

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 563**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/42** (2006.01)

**A61L 2/00** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2009 PCT/US2009/040032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09730332 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2285210**

54 Título: **Método de reducción de la deshidratación en una composición de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

**09.04.2008 US 43666 P**  
**07.08.2008 US 87034 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.10.2017**

73 Titular/es:

**CERUS CORPORATION (100.0%)**  
**2550 Stanwell Drive**  
**Concord, CA 94520, US**

72 Inventor/es:

**MUFTI, NAHEED;**  
**ERICKSON, ANNA y**  
**NORTH, ANNE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 636 563 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

Método de reducción de la deshidratación en una composición de glóbulos rojos

5 **Campo de la invención**

El campo de la presente invención se refiere a métodos mejorados de interrupción de compuestos electrófilos reactivos usados en el tratamiento de productos sanguíneos para inactivar posibles contaminantes patógenos. En particular, se usan compuestos nucleófilos, tales como tioles, a una concentración elevada para interrumpir los compuestos electrófilos reactivos en composiciones de glóbulos rojos y, después, se disminuye la concentración para reducir la deshidratación de los glóbulos rojos (GR).

**Antecedentes de la invención**

15 La transmisión de enfermedades a través de los productos sanguíneos y otros materiales biológicos sigue siendo un grave problema para la salud. Aunque se han producido avances importantes en la identificación sistémica de los donantes de sangre y en los análisis de sangre, los virus, tales como el virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pueden escapar a su detección en los 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 detectar la presencia de microbios no virales tales como bacterias o protozoos, en la sangre destinada a su uso en transfusiones. También existe el riesgo de que un patógeno hasta ahora desconocido pueda hacerse prevalente en el suministro sanguíneo y presentar una amenaza de transmisión de enfermedades como ocurrió, de hecho, antes del reconocimiento del riesgo de la transmisión del VIH a través de las transfusiones sanguíneas.

25 Se han introducido agentes químicos en la sangre o en el plasma sanguíneo para inactivar patógenos antes del uso clínico del producto sanguíneo. Por lo general, para los productos sanguíneos que tienen poco o ningún contenido de glóbulos rojos, tales como las plaquetas y en plasma, se usan compuestos fotoquímicamente activados tales como los psoralenos. Para los productos sanguíneos que contienen glóbulos rojos, se han desarrollado compuestos para la inactivación de patógenos, que no requieren fotoactivación. Estos compuestos normalmente tienen grupos electrófilos que reaccionan con los patógenos, más concretamente, con ácido nucleico patógeno. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.055.485 describe la inactivación de virus en composiciones que contienen células y proteínas usando epóxidos de arildiol. Se pueden usar otros compuestos que generan electrófilos *in situ*. LoGrippto *et al.*, evaluaron el uso de la mostaza de nitrógeno,  $\text{CH}_3\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ , para la inactivación vírica. LoGrippto *et al.*, "Proceedings of the Sixth Congress of the International Society of Blood Transfusion", Bibliotheca Haematologica (Hollander, ed.), 1958, pág. 225-230. Más significativamente, las patentes de EE.UU. n.º 5.691.132; 6.177.441; 6.410.219; 6.143.490; y 6.093.725, describen el uso de compuestos que tienen un componente dirigido al ácido nucleico, así como un componente electrófilo que reacciona con el ácido nucleico con el fin de inactivar el patógeno. Las patentes de EE.UU. n.º 6.093.725 y 6.514.987 describen compuestos similares, en los que el componente dirigido al ácido nucleico del compuesto está unido al componente electrófilo reactivo a través de un enlazador hidrolizable. Las patentes de EE.UU. n.º 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 normalmente 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 usan para inactivar patógenos de la sangre, de los productos sanguíneos y de varias muestras de origen biológico.

50 Existe la preocupación de que, mientras estos compuestos están diseñados para dirigirse específicamente a los ácidos nucleicos, pueden reaccionar con otros componentes 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 ser reconocidos por el sistema inmune. Cuando se usan repetidamente dichos productos sanguíneos, pueden generar una respuesta inmune del receptor hacia el producto sanguíneo tratado. Las patentes de EE.UU. n.º 6.270.952; 6.709.810; y 7.293.985 describen métodos de interrupción de dichos compuestos inactivadores de patógenos con el fin de reducir el nivel de cualquiera de dichas reacciones secundarias adversas. La publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0115466 (WO 2006/050238) describe mejoras en estas condiciones de interrupción que se dirigen a una respuesta inmune desarrollada contra el compuesto inactivador de patógenos. Sin embargo, a pesar de la mejora en la eficacia de interrupción, en algunos casos, se ha encontrado que los glóbulos rojos tratados tienen una vida útil reducida atribuida al aumento de la deshidratación celular, medida por la disminución de la fragilidad osmótica y la disminución del hematocrito centrifugado.

65 Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para reducir las reacciones secundarias electrófilas no deseadas de compuestos inactivadores de patógenos, conservando a la vez la capacidad del compuesto inactivador de patógenos para inactivar patógenos dañinos sin afectar negativamente a la vitalidad y la vida útil del producto sanguíneo tratado. En concreto, existe la necesidad de métodos mejorados de interrupción de compuestos inactivadores de patógenos en los glóbulos rojos.

**Breve resumen de la invención**

La presente divulgación proporciona varios métodos de tratamiento de composiciones de glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos y un desactivador en condiciones que proporcionan la inactivación adecuada de los patógenos y la reducción de reacciones secundarias no deseadas (tales como la modificación de los glóbulos rojos), a la vez que reducen o minimizan efectos adversos tales como el aumento de la deshidratación de las células. En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión, que se neutraliza con una cantidad apropiada de base, y el método implica la reducción de la concentración de glutatión después de la inactivación de los patógenos. La invención se define en las reivindicaciones anexas.

En el presente documento, se desvela un método de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar i) una cantidad eficaz de un compuesto inactivador de patógenos para inactivar un patógeno, si está presente, en el que el compuesto inactivador de patógenos comprende un compuesto funcional que es o que forma un grupo electrófilo reactivo; ii) una cantidad eficaz de un desactivador que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos; e iii) una composición que comprende glóbulos rojos; b) mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador con la composición que comprende glóbulos rojos; y c) reducir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla, en relación con el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla a la concentración original del desactivador. En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración del desactivador comprende la eliminación de la solución usada durante la inactivación y la adición de una solución final de aditivos (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M, AS-5 o cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la etapa (a) comprende además proporcionar una base adecuada; la etapa (b) comprende además mezclar la base con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de una reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos en la mezcla, con respecto a la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, 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 algunas realizaciones, la etapa (a) comprende además proporcionar una base adecuada; la etapa (b) comprende además mezclar la base con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de unión del anticuerpo anti-compuesto inactivador de patógenos a la composición de glóbulos rojos tratada en la mezcla resultante en al menos aproximadamente el 5 % (o 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 la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, la base y el desactivador se mezclan con la composición de glóbulos rojos antes, al mismo tiempo o no más de aproximadamente 30 minutos después de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base y el desactivador se mezclan entre sí antes de mezclar bien la base o el desactivador con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base es NaOH. En algunas realizaciones, la base es un tampón básico. En algunas realizaciones, la base comprende de aproximadamente 0,5 a 1,5 equivalentes de base, donde un equivalente significa una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de desactivador en la mezcla. En algunas realizaciones, la base comprende de aproximadamente 0,75 a 1,25 equivalentes de base. En algunas realizaciones, la base comprende aproximadamente 1 equivalente de base. En algunas realizaciones, la mezcla resultante de la etapa (b) tiene un pH a 37 °C de aproximadamente 6,0 a 7,5. En algunas realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,5 a 7,1. En algunas realizaciones, el pH es de aproximadamente 6,8 o 6,9.

En algunas realizaciones, el desactivador comprende cisteína o un derivado de cisteína. En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la concentración del desactivador en la mezcla resultante de la etapa (b) es superior a 2 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es de aproximadamente 20 mM.

En algunas realizaciones, la disminución de la concentración de desactivador en la etapa (c) comprende la centrifugación de la mezcla seguida de la eliminación del sobrenadante. En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende la separación por exclusión de tamaño. En algunas realizaciones, el desactivador de la mezcla resultante de la etapa (c) está a una concentración inferior a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 8 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 6 mM (o inferior a aproximadamente 4 mM o inferior a aproximadamente 2 mM). En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es el almacenamiento de la mezcla durante más de 10 días a 4 °C. En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es el almacenamiento de la mezcla durante más de 42 días (o 28 días) a 4 °C. En algunas realizaciones, el método comprende la adición de una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol). En algunas realizaciones, la mezcla se almacena en una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2

y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol). En algunas realizaciones, el método comprende además el reemplazo de una solución de tratamiento (por ejemplo, cualquier solución descrita en las Tablas 2, 3 o 4 y/o una solución que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol) con una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol). En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la composición antes de disminuir la concentración del desactivador es inferior a aproximadamente 100 mM (o aproximadamente 75 mM). En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la composición después de disminuir la concentración del desactivador y/o añadir la solución de aditivos es superior a aproximadamente 100 mM (o aproximadamente 125 mM).

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el grupo funcional es una mostaza, un producto intermedio de mostaza o un equivalente de mostaza. En algunas realizaciones, el grupo funcional es, o es capaz de formar, un ion aziridinio. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo reactivo es capaz de reaccionar con ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos comprende además un ligando de unión a ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el ligando de unión a ácidos nucleicos es un intercalador. En algunas realizaciones, el intercalador es una acridina. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos comprende un enlazador frangible que une el grupo funcional y el ligando de unión a ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos es *N*-(acridin-9-il)-2-[bis(2-cloroetil)amino]etiléster de β-alanina. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto de inactivación de patógenos en la mezcla resultante de la etapa (b) es de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, la concentración es suficiente para inactivar al menos 1 log de un patógeno en la composición de glóbulos rojos, si está presente. En algunas realizaciones, la concentración es suficiente para inactivar al menos 3 log de un patógeno. En algunas realizaciones, la concentración es suficiente para inactivar al menos 3 log de un patógeno. En algunas realizaciones, el tiempo entre la etapa (b) y la etapa (c) es de aproximadamente 1 a 48 horas. En algunas realizaciones, el tiempo es de aproximadamente 10 a 30 horas. En algunas realizaciones, el tiempo es de aproximadamente 15 a 25 horas. En algunas realizaciones, el tratamiento inactiva al menos 1 log de un contaminante patógeno en la composición de glóbulos rojos, si está presente. En algunas realizaciones, el tratamiento inactiva al menos 3 log. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de disminuir la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla. En algunas realizaciones, las etapas de disminución de la concentración del desactivador en la mezcla y de disminución de la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla se producen al mismo tiempo.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, a las 20 horas siguientes a la etapa (b), los glóbulos rojos (GR) de la mezcla resultante tienen una capacidad de unión al anticuerpo anti-compuesto de inactivación de patógenos (CUA) inferior al 65 % en comparación con el valor de CUA de los glóbulos rojos del mismo método en las mismas condiciones, pero sin el uso de base. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media inferior a aproximadamente 50.000. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos tienen un CUA media inferior a aproximadamente 40.000. En algunas realizaciones, los GR tienen un CUA media de entre aproximadamente 25.000 y 70.000. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media de entre aproximadamente 35.000 y 45.000. En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen menos del 1 % de hemólisis después de la etapa (c). En algunas realizaciones, los glóbulos rojos tienen menos del 1 % de hemólisis en un tiempo de 42 días (o 28 días) a 4 °C tras la etapa (c). En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 50 % después de la etapa (c). En algunas realizaciones, los GR tienen un PCV superior al 50 % en un tiempo de 42 días (o 28 días) a 4 °C después de la etapa (c). En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen un valor de la mediana de la fragilidad corpuscular superior a 140 (o 150) después de 42 días (o 28 días) a 4 °C tras la etapa (c). En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto de inactivación de patógenos no se reduce y/o el compuesto de inactivación de patógenos no se pone en contacto con un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD).

La invención proporciona un método de reducción de la deshidratación en una composición de glóbulos rojos según lo expuesto en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el desactivador de la mezcla resultante de la etapa (b) está a una concentración inferior a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 8 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 6 mM o inferior a aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos (GR) de la mezcla resultante tienen menos del 1 % de hemólisis en un tiempo de 42 días (o 28 días) a 4 °C tras la etapa (b). En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 50 % después de la etapa (b). En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen un PCV superior al 50 % en un tiempo de 42 días (o 28 días) a 4 °C después de la etapa (b). En algunas realizaciones, los GR de la mezcla resultante tienen un valor de la mediana de la fragilidad corpuscular superior a 140 (o 150) después de 42 días (o 28 días) a 4 °C tras la etapa (b). En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es un almacenamiento de la mezcla durante más de 10 días a 4 °C. En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es un almacenamiento de la mezcla durante más de 42 días (o 28 días) a 4 °C. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto de inactivación de patógenos no se reduce y/o el compuesto de inactivación de patógenos no se pone en contacto con un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD).

Se proporcionan composiciones de glóbulos rojos (GR) producidas mediante cada uno de los métodos anteriormente desvelados. También se proporcionan composiciones de GR que se pueden preparar mediante cada uno de los métodos anteriormente desvelados.

5 En un aspecto adicional, en el presente documento, se describe una composición que comprende: a) glóbulos rojos, en la que los glóbulos rojos han reaccionado covalentemente con un grupo electrófilo de un compuesto inactivador de patógenos; y b) un desactivador que comprende un grupo tiol que es capaz de reaccionar con el compuesto inactivador de patógenos; en el que la composición es adecuada para su infusión en seres humanos después de un almacenamiento de hasta 42 días (o 28 días) a 4 °C. En algunas realizaciones, se inactiva al menos 1 log de un patógeno, si está presente. En algunas realizaciones, se inactivan al menos 3 log. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo es una mostaza, un producto intermedio de mostaza o un equivalente de mostaza. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo es, o es capaz de formar, un ion aziridinio. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo es capaz de reaccionar con ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo. En algunas realizaciones, el grupo electrófilo se hace reaccionar covalentemente con la superficie celular de los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos comprende además un ligando de unión a ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ligando de unión a ácido nucleico es un intercalador. En algunas realizaciones, el intercalador es una acridina. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos comprende un enlazador frágil que une el grupo electrófilo y el ligando de unión a ácido nucleico. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos es *N*-(acridin-9-il)-2-[bis(2-cloroetil)amino]etiléster de β-alanina. En algunas realizaciones, el desactivador comprende cisteína o un derivado de cisteína. En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el desactivador está a una concentración que es lo suficiente baja para evitar o reducir al mínimo la deshidratación de los glóbulos rojos durante el almacenamiento. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 8 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es inferior a aproximadamente 6 mM, o inferior a aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos (GR) tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 55 %. En algunas realizaciones, los GR tienen un PCV superior al 60 %. En algunas realizaciones, los GR tienen una capacidad de unión a anticuerpos (CUA) media inferior a aproximadamente 50.000. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media inferior a aproximadamente 40.000. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media de entre aproximadamente 25.000 y 60.000. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media de entre aproximadamente 25.000 y 70.000. En algunas realizaciones, los GR tienen una CUA media de entre aproximadamente 35.000 y 45.000. En algunas realizaciones, la composición comprende además una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol). En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la solución de aditivos y/o de la composición es superior a aproximadamente 100 mM (o aproximadamente 125 mM).

En un aspecto adicional, en el presente documento, se describen métodos de infusión de glóbulos rojos en un individuo, que comprende: a) proporcionar una cualquiera de las composiciones de glóbulos rojos anteriormente mencionadas o una composición de glóbulos rojos producida mediante uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento; y b) infundir la composición de glóbulos rojos en el individuo.

En un aspecto, en el presente documento, se describe un método de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: (a) mezclar (i) un compuesto inactivador de patógenos que comprende un grupo funcional que es o que forma un grupo electrófilo reactivo (por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto inactivador de patógenos para inactivar un patógeno, si está presente); (ii) un desactivador (por ejemplo, una cantidad eficaz de un desactivador) que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos; e (iii) una composición que comprende glóbulos rojos; y (b) disminuir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación de glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla con respecto al nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla a la concentración original de desactivador. En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración del desactivador comprende la eliminación de la solución usada durante la inactivación y la adición de una solución final de aditivos (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M, AS-5 o cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4). El método puede comprender una o más de las realizaciones enumeradas anteriormente y/o en el presente documento.

En algunas realizaciones, el método comprende además mezclar una base adecuada con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de una reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos en la mezcla, con respecto a la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, 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 algunas realizaciones, el método comprende además mezclar una base adecuada con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de unión del anticuerpo anti-compuesto inactivador de patógenos a la composición de glóbulos rojos tratada en la mezcla resultante en al menos aproximadamente el 5 % (o 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 la mezcla sin la base.

La invención proporciona un método de reducción de la deshidratación en una composición de glóbulos rojos según lo expuesto en las reivindicaciones.

- 5 En otro aspecto, en el presente documento, se describe un método de infusión de glóbulos rojos, que comprende infundir una composición de glóbulos rojos descrita en el presente documento en un individuo.

#### Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos a diversos niveles de base tras la dosificación inicial del desactivador como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 2 muestra la densidad de glóbulos rojos a varios niveles de base a las 20 horas de incubación.

- 15 La Figura 3 muestra la densidad de glóbulos rojos a varios niveles de base tras la incubación y 36 días de almacenamiento.

La Figura 4 muestra la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos tras la incubación y 36 días de almacenamiento con y sin disminución de la concentración de desactivador (es decir, con/sin etapa de intercambio).

- 20 La Figura 5 muestra la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos tras la incubación y 42 días de almacenamiento con una concentración inicial de desactivador variable (con etapa de intercambio) en comparación con la concentración inicial moderada de desactivador (sin etapa de intercambio).

- 25 La Figura 6 muestra la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos tras la incubación y 36 días de almacenamiento con y sin compuesto inactivador de patógenos.

La Figura 7 muestra los valores de capacidad de unión a anticuerpos (CUA) para varios preparados de glóbulos rojos usando los métodos de la presente invención.

- 30

#### Descripción detallada de la invención

- La presente invención se refiere a un método de tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar los patógenos que pueden estar presentes, reduciendo o minimizando a la vez las reacciones secundarias no deseadas (tales como la modificación de los glóbulos rojos que conduce a una respuesta inmune no deseada) y reduciendo y minimizando los efectos adversos sobre la vitalidad celular (por ejemplo, disminución de la fragilidad osmótica y/o aumento de la deshidratación) y/o la vida útil durante y después del tratamiento. Los presentes inventores han encontrado que el control adecuado del pH junto con las cantidades adecuadas de desactivador durante el proceso de inactivación de patógenos pueden reducir la deshidratación inicial de los glóbulos rojos tratados con un compuesto inactivador de patógenos. A continuación, el proceso puede seguirse mediante la reducción de la concentración inicial del desactivador para proporcionar glóbulos rojos con patógenos inactivados sanos capaces de almacenar células, sin cambios significativos en la fragilidad osmótica. Estos métodos son particularmente adecuados para la preparación de composiciones de glóbulos rojos en las que se han inactivado los patógenos para su uso clínico, en especial, cuando las composiciones se han de almacenar durante un período de tiempo previo al uso clínico. La invención se define en las reivindicaciones.

- En el presente documento, se describe un método de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende un compuesto inactivador de patógenos y un desactivador, mediante (1) la mezcla del compuesto inactivador de patógenos y el desactivador con la composición que comprende glóbulos rojos; y (2) la reducción suficiente de la concentración del desactivador para reducir el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos como resultado del almacenamiento de la mezcla con respecto al nivel de deshidratación de glóbulos rojos como resultado del almacenamiento de la mezcla a la concentración original.

- En el presente documento, se describen métodos de reducción de la deshidratación y/o aumento de la fragilidad osmótica en los glóbulos rojos, así como métodos de infusión de glóbulos rojos en seres humanos. También se describen composiciones de glóbulos rojos tratadas.

#### *Glóbulos rojos*

- 60 Las composiciones de glóbulos rojos descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, cualquier producto sanguíneo que comprenda glóbulos rojos (por ejemplo, sangre humana), en las que el producto sanguíneo proporciona o se procesa para proporcionar glóbulos rojos adecuados para su uso en seres humanos, mamíferos y/o vertebrados, tal como para infusión. Las composiciones de glóbulos rojos incluyen, por ejemplo, concentrados de sangre entera y glóbulos rojos, tales como glóbulos rojos empaquetados (por ejemplo, glóbulos rojos con un mayor hematocrito y/o que no contienen solución de aditivos). Las composiciones de glóbulos rojos pueden describirse por su hematocrito o volumen de células empaquetadas (PCV), una medida de la concentración de glóbulos rojos en la

composición. Las composiciones de glóbulos rojos pueden tener un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 1 al 100 %, más probablemente del aproximadamente 10 al 90 %, también aproximadamente del 35 al 80 % o del aproximadamente 40 al 70 %. Dichas composiciones de glóbulos rojos pueden incluir productos químicos tales como compuestos inactivadores de patógenos y desactivadores. También pueden incluir tampones y otras soluciones, tales como soluciones de aditivos de glóbulos rojos (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M, AS-5 o cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4), incluyendo sales o soluciones tamponadas. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos descritas en el presente documento son glóbulos rojos empaquetados que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 70 al 90 %, o del aproximadamente 75 al 85 %, o del aproximadamente 80 %, antes de su uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos son glóbulos rojos no empaquetados que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 %, antes y/o durante el uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos se diluyen con una solución diluyente y tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 30 al 50 %, o del aproximadamente 35 al 45 %, o del aproximadamente 40 %, antes y/o durante el uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos descritas en el presente documento se han empobrecido en leucocitos antes de su uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos no se han empobrecido en leucocitos. Cualquier composición de glóbulos rojos que entre en contacto con o que se introduzca en un ser humano, mamífero o vertebrado vivo, cuando dicho contacto conlleva el riesgo de transmitir enfermedades debido a patógenos contaminantes, puede tratarse como se desvela en el presente documento.

