

10



378451

378451

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>A 61</u> <u>A 61</u>
SUBCLASE <u>J</u> <u>K</u>

PATENTE DE INVENCION

Que por veinte años se solicita a favor de BAXTER LABORATORIES INC., de nacionalidad estadounidense, domiciliada en Morton Grove/Illinois ( Estados Unidos ), y que ha de recaer sobre:

" METODO PARA PROLONGAR LA VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS QUE HAN SIDO SEPARADOS DE LA SANGRE PARA FACILITAR SU TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO ".

5

Memoria Descriptiva

El registro de la Patente de Invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un método para prolongar la viabilidad de los linfocitos que han sido separados de la sangre para facilitar su transporte y almacenamiento, conforme se describe a continuación.

10

378451



La presente invención se refiere a un método para separar leucocitos de la sangre completa sin aglutinación de eritrocitos y para prolongar la viabilidad de los linfocitos separados.

5 El fraccionamiento de la sangre y la preservación de los componentes separados para usos terapéuticos y otros usos medicinales, constituye una práctica establecida, particularmente desde la época de Cohn y sus asociados en la Escuela Médica de la Universidad de Harvard. Se ha hallado que los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, permanecen viables durante períodos de tiempo más  
10 largos si los mismos se separan del plasma y unos de otros, y que las proteínas del plasma aislado son muy estables cuando se tratan separadamente.

De todos los componentes de la sangre, los leucocitos son los más activos metabólicamente. Su actividad metabólica es tan  
15 grande que no sobreviven normalmente más que unas pocas horas después de haber sido retirados del cuerpo. Además, los leucocitos se dañan fácilmente mediante excesivo trauma mecánico o manipulaciones de laboratorio. Consecuentemente, la separación y preservación de los leucocitos ha presentado un problema difícil a  
20 través de los años.

La mayoría de los métodos para aislar los leucocitos de los eritrocitos y plaquetas, utilizan las diferencias de densidad de éstos elementos celulares o formados de la sangre. Otros métodos envuelven purificación de los leucocitos mediante destrucción  
25 de los otros elementos formados. Varios procedimientos, recientemente desarrollados, emplean los principios de sedimentación y de centrifugación. En los últimos procedimientos, algunos de los expansores de volumen de plasma, por ejemplo, dextran y polivinilpirrolidona, han demostrado ser excelentes agentes de sedimentación.  
30

378451

- 3 379



Una vez que los leucocitos han sido aislados de los otros elementos formados de la sangre, aquellos pueden ser tratados por uno u otro medio para mantener o prolongar su viabilidad si han de ser almacenados y aplicables a investigación médica u otros usos. Se han recomendado para este propósito varios medios de cultivo de tejido nutritivo. Otros medios de preservación de los leucocitos separados implican el uso de un medio que contenga gelatina, el cual, al enfriarse, forma un gel que conserva las células individuales separadas unas de otras.

El desarrollo y uso de los procedimientos precedentes y varios otros para la separación y preservación de los leucocitos, se describe más detalladamente por Tullis, en "Blood", vol.7 pag. 891-6 (1952) y vol. 8 pag. 563-75 (1953) que se citan aquí como referencia para los antecedentes de la invención.

Un método conveniente y adecuado para la separación y preservación de los leucocitos, sería de gran utilidad en varios campos de la investigación médica, medico-legal y antropológica. En particular, la prolongada viabilidad "in vitro" de linfocitos periféricos humanos encontraría frecuente empleo en la tipificación de tejidos para el transplante de órganos. De acuerdo con esto, es una finalidad de la presente invención proveer un método nuevo y perfeccionado para separar los leucocitos de la sangre completa y para prolongar la viabilidad de los linfocitos separados para su uso en procedimientos de tipificación de tejidos y otras actividades de investigación médica.

