



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 575**

51 Int. Cl.:  
**A01N 43/84** (2006.01)  
**A61L 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778209 .9**  
96 Fecha de presentación : **12.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1643837**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Método de mezcla de colorantes para inactivar patógenos que circulan por la sangre.**

30 Prioridad: **11.07.2003 US 487160 P**

73 Titular/es: **Shanbrom Technologies, L.L.C.**  
**Suite B, 603 West Ojai Avenue**  
**Ojai, California 93023-3732, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2009**

72 Inventor/es: **Shanbrom, Edward**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2009**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 328 575 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 mezcla de colorantes para inactivar patógenos que circulan por la sangre.

**5 Antecedentes de la invención****Campo técnico**

La presente invención se refiere a desinfectar sangre y fracciones de sangre y más específicamente a un método simple de destruir gran número de patógenos en sangre humana antes de una transfusión.

**Descripción de la técnica anterior**

Se ha usado una amplia variedad de tratamientos para reducir o eliminar agentes infecciosos de sangre y productos sanguíneos. Aunque los denominados colorantes desinfectantes se conocen desde hace mucho tiempo, no se ha difundido su uso excepto para reducción de parásitos en algunos países tropicales. Se conoce que algunos colorantes combinados con tratamientos con luz actínica pueden dar lugar a inactivación de varios virus diferentes. Sin embargo, el requisito de exposición a la luz ha limitado la aceptación de tales métodos porque los tratamientos con luz son complejos y porque tales tratamientos pueden dar lugar a daño colateral significativo.

WO 00/03751 describe un método para desinfectar una muestra de sangre usando luz visible en lugar de luz ultravioleta en que los colorantes con propiedades “desinfectantes”, por ejemplo una mezcla de azul de metileno y violeta de cristal, se quitan posteriormente filtrando la muestra a través de un filtro de polivinil acetal.

Por WO 95/32732 se conoce que el ascorbato añadido secuencialmente o simultáneamente con azul de metileno a plasma en sangre tiene un efecto beneficioso y estabilizante en el plasma en sangre tratado.

R. Docampo y colaboradores (Molecular and Biochemical Parasitology, 27 (1988) 241-247) muestran que el ascorbato mejora la actividad del tratamiento de sangre con violeta de cristal contra *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas.

**Resumen de la invención**

Se ha hallado que el tratamiento de sangre y fracciones de sangre con una mezcla de azul de metileno y violeta de cristal (“Colorante doble”) elimina varias bacterias, virus y parásitos sin dañar apreciablemente las células o proteínas de la sangre. Se observó una reducción de 4 log en *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens*. El método de “colorante doble” produce una reducción de 9 log del virus de la estomatitis vesicular, una reducción de 6 log del virus de la encefalomiocarditis, una reducción de 4,5 log del virus de la diarrea bovina y una reducción de 5 log del parvovirus porcino. Se logró la muerte completa de estos virus añadiendo suficiente ascorbato para convertir en gran parte los dos colorantes a su forma leuco. Aunque otros antioxidantes son efectivos, el ácido ascórbico parece el más eficaz para inducir la transferencia de electrones, reduciendo los colorantes a una forma leuco. Finalmente, se usa un método de filtración PVA para quitar los colorantes antes del uso de la sangre desinfectada o componente de sangre. Así, el método de colorante doble-ascorbato-PVA es una forma efectiva de bajo costo de eliminar patógenos de sangre entera, plaquetas, plasma u otras fracciones de sangre sin incurrir en riesgos inherentes al uso de luz ultravioleta.

**Descripción detallada de la invención**

La descripción siguiente se ofrece con el fin de permitir que los expertos en la técnica lleven a cabo y utilicen la invención, y expone los mejores modos contemplados por el inventor de poner en práctica su invención. Sin embargo, varias modificaciones serán fácilmente evidentes a los expertos en la técnica, dado que los principios generales de la presente invención se han definido aquí específicamente para proporcionar un método basado en colorante y mejorado para desinfectar sangre y productos sanguíneos.

**55 Tratamiento con colorante**

La solución a tratar se pone a aproximadamente 0,01% en peso de colorante doble (azul de metileno más violeta de cristal) añadiendo una solución de material conteniendo iguales porcentajes en peso de los dos colorantes. Por ejemplo, se puede usar convenientemente una solución de material de colorante doble de 1% en peso de cada colorante. Además, se añade un agente reductor. Los mejores resultados se obtienen añadiendo suficiente agente reductor en forma de ácido ascórbico (vitamina C) o sus derivados próximos para hacer que la solución colorante diluida se decolore. Generalmente, es suficiente un porcentaje en peso de ascorbato añadido igual a los pesos combinados del colorante añadido. En algunos casos, la muestra de sangre puede ser especialmente pobre en agentes reductores naturales (como indica un color azul obvio después de la adición de colorante y ascorbato) de modo que se debe añadir ascorbato adicional para reducir el color.