*Patógenos sanguíneos*

Un contaminante patógeno, si está presente, que se inactivará en los métodos de la invención incluye cualquier agente que contenga ácido nucleico capaz de causar una enfermedad en un ser humano, otros mamíferos o vertebrados. El agente patógeno puede ser unicelular o multicelular. Los ejemplos de patógenos son bacterias, virus, protozoos, hongos, levaduras, mohos y micoplasmas causantes de 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 como ácido nucleico monocatenario o bicatenario. 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
	Seudorrabias
Orothomyxo	Gripal
Papova	SV-40
Paramyxo	Sarampión
	Paperas
	Paragripal 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)	<i>R. akari</i> (rickettsiosis)

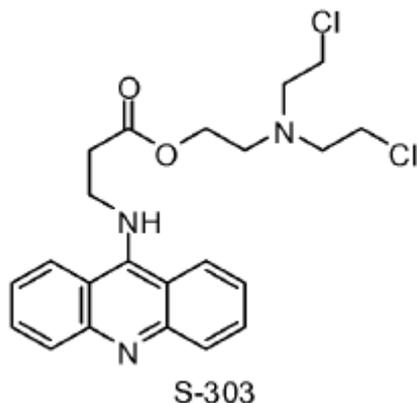
Además de inactivar posibles contaminantes patógenos, los métodos de la presente invención también pueden inactivar leucocitos que pueden estar presentes en la composición de glóbulos rojos. Se usan métodos de empobrecimiento en leucocitos para eliminar preferentemente la mayoría de los leucocitos de las composiciones de glóbulos rojos diseñadas para infusión, puesto que pueden generar respuestas inmunes no deseadas en el receptor. Sin embargo, no toda la sangre está empobrecida en leucocitos, o los métodos de empobrecimiento en leucocitos pueden no eliminar todos los leucocitos. Por lo tanto, la inactivación de cualquier leucocito residual mediante los métodos de la invención descritos en el presente documento puede reducir adicionalmente el riesgo de dichas respuestas inmunes.

*Compuestos inactivadores de patógenos*

La inactivación de un patógeno en las composiciones de glóbulos rojos se efectúa poniendo en contacto el patógeno de la composición de glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos. El compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303 descrito en el presente documento) puede estar presente en una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad eficaz para inactivar un patógeno, tal como una cantidad suficiente para inactivar, por ejemplo, al menos 1 log, 2 log, o 3 log de un patógeno en la composición de glóbulos rojos, si está presente). Los compuestos inactivadores de patógenos que se pueden usar mediante métodos de la invención incluyen compuestos que comprenden un grupo funcional que es, o que es capaz de formar y ha formado, por ejemplo, *in situ*, un grupo reactivo tal como un grupo electrófilo. En algunos casos, 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 producto 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 ión tiirano. 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 productos intermedios reactivos tales como grupos aziridinio y aziridina o grupos tiirano y tiirano. Los ejemplos incluyen derivados de aziridina, grupos mono o bis-(mesiletil)amina, grupos mono-(mesiletil)sulfuro, grupos mono o bis-(tosiletil)amina y grupos 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 de un desactivador. 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 una fracción que es capaz de unirse no covalentemente a un biopolímero de ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y también se denomina un ligando de unión a ácido nucleico, un grupo de unión a ácido nucleico o una fracción de unión a ácido nucleico. Se describen ejemplos de dichos componentes en las patentes de EE.UU. n.º 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 comprende 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 EE.UU. n.º 6.514.987. La porción de anclaje de los compuestos inactivadores de patógenos tiene afinidad hacia los ácidos nucleicos. Dicha afinidad se puede deber 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 (por ejemplo, unión de cadena principal de fosfato). La afinidad también se puede deber a modos mixtos de unión (por ejemplo, intercalación y unión de surco menor). La unión puede ser específica de la secuencia (es decir, una mayor afinidad de unión por una o más secuencias de ácido nucleico particulares frente a otras secuencias de ácido nucleico) o no específica de la secuencia. En las patentes que se han mencionado anteriormente, se pueden encontrar ejemplos detallados de dichas fracciones de unión a ácido nucleico.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos, de las composiciones y de los kits que se describen en el presente documento, el compuesto inactivador de patógenos puede comprender un grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo reactivo que reacciona con el nucleófilo del desactivador seleccionado. En algunas realizaciones, 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.

El compuesto inactivador de patógenos para su uso en la presente invención es *N*-(acridin-9-il)-2-[bis(2-cloroetil)amino]etiléster de β-alanina (como alternativa, también denominado en el presente documento "S-303"), cuya estructura es la siguiente, incluyendo sales del mismo.



En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos, tal como S-303, en la mezcla con la composición de glóbulos rojos y el desactivador 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, de aproximadamente 0,1 mM a 0,3 mM o de aproximadamente 0,2 mM. En algunas realizaciones, la relación molar de desactivador con respecto al compuesto inactivador de patógenos, una vez que ambos componentes se han mezclado con la composición de glóbulos rojos, 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.

#### Desactivadores

Los desactivadores para su uso en los métodos descritos en el presente documento pretenden reducir las reacciones secundarias no deseadas de las especies electrófilas reactivas usadas para inactivar patógenos (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR que puede conducir a una respuesta inmune no deseada). En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el desactivador (por ejemplo, el glutatión descrito en el presente documento) puede estar presente en una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad eficaz para reducir las reacciones secundarias no deseadas, tales como las cantidades descritas en el presente documento). Los desactivadores adecuados comprenden un grupo nucleófilo que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo del compuesto inactivador de patógenos. En la patente de EE.UU. n.º 6.709.810, se describen ejemplos no limitantes. En algunas realizaciones, los desactivadores 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 lo suficiente un patógeno que pueda estar contaminando la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento proporcionan una cantidad eficaz de desactivador en combinación con una cantidad eficaz de compuesto inactivador de patógenos en condiciones que proporcionan una reducción óptima en reacciones secundarias no deseadas combinadas (por ejemplo, unión del compuesto inactivador de patógenos) con suficiente inactivación de patógenos, sin alterar significativamente (por ejemplo, sin disminuir) la fragilidad osmótica celular y sin alterar significativamente (por ejemplo, sin aumentar) la deshidratación. Se puede reducir varias reacciones secundarias no deseadas tales como la reacción del compuesto inactivador de patógenos con proteínas y/o componentes de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el desactivador proporciona una reducción óptima en la modificación de los glóbulos rojos, tales como la unión de IgG a los glóbulos rojos o la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos. Aunque los métodos de la divulgación implican el tratamiento *ex vivo* de las composiciones de glóbulos rojos, algunos desactivadores pueden permanecer en la composición tras su introducción en un individuo. Como tales, en algunas realizaciones, los desactivadores de la divulgación son adecuados para la infusión. Los desactivadores adecuados incluyen, pero sin limitación, compuestos que comprenden un grupo tiol, tales como desactivadores que comprenden el aminoácido cisteína o un derivado adecuado de cisteína, tal como *N*-acetilcisteína. Los ejemplos de dichos desactivadores incluyen cisteína y péptidos que comprenden al menos una cisteína, tal como glutatión. En algunas realizaciones, los desactivadores adecuados comprenden un derivado de cisteína que puede formar un grupo tiol *in situ*, con o sin el uso de sustancias químicas adicionales o enzimas añadidas tales como *S*-acetilcisteína u otros profármacos derivados apropiados de tiol de cisteína o péptidos que comprenden *S*-acetilcisteína u otros profármacos de cisteína derivados de tiol adecuados. Los derivados adecuados de cisteína son aquellos que comprenden o son capaces de formar *in situ* un cisteiniltiol que es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo del compuesto inactivador de patógenos.

En algunas realizaciones, el desactivador es un péptido de 2 a 10 aminoácidos, en el que al menos uno de los aminoácidos es cisteína, *N*-acetilcisteína, *S*-acetilcisteína u otro derivado adecuado de cisteína. En algunas realizaciones, el desactivador es un péptido de al menos 3 aminoácidos, tal como de aproximadamente 3-10 aminoácidos, también de aproximadamente 3-6 aminoácidos, en el que al menos uno de los aminoácidos es cisteína, *N*-acetilcisteína, *S*-acetilcisteína u otro derivado adecuado de cisteína. En algunas realizaciones, el

desactivador es un péptido de al menos 3 aminoácidos, tal como de aproximadamente 3-10 aminoácidos, también de aproximadamente 3-6 aminoácidos, en el que al menos uno de los aminoácidos es cisteína, N-acetilcisteína, S-acetilcisteína u otro derivado adecuado de cisteína, también en el que al menos 2 o al menos 3 de los aminoácidos son cisteína, N-acetilcisteína, S-acetilcisteína u otro derivado adecuado de cisteína.

5 En una realización preferida, el desactivador es glutatión neutralizado (también conocido como L-glutatión y  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). El glutatión tiene muchas propiedades que lo hacen particularmente útil como un desactivador. Está normalmente presente en todos los tipos de células. No se cree que sea capaz de penetrar de forma pasiva en un patógeno, tal como pasando a través de las membranas celulares o las cubiertas lipídicas, de bacterias ni de virus envueltos en lípidos, o pasando a través de la cápside vírica de virus no envueltos. A pH aproximadamente neutro, el glutatión se carga y, en ausencia de transporte activo, no penetra en las bicapas lipídicas en ningún grado significativo. Esto coincide con la inactivación de los virus de envoltura lipídica tales como el VIH y el VSV que no se ven sustancialmente afectados por el glutatión, incluyendo el uso de concentraciones de glutatión neutralizado superiores a 2 mM. El uso de glutatión tiene algún efecto en la inactivación de, por ejemplo, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus epidermidis* y *Serratia marcescens*. Sin embargo, esto puede tratarse mediante el uso de cantidades eficaces de glutatión neutralizado y el compuesto inactivador de patógenos. Como tales, los métodos preferidos de inactivación se proporcionan cuando la contaminación de una composición de glóbulos rojos por un patógeno vírico o bacteriano se inactiva en al menos 2 log, preferentemente en 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. En algunas realizaciones, la inactivación de *Staphylococcus epidermidis* con S-303 está en aproximadamente 3 log, también aproximadamente 2 log o aproximadamente 1 log de la de una composición similar inactivada con el glutatión ácido 2 mM y S-303 0, 2 mM. En algunas realizaciones, la inactivación del VSV con S-303 está en aproximadamente 2 log o aproximadamente 1 log o es esencialmente igual a la de una composición similar inactivada con glutatión ácido 2 mM y S-303 0,2 mM. En condiciones apropiadas, según lo descrito por la presente invención, el glutatión también es compatible con el almacenamiento *in vitro* de glóbulos rojos, y la composición de glóbulos rojos resultante es adecuada para la introducción *in vivo*.

30 En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión en su forma reducida. También se puede usar disulfuro de glutatión, la forma oxidada del glutatión, siempre que el disulfuro de glutatión esté lo suficiente reducido en solución antes de la adición de la solución a la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos o lo suficiente reducido después de la adición a la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos.

35 En algunas realizaciones, el desactivador es un derivado de glutatión, tal como un monoalquiléster o dialquiléster 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, grupo metilo, grupo etilo, grupo propilo, grupo isopropilo, grupo butilo, grupo isobutilo, grupo *terc*-butilo, grupo pentilo, grupo isopentilo, grupo neopentilo, grupo *terc*-pentilo, grupo 1-metilbutilo, grupo hexilo, grupo isohexilo, grupo 2-metilpentilo, grupo 1-etilbutilo, grupo heptilo, grupo octilo, grupo nonilo y grupo decilo. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de derivados de glutatión incluyen metiléster de glutatión, monoetiléster de glutatión y monoisopropiléster de glutatión. En algunas realizaciones, se usa dietiléster oxidado de glutatión (GSSG-(glicil)-dietiléster). En algunas realizaciones, se hidroliza un tioéster de glutatión tras la adición a las composiciones de glóbulos rojos para formar el tiol.

45 Se entiende que, en algunas realizaciones, el desactivador se proporcionará en forma de un ácido o de una base libre, mientras que, en otras realizaciones, el desactivador se proporcionará en forma de una sal. Si el desactivador está en forma de una sal, la sal es preferentemente una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos (en forma de productos hidro- o lipo-solubles o dispersables) incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de dichas sales de adición de ácido 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, metanosulfonato, 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 de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de diciclohexilamina, *N*-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc.. También, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden estar cuaternizados con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, didbutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como los bromuros de bencilo y fenetilo y otros. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen la sal de sulfato etanolato y sales de sulfato.

65 Por ejemplo, en algunas realizaciones, el desactivador está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable formada a partir de glutatión. En algunas realizaciones, el desactivador está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable formada a partir de glutatión y uno o más cationes tales como sodio, aluminio, calcio, litio, magnesio, cinc

o tetrametilamonio. En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión (reducido), y se proporciona en forma de sal monosódica de glutatión (disponible, por ejemplo, en Biomedica Foscoma, 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 (reducida). En otras realizaciones, se usa un sulfato de monoalquiléster de glutatión. En algunas realizaciones, el glutatión se proporciona en forma de sal disódica oxidada de glutatión.

*Métodos de inactivación e interrupción*

Los métodos de la presente divulgación implican la combinación de una composición de glóbulos rojos con un compuesto inactivador de patógenos y un desactivador en condiciones en las que, al mezclar la composición con el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador, el pH de la composición resultante está en un intervalo adecuado para proporcionar la inactivación de los patógenos y la reducción de las reacciones secundarias no deseadas adecuadas (tal como la modificación de los glóbulos rojos) con un efecto limitado o nulo sobre la viabilidad (por ejemplo, fragilidad osmótica y deshidratación) y/o la vida útil del producto sanguíneo tratado. Además, la presente divulgación describe la reducción de la concentración del desactivador en la composición de glóbulos rojos después de un período de inactivación de patógenos para ayudar a mantener la vitalidad y la vida útil de los glóbulos rojos durante el almacenamiento. También se puede utilizar una solución de aditivos, como se describe en el presente documento, para los glóbulos rojos durante el almacenamiento y se puede usar para reemplazar soluciones de tratamiento y/o soluciones diluyentes usadas durante la inactivación de los patógenos.

Los métodos mejorados incluyen varias características que pueden ser importantes para la 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 un cierto nivel de interrupción mediante el ajuste adecuado del pH de la solución. Como tales, los desactivadores de la divulgación proporcionan cierta capacidad de tamponamiento a la composición que comprende glóbulos rojos, donde la propia capacidad de tamponamiento proporciona una mejor interrupción. Por ejemplo, el uso de un análogo de cisteína tal como metionina como un desactivador, cuando se modifica apropiadamente para proporcionar un cambio de pH adecuado en la composición de glóbulos rojos, dará lugar a un cierto nivel de interrupción de la unión del compuesto inactivador de patógenos a los glóbulos rojos. Dado que el átomo de azufre en la metionina no es nucleófilo, la metionina no proporciona ninguna interrupción distinta de proporcionar el pH necesario de la solución. Por lo tanto, la combinación del ajuste del pH y un grupo tiol proporciona una mejor interrupción. Un ajuste adecuado del pH y del equivalente de base también puede disminuir el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos durante el periodo de inactivación. Una tercera característica que puede ser importante para proporcionar una mejor interrupción en algunas realizaciones es la selección de desactivadores preferidos que no penetran esencialmente dentro de patógenos tales como virus y bacterias. Dichos desactivadores proporcionan una interrupción adecuada en el entorno extracelular, en el que se producen reacciones perjudiciales tales como la unión a las superficies de los glóbulos rojos, sin una interrupción adicional del compuesto inactivador de patógenos una vez que ha penetrado dentro del patógeno. Por último, los métodos de interrupción mejorados de la presente divulgación incluyen la disminución de la concentración del desactivador después de la inactivación y, en algunos casos, la adición de una solución de aditivos para el almacenamiento. Se ha demostrado que los glóbulos rojos tienen una mayor vida útil y menores niveles de deshidratación durante el almacenamiento cuando la concentración total de desactivador se reduce a niveles adecuados.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una composición de glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar i) un compuesto inactivador de patógenos que comprende un compuesto funcional que es o que forma un grupo electrófilo reactivo (por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto inactivador de un patógeno para inactivar un patógeno, si está presente); ii) un desactivador (por ejemplo, una cantidad eficaz de un desactivador como se describe en el presente documento) que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos; e iii) una composición que comprende glóbulos rojos; b) mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador con la composición que comprende glóbulos rojos; y c) reducir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla, en relación con el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla a la concentración original del desactivador. En algunas realizaciones, la etapa (a) comprende además proporcionar una base adecuada, la etapa (b) comprende además mezclar la base adecuada con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de una reacción no deseada del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos en la mezcla, con respecto a la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, 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 algunas realizaciones, la etapa (a) comprende además proporcionar una base adecuada; la etapa (b) comprende además mezclar la base con la composición que comprende glóbulos rojos, y la base es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de unión del anticuerpo anti-compuesto inactivador de patógenos a la composición de glóbulos rojos tratados en la mezcla resultante en al menos aproximadamente el 5 % (o 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 la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es superior, igual o inferior a 7, 10, 14, 21, 28, 35 o 42 días de almacenamiento a 4 °C

o a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la mezcla se almacena en una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol). En algunas realizaciones, el método comprende además el reemplazo de una solución usada durante el tratamiento con una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol).

5 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de reducción de la deshidratación en glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar una composición de glóbulos rojos que comprende i) un desactivador, en el que el desactivador es capaz de reaccionar con un compuesto inactivador de patógeno; e ii) glóbulos rojos; y b) disminuir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla con respecto al nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla a la concentración original del desactivador. En algunas realizaciones, el almacenamiento de la mezcla es superior, igual o inferior a 7, 10, 14, 21, 28, 35 o 42 días de almacenamiento a 4 °C o a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el método comprende además la adición de una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol), por ejemplo, antes del almacenamiento.

10 El desactivador y/o la base añadida (o el desactivador neutralizado) usados en los métodos descritos en el presente documento se pueden mezclar con la composición de glóbulos rojos antes, al mismo tiempo o después de la adición del compuesto inactivador de patógenos a la composición de glóbulos rojos. Si el desactivador y la base (o el desactivador neutralizado) se mezclan con la composición de glóbulos rojos después de que la solución inactivadora de patógenos se haya mezclado con la composición de glóbulos rojos, el desactivador y/o la base (o el desactivador neutralizado) se añaden preferentemente a la composición de glóbulos rojos antes de que se haya producido una cantidad significativa de reacción secundaria del compuesto inactivador de patógenos con los glóbulos rojos, de modo que se pueda lograr la interrupción adecuada de la reacción secundaria no deseada. En algunas realizaciones, el desactivador y/o la base (o el desactivador 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 desactivador y la base se mezclan con la composición de glóbulos rojos al mismo tiempo que el compuesto inactivador de patógenos.

20 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos descritos en el presente documento, el desactivador y la base añadida (o el desactivador neutralizado) se tratan previamente con la composición de glóbulos rojos durante un intervalo de tiempo adecuado antes de la adición del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303), tal como menos de aproximadamente una hora, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 20 minutos, menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 2 minutos o menos de aproximadamente 1 minuto antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones adicionales, el pretratamiento es a una temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o de aproximadamente 37 °C o aproximadamente a la temperatura ambiente.

30 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos descritos en el presente documento, el compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303) se incuba con la composición de glóbulos rojos en presencia del desactivador y la base añadida (o el desactivador neutralizado) durante un intervalo de tiempo, tal como durante aproximadamente 30 minutos a 48 horas, también de aproximadamente 2 a 36 horas, también de aproximadamente 8 a 24 horas, también durante aproximadamente 20 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 a aproximadamente 37 °C o a aproximadamente temperatura ambiente.

40 Con respecto a la característica de ajustar el pH de la composición de glóbulos rojos, los métodos previos de interrupción de dichos compuestos inactivadores de patógenos no reconocen la importancia del pH de la mezcla resultante con respecto tanto a la eficacia de la interrupción como a la vitalidad celular durante la inactivación. Aunque los métodos anteriores han demostrado la necesidad de suficiente base y un nivel de pH adecuado para interrumpir adecuadamente las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, aumentando los niveles de glutatión no protonado para reducir la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR), estos métodos no realizan ni describen los efectos del aumento de la base en la deshidratación celular durante el proceso de la inactivación. Por lo tanto, un aspecto de la presente divulgación implica ajustar el pH de la composición de glóbulos rojos a un nivel adecuado para la incubación del compuesto inactivador de patógenos y el desactivador (por ejemplo, un nivel adecuado para evitar una deshidratación adversa).

50 En algunas realizaciones, al mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador con la composición de glóbulos rojos, el pH de la mezcla está a un nivel adecuado para reducir las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógeno a la superficie de

los GR que puede conducir a una respuesta inmune no deseada) y reducir lo suficiente la deshidratación celular durante la inactivación. En algunas realizaciones, la reacción secundaria no deseada es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, la modificación es la unión covalente del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los glóbulos rojos. En otras realizaciones, la modificación es la unión no covalente del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los glóbulos rojos.

Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones de cada uno de los métodos, 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 la 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 un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 % o al menos aproximadamente un 90 %. La reducción de la reacción secundaria puede evidenciarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de unión a los glóbulos rojos tratados de anticuerpos específicos del 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 mediante un segundo método diferente (por ejemplo, un método sin suficiente desactivador y/o base añadida a la mezcla de reacción, un método en el que no se añade desactivador ni/o base a la mezcla de reacción, y/o un tratamiento a un pH inferior). Por ejemplo, en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el nivel de unión del anticuerpo del compuesto inactivador de patógenos a las células sanguíneas tratadas se reduce en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 % o al menos aproximadamente un 90 %, con respecto a un segundo método (por ejemplo, un método sin suficiente desactivador ni/o base añadida a la mezcla de reacción, un método en el que no se añade a la mezcla de reacción ningún desactivador ni/o base, y/o tratamiento a un pH inferior).

