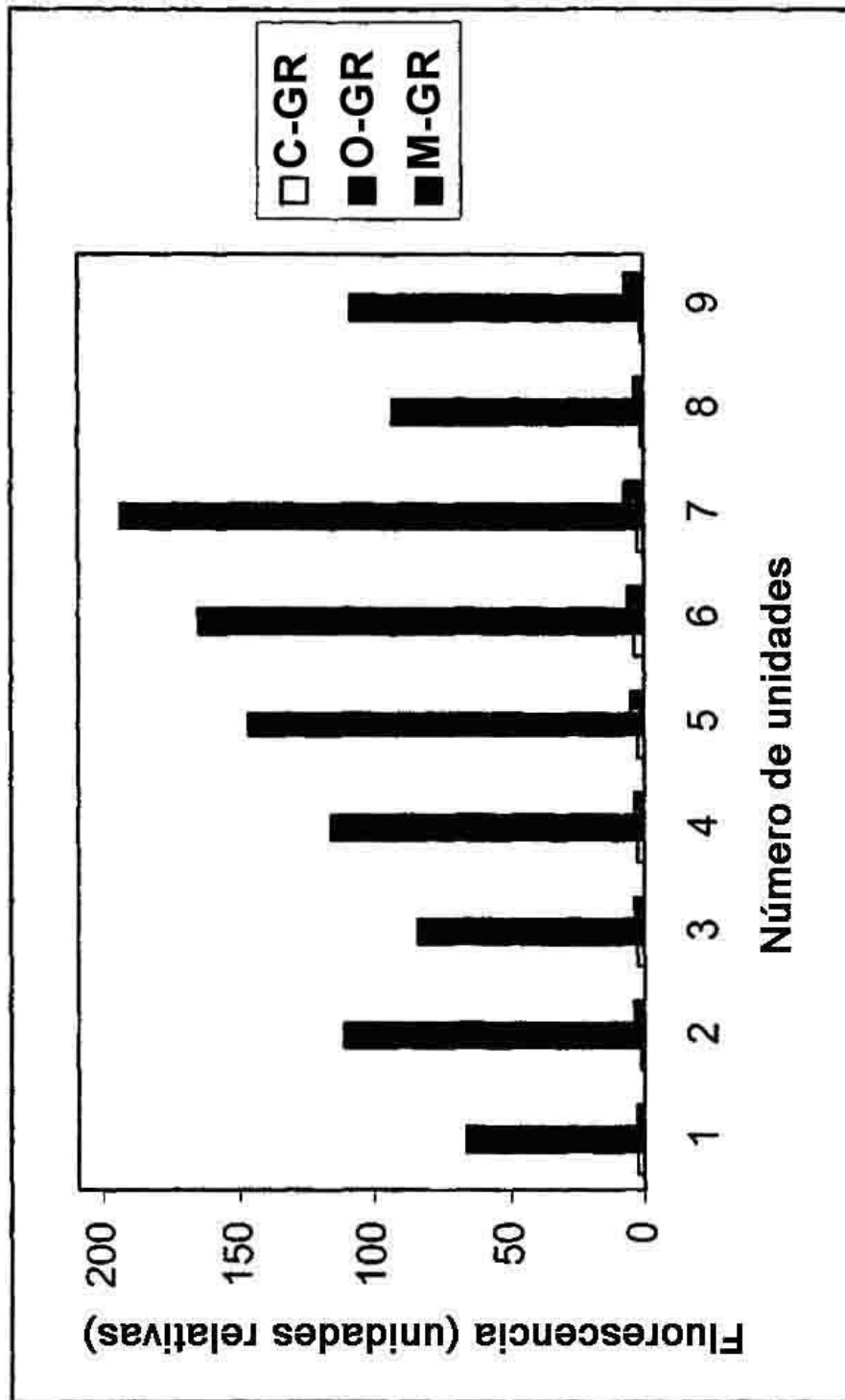


FIGURA 6