## ES 2 328 575 T3

### *Extracción del colorante*

Aunque los colorantes se consideran seguros, se considera prudente quitarlos antes de administrar a un paciente la sangre o fracción de sangre tratadas. Esto se puede llevar a cabo con varios filtros y materiales de unión. En la presente invención, la extracción con polivinil acetal es un método preferido, aunque también son utilizables los otros métodos de extracción bien conocidos en la técnica. A efectos de prueba se añadieron 2,5 ml de solución de “colorante doble” a 1% (violeta de cristal/azul de metileno, pesos iguales) a 250 ml de sangre entera (concentración de colorante final 0,01% en peso de cada colorante). Para este experimento el colorante no se decoloró con ascorbato. Se centrifugó una muestra de la sangre para agrupar las células sanguíneas, y la absorbancia (“densidad óptica” o DO) del plasma supernadante se determinó a 600 nm y 660 nm.

La sangre se filtró posteriormente a través de una columna de filtro esponja de polivinil acetal (PVA) (seis almohadillas de 1,0 cm de grosor) con el fin de quitar los colorantes, ambos unidos fuertemente al material de PVA. Se centrifugó una segunda alícuota de la sangre, y la absorbancia del plasma supernadante filtrado se midió a 600 nm y 660 nm como un control de supresión. Los resultados muestran la extracción esencialmente total de los colorantes.

Los resultados de la absorbancia se enumeran a continuación en la tabla 1:

TABLA 1

Pre	DO
600 nm	0,65
660 nm	0,82
Post	
600 nm	0,01
660 nm	0,01

### *Efecto del colorante doble en células sanguíneas*

Es imperativo que cualquier tratamiento dirigido a desinfectar sangre no dañe las delicadas células sanguíneas. En un experimento típico se añadieron 2,5 ml de solución de “colorante doble” a 1% (violeta de cristal/azul de metileno) a 250 ml de sangre entera (concentración de colorante final 0,01%). Se añadió suficiente agente reductor (ascorbato) para decolorar el colorante (aproximadamente 0,015% de ascorbato por peso). Se apartó una alícuota de 10,0 ml de sangre no tratada como el control normal.

La sangre se filtró a través de una columna filtro de PVA (seis almohadillas de 1,0 cm de grosor), flujo por gravedad. En muestras de control y sangre tratada de 10,0 ml se examinó visualmente la presencia de hemoglobina en el plasma supernadante y los cambios en volumen de células empaquetadas (ambos signos de daño celular). Se preparó un frotis de sangre y en las células se examinaron microscópicamente los cambios morfológicos.

La capacidad de unión de anexina V (%) del RBCs se determinó por análisis FACS como una medida de la alteración de la membrana. La anexina V se une a fosfatidil serina, que se encuentra predominantemente en la superficie interior de la membrana de los glóbulos rojos. Así, la unión incrementada es un signo de daño de la membrana puesto que la superficie interior no deberá ser accesible. El FACS y otros resultados se muestran a continuación.

#### Hemoglobina

Control	Neg
Tratado	Neg

#### Volumen de células empaquetadas

Control	4,9 ml
Tratado	4,9 ml

## ES 2 328 575 T3

### Aspecto microscópico

Control	Normal
Tratado	Normal

5

### Unión de anexina V (%) (por FACS)

Control	6,25%
Tratado	6,31%

10

### 15 *Efectos en plaquetas*

Se añadió 1,0 ml de solución de “colorante doble” a 1% (violeta de cristal/azul de metileno) a 100 ml de plasma rico en plaquetas (PRP) (concentración de colorante final 0,01%). Se apartaron 100 ml de PRP no tratado como el control normal. Las muestras PRP se incubaron durante nueve días a 21°C con mezcla constante.

20

Los días 0, 3, 6 y 9 se filtraron 50 ml del PRP tratado a través de una columna filtro de PVA (dos almohadillas de 1,0 cm de grosor), flujo por gravedad. Se mezcló 0,1 ml del PRP tratado con 1,0 ml de fibrinógeno, 0,1 ml de complejo de protrombina y 0,01 ml 0,025 M CaCl<sub>2</sub>. Esto se repitió con EL PRP de control. La formación de coágulos indica actividad normal de tromboplastina en plaquetas.