En algunas realizaciones, al mezclar el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador con la composición de glóbulos rojos, el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,1, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 6,6 a 6,8 o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. Aunque el pH de una composición de glóbulos rojos puede cambiar con el tiempo, es deseable que el pH esté en un intervalo deseado cuando se añada el desactivador a la composición de glóbulos rojos, independientemente de si ya contiene o no compuesto inactivador de patógeno. Los métodos de la presente divulgación implican la adición de compuesto inactivador de patógenos y desactivador 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 desactivador, independientemente del orden de adición del compuesto inactivador de patógenos y/o del desactivador a la composición de glóbulos rojos. En otras palabras, una vez que se han mezclado los tres componentes, el pH está en el intervalo deseado. En algunas realizaciones, el desactivador se añade antes del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos se añade antes del desactivador. En algunas realizaciones, el desactivador y el compuesto inactivador de patógenos se añaden de manera esencialmente simultánea. De este modo, tras la adición de compuesto inactivador de patógenos y el desactivador significa en el momento en el que tanto el desactivador como el compuesto inactivador de patógenos se han mezclado con la composición de glóbulos rojos. El pH deseado se puede conseguir mediante varios medios y no está limitado 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 se puede alcanzar ajustando el pH. El ajuste del pH se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de una solución de aditivos adecuada, tal como una solución tampón, antes de añadir el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador. En algunas realizaciones, la composición de glóbulos rojos puede lavarse una o más veces con un tampón adecuado antes de suspenderla en el mismo tampón o en otro tampón adecuado. Como alternativa, el pH de la composición de glóbulos rojos se puede ajustar simultáneamente con la adición bien del compuesto inactivador de patógenos, el desactivador o ambos. En algunas realizaciones, el pH se ajusta simultáneamente con la adición del desactivador. En algunas realizaciones, el desactivador se neutraliza, de manera que la adición del desactivador neutralizado proporciona el intervalo de pH deseado en la composición de glóbulos rojos. Como ejemplo, se puede usar la neutralización del glutatión para efectuar los ajustes de pH necesarios. En algunas realizaciones, se puede usar un nivel apropiado de neutralización del glutatión, por ejemplo, mediante la adición de 1 equivalente de base, para proporcionar un desactivador que, tras la adición a una composición de glóbulos rojos, proporcionará el ajuste de pH necesario de la composición. La neutralización apropiada dependerá del desactivador usado. Por ejemplo, cuando se usa un péptido, puede depender de los componentes de aminoácidos del péptido. En algunas realizaciones, se puede usar un desactivador que no afecte significativamente al pH de la composición de glóbulos rojos. Por ejemplo, el uso de un péptido que comprende una cisteína que pueda comprender además uno o más aminoácidos que dan lugar a un pH más neutro para una solución del péptido aislado de manera natural. En algunas realizaciones, el péptido comprende además al menos un aminoácido básico, tal como arginina o lisina.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, donde se mezcla una base con la composición de glóbulos rojos junto con el compuesto inactivador de patógenos y el desactivador para aumentar el pH de la mezcla hasta un nivel deseado y/o para mejorar la interrupción de las reacciones secundarias no deseadas, la base es una sal básica. La sal básica puede disolverse primero en una solución acuosa antes de mezclarse con la

- composición de glóbulos rojos. En otras realizaciones, la sal se puede añadir directamente a la composición de glóbulos rojos en forma sólida. En algunas realizaciones, la sal básica comprende el desactivador y proporciona tanto el desactivador como la base a la mezcla. En algunas realizaciones, la base usada en el método es una base fuerte, tal como NaOH. Por lo general, una base fuerte como NaOH se disolverá primero en solución acuosa antes de mezclarse con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base fuerte (por ejemplo, en forma de solución o sólida) se mezcla con el desactivador antes de mezclar el desactivador con la composición de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la base es un tampón básico (añadido en cantidades suficientes y que tiene un pKa apropiado para llevar la mezcla al intervalo de pH deseado). Si se usa un tampón básico, el tampón será, en algunas realizaciones, un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el tampón tendrá un protón titulable con un pKa en el intervalo de aproximadamente 7 a 8. Los ejemplos de tampones que se pueden usar como tampones básicos incluyen, pero sin limitación, ácido *N*-(2-hidroxietil)-piperazin-*N'*-2-etanosulfónico (HEPES), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tampón de fosfato sódico. Otros tampones básicos adecuados serán fácilmente identificables por un experto en la materia.
- 15 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a aproximadamente 5,5, superior a aproximadamente 5,7, superior a aproximadamente 6,0, superior a aproximadamente 6,3, superior a aproximadamente 6,5, superior a aproximadamente 6,7, superior a aproximadamente 7,0 o superior a aproximadamente 7,2. En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, desactivador, compuesto inactivador de patógenos y base (si se añade alguno) está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,1, de aproximadamente 6,5 a 7,0 o de aproximadamente 6,6 a 6,8 o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. En algunas realizaciones, el pH indicado es el pH a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el pH indicado es el pH a 37 °C. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición que comprende los glóbulos rojos se trata con el compuesto inactivador de patógenos en presencia del desactivador y de cualquier base añadida, estando el pH de la mezcla en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0 (o 7,1) a 37 °C.
- 30 En algunas realizaciones, el pH de la mezcla de glóbulos rojos, el desactivador y la base (si se añade la base como parte del método) está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,1, de aproximadamente 6,5 a 7,0 o de aproximadamente 6,6 a 6,8 o de aproximadamente 6,5, 6,7, 6,8 o 6,9, antes de mezclar el compuesto inactivador de patógenos con la composición de glóbulos rojos. En algunas otras realizaciones, el pH se alcanza al mismo tiempo 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 la mezcla del compuesto inactivador de patógenos con la composición que comprende los glóbulos rojos. En algunas realizaciones de los métodos en los que se ajusta el pH, el pH se ajusta hasta el intervalo de pH deseado antes, al mismo tiempo, 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 la mezcla del compuesto inactivador de patógenos con la composición que comprende los glóbulos rojos. En esas realizaciones, donde el desactivador es glutatión y el compuesto inactivador de patógenos es S-303, el pH de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos y el desactivador se ajusta preferentemente hasta el intervalo de pH deseado (por ejemplo, pH 6,5 a 7,0) antes de mezclar el S-303 con la composición de glóbulos rojos.
- 45 En algunas realizaciones, el pH resultante de la composición después de mezclar los glóbulos rojos, el desactivador y la base, no es necesariamente un ajuste del pH de la composición de glóbulos rojos inicial. Por ejemplo, una composición de glóbulos rojos puede tener un pH en el intervalo deseado de 6,0 a 7,5, y el pH de la composición no cambia significativamente con la adición de desactivador, y posteriormente, de un compuesto inactivador de patógenos. En dichas realizaciones, el desactivador proporciona de manera natural el pH deseado o se neutraliza en consecuencia para proporcionar el pH deseado. Es la combinación de añadir cantidades iniciales elevadas de desactivador, tal como de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, con un pH resultante en el intervalo deseado lo que es importante. Los métodos conocidos que usan dichas concentraciones de glutatión, por ejemplo, no se han usado con el intervalo de pH deseado en combinación con otros aspectos de la presente divulgación. Por lo tanto, para los péptidos, independientemente del desactivador peptídico, puede neutralizarse eficazmente según sea necesario para proporcionar un intervalo de pH adecuado cuando se añade a una composición de glóbulos rojos y, además, se puede seleccionar para proporcionar una cantidad adecuada de tamponamiento en el intervalo de pH deseado. Como tal, un desactivador neutralizado significa que el desactivador se titula adecuadamente con ácido o base según sea necesario, de manera que al añadirse a una composición de glóbulos rojos, la mezcla resultante tenga un pH que proporcione una mejor interrupción de las reacciones secundarias no deseadas (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR que puede conducir a una respuesta inmune no deseada), evitando al mismo tiempo la deshidratación celular durante la inactivación, tal como un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 6,5 a 7,1, o de aproximadamente 6,6 a 6,8, o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. En algunas realizaciones, el péptido como aislado de manera natural, se neutraliza adecuadamente, es decir, no requiere la adición de ácido ni de base para proporcionar el pH deseado en la mezcla final. Además, los desactivadores preferidos proporcionarán una capacidad de tamponamiento para mantener el pH en el intervalo deseado durante un

tiempo necesario para interrumpir las reacciones secundarias no deseadas.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, el desactivador se neutraliza. Se dice que un desactivador es "neutralizado" por una base, si se ha combinado una cantidad suficiente de la base con el desactivador, de manera 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 desactivador. Un "desactivador neutralizado" no tiene necesariamente un pH neutro, ni está necesariamente sin carga. En algunas realizaciones, el desactivador neutralizado no está en su forma más protonada ni en su forma más desprotonada. En algunas realizaciones, donde el desactivador es muy ácido, el pH del desactivador neutralizado puede seguir siendo inferior a 7,0 (por ejemplo, de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9). En algunas realizaciones, el pH de la solución del desactivador neutralizado puede ser superior a 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la solución del desactivador neutralizado será detectablemente superior a la del desactivador antes de la adición de la base. En algunas realizaciones, el neutralizador se neutraliza con al menos aproximadamente 0,25 equivalentes, al menos aproximadamente 0,5 equivalentes, al menos aproximadamente 0,75 equivalentes, al menos aproximadamente 1 equivalente, al menos aproximadamente 1,25 equivalentes, al menos aproximadamente 1,5 equivalentes o al menos aproximadamente 2 equivalentes de una base. En algunas realizaciones, el desactivador se neutraliza con menos de aproximadamente 2 equivalentes, menos de aproximadamente 1,5 equivalentes, menos de aproximadamente 1,25 equivalentes, menos de aproximadamente 1 equivalente o menos de aproximadamente 0,75 equivalentes de una base. En algunas realizaciones, el desactivador se neutraliza con aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2 equivalentes, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 equivalentes o de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,25 equivalentes de base. En algunas realizaciones, el desactivador se neutraliza con aproximadamente 0,75 equivalentes de base. En otras realizaciones, el desactivador se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de base. En otras realizaciones, el desactivador se neutraliza con aproximadamente 1,25 equivalentes de base. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, el glutatión se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de una base adecuada, tal como hidróxido de sodio. En este caso, una solución del glutatión protonado tiene un pH de aproximadamente 3, una solución neutralizada con 1 equivalente de hidróxido sódico tiene un pH de aproximadamente 4,5 y una solución neutralizada con 2 equivalentes de hidróxido sódico tiene un pH de aproximadamente 9,5. Cualquier desactivador peptídico apropiado que comprenda al menos una cisteína puede ajustarse adecuadamente para proporcionar el pH deseado tras la adición a la composición de glóbulos rojos.

Los métodos apropiados de neutralización del glutatión y otros desactivadores serán muy evidentes para los expertos en la materia. En algunas realizaciones, se usa hidróxido de sodio para neutralizar o neutralizar parcialmente el desactivador. En algunas realizaciones, se disuelven primero microgránulos 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, a continuación, se añade una cantidad apropiada de esa solución de NaOH al desactivador antes, al mismo tiempo o después de la adición del desactivador a la mezcla. Como alternativa, el NaOH se añade a la composición de glóbulos rojos o al compuesto inactivador de patógenos, o la combinación de los dos, antes de la adición del desactivador a la mezcla.

Además de proporcionar un desactivador que se ajuste adecuadamente al pH o se neutralice, en algunas realizaciones, los desactivadores preferidos no son capaces de entrar significativamente en los patógenos, de manera que interrumpen de forma óptima las reacciones no deseadas en el entorno extracelular, pero no interfieren en la inactivación del patógeno una vez que el compuesto inactivador de patógenos ha penetrado dentro del patógeno.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos descritos en el presente documento, el desactivador es un compuesto ácido. En algunas realizaciones, el desactivador se proporciona en forma de ácido libre. En algunas realizaciones, el desactivador es ácido y se añade al menos aproximadamente 1 equivalente de base para neutralizar el desactivador. Una solución que comprende dicho desactivador neutralizado puede ser, en algunos casos, básica, neutra o incluso ácida. En algunas realizaciones, se añade aproximadamente 1 equivalente de base para neutralizar o neutralizar parcialmente el desactivador. En algunas realizaciones, se añaden aproximadamente 2 equivalentes de base. En algunas realizaciones, el desactivador es ácido y se usan de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 equivalentes de base para neutralizar el desactivador. En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,25 equivalentes de base. En algunas realizaciones, se usa aproximadamente 1 equivalente de base.

En algunas realizaciones, el desactivador se neutraliza antes de la adición a la composición de glóbulos rojos y/o al compuesto inactivador de patógenos. En otras realizaciones, el desactivador se neutraliza después de combinar el desactivador bien con la composición de glóbulos rojos y/o con el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el pH del desactivador neutralizado antes de la adición a la composición de glóbulos rojos y/o al compuesto inactivador de patógenos está en el intervalo de aproximadamente 2,5 a 7,5, de aproximadamente 3,0 a 6,5, de aproximadamente 3,5 a 5,5, de aproximadamente 4,0 a 5,0 o de aproximadamente 4,3 a 4,5, o de aproximadamente 4,4.

En algunas realizaciones, el desactivador es glutatión, y se proporciona en forma de sal monosódica de glutatión y

se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de base, o no se neutraliza con base. En algunas otras realizaciones, el desactivador es glutatión y se proporciona en forma de sal clorhidrato de glutatión y se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de base.

- 5 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos descritos en el presente documento, la concentración inicial del desactivador en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida se eleva durante un período de inactivación y después se reduce hasta una concentración reducida después del período de inactivación. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador es adecuada para reducir lo suficiente las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR), luego se reduce hasta una concentración reducida para reducir lo suficiente afectar negativamente a la vitalidad (por ejemplo, la fragilidad osmótica y la deshidratación) y/o la vida útil durante el almacenamiento celular.

- 15 La presente divulgación engloba cualquier número de métodos usados para reducir la concentración de desactivador después del período de inactivación de patógenos. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador (por ejemplo, de glutatión) se reduce mediante la centrifugación de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador y el compuesto inactivador de patógenos, seguida de la eliminación del sobrenadante de la mezcla, después, la adición de nueva solución, tal como una solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol), para la resuspensión de las células (por ejemplo, mediante el lavado de las células). El proceso de centrifugación, la eliminación del sobrenadante y la adición de nueva solución (por ejemplo, cualquier solución de aditivos descrita en la Tabla 2 y/o una solución de aditivos que comprenda cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol), en algunas realizaciones, se puede repetir durante 1, 2, 3, 4, 5 o más veces más. En algunas realizaciones, el método usado para reducir la concentración del desactivador está automatizado. En algunas realizaciones, la nueva solución no comprende el desactivador o comprende una concentración inferior del desactivador. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador (por ejemplo, de glutatión) se reduce mediante la interrupción química del desactivador. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador (por ejemplo, de glutatión) se reduce mediante adsorción en un proceso de extracción discontinuo o de flujo, o por exclusión por tamaño en un proceso de flujo usando membranas (por ejemplo, membranas de fibra hueca o membranas de diálisis) o perlas de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, el desactivador no se reduce ni/o no se pone en contacto con un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD).

- 35 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a aproximadamente 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM, superior a aproximadamente 10 mM, superior a aproximadamente 15 mM o superior a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador inicial 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, o hasta 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM o 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador inicial en la mezcla es de aproximadamente 20 mM.

- 45 En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial de desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla de glóbulos rojos, desactivador y compuesto inactivador de patógenos es superior a aproximadamente 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM o superior a aproximadamente 10 mM, y el pH de la mezcla es superior a aproximadamente 5,5, superior a aproximadamente 5,7, superior a aproximadamente 6,0, superior a aproximadamente 6,3, superior a aproximadamente 6,5, superior a aproximadamente 6,7, superior a aproximadamente 7,0 o superior a aproximadamente 7,2. En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial del desactivador 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, o de aproximadamente 20 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,1, de aproximadamente 6,5 a 7,0 o de aproximadamente 6,6 a 6,8, o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. En algunas realizaciones, la concentración inicial de desactivador en la mezcla es superior a aproximadamente 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM o superior a aproximadamente 10 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,1, de aproximadamente 6,5 a 7,0 o de aproximadamente 6,6 a 6,8, o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador (por ejemplo, de glutatión) 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 6,0 a 7,5. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 20 mM, y el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 7,0 (o 7,1).

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida después del período de inactivación se reduce en más de 2 veces, o 3 veces, o 4 veces, o 5 veces, o 6 veces, o 7 veces, u 8 veces, o 9 veces, o 10 veces o 15 veces, o 20 veces, o 25 veces, o 30 veces, o 35 veces, o 40 veces, o 50 veces, o 100 veces, o 500 veces o 1.000 veces con respecto a la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, glutatión) en la mezcla.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración reducida del desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida después del período de inactivación es inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM, inferior a aproximadamente 2 mM, inferior a aproximadamente 1 mM, inferior a aproximadamente 0,75 mM, inferior a aproximadamente 0,5 mM o inferior a aproximadamente 0,25 mM. En algunas realizaciones, la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 20 mM, de aproximadamente 2 mM a 15 mM, de aproximadamente 3 mM a 10 mM, de aproximadamente 4 mM a 8 mM o de aproximadamente 5 mM a 6 mM. En algunas realizaciones, la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está a una concentración de hasta aproximadamente 0,25 mM, o 0,5 mM, o 0,75 mM, o 1 mM, o 1,5 mM, o 2 mM, o 3 mM, o 4 mM, o 5 mM, o 6 mM, o 7 mM, u 8 mM, o 9 mM, o 10 mM, o 12,5 mM, o 15 mM o 20 mM.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, del glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM o superior a aproximadamente 10 mM, y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación es inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM, inferior a aproximadamente 2 mM, inferior a aproximadamente 1,5 mM, inferior a aproximadamente 1 mM, inferior a aproximadamente 0,75 mM, inferior a aproximadamente 0,5 mM o inferior a aproximadamente 0,25 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador 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, o de aproximadamente 20 mM, y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 20 mM, de aproximadamente 2 mM a 15 mM, de aproximadamente 3 mM a 10 mM, de aproximadamente 4 mM a 8 mM, o de aproximadamente 5 mM a 6 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a 30 mM, y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) es de aproximadamente 20 mM, y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a 8 mM.

En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador (por ejemplo, glutatión), el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM o superior a aproximadamente 10 mM; el pH de la mezcla es superior a aproximadamente 5,5, superior a aproximadamente 5,7, superior a aproximadamente 6,0, superior a aproximadamente 6,3, superior a aproximadamente 6,5, superior a aproximadamente 6,7, superior a aproximadamente 7,0 o superior a aproximadamente 7,2; y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación es inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM, inferior a aproximadamente 2 mM, inferior a aproximadamente 1,5 mM, inferior a aproximadamente 1 mM, inferior a aproximadamente 0,75 mM, inferior a aproximadamente 0,5 mM o inferior a aproximadamente 0,25 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador 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, o de aproximadamente 20 mM; el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 8,5, de aproximadamente 6,0 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 6,5 a 7,1 o de aproximadamente 6,6 a 6,8, o de aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9; y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 20 mM, de aproximadamente 2 mM a 15 mM, de aproximadamente 3 mM a 10 mM, de aproximadamente 4 mM a 8 mM o de aproximadamente 5 mM a 6 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a 30 mM; el pH de la mezcla está en el

intervalo de aproximadamente 6,0 a 7,5; y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) es de aproximadamente 20 mM; el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 7,0 (o 7,1); y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a 8 mM.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es suficiente para reducir las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR, que puede conducir a una respuesta inmune no deseada). En algunas realizaciones, el período de tiempo es suficiente para reducir las reacciones secundarias no deseadas del compuesto inactivador de patógenos y para evitar o reducir la deshidratación celular durante el proceso de inactivación.

En algunas realizaciones, el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a, aproximadamente igual o inferior a 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas o 50 horas. En algunas realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 1 a 96 horas, o de aproximadamente 1 a 72 horas, o de aproximadamente 1 a 48 horas, o de aproximadamente 10 a 30 horas, o de aproximadamente 15 a 25 horas, o de aproximadamente 20 horas.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) en la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida es superior a 2 mM, superior a aproximadamente 4 mM, superior a aproximadamente 6 mM, superior a aproximadamente 8 mM, superior a aproximadamente 10 mM o superior a aproximadamente 15 mM; la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación es inferior a aproximadamente 25 mM, inferior a aproximadamente 20 mM, inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM, inferior a aproximadamente 2 mM, inferior a aproximadamente 1,5 mM, inferior a aproximadamente 1 mM, inferior a aproximadamente 0,75 mM, inferior a aproximadamente 0,5 mM o inferior a aproximadamente 0,25 mM; y el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida es superior a, aproximadamente igual o inferior a 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas o 50 horas.

En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador 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, o de aproximadamente 20 mM; la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 20 mM, de aproximadamente 2 mM a 15 mM, de aproximadamente 3 mM a 10 mM, de aproximadamente 4 mM a 8 mM o de aproximadamente 5 mM a 6 mM; y el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida es de aproximadamente 1 a 96 horas, o de aproximadamente 1 a 72 horas, o de aproximadamente 1 a 48 horas, o de aproximadamente 10 a 30 horas, o de aproximadamente 4 a 30 horas, o de aproximadamente 10 a 25 horas, o de aproximadamente 15 a 25 horas, o de aproximadamente 20 horas.

En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a 30 mM; la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a 15 mM; y el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida es de aproximadamente 10 a 30 horas. En algunas realizaciones, la concentración inicial del desactivador (por ejemplo, de glutatión) es de aproximadamente 20 mM; y la concentración reducida del desactivador en la mezcla después del período de inactivación está en el intervalo de aproximadamente 4 mM a 8 mM; y el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida es de aproximadamente 15 a 25 horas. En algunas de estas realizaciones, el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 7,0 (o 7,1). En otras de estas realizaciones, el pH de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 7,5.

En cualquiera de estas realizaciones, la temperatura de la mezcla que comprende la composición de glóbulos rojos y el desactivador durante el período de tiempo entre el punto de adición del desactivador a la concentración inicial y el punto de reducción de la concentración del desactivador a una concentración reducida está en un intervalo de

temperatura de aproximadamente 1 °C a 30 °C, también de aproximadamente 18 °C a 25 °C, o a aproximadamente 37 °C, o aproximadamente la temperatura ambiente.

5 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una composición de  
 10 glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar i) un compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, una cantidad  
 eficaz de un compuesto inactivador de patógenos para inactivar un patógeno, si está presente), que comprende un  
 15 enlazador frágil que une un grupo de mostaza y un ligando de unión a ácido nucleico (por ejemplo, S-303); ii) un  
 desactivador (por ejemplo, una cantidad eficaz de un desactivador) que comprende un grupo tiol, en el que el tiol es  
 capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo,  
 20 glutatión); iii) una composición que comprende glóbulos rojos; e iv) una base adecuada (por ejemplo, NaOH); b)  
 mezclar el compuesto inactivador de patógenos, el desactivador y la base adecuada con la composición que  
 comprende glóbulos rojos; y c) reducir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla a una cantidad  
 que reduzca el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla (por  
 25 ejemplo, después de 10, 28 o 42 días a 4 °C) con respecto al nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante  
 del almacenamiento de la mezcla a la concentración original de desactivador. En algunas realizaciones, la mezcla  
 comprende de aproximadamente 0,5 a 1,5 equivalentes de base (o de aproximadamente 0,75 a 1,25 equivalentes),  
 en la que un equivalente significa una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de desactivador en la  
 mezcla, y/o la mezcla resultante de la etapa (b) tiene un pH a 37 °C de aproximadamente 6,0 a 7,5 (o de  
 30 aproximadamente 6,5 a 7,0, o de 7,1). En algunas realizaciones, la base de la etapa (a) es de una cantidad  
 suficiente para reducir el nivel de anticuerpo anti-compuesto inactivador de patógenos que se une a la composición  
 de glóbulos rojos tratada en la mezcla resultante en al menos aproximadamente un 5 % (o al menos  
 aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos  
 aproximadamente un 75 % o al menos aproximadamente un 90 %) con respecto a la mezcla sin la base. En algunas  
 35 realizaciones, la concentración de desactivador es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM (o de  
 aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM) y/o el desactivador en la mezcla resultante de la etapa (c)  
 está a una concentración inferior a aproximadamente 10 mM (o inferior a aproximadamente 6 mM o inferior a  
 aproximadamente 2 mM). En algunas realizaciones, la concentración del compuesto de inactivación de patógenos  
 en la mezcla resultante de la etapa (b) es de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 5 mM y/o es suficiente  
 para inactivar al menos 1 log (o 3 log) de un patógeno en la composición de glóbulos rojos, si está presente. En  
 40 algunas realizaciones, el tiempo entre la etapa (b) y la etapa (c) es de aproximadamente 1 a 48 horas (o 15 a 25  
 horas). En algunas realizaciones, a las 20 horas posteriores a la etapa (b), los glóbulos rojos (GR) de la mezcla  
 resultante tienen una capacidad de unión a anticuerpos (CUA) inferior al 65 % en comparación con el valor de CUA  
 de los glóbulos rojos del mismo método en las mismas condiciones, pero sin el uso de base y/o tienen una CUA  
 media inferior a aproximadamente 50.000 (o de entre aproximadamente 25.000 y 70.000), y/o tienen menos del 1 %  
 45 de hemólisis después de la etapa (c) (o tras el almacenamiento durante 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un volumen  
 de células empaquetadas (PCV) superior al 50 % después de la etapa (c) (o después del almacenamiento durante  
 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un valor de la mediana de la fragilidad corpuscular superior a 140 (o 150) después de  
 28 (o 42) días a 4 °C después de la etapa (c). En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración  
 del desactivador en la etapa (c) comprende la retirada de la solución usada durante la inactivación y la adición de  
 50 una solución de aditivos final (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M,  
 AS-5, cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4, o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina,  
 glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol).

5 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una composición de  
 45 glóbulos rojos que comprende: a) mezclar i) un compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, una cantidad  
 eficaz de un compuesto inactivador de patógenos para inactivar un patógeno, si está presente) que comprende un  
 grupo funcional que es, o que forma, un grupo electrófilo reactivo (por ejemplo, S-303); (ii) un desactivador (por  
 ejemplo, una cantidad eficaz de un desactivador) que comprende un grupo tiol (por ejemplo, glutatión), en el que el  
 50 tiol es capaz de reaccionar con el grupo electrófilo reactivo del compuesto inactivador de patógenos; e iii) una  
 composición que comprende glóbulos rojos; e (iv) una base adecuada (por ejemplo, NaOH) y; (b) reducir lo  
 suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación  
 de los glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla, en relación con el nivel de deshidratación de los  
 glóbulos rojos producida por el almacenamiento de la mezcla (por ejemplo, tras 10, 28 o 42 días a 4 °C) a la  
 55 concentración original del desactivador. En algunas realizaciones, la mezcla comprende de aproximadamente 0,5 a  
 1,5 equivalentes de base (o de aproximadamente 0,75 a 1,25 equivalentes), en la que un equivalente significa una  
 cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de desactivador en la mezcla, y/o la mezcla resultante de la  
 etapa (a) tiene un pH a 37 °C de aproximadamente 6,0 a 7,5 (o de aproximadamente 6,5 a 7,0, o de 7,1). En algunas  
 60 realizaciones, la base de la etapa (a) es de una cantidad suficiente para reducir el nivel de anticuerpo anti-  
 compuesto inactivador de patógenos que se une a la composición de glóbulos rojos tratada en la mezcla resultante  
 en al menos aproximadamente un 5 % (o al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un  
 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 % o al menos aproximadamente un  
 90 %) con respecto a la mezcla sin la base. En algunas realizaciones, la concentración de desactivador es de  
 65 aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM (o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM) y/o  
 el desactivador en la mezcla resultante de la etapa (b) está a una concentración inferior a aproximadamente 10 mM  
 (o inferior a aproximadamente 6 mM o inferior a aproximadamente 2 mM). En algunas realizaciones, la  
 concentración del compuesto de inactivación de patógenos en la mezcla resultante de la etapa (a) es de

aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 5 mM y/o es suficiente para inactivar al menos 1 log (o 3 log) de un patógeno en la composición de glóbulos rojos, si está presente. En algunas realizaciones, el tiempo entre la etapa (a) y la etapa (b) es de aproximadamente 1 a 48 horas (o 15 a 25 horas). En algunas realizaciones, a las 20 horas de la etapa (b), los glóbulos rojos (GR) de la mezcla resultante tienen una capacidad de unión a anticuerpos (CUA) inferior al 65 % en comparación con el valor de CUA de los glóbulos rojos del mismo método en las mismas condiciones, pero sin el uso de base y/o tienen una CUA media inferior a aproximadamente 50.000 (o de entre aproximadamente 25.000 y 70.000), y/o tienen menos del 1 % de hemólisis después de la etapa (b) (o tras el almacenamiento durante 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 50 % después de la etapa (b) (o después del almacenamiento durante 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un valor de la mediana de la fragilidad corpuscular superior a 140 (o 150) después de 28 (o 42) días a 4 °C después de la etapa (b). En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración del desactivador en la etapa (b) comprende la retirada de la solución usada durante la inactivación y la adición de una solución de aditivos final (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M, AS-5, cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4, o una solución de aditivos que comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato, guanosina, citrato y/o manitol).

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de reducción de la deshidratación de los glóbulos rojos que comprende: a) proporcionar una composición de glóbulos rojos que comprende i) un desactivador (por ejemplo, glutatión), en la que el desactivador es capaz de reaccionar con un compuesto inactivador de patógeno; e ii) glóbulos rojos; y b) disminuir lo suficiente la concentración del desactivador en la mezcla hasta una cantidad que reduzca el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla con respecto al nivel de deshidratación de los glóbulos rojos resultante del almacenamiento de la mezcla a la concentración original del desactivador (por ejemplo, tras 10, 28 o 42 días a 4 °C). En algunas realizaciones, el desactivador en la mezcla resultante de la etapa (b) está a una concentración inferior a aproximadamente 10 mM (o inferior a aproximadamente 6 mM o inferior a aproximadamente 2 mM). En algunas realizaciones, los glóbulos rojos (GR) de la mezcla resultante tienen menos del 1 % de hemólisis después de la etapa (b) (o después del almacenamiento durante 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 50 % después de la etapa (b) (o después del almacenamiento durante 28 o 42 días a 4 °C) y/o tienen un valor de la mediana de la fragilidad corpuscular superior a 140 (o 150) después de 28 o 42) días a 4 °C después de la etapa (b).

Los métodos de la presente divulgación incluyen el uso *ex vivo* de un compuesto inactivador de patógenos y un desactivador. El uso *ex vivo* implica el uso de 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 está destinado al uso dentro 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 está destinada a su reintroducción en ese ser humano u otro ser humano. La reintroducción de la sangre humana en ese ser humano u otro ser humano sería el uso *in vivo* de la sangre, en oposición al uso *ex vivo* del compuesto. Si el compuesto sigue estando presente en la sangre cuando se reintroduce en el ser humano, entonces el compuesto, además de su uso *ex vivo*, también se introduce *in vivo*. Algunas realizaciones de la presente divulgación implican el uso *ex vivo* de un desactivador, en el que la composición de glóbulos rojos está destinada a uso *in vivo*. En algunos casos, queda un cierto nivel de desactivador en la composición de glóbulos rojos de manera que el desactivador 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 compuesto no está destinado a su reintroducción en un ser humano, mamífero o vertebrado vivo. Un ejemplo de uso *in vitro* sería el análisis de diagnóstico de los componentes de una muestra de glóbulos rojos. Los métodos de la divulgación pueden aplicarse al uso *in vitro* de las composiciones de glóbulos rojos, ya que la modificación de los glóbulos rojos u otros constituyentes puede afectar al análisis *in vitro* de los componentes de la muestra de sangre. Por lo tanto, los métodos de la divulgación pueden proporcionar seguridad en el tratamiento de dichas muestras *in vitro* con una interrupción adecuada de las modificaciones de la muestra que, de otro modo, podrían interferir con los ensayos de diagnóstico de la muestra.

Se pueden usar soluciones de aditivos, incluyendo sales y/o soluciones tamponadas, con los métodos y las composiciones de glóbulos rojos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, se puede añadir un tampón seleccionado (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en las Tablas 2, 3 y/o 4) a la composición de glóbulos rojos antes, durante y/o después del período de inactivación y/o en el momento en que disminuye la concentración de desactivador.

#### **Métodos de inactivación usando glóbulos rojos empaquetados**

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos empaquetados (GR empaquetados) (por ejemplo, los glóbulos rojos que carecen de solución de aditivos y/o que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 70 al 90 %, o del aproximadamente 75 al 85 %, o del aproximadamente 80 %) se someten a un método de inactivación descrito en el presente documento (por ejemplo, un método en el que la composición comprende GSH aproximadamente 20 mM con aproximadamente 1 equivalente de base y S-303 aproximadamente 0,2 mM), después se someten a (en algunos casos, se conserva con) una solución de aditivos (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 2). Los ejemplos de soluciones de aditivos se muestran en la Tabla 2 y se

describen en el presente documento. En algunas de estas realizaciones, la solución de aditivos (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 2) se añade a la composición de glóbulos rojos que comprende desactivador, compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida, de aproximadamente 5 minutos a 20 horas después la adición del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303) y/o del desactivador (por ejemplo, GSH). En algunas realizaciones, la solución de aditivos se añade a la composición de GR de aproximadamente 5 minutos a 10 horas, o de aproximadamente 5 minutos a 5 horas, o de aproximadamente 5 minutos a 60 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a 30 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a 20 minutos o de aproximadamente 15 minutos después de la adición del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303) y/o del desactivador (por ejemplo, GSH). En algunas realizaciones, la concentración del desactivador se reduce como se describe en el presente documento después de la adición de la solución de aditivos (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 2). Por ejemplo, los GR empaquetados pueden tratarse con un método de inactivación descrito en el presente documento (por ejemplo, tratamiento en el que la composición comprende GSH aproximadamente 20 mM, aproximadamente 1 equivalente de base y S-303 aproximadamente 0,2 mM), luego se tratan con una solución de aditivos (por ejemplo SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 2) en un tiempo especificado después de la adición del compuesto inactivador de patógenos y/o del desactivador (tal como de aproximadamente 5 minutos a 5 horas o de aproximadamente 10 minutos a 20 minutos, o de aproximadamente 15 minutos), seguido por la disminución de la concentración de desactivador como se describe en el presente documento (por ejemplo, hasta menos de aproximadamente 10 mM o menos de aproximadamente 5 mM). En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración del desactivador comprende la retirada de la solución de tratamiento y/o la solución de aditivos, seguida de la adición de una solución de aditivos final (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 2) para proporcionar una composición de glóbulos rojos que tenga, por ejemplo, un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 %. En algunas realizaciones, la concentración de ion cloruro en la composición de glóbulos rojos antes y/o durante la inactivación es inferior o superior a aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 90 mM, aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 50 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 25 y 250 mM, o aproximadamente 40 y 100 mM, o aproximadamente 50 y 75 mM, o aproximadamente 60 y 70 mM, o aproximadamente 65 mM.

En algunas realizaciones, la solución de aditivos a la que se hace referencia en el presente documento (por ejemplo, la solución de aditivos administrada antes y/o después de la disminución de la concentración de desactivador) comprende uno o más de los siguientes componentes: dextrosa, adenina, guanosina, manitol, citrato (por ejemplo, citrato de sodio), ácido cítrico, fosfato (por ejemplo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y cloruro (por ejemplo, de cloruro sódico). En algunas realizaciones, la concentración de dextrosa de la solución de aditivos y/o la concentración final de dextrosa en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de adenina de la solución de aditivos y/o la concentración final de adenina en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2,5 mM. En algunas realizaciones, la concentración de guanosina de la solución de aditivos y/o la concentración final de guanosina en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2,5 mM, o de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones, la concentración de manitol de la solución de aditivos y/o la concentración final de manitol en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 35 mM a aproximadamente 45 mM. En algunas realizaciones, la concentración de citrato (por ejemplo, de citrato de sodio) de la solución de aditivos y/o la concentración final de citrato en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 35 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato (por ejemplo,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) de la solución de aditivos y/o la concentración final de fosfato en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) está en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la solución de aditivos y/o la concentración final de cloruro en la composición de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) es inferior o superior a aproximadamente 500 mM, o aproximadamente 250 mM, o

aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 100 mM, aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mM, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM, o aproximadamente 150 mM.

En algunas realizaciones, la solución de aditivos a la que se hace referencia en el presente documento (por ejemplo, la solución de aditivos administrada antes y/o después de la disminución de la concentración de desactivador) y/o la composición final de GR después del intercambio (por ejemplo, antes de la transfusión) comprende dextrosa de 10 mM a aproximadamente 150 mM (o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 90 mM), adenina de 0,5 mM a aproximadamente 5 mM (o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM), manitol de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM (o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM), citrato de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM (o aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM) (por ejemplo, citrato de sodio), fosfato de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM (o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM) (por ejemplo, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y/o NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y cloruro de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mM o (de aproximadamente 100 a aproximadamente 175 mM).

Tabla 2: Soluciones de aditivos ilustrativas

	AS-1	AS-3	SAG-M	Eritrosol	AS-5	PAGGS-M	MAP
Dextrosa (mM)	111,0	55,5	45,4	81,1	45,4	47,5	36,4
Adenina (mM)	2,0	2,2	1,3	1,6	2,2	1,4	1
Guanosina (mM)						1,44	
Manitol (mM)	41,2		28,8	42,5	28,8	55	80
Citrato de sodio dihidratado (mM)		20		26,6			5,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM)				17		8	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)		20		4,7		8	6
NaCl (mM)	154,0	70	150		150	72	85
Ácido cítrico (mM)		2					1
Osmolalidad (mOsm)		276	359	175	351	296	

## 20 Métodos de inactivación usando glóbulos rojos diluidos

Las composiciones de glóbulos rojos descritas en el presente documento se pueden diluir antes de la inactivación. Someter los glóbulos rojos a un diluyente puede reducir la concentración de especies disueltas (por ejemplo, sales tales como Cl<sup>-</sup>) hasta un nivel que sea adecuado para la inactivación con los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de soluciones de diluyentes se describen en el presente documento y se muestran en la Tabla 3. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos no empaquetados (por ejemplo, glóbulos rojos que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 % y que comprenden opcionalmente SAG-M u Optisol) se someten a una solución de diluyentes (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 3) antes de un método de inactivación descrito en el presente documento (por ejemplo, un método en el que la composición comprende GSH aproximadamente 20 mM con aproximadamente 1 equivalente de base y S-303 aproximadamente 0,2 mM) seguido por la reducción de la concentración de desactivador como se describe en el presente documento (por ejemplo, hasta menos de aproximadamente 10 mM o menos de aproximadamente 5 mM). En algunas de estas realizaciones, la disminución de la concentración del desactivador comprende la retirada de la solución de tratamiento (por ejemplo, una solución de tratamiento diluida), seguida de la adición de una solución de aditivos final (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita anteriormente o en la Tabla 2) para proporcionar, por ejemplo, una composición de glóbulos rojos que tenga un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 %. En algunas realizaciones, la concentración de ion cloruro en la composición de glóbulos rojos está diluida a menos o más de aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 90 mM, aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 50 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 25 y 250 mM, o aproximadamente 40 y 100 mM, o aproximadamente 50 y 75 mM, o aproximadamente 60 y 70 mM, o aproximadamente 65 mM antes de la inactivación. En algunas realizaciones, la cantidad (en volumen) de solución de diluyentes añadida a la solución de GR es entre aproximadamente 0,2 y 2 veces, o aproximadamente 0,3 y 1,5 veces, o aproximadamente 0,4 y 1 vez, o aproximadamente 0,5 y 0,75 veces la cantidad de solución de GR. En algunas de estas realizaciones, la composición de glóbulos rojos se diluye con una solución de diluyentes (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento o en la Tabla 3) hasta un nivel de hematocrito en el intervalo del aproximadamente 30 al 50 %, o del aproximadamente 35 al 45 % o del aproximadamente 40 %.

En algunas realizaciones, la solución de diluyentes a la que se hace referencia en el presente documento comprende uno o más de los siguientes componentes: dextrosa, adenina, manitol, citrato (por ejemplo, citrato de sodio), ácido cítrico, fosfato (por ejemplo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y/o NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y cloruro (por ejemplo, cloruro sódico). En algunas realizaciones, la concentración de dextrosa de la solución de diluyentes y/o la concentración final de dextrosa en la

composición de GR después de la dilución con la solución de diluyentes está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones, la concentración de adenina de la solución de diluyentes y/o la concentración final de adenina en la composición de GR después de la dilución con la solución de diluyentes es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2,5 mM. En algunas realizaciones, la concentración de manitol de la solución de diluyentes y/o la concentración final de manitol en la composición de GR después de la dilución es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM. En algunas realizaciones, la concentración de citrato (por ejemplo, citrato sódico) de la solución de diluyentes y/o la concentración final de citrato en la composición de GR después de la dilución con la solución de diluyentes es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 35 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato (por ejemplo,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) de la solución de diluyentes y/o la concentración final de fosfato en la composición de GR después de la dilución con la solución de diluyentes es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la solución de diluyentes y/o después de la dilución con la solución de diluyentes es inferior o superior a aproximadamente 500 mM, o aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mM, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM.

En algunas realizaciones, la solución de diluyentes a la que se hace referencia en el presente documento y/o la composición de GR después de la dilución con la solución de diluyentes comprende dextrosa de 10 mM a aproximadamente 150 mM (o de aproximadamente 35 mM a aproximadamente 65 mM), adenina de 0,5 mM a aproximadamente 5 mM (o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM), manitol de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM (o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM), citrato de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM (o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM) (por ejemplo, citrato de sodio), fosfato de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM (o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM) (por ejemplo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), y cloruro de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM o (de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mM).

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos no empaquetados se someten a una solución de diluyentes (por ejemplo, cualquier solución descrita anteriormente o en la Tabla 3) antes de un método de inactivación descrito en el presente documento, seguido de la reducción de la concentración de desactivador como se describe en el presente documento, luego se tratan con una solución de aditivos final (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita anteriormente o en la Tabla 2) para proporcionar una composición de GR adecuada para su uso (por ejemplo, adecuada para la transfusión). En algunas realizaciones, la solución de aditivos final puede ser cualquier solución de aditivos descrita en el presente documento, por ejemplo, una solución de aditivos en la que la concentración de cloruro (y/o la concentración final de cloruro en la composición de GR después del intercambio, tal como antes de la transfusión) sea inferior a aproximadamente 500 mM, o aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 100 mM, aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 25 mM, o de entre aproximadamente 25 y 250 mM, o de aproximadamente 40 a 100 mM, o de aproximadamente 50 a 75 mM, o de aproximadamente 60 a 70 mM, o de aproximadamente 100 a 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a 175 mM, o aproximadamente 150 mM.

Tabla 3: Soluciones de diluyentes ilustrativas

	DS 1	DS 2	DS 3	DS 4	DS 5	DS 6	DS 7	DS 8	DS 9	DS 10	DS 11	DS 12	DS 13
Dextrosa (Mm)	55	55	55	55	55	45,4	45,4	45,4	45,4	45,4	45,4	45,4	
Adenina/HCl de adenina (mM)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Manitol (mM)	55	55	55	55	55	28,8			28,8	28,8	28,8	28,8	28,8
Citrato de sodio dihidratado o anhidro (mM)	20	20				33,5	33,5	33,5	20	20	20	20	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM)				20	15			33,5	12,7	3,5	16,2	20	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)						33,5	33,5		3,5	12,7			16,2
NaCl (mM)				15	20								
Osmolalidad (mOsm)	180	178	128	177	179	287	243	215	227	179	174	181	
pH	6,9	7,6-8,0		8,61	8,38	6,28	6,29	8,77	7,48	6,63	8,62	8,7	7,5

**Métodos de inactivación usando glóbulos rojos empaquetados reconstituidos**

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos empaquetados (GR empaquetados) (por ejemplo, glóbulos rojos que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 70 al 90 %, o del aproximadamente 75 al 85 %, o del aproximadamente 80 %) se someten a una solución de tratamiento antes de realizar el método de inactivación descrito en el presente documento (por ejemplo, un método en el que la composición comprende GSH aproximadamente 20 mM con aproximadamente 1 equivalente de base y S-303 aproximadamente 0,2 mM). En la Tabla 4, se muestran ejemplos de soluciones de tratamiento. En algunas realizaciones, la solución de tratamiento (por ejemplo, cualquier solución descrita en la Tabla 4) se añade a los GR empaquetados antes de la adición del desactivador, compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida. En algunas de estas realizaciones, la composición de GR empaquetados se trata con una solución de tratamiento, lo que genera glóbulos rojos no empaquetados (por ejemplo, glóbulos rojos que tienen un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 %). En algunas realizaciones, (a) se añade una solución de tratamiento a los GR empaquetados; (b) se realiza un método de inactivación descrito en el presente documento (por ejemplo, un método en el que la composición comprende GSH aproximadamente 20 mM con aproximadamente 1 equivalente de base y S-303 aproximadamente 0,2 mM); y (c) la concentración del desactivador se reduce tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, a menos de aproximadamente 10 mM o menos de aproximadamente 5 mM). En algunas de estas realizaciones, la etapa (c) comprende la retirada de la solución de tratamiento y la adición de una solución de aditivos final (por ejemplo, cualquier solución descrita en el presente documento, tal como SAG-M, AS-5 o cualquier solución de las Tablas 2, 3 o 4) para proporcionar, por ejemplo, una composición de glóbulos rojos que tenga un hematocrito en el intervalo del aproximadamente 50 al 70 %, o del aproximadamente 55 al 65 %, o del aproximadamente 60 %. En algunas de estas realizaciones, la concentración de ión cloruro en la composición de glóbulos rojos antes y/o durante la inactivación es inferior o superior a aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 90 mM, aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 50 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 25 y 250 mM, o aproximadamente 40 y 100 mM, o aproximadamente 50 y 75 mM, o aproximadamente 60 y 70 mM, o aproximadamente 65 mM.

En algunas realizaciones, la solución de tratamiento a la que se hace referencia en el presente documento comprende uno o más de los siguientes componentes: dextrosa, adenina, manitol, citrato (por ejemplo, citrato de sodio), ácido cítrico, fosfato (por ejemplo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y cloruro (por ejemplo, cloruro sódico). En algunas realizaciones, la concentración de dextrosa de la solución de tratamiento y/o la concentración de dextrosa en la solución de aditivos después de la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones, la concentración de adenina de la solución de tratamiento y/o la concentración de adenina en la solución de aditivos tras la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2,5 mM. En algunas realizaciones, la concentración de manitol de la solución de tratamiento y/o la concentración de manitol en la solución de aditivos tras la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones, la concentración de citrato (por ejemplo, de citrato de sodio) de la solución de tratamiento y/o la concentración de citrato en la solución de aditivos tras la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 7,5 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración de fosfato (por ejemplo,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) de la solución de tratamiento y/o la concentración de fosfato en la solución de aditivos tras la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de la solución de tratamiento y/o la concentración de cloruro en la solución de aditivos tras la retirada de la solución de tratamiento en la composición de GR es de aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mM, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mM, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 mM, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM.