25

### Tiempo de formación de coágulos (día 0)

Control	62 s
Tratado	63 s

30

### Tiempo de formación de coágulos (día 3)

Control	60 s
Tratado	63 s

35

### Tiempo de formación de coágulos (día 6)

Control	94 s
Tratado	99 s

40

### Tiempo de formación de coágulos (día 9)

Control	134 s
Tratado	142 s

45

Estos resultados indican que el tratamiento no daña de forma significativa las plaquetas en comparación con las células no tratadas. Así, el método de “doble colorante” es un método seguro y fácil de llevar a cabo para inactivar patógenos en suspensiones de RBC y plaquetas.

55

### *Parásitos*

60

La enfermedad de Chagas es endémica de América del Sur y Central y es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Aproximadamente 100 millones de personas viven en condiciones que las ponen en riesgo de contraer la enfermedad. El tratamiento tradicional es con azul de metileno y luz ultravioleta. La luz ultravioleta es absorbida por las moléculas de colorante y la energía impartida daña/mata el parásito; sin embargo, esta misma energía eleva los riesgos de daño de las proteínas de la sangre y puede incluso suponer un riesgo de carcinogénesis. Los tratamientos inadecuados de la enfermedad de Chagas subrayan la necesidad de un suministro de sangre libre de contaminación por patógenos y costeable por parte de los países en vías de desarrollo. La presente invención incluye el descubrimiento de que la combinación de colorantes azul de metileno y violeta de cristal permite destruir el *T. Cruzi* en sangre entera

65

## ES 2 328 575 T3

o plasma sin la necesidad de luz ultravioleta. Se añadieron 5 ml de una solución de colorantes azul de metileno/violeta de cristal a 1,0 por ciento (1% en peso de cada colorante) a 500 ml de sangre entera (concentración de colorante final de 0,01%) e incubaron en presencia de ácido ascórbico (vitamina C) suficiente en gran parte para decolorar la solución colorante (considerada en la ausencia de sangre). La sangre se pasó posteriormente a través de una esponja filtro de polivinil acetal (PVA), que quitó todo el colorante visible. No hubo lesión de eritrocitos, medida por examen morfológico y medición FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) de unión de anexina V. Las plaquetas también se trataron con "colorante doble" y pasaron a través del filtro PVA. No se observó pérdida de función de las plaquetas. No se halló evidencia de *T. Cruzi* en muestras tratadas con los colorantes azul de metileno/violeta de cristal.

### *Inactivación tripanosómica*

Se obtuvieron aproximadamente 500 ml de sangre entera fresca (anticoagulante CPD-A1). La sangre se recuperó con 1,0 ml de suspensión de *Trypanosoma cruzi* ( $1 \times 10^8$  org/ml). La concentración final de *T. Cruzi* en la sangre era  $2 \times 10^5$  org/ml.

La sangre recuperada se mezcló durante 15 minutos a 21°C. Se dispensaron 250 ml de la sangre recuperada a otra bolsa de sangre fresca conteniendo 2,5 ml (50 mg) de la solución de "Colorante doble" (violeta de cristal/azul de metileno). No se trataron otros 250 ml de sangre, y se usaron como el control positivo de *Trypanosoma cruzi*. Ambas bolsas se incubaron a 5°C durante 48 horas. A las 48 horas, ambas muestras se filtraron a través de una columna de seis filtros de PVA de 1,0 cm de grosor para quitar la mezcla colorante.

Las muestras se diluyeron en serie e inocularon a caldo de cultivo BHI, e incubaron durante 28 días. Los cultivos se examinaron microscópicamente los días 7, 14, 21 y 28 en busca de evidencia de parásitos vivos como se expone en la tabla 2.

TABLA 2

Sin colorante	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Inóculo (org/ml)				
	neg	neg	neg	neg
$1 \times 10^1$				
$1 \times 10^2$	neg	neg	neg	pos
$1 \times 10^3$	neg	neg	pos	pos
$1 \times 10^4$	neg	pos	pos	pos
$1 \times 10^5$	pos	pos	pos	pos
0,2 mg/g CV/MB	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Inóculo (org/ml)				
$1 \times 10^1$	neg	neg	neg	neg
$1 \times 10^2$	neg	neg	neg	neg
$1 \times 10^3$	neg	neg	neg	neg
$1 \times 10^4$	neg	neg	neg	neg
$1 \times 10^5$	neg	neg	neg	neg

Estos resultados muestran que el colorante doble es completamente efectivo para eliminar el parásito. En estos resultados no se muestra el efecto del ascorbato. Esencialmente, el ascorbato era poco efectivo en la destrucción del parásito. Sin embargo, en la práctica real sería deseable la eliminación de virus (véase más adelante) así como parásitos de modo que la adición de ascorbato sería preferible.