En algunas realizaciones, la solución de tratamiento y/o la solución de aditivos tras la retirada de la solución de

tratamiento en la composición de GR comprende dextrosa de 10 mM a aproximadamente 150 mM (o de aproximadamente 35 mM a aproximadamente 65 mM), adenina de 0,5 mM a aproximadamente 5 mM (o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 3 mM), manitol de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM (o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM), citrato de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 75 mM (o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM) (por ejemplo, citrato de sodio), fosfato de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 75 mM (o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM) (por ejemplo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y/o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), y cloruro de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mM o (de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM).

**Tabla 4: Soluciones de tratamiento ilustrativas**

	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5
Dextrosa (mM)	45,4	45,4	45,4	45,4	45,4
Adenina/HCl de adenina (mM)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Manitol (mM)	55	44,5	44,5	44,5	30
Citrato de sodio dihidratado o anhidro (mM)		12	12	12	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (mM)					15
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (mM)					
NaCl (mM)	70	60	60	60	70
Osmolalidad (mOsm)					
pH (ajustado con ácido cítrico)			7	6,5	6,5

#### *Evaluación de la eficacia del método*

Además de comparar la inactivación logarítmica descrita anteriormente, la eficacia de los métodos de interrupción mejorados puede evaluarse mediante otros varios métodos, como se los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0115466. Por ejemplo, los métodos de interrupción pueden evaluarse evaluando la modificación de la composición de glóbulos rojos, en términos de función, morfología y estado de hidratación de los glóbulos rojos, y en términos de reactividad de los glóbulos rojos tratados con el sistema inmune, tal como con anticuerpos. Si la composición de glóbulos rojos tratada está destinada al uso humano, tal como a la infusión, los métodos de interrupción no deben dañar sustancialmente la función de los glóbulos rojos (por ejemplo, mediante la deshidratación). La falta de un efecto sustancialmente dañino sobre la función de los glóbulos rojos puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica para ensayar la función de los glóbulos rojos. En particular, los niveles de deshidratación se pueden medir, por ejemplo, por el hematocrito (volumen de células empaquetadas, PCV), la fragilidad osmótica, la concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), el porcentaje de hemólisis y la ectacitometría. Se pueden medir los niveles de otros indicadores de la función, tales como el ATP total (adenosina 5'-trifosfato), 2,3-DPG total (2,3-difosfoglicerol) o el potasio extracelular, y compararse con un control no tratado. Además, se pueden medir el pH intracelular y extracelular, la hemoglobina, el consumo de glucosa y la producción de lactato. Los métodos mejorados de la presente divulgación se pueden comparar con las condiciones de tratamiento previamente descritas en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0115466 (por ejemplo, glutatión 20 mM completamente interrumpido (2 equivalentes de base) en combinación con mezcla de S-303/glóbulos rojos sin reducción de la concentración de desactivador tras la incubación descrita en la misma)

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los glóbulos rojos de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento tienen un daño mínimo o nulo después del tratamiento (por ejemplo, deshidratación, hemólisis, etc.). En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida (antes o después de la reducción en la concentración de interrupción) tienen menos del 4 % o menos del 3 % o menos del 2 %, menos del 1 % de hemólisis, o menos del 0,5 % de hemólisis. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante tienen menos del 4 %, o menos del 3 %, o menos del 2 %, o menos del 1 %, o menos del 0,5 % de hemólisis en un tiempo de aproximadamente 10 días a 4 °C, o aproximadamente 28 o 42 días a 4 °C, o aproximadamente 42 días a 4 °C tras la reducción en la concentración del desactivador (por ejemplo, glutatión).

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida (antes o después de la reducción de la concentración de desactivador) tienen más del 50 %, o más del 55 %, más del 60 %, o más del 65 % de volumen de células empaquetadas (PCV). En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante tienen más del 50 %, o más del 55 %, o más del 60 %, o más del 65 % del volumen de células empaquetadas (PCV) en un tiempo de aproximadamente 10 días a 4 °C, o de aproximadamente 28 o 42 días a 4 °C, o de aproximadamente 42 días a 4 °C después de la reducción de la concentración del desactivador (por ejemplo, glutatión).

En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante que comprende la composición de glóbulos rojos, el desactivador, el compuesto inactivador de patógenos y cualquier base añadida (antes o después de la reducción de la concentración de desactivador) tienen una mediana de la fragilidad corpuscular (MCF; osmolaridad a la que se produce el 50 % de hemólisis) superior a 130, o superior a 135, o superior a 140, o superior a 145, o

superior a 150 o superior a 155. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos de la mezcla resultante tienen una mediana de la fragilidad corpuscular (MCF) superior a 130, o superior a 135, superior a 140, o superior a 145, o superior a 150, o superior a 155 en el tiempo de aproximadamente 10 días a 4 °C o de aproximadamente 28 o 42 días a 4 °C o de aproximadamente 42 días a 4 °C tras la reducción de la concentración del desactivador (por ejemplo, de glutatión).

Los métodos de determinación del ATP, 2,3-DPG, glucosa, hemoglobina, hemólisis y potasio están disponibles en la técnica y se describen en el presente documento en el apartado experimental. Véase, por ejemplo, Davey *et al.*, "Transfusion", 32:525-528 (1992). Los métodos de determinación de la función de los glóbulos rojos también se describen en Greenwalt *et al.*, Vox Sang, 58:94-99 (1990); Hogman *et al.*, Vox Sang, 65:271-278 (1993); y Beutler *et al.*, "Blood", Vol. 59 (1982). Por ejemplo, el ATP total y el 2,3-DPG total se pueden medir usando un kit de ATP Sigma o un kit de 2,3-DPG (Sigma, St. Louis, Mo.). El kit de ATP puede usarse siguiendo el procedimiento Sigma n.º 366-UV. El ATP total también puede medirse usando un ensayo enzimático basado en luciferasa o un protocolo descrito por Beutler (1984). Los niveles de potasio extracelular pueden medirse usando un Analizador de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ciba Corning Modelo 614 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medford, MA). El pH extracelular se puede medir centrifugando las células a 4 °C durante 15 minutos a 12.000 x g y retirando el sobrenadante, para lo que se puede medir el pH usando un medidor de pH convencional a temperatura ambiente (p. Beckman, Electrodo Epoxi Calomel). Para el pH intracelular, se puede tapar el microgránulo restante en el tubo de centrifugación y almacenarse a aproximadamente -80 °C durante al menos 2 horas. Esto puede entonces lisarse mediante la adición de agua desionizada. La muestra lisada se puede mezclar bien y el pH de la solución se puede medir ya sea a temperatura ambiente usando un medidor de pH convencional o a temperatura ambiente usando un analizador de gases en sangre de Ciba Corning modelo 238 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medford, MA). Las mediciones pueden realizarse poco después del tratamiento y en función del almacenamiento posterior al tratamiento, por ejemplo, el almacenamiento de hasta 42 días. Los métodos de la presente divulgación proporcionan una composición de glóbulos rojos en la que la hemólisis de los glóbulos rojos tratados sea inferior al 3 % después de 28 días de almacenamiento, más preferentemente inferior al 2 % después de 42 días de almacenamiento y lo más preferentemente inferior o igual al aproximadamente 1 % después de 42 días de almacenamiento a 4 °C. En algunas realizaciones, se proporciona una composición de glóbulos rojos (por ejemplo, una composición de glóbulos rojos usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento) en la que el nivel total de ATP puede ser superior en comparación con una composición de glóbulos rojos tratada usando glutatión ácido 2 mM y S-303 0,2 mM. En algunas realizaciones, los métodos de interrupción descritos en el presente documento proporcionan composiciones de glóbulos rojos que tienen niveles de ATP que son aproximadamente un 20 %, también un 30 %, también un 40 % o aproximadamente un 50 % superiores en comparación con las composiciones de los métodos que usan glutatión ácido 2 mM de y S-303 0,2 mM. En algunas realizaciones, el nivel más alto de ATP se mantiene después de 7, 14, 21, 28, 35 o 42 días de almacenamiento. En algunas realizaciones, el nivel más alto de ATP disminuye durante el almacenamiento.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento incluyen composiciones de glóbulos rojos en las que los glóbulos rojos tienen un número reducido de reacciones secundarias no deseadas procedentes del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR). En algunas realizaciones, la reacción secundaria es la modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos. La reducción en la modificación de los glóbulos rojos en los métodos de la presente divulgación se puede evaluar mediante varios ensayos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0115466. También se puede determinar la cuantificación de acridina unida a la superficie de los GR usando un ensayo de citometría de flujo inmune (iFC) activado por fluorescencia sensible descrito en el presente documento.

Con respecto a los ensayos de detección de la fluorescencia, los métodos de interrupción de la presente divulgación, cuando se comparan con el mismo tratamiento sin el uso de base (por ejemplo, métodos que usan glutatión neutralizante en comparación con los mismos métodos que usan glutatión no neutralizado) pueden producir la reducción de la mediana de la fluorescencia en al menos un 10 %, también al menos un 25 %, también al menos un 50 %, también al menos un 75 % o al menos un 90 %. Por ejemplo, los métodos de interrupción de la presente divulgación en los que se usa cualquiera de las composiciones descritas con el uso de una base (por ejemplo, una composición de glóbulos rojos que comprende glutatión aproximadamente 15-25 mM, de aproximadamente 0,5 a 1,5 equivalentes de base, y S-303 aproximadamente 0,2 mM) puede dar lugar a un menor nivel de la mediana de la fluorescencia en comparación con una composición idéntica, pero sin el uso de base (por ejemplo, una composición de glóbulos rojos que comprende glutatión aproximadamente 15-25 mM y S-303 aproximadamente 0,2 mM sin base)

El nivel de compuesto inactivador de patógenos unido a la superficie de los glóbulos rojos para los métodos y las composiciones de interrupción de la presente divulgación también se puede medir en términos de capacidad de unión a anticuerpos (CUA, el número de moléculas de compuesto inactivador de patógenos o derivado del mismo por glóbulo rojo, según lo determinado mediante el uso de perlas de calibración de Bangs Laboratories, Inc, Fishers, IN, véanse los Ejemplos 5 y 9), lo que implica un anticuerpo anti-acridina monoclonal de ratón conjugado con alofocianina (APC) y un citómetro de flujo FACS-Caliber (BD Biosciences). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos y de las composiciones de la presente divulgación, los GR tienen un valor medio de la CUA inferior a

aproximadamente 75.000, o inferior a aproximadamente 70.000, o inferior a aproximadamente 60.000, o inferior a aproximadamente 55.000, o inferior a aproximadamente 52.500, o inferior a aproximadamente 50.000, o inferior a aproximadamente 47.500, o inferior a aproximadamente 45.000, o inferior a aproximadamente 42.500, o inferior a aproximadamente 40.000, o inferior a aproximadamente 37.500, o inferior a aproximadamente 35.000, o inferior a aproximadamente 32.500, o inferior a aproximadamente 30.000, o inferior a aproximadamente 27.500, o inferior a aproximadamente 25.000. En algunas realizaciones, los GR tienen un valor de CUA medio de entre aproximadamente 10.000 y 80.000, o de entre aproximadamente 20.000 y 70.000, o de entre aproximadamente 25.000 y 70.000, o de entre aproximadamente 25.000 y 60.000, o de entre aproximadamente 30.000 y 50.000, o de entre aproximadamente 35.000 y 45.000. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, en comparación con un tratamiento similar con el desactivador y la base (por ejemplo, glutatión neutralizado), puede dar lugar a un valor de CUA inferior al 90 %, también inferior al 75 %, también inferior al 65 %, también inferior al 55 %, también inferior al 45 %, también inferior al 35 %, también inferior al 25 %, o inferior al 10 % en comparación con los métodos idénticos usando una composición de GR que no se trata con base (por ejemplo, glutatión que no esté neutralizado).

Los métodos de interrupción de la divulgación también se pueden comparar con los métodos existentes determinando el nivel de modificación de los ácidos nucleicos en una muestra. Por lo general, una composición de glóbulos rojos puede contener leucocitos, y se puede aislar el ácido nucleico de los leucocitos. Un compuesto inactivador de patógenos que tenga un isótopo radiactivo, tras la reacción del compuesto con el ácido nucleico, permanecerá unido al ácido nucleico. Esto puede usarse para evaluar la cantidad de compuesto reaccionado con el ácido nucleico para varios métodos de interrupción, y proporciona una medida que puede correlacionarse directamente con la inactivación esperada de leucocitos. Se puede usar el número de aductos S-303 formados por cada 1.000 pares de bases de ácidos nucleicos como modelo para evaluar el impacto esperado de los diversos métodos sobre la inactivación de los patógenos. Como alternativa, se puede añadir una cantidad adecuada de un patógeno a una composición de glóbulos rojos, y se puede aislar el ácido nucleico del patógeno después del tratamiento. Sin embargo, en este caso, la muestra necesita ser empobrecida en leucocitos de manera que los niveles de cualquier leucocito residual no interfieran con la medición del ácido nucleico patógeno.

Además de proporcionar una inactivación adecuada de los patógenos a la vez que se reducen los niveles de reacciones secundarias no deseadas (por ejemplo, la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR que puede conducir a una respuesta inmune no deseada) y la deshidratación, los métodos de interrupción de la presente divulgación también proporcionan, en al menos algunas realizaciones, una reducción en la concentración de especies electrófilas reactivas tras la inactivación de los patógenos. Si las composiciones de glóbulos rojos están destinadas a la infusión, es importante que el nivel de las especies electrófilas reactivas sea lo más bajo posible, preferentemente esencialmente ya no detectable. La presencia de la especie electrófila reactiva puede determinarse usando métodos disponibles en la técnica, tales como métodos cromatográficos que incluyen cromatografía líquida-espectroscopia de masas (LC-MS-MS). Además, se puede evaluar la actividad residual de una muestra evaluando su capacidad para reaccionar con un resto de guanina de un ácido nucleico, tal como usando el ensayo de alquilación general descrito por Mattes (Mattes, W. R., *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 desactivador. Cualquier compuesto residual inactivador de patógenos, así como el desactivador y otras especies pequeñas, se separan de las proteínas. A continuación, se incuban estas especies con ADN bicatenario (bc) sintetizado con restos de guanina 8-<sup>3</sup>H. El compuesto inactivador de los patógenos residuales reacciona con el ADNbc en la posición N7 de la guanina, lo que acidifica el resto 8-H y libera el <sup>3</sup>H en la solución, donde puede aislarse y medirse. La cantidad de tritio liberado puede cuantificarse, y tiene una correlación de 1:1 con la cantidad de agente alquilante residual presente en las muestras extraídas ensayadas. El nivel de especies electrófilas determinado por estos métodos se puede evaluar usando los métodos mejorados de la divulgación y comparándolos con métodos conocidos.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además la etapa de reducir la concentración de un compuesto en la mezcla, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en el compuesto inactivador de patógenos y un producto de degradación del compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de reducir la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla. En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de reducir la concentración de las especies electrófilas en la mezcla. La concentración del compuesto inactivador de patógenos en un material biológico, tal como un producto sanguíneo, puede reducirse después del tratamiento, por ejemplo, mediante la adsorción en un proceso de eliminación discontinuo o de flujo. Los métodos y dispositivos que pueden usarse se describen en las patentes de EE.UU. n.º 6.544.727; 6.331.387; 6.951.713; y 7.037.642; y las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 2002/0192632 (abandonada) y 2001/0009756 (abandonada). 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 afinidad por el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, el sistema de adsorción se configuraría para eliminar el compuesto inactivador de patógenos en un proceso discontinuo. En algunas realizaciones, el compuesto de inactivación de patógenos no se reduce usando un dispositivo de adsorción de compuestos. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla se reduce lavando los glóbulos rojos usando técnicas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador

de patógenos en la mezcla se reduce eliminando parte o la totalidad de la solución de tratamiento (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en las Tablas 2, 3 y/o 4) mediante métodos descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica (por ejemplo, usando centrifugadoras y dispositivos de expresión o centrifugadoras y expresores combinados tales como TACSI fabricado por Terumo®). En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos en la mezcla se reduce eliminando parte o la totalidad de la solución de tratamiento (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en las Tablas 2, 3 y/o 4), seguido de la adición de una solución de aditivos (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita en la Tabla 2) a la mezcla. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto inactivador de patógenos se reduce simultáneamente con una reducción en la concentración del desactivador.

#### *Composiciones sanguíneas tratadas*

En algunas realizaciones, la divulgación también proporciona composiciones de glóbulos rojos resultantes de cada uno de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la divulgación también proporciona composiciones de glóbulos rojos que se pueden preparar mediante cada uno de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende a) glóbulos rojos, en los que los glóbulos rojos han reaccionado covalentemente con un grupo electrófilo de un compuesto inactivador de patógenos; y b) un desactivador que comprende un grupo tiol que es capaz de reaccionar con el compuesto inactivador de patógenos; en el que la composición es adecuada para la infusión en seres humanos después del almacenamiento de 28 o 42 días a 4 °C.

En algunas realizaciones de cada uno de los métodos y de las composiciones que se describen en el presente documento, los glóbulos rojos de la composición de glóbulos rojos son células sanguíneas de mamíferos. Por ejemplo, los glóbulos rojos pueden ser glóbulos rojos de roedores (por ejemplo, ratón o rata), caninos, lagomorfos (por ejemplo, conejos), primates no humanos (por ejemplo, chimpancés) o glóbulos rojos de ser humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los glóbulos rojos son humanos. En algunas realizaciones, los glóbulos rojos se han empobrecido en leucocitos. En algunas otras realizaciones, los glóbulos rojos no se han empobrecido en leucocitos. 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. En algunas realizaciones, si está presente, se inactivará al menos 1 log, o al menos 2 log, o al menos 3 log, o al menos 4 log de patógeno en la composición.

En algunas realizaciones, la divulgación engloba composiciones de glóbulos rojos en las que los glóbulos rojos se han modificado con un compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303), como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos producidas por el tratamiento de los métodos comprenden productos de degradación del compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, el producto de reacción del desactivador con el compuesto inactivador de patógenos). En algunas realizaciones, la modificación es la reacción del grupo electrófilo de un compuesto inactivador de patógenos con la superficie de los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos está unido covalentemente a la superficie de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos está unido covalentemente a una o más proteínas en la superficie de los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la modificación es un grupo nucleófilo del glóbulo rojo que reacciona con el grupo electrófilo del compuesto inactivador de patógeno, en el que el grupo electrófilo es un grupo mostaza y el grupo nucleófilo ha reemplazado uno o más de los átomos de cloro del grupo mostaza. En algunas realizaciones, el compuesto inactivador de patógenos está unido no covalentemente a la superficie de los glóbulos rojos. En algunas realizaciones, las composiciones de GR tienen un valor medio de CUA inferior a 75.000, o inferior a 70.000, o inferior a 60.000, o inferior a 55.000, o inferior a 52.500, o inferior a 50.000, o inferior a 47.500, o inferior a 45.000, o inferior a 42.500, o inferior a 40.000, o inferior a 37.500, o inferior a 35.000, o inferior a 32.500, o inferior a 30.000, o inferior a 27.500, o inferior a 25.000. En algunas realizaciones, los GR tienen un valor medio de CUA de entre aproximadamente 10.000 y 80.000, o de entre aproximadamente 20.000 y 70.000, o de entre aproximadamente 25.000 y 70.000, o de entre aproximadamente 25.000 y 60.000, o de entre aproximadamente 30.000 y 50.000, o de entre aproximadamente 35.000 y 45.000.

En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos comprenden niveles reducidos de modificación de la superficie de los glóbulos rojos por el compuesto inactivador de patógenos, en relación con los glóbulos rojos producidos mediante otros métodos que implican el tratamiento con el compuesto inactivador de patógenos. En algunas realizaciones, las composiciones de glóbulos rojos producidas mediante los tratamientos de los métodos descritos en el presente documento comprenden una cantidad reducida de compuesto inactivador de patógenos que comprende el grupo electrófilo reactivo una vez finalizado el tratamiento, con respecto a una composición de glóbulos rojos producida mediante otro método que implica el tratamiento con el compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, un método sin suficiente desactivador y/o base añadido a la mezcla de reacción, un método en el que no se añade a la mezcla de reacción un desactivador ni/o base, y/o un tratamiento a un pH más bajo). En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto inactivador de patógenos que comprende el grupo electrófilo reactivo en la composición se ha reducido en aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % con respecto a una composición tratada mediante otro método que implica el compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, un método sin suficiente desactivador ni/o base añadida a la mezcla de

reacción, un método en el que no se añade a la mezcla de reacción un desactivador ni/o base ni/o tratamiento a un pH más bajo).

- En algunas de estas realizaciones, la composición de glóbulos rojos comprende compuesto desactivador residual (por ejemplo, glutatión). En algunas realizaciones, la composición comprende una concentración de desactivador lo suficientemente baja para mantener la vitalidad y la vida útil de los GR y evitar la deshidratación de los glóbulos rojos y/o la fragilidad osmótica reducida durante el almacenamiento. En algunas realizaciones, la composición comprende una concentración de desactivador que es lo suficientemente inferior a una concentración de desactivador previamente usada en la composición. En algunas realizaciones, la concentración superior de desactivador usado anteriormente disminuye la vitalidad y la vida útil de los GR y/o aumenta la deshidratación de los glóbulos rojos y disminuye la fragilidad osmótica durante el almacenamiento, mientras que la concentración inferior es lo suficientemente inferior a una concentración de desactivador usada previamente en la composición. En algunas realizaciones, la concentración del desactivador en la composición es inferior a aproximadamente 25 mM, inferior a aproximadamente 20 mM, inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM, inferior a aproximadamente 2 mM o de aproximadamente 1 mM. En algunas realizaciones, la concentración del desactivador en la composición está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 20 mM, de aproximadamente 2 mM a 15 mM, de aproximadamente 3 mM a 10 mM, de aproximadamente 4 mM a 8 mM o de aproximadamente 5 mM a 6 mM.
- En algunas realizaciones, la composición comprende una solución de aditivos (por ejemplo, una solución descrita en la Tabla 2 o una solución que comprende cualquier combinación de los componentes descritos en la Tabla 2). En algunas realizaciones, la composición comprende cloruro sódico, adenina, glucosa, fosfato y/o manitol. En algunas realizaciones, la concentración final de ión cloruro en la composición de GR (por ejemplo, antes de la transfusión) es inferior a aproximadamente 500 mM, o aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 100 mM, aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 25 mM, o entre aproximadamente 25 y 250 mM, o de aproximadamente 40 a 100 mM, o de aproximadamente 50 a 75 mM, o de aproximadamente 60 a 70 mM, o de aproximadamente 100 a 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a 175 mM, o aproximadamente 150 mM.
- En algunas realizaciones, la composición es adecuada para la infusión en un individuo (por ejemplo, un ser humano) después de aproximadamente 2 días, o aproximadamente 5 días, o aproximadamente 10 días, o aproximadamente 15 días, o aproximadamente 20 días, o aproximadamente 28 días, o aproximadamente 35 días, o aproximadamente 42 días de almacenamiento a 4 °C.
- En algunas de estas realizaciones, la composición comprende a) glóbulos rojos que se hacen reaccionar covalentemente con un grupo electrófilo de un compuesto inactivador de patógenos (por ejemplo, S-303) sobre la superficie celular e i) tienen un volumen de células empaquetadas (PCV) superior al 60 %, y/o ii) tienen una capacidad media de unión a anticuerpos (CUA) de entre aproximadamente 25.000 y 70.000 (o aproximadamente 35.000 y 45.000); y b) un desactivador de glutatión a una concentración inferior a aproximadamente 8 mM (o inferior a 6 mM, o inferior a aproximadamente 2 mM). En algunas realizaciones, al menos 3 log (o al menos 1 log) de un patógeno está inactivado, si está presente. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para la infusión en seres humanos hasta 28 o 42 días de almacenamiento a 4 °C.

#### *Kits*

- Además de los métodos mejorados de interrupción, la presente divulgación proporciona kits desechables para el procesamiento de una composición de glóbulos rojos, donde el procesamiento puede realizarse manual o automáticamente. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona kits que comprenden el compuesto inactivador de patógenos, el desactivador y/o la base usados en cada uno de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit proporciona una solución recién preparada (tal como un tampón para la resuspensión de las células) para su uso tras reducir la concentración de desactivador descrita en este documento.

- En algunas realizaciones, el kit comprende S-303, incluyendo cualquiera de sus sales, y glutatión neutralizado, incluyendo cualquiera de sus sales. El S-303 puede estar en forma sólida o en solución. De forma similar, el glutatión neutralizado puede estar en forma sólida o en solución. Estos sólidos o soluciones pueden comprender además excipientes, adyuvantes, diluyentes o estabilizantes aceptables. En algunas realizaciones, S-303 es la sal clorhidrato y el glutatión neutralizado se neutraliza con aproximadamente 1 equivalente de hidróxido sódico. En algunas realizaciones, el S-303 y el glutatión neutralizado están en forma sólida, y el kit comprende además una solución adecuada para disolver el S-303 y una solución adecuada para disolver el glutatión neutralizado. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un kit que comprende un compuesto inactivador de patógenos, un desactivador y una solución para disolver el desactivador, en el que la solución neutraliza o neutraliza parcialmente el desactivador. Los métodos y kits descritos en el presente documento engloban cualquier formulación farmacéutica adecuada del compuesto inactivador de patógenos y desactivador, que puede formularse como una mezcla o por separado. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables son conocidas por los expertos en la materia y pueden encontrarse ejemplos de excipientes, adyuvantes, diluyentes o estabilizantes adecuados, por ejemplo, en Gennaro, ed., "Remington's The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott Williams & Wilkins. La divulgación

también incluye las composiciones resultantes de los métodos descritos anteriormente, que comprenden glóbulos rojos, un compuesto inactivador de patógenos y un desactivador como se ha descrito anteriormente, estando la composición en un intervalo de pH adecuado para efectuar una mejor interrupción del compuesto inactivador de patógenos.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit útil, por ejemplo, para tratar composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un compuesto inactivador de patógenos que comprende un ligando de unión a ácidos nucleicos y un grupo funcional que es o que forma un grupo electrófilo (incluyendo cualquier sal del mismo), un desactivador que comprende un grupo tiol (incluyendo cualquier sal del mismo) y aproximadamente de 0,75 a 10 aproximadamente 1,25 equivalentes de base, en el que un equivalente significa una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de desactivador del kit. En algunas realizaciones, el kit comprende aproximadamente 1 equivalente de una base adecuada.

15 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un kit de tratamiento de composiciones de glóbulos rojos para inactivar patógenos, que comprende un ligando de unión a ácidos nucleicos y un grupo funcional que es o que forma un grupo electrófilo (por ejemplo, S-303), incluyendo cualquier sal del mismo, un desactivador neutralizado que comprende un grupo tiol (por ejemplo, glutatión neutralizado), incluyendo cualquier sal del mismo, y opcionalmente solución recién preparada (tal como tampón para resuspensión de las células) para su uso tras reducir la 20 concentración del desactivador descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la solución es una solución de aditivos, una solución de diluyentes y/o una solución de tratamiento descrita en el presente documento (por ejemplo, SAG-M, AS-5 o cualquier solución descrita anteriormente o en las Tablas 2, 3 y/o 4).

*Ejemplos, materiales y métodos*

25 La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Preparación de organismos

*Ejemplos, materiales y métodos*

30 Las cepas bacterianas y virales usadas para estos estudios fueron aislados clínicos obtenidos del Departamento de Servicios de Salud de California o de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

35 Bacterias: se inocularon las reservas de trabajo de bacterias congeladas en un matraz de 500 ml que contenía una mezcla de medio de extracto de levadura al 50 % sin adición de glucosa y suero bovino fetal al 50 %. Se incubaron los matraces durante la noche en un baño de agua agitado a 37 °C. Se introdujeron bacterias Gram positivas en el producto sanguíneo directamente del cultivo de una noche. Los cultivos de una noche de bacterias Gram negativas se subcultivaron adicionalmente mediante una dilución 1:1000 en medio de cultivo recién preparado y se incubaron como antes hasta que alcanzaron la fase logarítmica determinada por densidad óptica. Se introdujo este crecimiento 40 en fase logarítmica en el producto sanguíneo para experimentos de PI.

Virus: se prepararon reservas víricas exentas de células usando las estirpes celulares apropiadas para cada virus. Se congelaron estas reservas a -80 °C hasta que se descongelaron y se introdujeron directamente en el producto sanguíneo para los experimentos de PI.

45 Ejemplo 2: Preparación de unidades GR

50 Se recibió sangre en Cerus como 450 ml o 500 ml de unidades de sangre entera bien en el día de la recolección o hasta 3 días después de la recolección. En la mayoría de los casos la sangre entera fue sometida a filtración de leucocitos antes de ser procesada en unidades de GR. Algunas unidades no pudieron someterse a filtración de los leucocitos con éxito (por ejemplo, sangre de donantes con rasgo falciforme), y estas unidades se usaron sin filtración de los leucocitos para los estudios de PI de organismos que no se sabe que sobreviven dentro de los glóbulos blancos.

55 Tras la filtración de los leucocitos, se centrifugó la sangre y se expresó el plasma. A continuación, se añadió la solución de aditivos de GR deseada, tal como AS-3 (Nutricel), y la unidad de GR resultante bien se usó inmediatamente o se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 3: Inactivación de patógenos (PI)

60 El proceso de PI implica la inoculación de unidades de GR con un cultivo del organismo que se vaya a ensayar. El título típico de aporte diana de los organismos en las unidades de GR era de aproximadamente 10<sup>6</sup> ufc o ufp/ml de GR. En la mayoría de los casos, el volumen del organismo (incluyendo cualquier medio de cultivo) era aproximadamente el 1 % del volumen de la unidad de GR, y normalmente no era superior al 10 %. Para evaluar la 65 inactivación de niveles de bacterias más bajos, más relevantes desde el punto de vista fisiológico, se usaron aportes de 10 a 10<sup>5</sup> ufc/unidad. Para los estudios de aporte de bajo nivel, se agruparon dos unidades de GR, se añadieron y

se dividieron en una unidad de ensayo que se trató como se describe en este documento y una unidad de control a la que solo se añadió el desactivador (por ejemplo, GSH) (no se usó inactivador de patógenos, por ejemplo, S-303) y se mantuvo en las mismas condiciones de temperatura que la unidad de ensayo.

- 5 Tras la adición del organismo a la unidad de GR, se mezcló la unidad agarrando los extremos del recipiente y moviendo los extremos 10 veces en un movimiento en forma de ocho o de pedal de bicicleta.

10 A continuación, se transfirieron los GR contaminados al recipiente de mezcla del conjunto desechable de GR del proceso de PI. El conjunto consiste en una serie de recipientes de plástico y puertos conectados por tubos de plástico. El recipiente de mezcla era un recipiente de plástico PL1813 de 600 ml de capacidad y doble puerto. Conectado a cada uno de los puertos, se encontraba un conjunto de tubos en Y con filtros pediátricos adaptados a Luer unidos a un cable. Se conecta el cable sin usar sobre un puerto a otro recipiente de plástico PL1813 de 600 ml de capacidad (recipiente de incubación). El cable restante sin usar fue la línea usada para conectar la unidad de GR original.

15 Se prepararon las soluciones de dosificación y se añadieron a las unidades de la siguiente manera: se preparó una solución de glutatión (GSH) 600 mM con 1 equivalente de NaOH disolviendo 2,8 g de GSH en ~12 ml de solución salina al 0,9 % y 0,9 ml de NaOH 10 N. Se extrajo el volumen apropiado de solución de GSH en una jeringa de 20 ml de capacidad. El volumen usado normalmente fue de 10 ml de solución de GSH por 280 ml de GR, más 2 ml de pérdida de línea para generar GSH 20 mM en la unidad de GR dosificada. Se conectó la jeringa que contenía GSH al recipiente de mezcla usando el cable filtrado que comparte un adaptador en Y con el cable conectado al recipiente de incubación. Se colocó la unidad sobre un balancín para facilitar la mezcla de arriba a abajo durante la adición de soluciones de dosificación. Se añadió el GSH a la unidad mientras la unidad se está mezclando en el balancín. A continuación, se mezcló la unidad manualmente usando el método de mezcla en forma de ocho descrito anteriormente. Tras la adición del GSH, se dejaron reposar las unidades a temperatura ambiente durante 5 minutos.

30 Tras el período de descanso, se retiró una pequeña muestra de GR y se cultivó para determinar el título de pretratamiento. Se usaron ensayos de placa convencionales para muestras bacterianas y ensayos de cultivo celular para virus.

35 Se preparó una solución de clorhidrato de amustina 6 mM (S-303) disolviendo 46 mg de S-303 en ~15 ml de solución salina al 0,9 %. Se extrajo la dosis apropiada de solución de S-303 en una jeringuilla de 20 ml. El volumen usado era normalmente de 10 ml de solución de S-303 por 280 ml de GR, más 2 ml de pérdida de línea para generar S-303 0,2 mM en la unidad de GR dosificada. A continuación, se mezcló la unidad manualmente usando el método de mezcla en forma de ocho como se ha descrito anteriormente. Se incubó la unidad de GR tratada a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 horas tras la adición de S-303 para garantizar la finalización de la inactivación de patógenos antes del muestreo para el título posterior al tratamiento.

40 A las 3 horas después del PI, se retiraron las muestras y se cultivaron, como se ha descrito anteriormente, para determinar el título después del tratamiento. Para los estudios de evaluación de la inactivación de el aporte bacteriana de bajo nivel, se incubaron las unidades tanto de ensayo como de control a TA durante ~20 horas tras el tratamiento y luego se incubaron a 37 °C durante la noche. Tras la incubación a 37 °C, se retiraron muestras de cada unidad de ensayo tratada y de la unidad de control no tratada idéntica, y se cultivaron para obtener una evaluación cualitativa del título bacteriano. La unidad de control no tratada mostró crecimiento.

45 Se determinó la reducción logarítmica para cada unidad tomando el log de la relación del título previo al tratamiento con el título posterior al tratamiento, donde los títulos se expresaron como 10 x ufc o ufp/ml.

#### 50 Ejemplo 4: Experimentos de la función *in vitro* de los GR

55 Se prepararon unidades de GR humanos en soluciones de aditivos, tales como AS-3 (Nutricel), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se trataron las unidades de GR con diversas concentraciones de GSH para alcanzar concentraciones finales que variaban de 2 mM a 30 mM. En algunos casos, se ajustó el pH del GSH con 1 o 2 equivalentes de base con bicarbonato sódico o hidróxido sódico antes del tratamiento. Tras el tratamiento con GSH, se trataron los GR con S-303, se disolvieron con cloruro sódico al 0,9 %, para conseguir una concentración de S-303 0,2 mM en los GR, o se simuló la dosificación de cloruro sódico al 0,9 %. Tras el tratamiento, se incubaron las unidades durante 20 h a 20-25 °C. Tras la incubación, se centrifugaron algunas unidades a los 6 minutos, 21 °C, 4.100 x g, se expresó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de solución de aditivos recién preparada a los GR. Se dispusieron todas las unidades a 4 °C para el almacenamiento. Los controles no tratados se dispusieron a 4 °C tras su preparación en solución de aditivos.

65 Se ensayó la función *in vitro* en diversos puntos de tiempo durante el almacenamiento. Se determinó el pH extracelular a 37 °C midiendo el pH de los GR de cada unidad en un analizador gaseoso de sangre de Chiron Diagnostics. Se midió el ATP total usando un ensayo enzimático basado en luciferasa o un protocolo descrito por Beutler (1984). Se prepararon sobrenadantes exentos de células para evaluar el potasio extracelular, la glucosa y el lactato. El potasio extracelular se determinó midiendo el contenido de K<sup>+</sup> de sobrenadante exento de células usando

un analizador de Na/K de Chiron Diagnostics (modelo n.º 614) o un analizador similar. Se evaluaron la glucosa extracelular y el lactato en un analizador NexCT. Los índices de glóbulos rojos se recogieron usando el analizador de hematología Advia (Siemens).

- 5 Se lavaron los GR tres veces con cloruro sódico al 0,9 % y se incubaron un mínimo de 1 h a TA antes del análisis para determinar la fragilidad osmótica y los perfiles de densidad. El método usado para la fragilidad osmótica es el descrito por Beutler *et al.*, 1982, (*Blood Journal* 59:1141-1147), y se modificó para un formato de 96 pocillos (Lew *et al.*, 2003, *Blood* 101:4189-4194). Las curvas de distribución de la densidad se obtuvieron según Danon y Marikovsky, 1964 (*J Lab Clin Med* 6: 668-674), usando ésteres de ftalato en tubos de microhematocrito.

10

Ejemplo 5: Cuantificación de la unión del compuesto inactivador de patógenos a la superficie de los GR

- 15 Se detectó el nivel de acridina unida a la superficie de los GR con un ensayo de citometría de flujo inmune (iFC) activado por fluorescencia, usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-acridina conjugado con alofocianina (APC) y un citómetro de flujo FACS-Caliber (BD Biosciences). En resumen, se lavaron los glóbulos rojos tres veces en solución salina al 0,9 % y se volvieron a suspender hasta un hematocrito al 4 % en tampón de incubación de flujo (HBSS, BSA al 1 %, NaN<sub>3</sub> al 0,1 %, EDTA 1 mM, BSA al 3 %). A continuación, se añadió anticuerpo anti-acridina monoclonal de ratón conjugado con APC y se incubó durante 30 minutos a 4 °C; se lavaron las células en tampón de lavado de flujo (HBSS, BSA al 1 %, NaN<sub>3</sub> al 0,1 %, EDTA 1 mM) resuspendido en el mismo tampón, y se evaluó un total de 30.000 eventos en el FACS-Caliber en ventanas de análisis apropiadas. La cuantificación del número de moléculas de S-303 unidas a la superficie celular de los GR humanos (CUA) se realizó usando kits de perlas Quantum Simply Cellular (Bang Laboratories, Inc., Fishers, IN).

25 Ejemplo 6: Efectos del pH del glutatión sobre la hidratación y la función de los GR inmediatas y en relación con el almacenamiento

- 30 Se trataron las unidades de GR con S-303 (0,2 mM) y GSH (20 mM) de pH ajustado con NaOH (diferentes equivalentes de bases (e.b.)) para potenciar la interrupción del GSH. El pH de las soluciones de dosificación ensayadas fue de 2,9, 4,5 y 8,9 para 0 e.b., 1 e.b. y 2 e.b., respectivamente. Tras el tratamiento, se almacenaron los glóbulos rojos a 4 °C y se ensayaron periódicamente para determinar el pH extracelular, la glucosa, el lactato, el potasio, el ATP total y la hemólisis. Los parámetros físicos de los GR (MCV, MCH, MCHC, HDW, etc.) se midieron mediante citometría de flujo óptica, y se realizaron mediciones de la fragilidad osmótica según Beutler *et al.*, (1982) con las modificación de Lew *et al.*

- 35 La exposición de los GR al GSH alcalino dio lugar a la reducción del Hct con una fragilidad osmótica inmediata y sostenida reducida y un aumento de la densidad de los GR (por ejemplo, véase la Figura 1). Se corrigió esta deshidratación inmediata disminuyendo los equivalentes de base, produciendo un pH inferior de las soluciones de GSH (véase la Tabla 5). Aunque se mejoró la deshidratación inmediata, la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos continuó cambiando (Tabla 6, otros ejemplos en las Figuras 2 y 3) por la presencia de GSH de una manera dependiente de la concentración. La medición de la MCHC y la distribución de MCH usando citometría de flujo óptico (analizador de la hematología Advia, Siemens) se correlacionó con los cambios en la fragilidad osmótica y la densidad. La deshidratación fue independiente de S-303, ya que el efecto también se demostró por el pH y el GSH en ausencia de S-303.

45 Tabla 5: Efecto de los niveles ajustados con base de hidróxido de sodio del GSH sobre la hidratación de los GR inmediatamente después del tratamiento

Nivel base	MCF* (mOsm)	Hct (%)	MCHC (g/dl)	pH de la sangre
Sin tratamiento	160	62	31	6,743
Dosis simulada	No realizada	56	33	6,759
Dosificación (0 e.b.)	173	59	31	6,206
Dosificación (1 e.b.)	156	52	36	6,713
Dosificación (2 e.b.)	142	47	42	7,180

\*MCF (Mediana de la fragilidad corpuscular) = osmolaridad a la que se produce el 50 % de la hemólisis

Tabla 6: Efecto de los equivalentes base de GSH sobre la hidratación de los GR y la función durante el almacenamiento

Tiempo**	Nivel base	MCF* (mOsm)	Hct (%)	MCHC (g/dl)	pH de la sangre	ATP ( $\mu\text{mol/gHb}$ )	Glucosa (mM)	Lactato (mM)
20 h	Sin tratamiento	158	61 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1	6,749 $\pm$ 0,011	5,35 $\pm$ 0,41	11,6 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,7
	Dosificación (1 e.b.)	156	52 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1	6,644 $\pm$ 0,034	6,45 $\pm$ 0,37	14,5 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,0
14 días	Dosificación (2 e.b.)	145	46 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1	7,173 $\pm$ 0,020	8,17 $\pm$ 0,50	12,8 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
	Sin tratamiento	158	60 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1	6,617 $\pm$ 0,020	4,78 $\pm$ 0,62	9,8 $\pm$ 1,3	3,7 $\pm$ 0,3
35 días	Dosificación (1 e.b.)	152	51 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	6,486 $\pm$ 0,019	4,47 $\pm$ 0,70	9,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,6
	Dosificación (2 e.b.)	146	47 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	6,651 $\pm$ 0,035	5,58 $\pm$ 0,36	6,2 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,5
	Sin tratamiento	159	61 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1	6,477 $\pm$ 0,039	3,52 $\pm$ 0,37	11,6 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 2,0
	Dosificación (1 e.b.)	148	52 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	6,423 $\pm$ 0,033	2,77 $\pm$ 0,49	14,5 $\pm$ 0,9	20,6 $\pm$ 1,6
	Dosificación (2 e.b.)	147	49 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1	6,489 $\pm$ 0,030	3,937 $\pm$ 0,51	12,8 $\pm$ 0,5	10,1 $\pm$ 1,0

\*MCF (Mediana de la fragilidad corpuscular) = Osmolaridad a la que se produce el 50 % de la hemólisis

\*\*Días después de la dosificación. Sangre dosificada a los 5 días de vida.

Los cambios en la hidratación de los GR se correlacionaron con el GSH, el pH y la concentración, pero no se correlacionaron con S-303 ni con los ensayos bioquímicos (ATP, lactato, glucosa) usados habitualmente para evaluar la función de los GR. La limitación de la exposición al pH alto de GSH evitó el efecto de deshidratación inicial. La limitación de la exposición continuada de altos niveles de GSH evitó el efecto de deshidratación del almacenamiento. Estos estudios muestran que la evaluación del estado de hidratación de los GR almacenados debe incluirse como un predictor de la calidad de los GR, pues los cambios sustanciales en la hidratación no tuvieron ningún efecto sobre los criterios convencionales, pero pudieron haber contribuido al cambio moderado en la vida útil de los glóbulos rojos.

10 Ejemplo 7: Método de interrupción mejorado con disminución subsiguiente de los resultados del desactivador en la reducción de la deshidratación de los GR tras el almacenamiento

Se trataron unidades de GR con S-303 (0,2 mM) y GSH (20 mM) de pH ajustado con 1 equivalente de NaOH para potenciar la interrupción con GSH. Tras el tratamiento con GSH, se trataron los GR con S-303, se disolvieron con cloruro sódico al 0,9 %, para conseguir una concentración de S-303 de 0,2 mM en los GR, o se simuló la dosificación con cloruro sódico al 0,9 %. Tras el tratamiento, se incubaron las unidades durante 20 h a 20-25 °C. Tras la incubación, se centrifugaron algunas unidades a los 6 min, 21 °C, 4100 x g, se expresó sobrenadante y se añadieron 100 ml de solución de aditivos recién preparada a los GR. Se pusieron todas las unidades a 4 °C para el almacenamiento. Los controles no tratados se pusieron a 4 °C tras haber sido preparados en solución de aditivos. Se realizaron las mediciones de la fragilidad osmótica de los GR según Beutler et al., (1982) con la modificación de Lew et al., (2003).

La exposición prolongada de los GR a altas concentraciones de GSH produjo una mayor densidad de GR y una menor fragilidad osmótica (por ejemplo, véase la Tabla 5, Figuras 3 y 4). Esta deshidratación relacionada con el almacenamiento se corrigió eliminando el GSH antes del almacenamiento de los GR (por ejemplo, véanse las Figuras 4 y 5). El tiempo y la deshidratación dependiente de la concentración de GSH fue independiente de S-303, ya que el efecto también se demostró por GSH en ausencia de S-303 (por ejemplo, véase la Figura 6).

La hidratación de los GR cambia en correlación con el GSH. La limitación de la exposición a altas concentraciones de GSH mediante el intercambio de la solución de tratamiento para la solución de aditivos recién preparada evitó el efecto de la deshidratación inducido por el almacenamiento.

Ejemplo 8: Inactivación de patógenos para los métodos de interrupción mejorados

Se prepararon unidades de GR empobrecidas en leucocitos con un hematocrito del aproximadamente 60 % en medio de almacenamiento de AS-3. Las unidades de GR se inocularon con aproximadamente 6 log/ml de organismo viable, y se retiró una alícuota para servir como control de entrada no tratado. Se añadió GSH en una solución de 1 equivalente de NaOH a las unidades inoculadas hasta una concentración final de 20 mM y se mezcló bien. Se añadió S-303 a una concentración final de 0,2 mM y se volvieron a mezclar las unidades bien y se incubaron a de 20 °C a 25 °C durante tres horas. Tras la incubación, se retiraron las muestras y se ensayaron para detectar organismos viables residuales. Las muestras de control se titularon inmediatamente después de la preparación y de nuevo tras el período de incubación de 3 horas. Se realizaron al menos dos repeticiones para cada organismo.