## ES 2 328 575 T3

### *Efecto bactericida*

Se recuperaron dieciséis muestras de 10,0 ml de sangre entera con las bacterias siguientes (concentración final  $1 \times 10^4$  org/ml): *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens*. Las muestras se dividieron en dos conjuntos. Se añadió 0,1 ml de solución de "Colorante doble" a cada tubo de un conjunto, el otro conjunto se dejó sin tratar. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 21°C, con mezcla constante, bajo luz fluorescente normal. La sangre se filtró a través de una columna filtro de PVA (seis almohadillas de 1,0 cm de grosor), flujo por gravedad, para quitar los colorantes. Se esparcieron 14  $\mu$ l de cada muestra en agar tripticasa-soja. Las placas se incubaron durante la noche a 35°C. Los recuentos de colonias se efectuaron en cada placa y se exponen en la tabla 3.

TABLA 3

	Recuento de colonias	Control	Tratado	Red log.
15	Staph epi	102	0	4
20	Staph aureus	98	0	4
	Bacillus subtilis	104	0	4
	E. Coli	250	5	4
25	Y. Enterocolitica	92	0	4
	Pseudo aeruginosa	101	2	4

### 30 *Efecto virucida*

Se recogieron doce muestras de 10 ml de sangre entera con los virus siguientes: Virus de la estomatitis vesicular (VSV), Virus de la encefalomiocarditis (EMCV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), parvovirus porcino (PPV). Se prepararon tres tubos de cada uno.

35 Las muestras se dividieron en tres conjuntos. Se añadió 0,1 ml de solución de "Colorante doble" a cada tubo del primer conjunto, se añadió 0,1 ml de solución de "Colorante doble" y se añadieron 10 mg de ascorbato de sodio a cada tubo del segundo conjunto, y el tercer conjunto se dejó sin tratar.

40 Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 21°C, con mezcla constante bajo luz fluorescente normal. La sangre se filtró a través de una columna filtro de PVA (seis almohadillas de 1,0 cm de grosor), flujo por gravedad.

Los títulos virales se determinaron usando la variación Reed Muench del ensayo final viral y se exponen en la tabla 4.

TABLA 4

	Títulos virales	Control	Colorante	Colorante/Asc
50	VSV	9	0	0
	EMCV	6	0	0
55	BVDV	4,5	4,5	0
	PPV	5,1	5,1	0

60 Como se puede ver por estos resultados, la mezcla de colorante doble era efectiva sólo contra algunos virus. La adición de ascorbato mejoró esta efectividad y dio lugar a una matanza total de los virus no susceptibles al colorante doble solo.

65 El doble tratamiento con colorante con ascorbato es una forma efectiva de eliminar un rango grande de patógenos potencialmente infecciosos, incluyendo parásitos, virus y bacterias, del suministro de sangre. El tratamiento es barato y requiere poco equipo especializado o conocimientos especiales.

## ES 2 328 575 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para desinfectar sangre y fracciones de sangre sin usar tratamiento con luz ultravioleta incluyendo los pasos de:
- poner la sangre o fracción de sangre en contacto con una mezcla de colorantes violeta de cristal y azul de metileno y un agente reductor para formar una mezcla de sangre-colorante;
- 10 mezclar e incubar la mezcla de sangre-colorante; y
- sacar dichos colorantes de la sangre o fracción de sangre.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el azul de metileno y violeta de cristal están presentes en porcentajes en peso esencialmente iguales.
3. El método de la reivindicación 2, donde los porcentajes en peso son aproximadamente 0,01%.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, donde se añade suficiente agente reductor para convertir la mezcla en una forma leuco.
5. El método de la reivindicación 4, donde el porcentaje en peso de agente reductor añadido es al menos igual a los pesos combinados de los colorantes añadidos.
- 25 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el agente reductor es ascorbato.
7. El método de la reivindicación 1, donde el paso de extracción incluye pasar la mezcla de sangre-colorante a través de un filtro.
- 30 8. El método de las reivindicaciones 1 o 7, donde el filtro incluye polivinil acetal y donde dichos colorantes se unen al polivinil acetal.

35

40

45

50

55

60

65