A excepción de *Pseudomonas*, los virus Gram negativos, Gram positivos y un virus de ejemplo se inactivaron eficazmente mediante el tratamiento con GSH neutralizado con 1 equivalente de NaOH en comparación con la neutralización con 2 equivalentes de NaOH (véase la Tabla 7).

La inactivación de patógenos de *Pseudomonas aeruginosa* usando un título de inoculación total de hasta 4,4 log por unidad de GR resultó en la inactivación completa.

Tabla 7: Datos de inactivación de patógenos para mejores condiciones de interrupción frente a las condiciones anteriores

	GSH de reducción log (20 mM), 1 e.b.	GSH de reducción log (20 mM), 2 e.b.
<b><u>S. aureus</u></b>	6,0 ± 0,3 (n = 4)	6,4
<b><u>S. marcescens</u></b>	3,7 ± 0,4 (n = 3)	4,8
<b><u>Y. enterocolítica</u></b>	5,0 ± 0,4 (n = 4)	4,6
<b><u>E. coli</u></b>	5,9 ± 0,8 (n = 4)	6,5

<b><i>P. aeruginosa</i>*</b>	<b>1,2 ± 0,4</b> (n = 3)	<b>1,8</b>
<b>VSV</b>	<b>&gt; 5,9</b>	<b>4,2</b>

Ejemplo 9: Niveles de acridina unidos a la superficie para métodos de interrupción mejorados con etapa de intercambio

5 Se usó el método descrito en el Ejemplo 5 para determinar la capacidad de unión del anticuerpo anti-acridina a los glóbulos rojos tratados con GSH 20 mM neutralizado con 1 equivalente de NaOH y S-303 0,2 mM. La capacidad de unión del anticuerpo medida a través de varios preparados de GR fue de aproximadamente 39.000 por glóbulo rojo (véase la Figura 7). Este nivel de unión se compara con  $18.407 \pm 1.195$  CUA cuando los GR se tratan con GSH 20 mM neutralizado con 2 equivalentes de NaOH y de  $123.714 \pm 5.123$  CUA cuando los GR se tratan con GSH ácido 2 mM.

Ejemplo 10: Inactivación de patógenos con tratamiento con S-303 a hematocrito variable (Hct)

15 Se prepararon unidades de GR de 450 a 500 ml de colecciones de GB sin solución de aditivos (80 % de hematocrito (Hct) centrifugado) o en solución de aditivos (Hct del 60 %). Se filtraron los leucocitos de los GR del tratamiento a menos que se indique lo contrario. Las unidades de ensayo al 40 % de Hct se diluyeron con una solución de diluyentes. Se inocularon las unidades de GR con un aporte de alto nivel de  $\sim 10^6$  organismos/ml o un aporte de bajo nivel de 10 a  $10^5$  organismos por unidad. Para el aporte de alto nivel, se retiró una muestra de control de 28 ml antes del tratamiento con S-303. Para el aporte bacteriano de bajo nivel, se prepararon unidades de ensayo y de control agrupando y dividiendo las unidades de GR completas y se inoculó la unidad de control con  $\sim 10$  organismos por unidad. Las unidades de ensayo con 80 % y 60 % de Hct se trataron con S-303 200  $\mu$ M y GSH 20 mM, se neutralizaron con un equivalente de base de hidróxido sódico (1 e.b.). Las unidades de ensayo con 40 % de Hct se trataron con S-303 130  $\mu$ M y GSH 13 mM (1 e.b.). Las muestras o unidades de control se trataron bien con GSH 20 mM o GSH 13 mM (1 e.b.) basándose en Hct. Para las unidades con alto nivel de aporte, se ensayaron las muestras de control para determinar los organismos viables en el momento en que se trató la unidad de ensayo. 25 Tras 3 horas de incubación a la TA, se ensayaron tanto las unidades de ensayo como las muestras de control para determinar los organismos viables, que se cuantificaron por el crecimiento en placas de agar ricas (bacterias) o mediante el ensayo en placas en células Vero (VSV). Para las unidades con aporte de bajo nivel, se incubaron las unidades de control y ensayo a TA durante 20 horas y, a continuación, a 37 °C durante  $\sim 20$  horas. Después, se sembraron las muestras para detectar el crecimiento bacteriano. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Datos de inactivación de patógenos para las muestras de valores de hematocrito variables

Organismo	Hematocrito del 80 %	Hematocrito del 60 %	Hematocrito del 40 %
<b>Aporte de alto nivel</b>	<b>Reducción <math>\log_{10}</math> media<sup>a</sup> (n = 2)</b>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3,4 <sup>b</sup>	4,9	6,1
<i>Escherichia coli</i>	3,8 <sup>b</sup>	6,1 <sup>c</sup>	6,6
<i>Serratia marcescens</i>	4,4 <sup>b</sup>	4,5	3,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\geq 5,8^b$	6,7	>7
Virus de la estomatitis vesicular (VSV)	>6,2 <sup>b</sup>	>5,9	5,9
<b>Aporte de bajo nivel</b>	<b>Inactivación de unidades completas<sup>d</sup> (<math>\log_{10}</math>)</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\geq 2,7$	$\geq 2,5$	$\geq 2,5$

<sup>a</sup>La reducción logarítmica se calcula como el logaritmo (título sin tratamiento/título posterior al tratamiento), con el título expresado como  $10^x/ml$ .  
<sup>b</sup>Reducción de patógenos sin filtración de leucocitos  
<sup>c</sup>n = 3  
<sup>d</sup>En todos los casos, las unidades de control al nivel de aporte más bajo fueron positivas en crecimiento bacteriano.

Ejemplo 11: Hidratación de los GR tras el tratamiento con S-303 a hematocrito variable (Hct)

35 Los GR se prepararon a partir de sangre entera empobrecida en leucocitos al 40 % o 60 % de Hct, medida mediante hematocrito centrifugado, en solución de aditivos y al 80 % de Hct como glóbulos rojos empaquetados. Las unidades se trataron con GSH (sal sódica, BioMedica Foscoma, Italia) y S-303 a una concentración final de 20 mM y 0,2 mM respectivamente. Todas las unidades tratadas se incubaron hasta 20 horas a TA. La solución de tratamiento se sustituyó con SAG-M y las unidades se ajustaron a Hct del 60 % durante el almacenamiento a 4°C. Las unidades de GR de control se prepararon en SAG-M y se almacenaron a 4 °C. Todas las unidades se ensayaron periódicamente para determinar los parámetros físicos; la MCHC se midió manualmente, se realizaron mediciones de la fragilidad osmótica mediante métodos convencionales (Beutler *et al.*, y Lew *et al.*, 2003). La mediana de la fragilidad corpuscular (MCF) se definió como la concentración de NaCl a la que se hemolizó el 50 % de los glóbulos rojos. El cambio en la MCF es un índice de relación superficie/volumen (S/V) e hidratación de GR durante el almacenamiento.

Tras aproximadamente 6 semanas de almacenamiento, todas las unidades tratadas resultaron tener valores de MCF comparables a los controles no tratados, independientemente del Hct en el momento del tratamiento. La MCHC, otro índice de hidratación de los GR, fue similar entre las unidades de ensayo y de control al final del almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 9. El almacenamiento de los GR tratados durante un máximo de 6 semanas no alteró significativamente la hidratación de los GR ni S/V en una amplia selección de Hct usados en la práctica rutinaria para la preparación de concentrados de GR.

Tabla 9: Datos de hidratación para las muestras de valores de hematocrito variables

	MCF (mOsm) (n = 2)		MCHC (g/dl) (n = 2)	
	20 h después de la dosificación	Después del almacenamiento	20 h después de la dosificación	Después del almacenamiento
HCT del 40 %	156	152	33	31
HCT del 80 %	158	156	32	30
Control de SAG-M	156	158	32	30
HCT del 60 %	151	148	33	33
Control de SAG-M	150	154	32	32

10 Ejemplo 12: Calidad *in vitro* de los GR almacenados tras el tratamiento con S-303 a hematocrito variable (Hct)

Los GR se prepararon a partir de sangre entera empobrecida en leucocitos al 40 % o 60 % de Hct, medida mediante hematocrito centrifugado en solución de aditivos y al 80 % de Hct como glóbulos rojos empaquetados. Las unidades se trataron con GSH (sal sódica) y S-303 a una concentración final de 20 mM y 0,2 mM respectivamente. Todas las unidades tratadas se incubaron hasta 20 horas a TA. La solución de tratamiento se sustituyó con SAG-M y las unidades se ajustaron a Hct del 60 % durante el almacenamiento a 4 °C. Las unidades de GR de control se prepararon en SAG-M y se almacenaron a 4 °C. La función *in vitro* se ensayó antes y después del tratamiento y a intervalos regulares durante un periodo de almacenamiento de hasta 6 semanas. Los parámetros evaluados para la función de los GR *in vitro* incluyeron el pH, el ATP total, la hemólisis y el potasio extracelular, la glucosa y el lactato. Tras aproximadamente 6 semanas (del día 38 al día 44) de almacenamiento, todas las unidades de ensayo resultaron tener niveles de ATP totales superiores a 2 μmol de ATP/g de Hb y la hemólisis y la MCHC eran comparables a las unidades de control, independientemente del Hct del tratamiento. A lo largo del almacenamiento, la glucosa extracelular de las unidades de ensayo fue superior a la de las unidades de control para el Hct del 40 % y del 60 %, mientras que las unidades con el Hct del 80 % fueron más similares al control. El lactato extracelular fue inferior en todas las unidades de ensayo, independientemente del Hct, en comparación con el control. Al final del almacenamiento, el K<sup>+</sup> extracelular resultó ser ligeramente inferior en las unidades de ensayo que en el control para las unidades de Hct del 40 % y del 60 %, mientras que las unidades de Hct del 80 % resultaron ser comparables al control. El pH de todas las unidades de ensayo fue similar al control durante el almacenamiento. El rendimiento de hemoglobina del proceso, independientemente del Hct del tratamiento, cumplió con los requisitos de AABB. La actividad de todos los parámetros metabólicos fue similar al control tras el tratamiento con S-303 en una amplia selección de Hct a lo largo de 6 semanas de almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Parámetros metabólicos para la inactivación de patógenos de los GR a valores de hematocrito variables

	ATP (μmol/gHb) (n = 2)	% de hemólisis (n = 2)	MCHC (g/dl) (n = 2)	Glucosa (mmol/l) (n = 2)
HCT del 40 % del ensayo	3,28 (D38)	0,2 % (D44)	31 (D44)	11,8 (D44)
HCT del 80 % del ensayo	3,42 (D38)	0,3 % (D44)	30 (D44)	7,7 (D44)
Control de SAG-M	3,35 (D38)	0,3 % (D44)	30 (D44)	6,3 (D44)
HCT del 60 % del ensayo	2,96 (D42)	0,2 % (D42)	30 (D42)	9,1 (D42)
Control de SAG-M	3,19 (D42)	0,3 % (D42)	30 (D42)	5,1 (D42)

35 Ejemplo 13: Función *in vitro* e inactivación de patógenos de GR diluidos

Se prepararon unidades de GR con SAG-M a partir de unidades de sangre entera empobrecida en leucocitos de colecciones de 500 ml. Para los estudios de la función de los GR, se agruparon las unidades de GR con SAG-M por tipo de ABO y se dividieron en unidades de ensayo y unidades de control emparejadas. Antes del tratamiento, se añadieron a las unidades de ensayo 150 ml de solución de diluyentes que comprendía manitol 28,8 mM, adenina 1,3 mM, fosfato de sodio 16,2 mM y citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Se trataron las unidades de ensayo con una sal de sodio de GSH y S-303 a una concentración final de 20 mM y 0,2 mM respectivamente. Se incubaron las unidades

de ensayo hasta 20 horas a temperatura ambiente (TA). Tras la incubación con TA, se centrifugaron las unidades y se intercambi6 el sobrenadante con 100 ml de SAG-M que se a6adi6 antes del almacenamiento a 4 6C. Las unidades de GR de control se prepararon en SAG-M y se almacenaron a 4 6C. Todas las unidades se evaluaron durante aproximadamente 6 semanas de almacenamiento a 4 6C por muestreo en diversos puntos de tiempo. Para los estudios de inactivaci6n de pat6genos de los GR, se dividieron las unidades de GR con SAG-M por la mitad, y las unidades de GR se inocularon con pat6genos antes de la adici6n de la soluci6n de tratamiento y del GSH. Tras la adici6n de la soluci6n de tratamiento y el GSH, se retir6 una muestra de control (de 5 ml a 7 ml) de la unidad para determinar el t6tulo de pat6genos de entrada, y se trat6 la unidad restante con S-303. Las unidades tratadas se muestrearon para determinar el t6tulo residual de pat6geno viable tras una incubaci6n est6tica de 3 horas a temperatura ambiente.

Se evaluaron los 6ndices metab6licos y f6sicos *in vitro* en diversos puntos de tiempo durante el almacenamiento con ensayos *in vitro*. Se midi6 el pH extracelular a 37 6C en un analizador de gases de sangre Siemens Diagnostics. Se midi6 el ATP total usando un ensayo enzim6tico basado en luciferasa. Los sobrenadantes exentos de c6lulas se prepararon para evaluar el potasio extracelular (K<sup>+</sup>), la glucosa y el lactato. El potasio extracelular se determin6 midiendo el contenido de K<sup>+</sup> de sobrenadante exento de c6lulas usando un analizador de Na/K EasyLyte<sup>6</sup>. Se evaluaron la glucosa extracelular y el lactato en un analizador NexCT<sup>TM</sup>. La concentraci6n media de hemoglobina corpuscular (MCHC) y el hematocrito centrifugado se midieron manualmente. Las medidas de la fragilidad osm6tica se realizaron mediante m6todos convencionales (Beutler *et al.*, y Lew *et al.*, 2003). La fragilidad corpuscular media (MCF) se defini6 como la concentraci6n de NaCl a la que se hemoliz6 el 50 % de los gl6bulos rojos.

Para los estudios de inactivaci6n bacteriana, se inocularon GR con aproximadamente 6,5 log ufc/ml de *E. coli*, *S. marcescens*, *S. aureus*, *Y. enterocol6tica* o *P. aeruginosa*. Para los estudios de inactivaci6n v6rica, se inocularon GR con aproximadamente 4,1 log ufp/ml a 6,4 log ufp/ml, dependiendo del virus. Se a6adi6 GSH disuelto en soluci6n salina a la unidad hasta una concentraci6n final de 20 mM. Se determinaron los t6tulos bacterianos mediante la enumeraci6n de unidades formadoras de colonias (ufc) en placas de agar, y los t6tulos v6ricos se determinaron mediante la enumeraci6n de unidades formadoras de placas (ufp) en estirpes celulares apropiadas. Las muestras sin tratar se diluyeron en serie antes de la enumeraci6n. Las muestras tratadas no se diluyeron antes de la enumeraci6n de los t6tulos.

Los resultados mostrados en las Tablas 11 y 12 que se presentan a continuaci6n demuestran la funci6n metab6lica de los GR y los par6metros fisiol6gicos aceptables en el transcurso del almacenamiento y una inactivaci6n aceptable de los pat6genos.

35 Tabla 11: Hidrataci6n y par6metros metab6licos para la inactivaci6n de los pat6genos de las unidades de GR diluidas

D6as despu6s de la donaci6n	Tratamiento	MCF (mOsm)	Hct (%)	MCHC (g/dl)	pH de la sangre	ATP ( $\mu$ mol/gHb)	Glucosa (mM)	Lactato (mM)
1	Sin tratamiento	ND	54 $\pm$ 2	32 $\pm$ 0	6,982 $\pm$ 0,015	4,50 $\pm$ 0,87	34,2 $\pm$ 1,3	3,6 $\pm$ 0,2
1,8	Sin tratamiento	153 $\pm$ 3	54 $\pm$ 3	33 $\pm$ 1	6,944 $\pm$ 0,015	4,39 $\pm$ 0,41	33,1 $\pm$ 1,9	4,8 $\pm$ 0,1
	Tratadas	152 $\pm$ 2	57 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1	6,837 $\pm$ 0,016	7,05 $\pm$ 0,91	29,4 $\pm$ 1,1	3,9 $\pm$ 0,2
7-8	Sin tratamiento	154 $\pm$ 2	54 $\pm$ 3	32 $\pm$ 1	6,823 $\pm$ 0,021	4,87 $\pm$ 0,45	30,4 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 0,6
	Tratadas	150 $\pm$ 2	56 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1	6,701 $\pm$ 0,024	6,23 $\pm$ 0,69	26,3 $\pm$ 1,1	7,9 $\pm$ 0,5
21-23	Sin tratamiento	153 $\pm$ 3	54,5 $\pm$ 3	31 $\pm$ 1	6,623 $\pm$ 0,022	4,30 $\pm$ 0,83	24,5 $\pm$ 1,8	18,5 $\pm$ 1,4
	Tratadas	148 $\pm$ 2	56 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1	6,526 $\pm$ 0,028	4,53 $\pm$ 0,99	22,2 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 1,3
35	Sin tratamiento	155 $\pm$ 2	54 $\pm$ 3	32 $\pm$ 1	6,532 $\pm$ 0,014	3,31 $\pm$ 0,28	21,6 $\pm$ 1,3	25,2 $\pm$ 0,7
	Tratadas	152 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	6,429 $\pm$ 0,016	3,90 $\pm$ 0,49	19,7 $\pm$ 0,6	18,9 $\pm$ 1,1
n = 4								

Tabla 12: Datos de inactivaci6n de pat6genos para las muestras de unidades de GR diluidas

Bacterias	Destrucci6n logar6tmica media (n = 4)
<i>S. marcescens</i>	4,20
<i>E. coli</i>	= 6,69
<i>S. aureus</i>	4,15

ES 2 636 563 T3

<i>Y. enterocolitica</i>	= 6,57
<i>P. aeruginosa</i>	3,35

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de reducción de la deshidratación en una composición de glóbulos rojos, en el que la composición es una mezcla que comprende un desactivador capaz de reaccionar con un compuesto inactivador de patógenos, de  
5 aproximadamente 0,5 a 1,5 equivalentes de base, en donde un equivalente significa una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar del desactivador en la mezcla, glóbulos rojos y una solución de tratamiento o solución de diluyentes;  
en el que el compuesto inactivador de patógenos es *N*-(acridin-9-il)-2-[bis(2-cloroetil)amino]etiléster de  $\beta$ -alanina y el  
10 desactivador es un péptido de 3 a 6 aminoácidos, en donde al menos uno de los aminoácidos es cisteína, *N*-acetil-cisteína o *S*-acetil-cisteína;  
comprendiendo el método el reemplazo de la solución en la mezcla con una solución de aditivos final, de modo que los glóbulos rojos tengan un volumen de células empaquetadas superior al 50 % y de modo que la concentración del desactivador en la mezcla se reduce hasta una cantidad que reduce el nivel de deshidratación de los glóbulos rojos  
15 producida como consecuencia del almacenamiento de la mezcla con respecto al nivel de deshidratación de los glóbulos rojos producida como consecuencia del almacenamiento de la mezcla a la concentración original de desactivador.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la base comprende de aproximadamente 0,75 a 1,25 equivalentes de base, en el que un equivalente significa una cantidad molar que es equivalente a la cantidad molar de desactivador  
20 en la mezcla.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el desactivador es glutatión o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que el desactivador es sal monosódica de glutatión.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración del desactivador en la mezcla resultante es inferior a 10 mM.

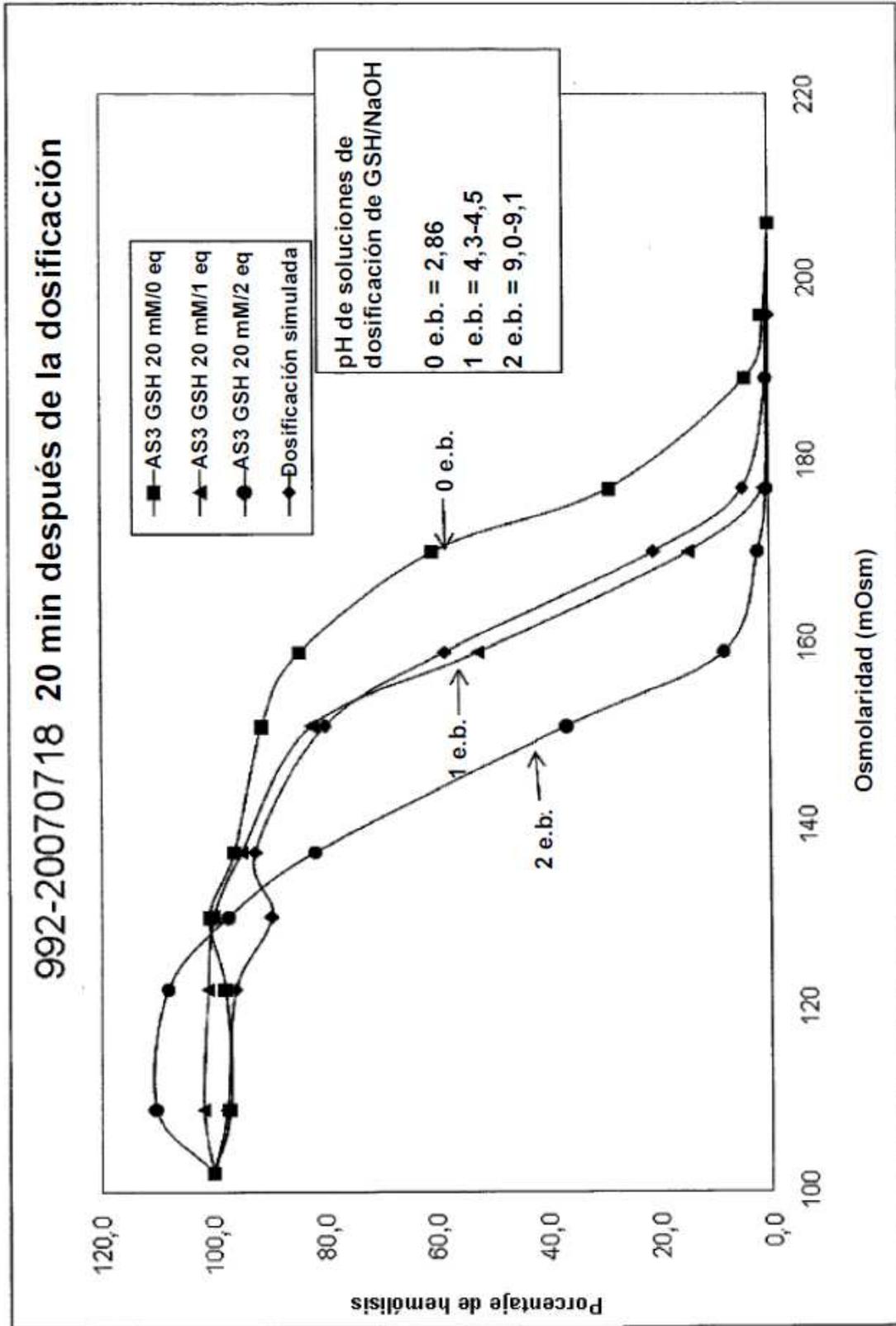


FIGURA 1

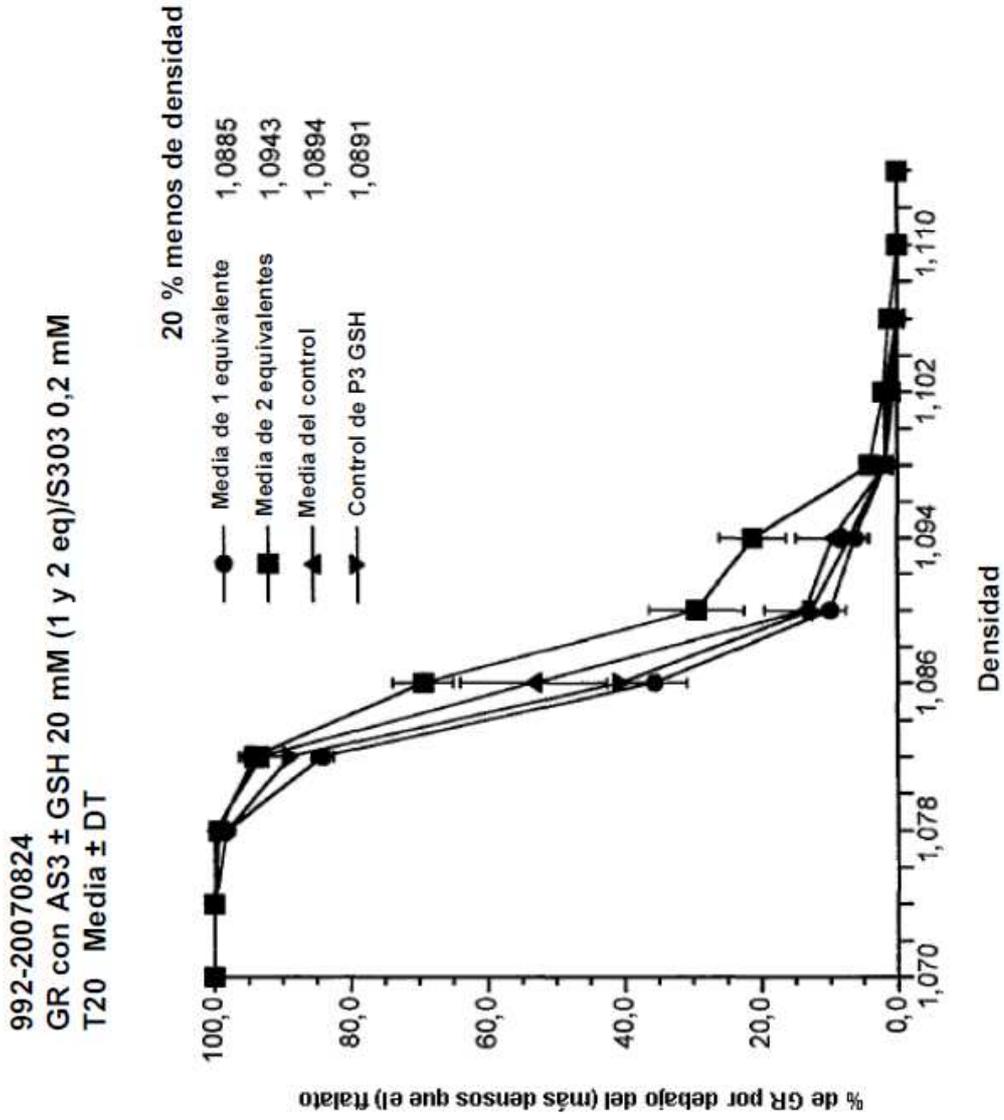


FIGURA 2

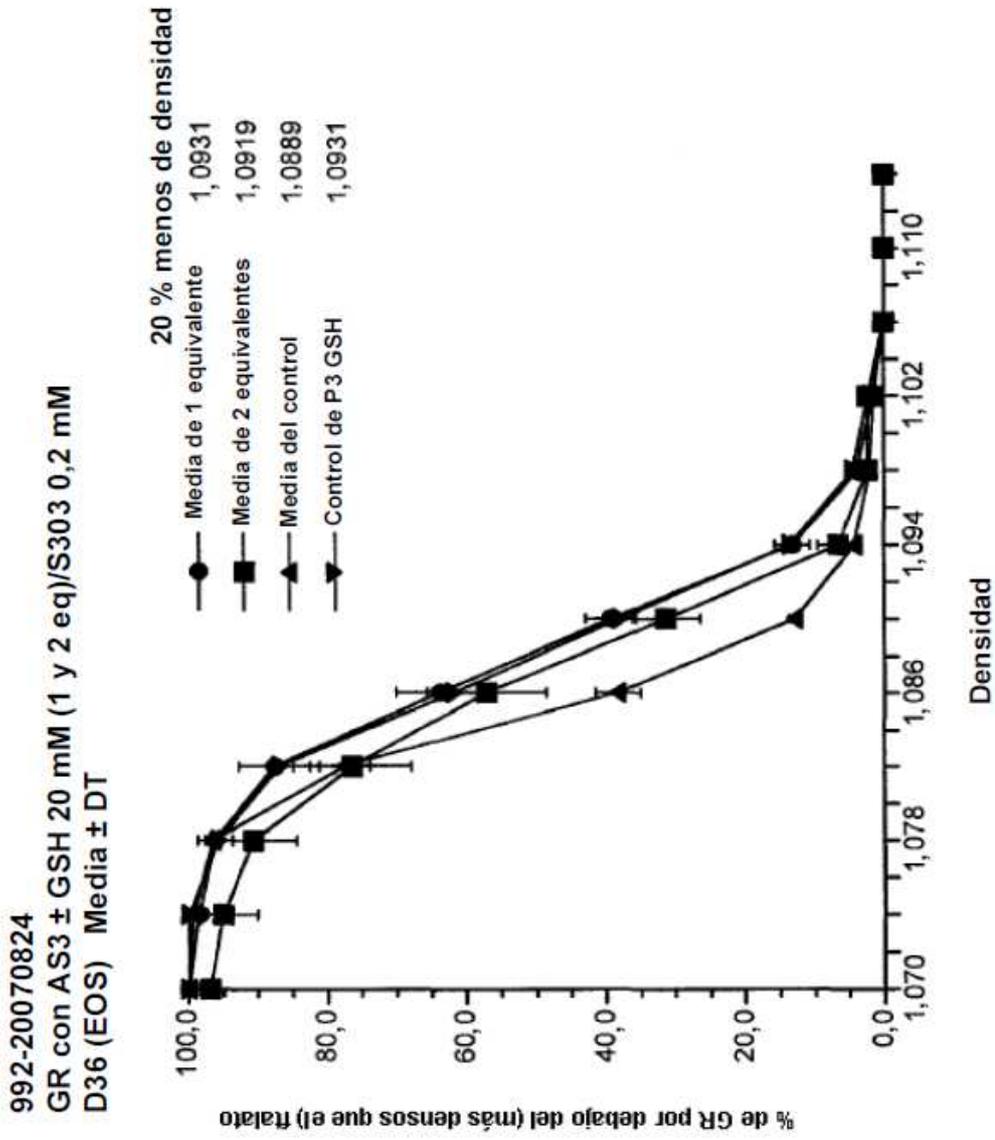


FIGURA 3

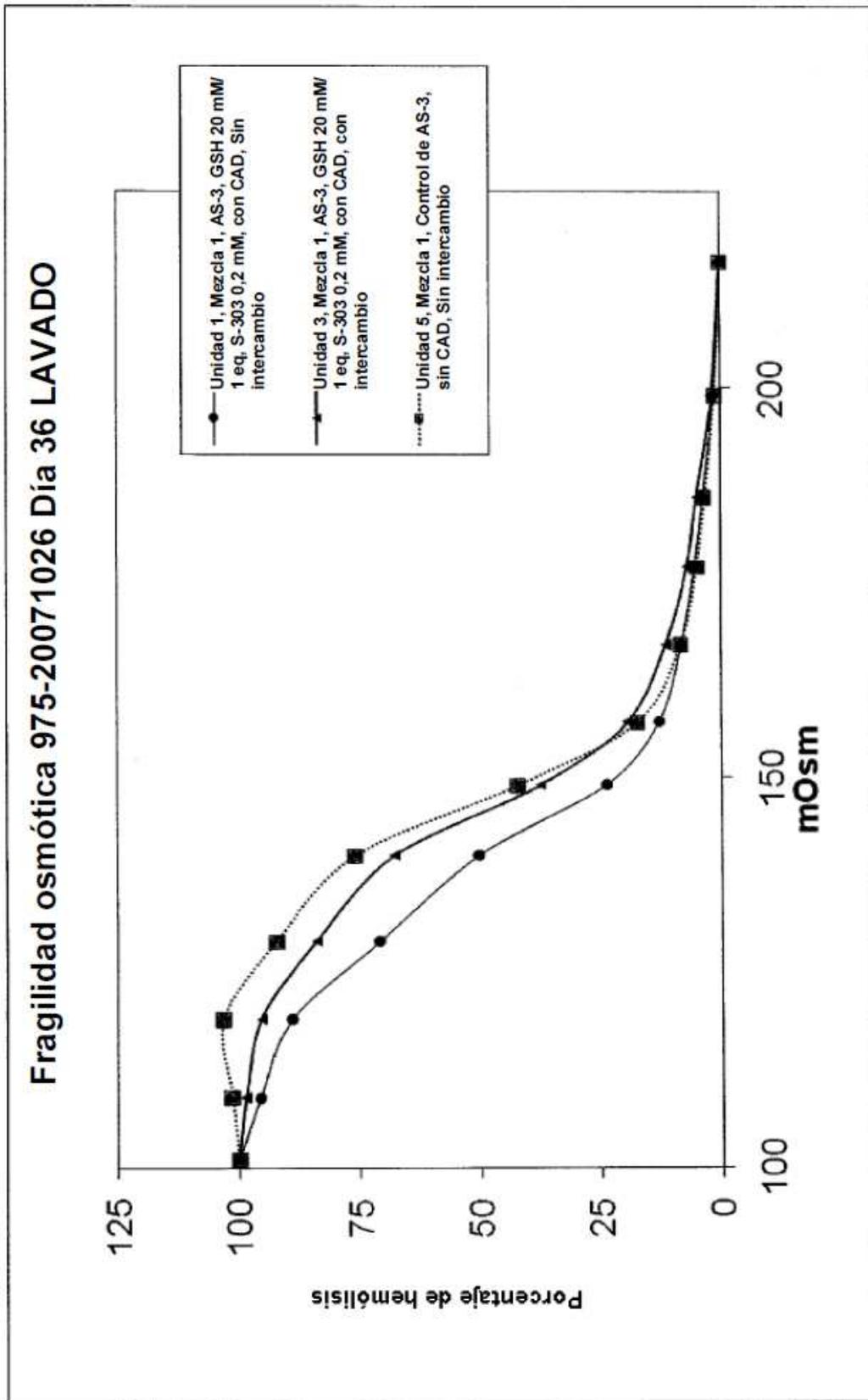


FIGURA 4

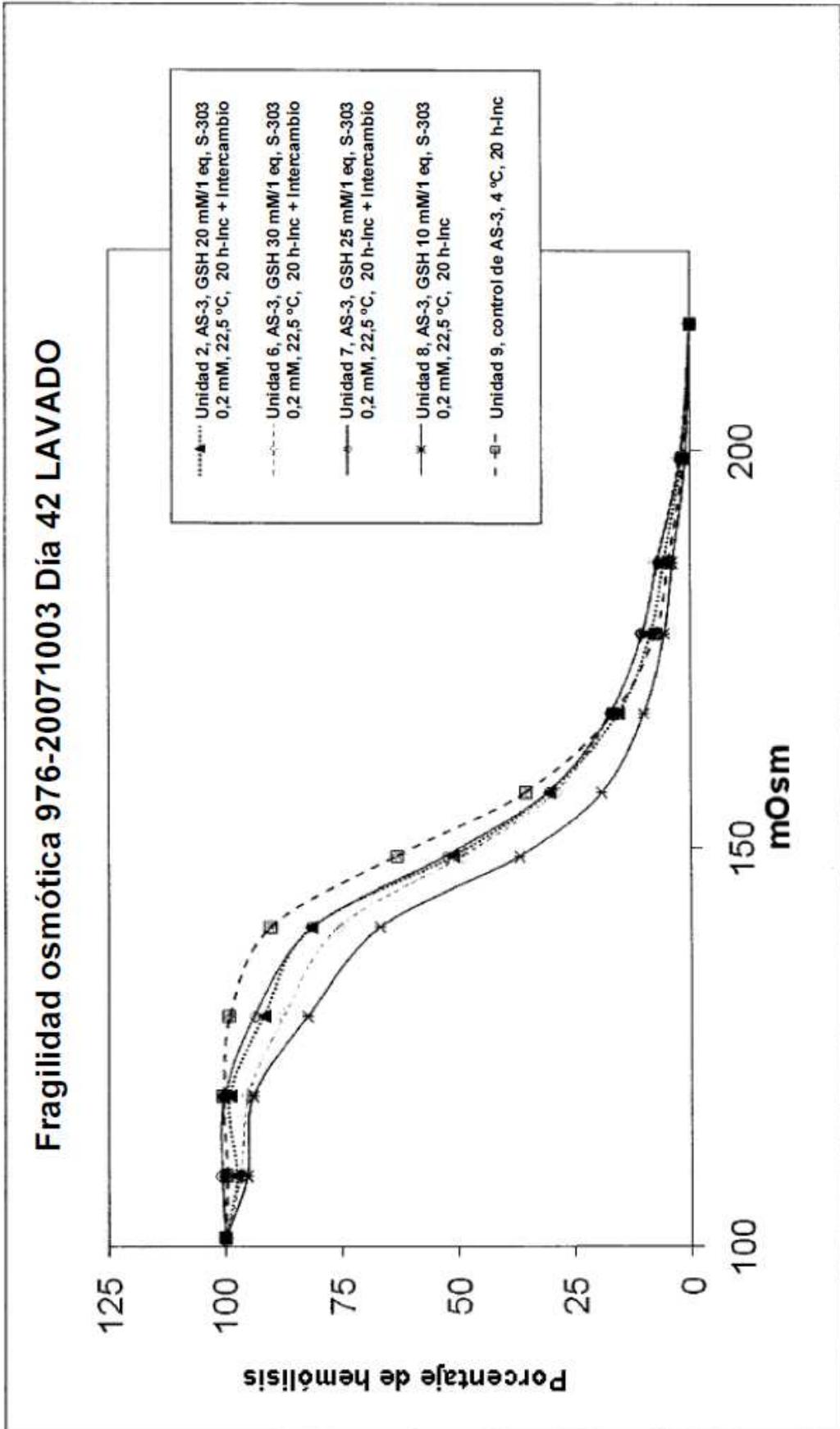


FIGURA 5

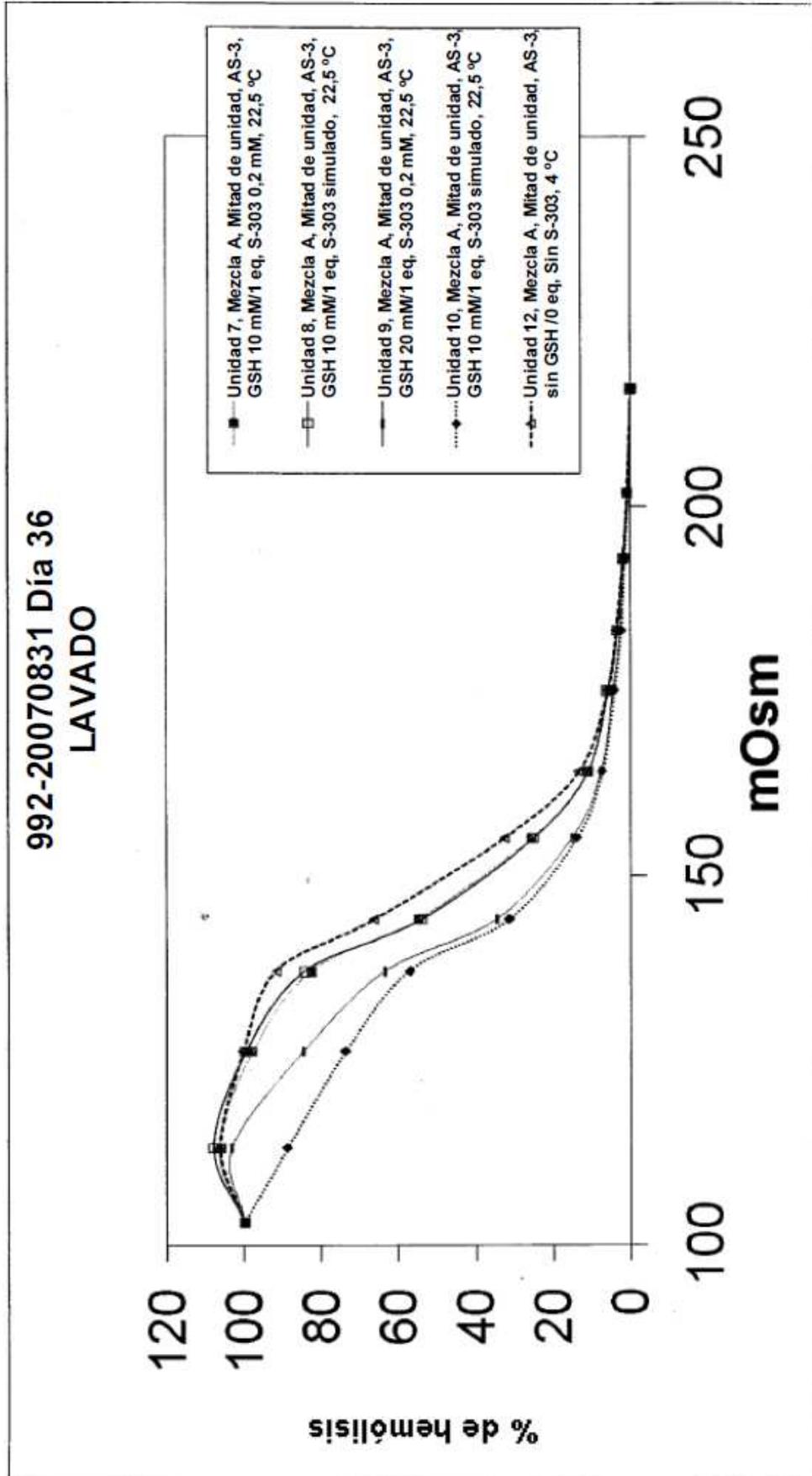


FIGURA 6

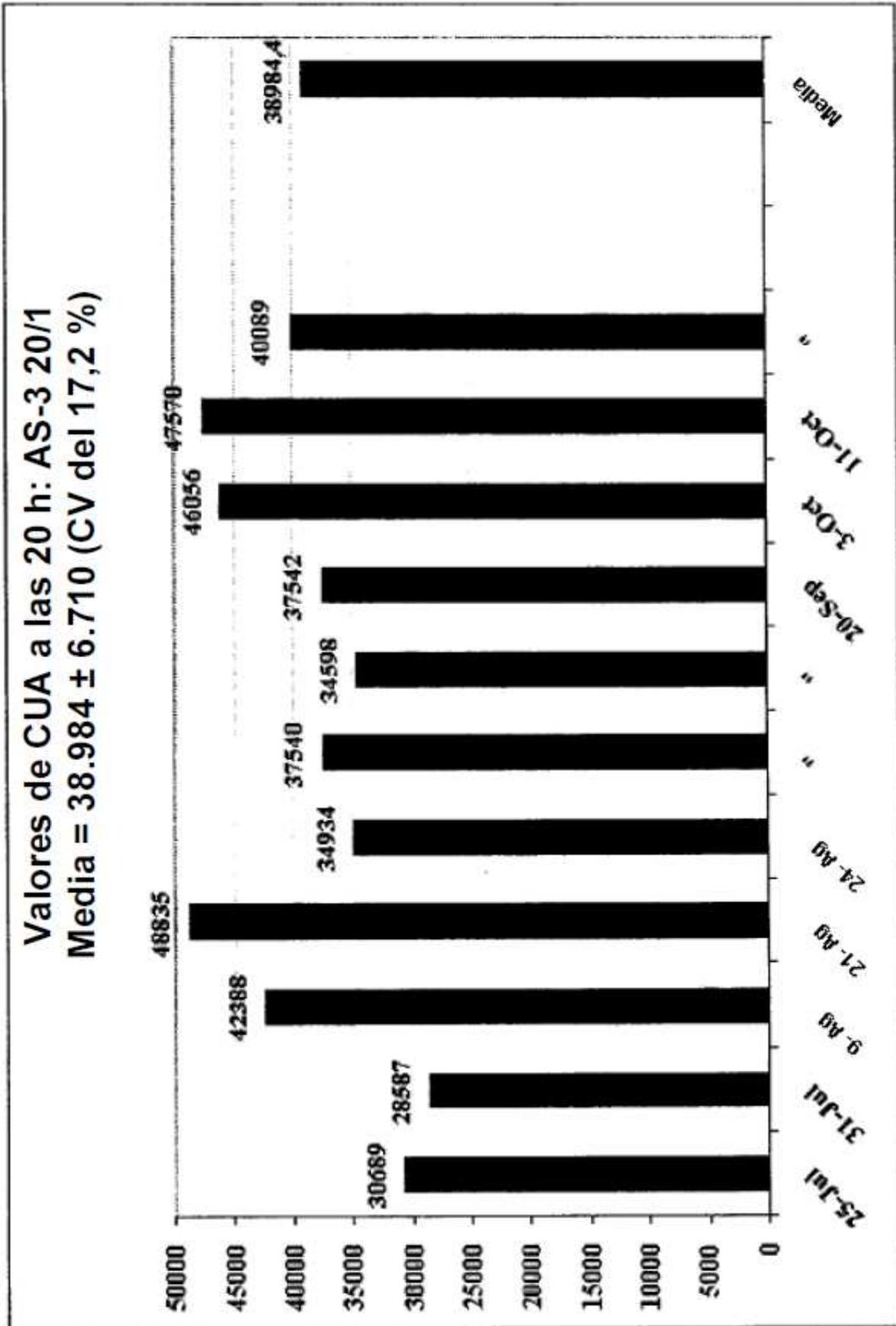


FIGURA 7