Se ha hallado, ahora, que el extracto líquido de las semillas de la hierba denominada Trigonella foenum graecum es capaz de separar los leucocitos de la sangre completa sin aglutinación de los eritrocitos y proporciona un medio básico útil para prolongar la viabilidad durante el almacenamiento de los linfocitos separados.

378451



La Trigonella foenum graecum, o alholva, es una hierba leguminosa del viejo mundo perteneciente a la familia Papilionacea, Grupo trifoliáceo, género Trigonella. Véase, por ejemplo, Hutchinson, "The Genera of Flowering Plants", volumen 1 pag. 456 (1964), publicado por Oxford University Press. Esta hierba ha sido hasta ahora empleada como alimento y como medicina.

Se ha sabido desde hace mucho tiempo que ciertas plantas poseen hemaglutininas para tipos específicos de sangre que las confiere empleo potencial como reactivos tipificadores de sangre. Se han investigado literalmente millares de plantas por todo el mundo en busca de sus propiedades hemaglutinantes. Las sustancias probadas han consistido, generalmente, en extractos acuosos o salinos de las semillas molidas de éstas plantas. Véase, por ejemplo Schertz y al., "Economic Botany" volumen 14, páginas 232-40 (1960) que describen la actividad hemaglutinante de ciertos extractos de semilla trifoliácea; Boyd, "J. Immunol." volumen 62, páginas 338-9 (1949) y Krüpe, "Biol. Zbl." volumen 72, páginas 424-31 (1953), que informan en particular que los extractos salinos de la Trigonella foenum graecum están desprovistos de actividad hemaglutinante para las células sanguíneas humanas. Sin embargo, no era conocido hasta ahora que los extractos de semillas de estas últimas especies de plantas podían ser usados como un agente separador de leucocitos y como un medio básico útil para prolongar la viabilidad durante almacenamiento de los linfocitos separados, tal como aquí se describe.

De acuerdo con la presente invención, las semillas secas de alholva son reducidas en forma de partículas tal como, por ejemplo, por fricción mecánica por conminución, molturación o pulverización. Las partículas de semilla de alholva se someten, entonces, a extracción con un líquido acuoso o un disolvente or-

378451



gánico, tal como una cetona baja, por ejemplo, acetona y metiletil  
cetona, o un alcohol alifático bajo, por ejemplo, metanol, etanol  
e isopropanol. Salina fisiológica normal es el líquido de extrac-  
ción preferido, ya que la mayoría de las reacciones serológicas  
5 se llevan a cabo en este medio. Extractos crudos o concentrados  
más purificados, obtenidos de los extractos líquidos, tales como  
métodos mediante sal adicional y fraccionamiento disolvente, pue-  
den ser usados.

La solubilización del principio activo procedente de las  
10 semillas de alholva en el líquido acuoso o disolvente orgánico,  
se facilita mediante tratamiento a bajas temperaturas, tales como  
entre 0° y, aproximadamente, 10° C durante la extracción.

La extracción se conduce durante por lo menos alrededor  
de una hora y preferentemente durante alrededor de 24 horas o  
15 más. El extracto líquido conteniendo el principio activo puede  
separarse del residuo por centrifugación, filtración o métodos  
análogos de separación.

Se obtienen extractos adecuados mediante conminutación  
de semillas secas de alholva en partículas de pequeño tamaño, por  
20 ejemplo de aproximadamente 1 a alrededor de 100 micrones, tales  
como las obtenidas con un mezclador Waring o un molinillo eléc-  
trico de café y equipos análogos, extrayéndose con de 2 a unas  
20 partes al peso de salina normal (0,9 % NaCl) y ajustando el  
pH del extracto resultante a unos 6,5-7,2.

El extracto líquido, aquí definido, de las semillas de  
25 alholva proporciona un medio básico adecuado para el almacenamien-  
to de linfocitos que hayan sido separados de la sangre. Bajo con-  
diciones de almacenamiento convencional in vitro, tales como en  
solo un medio de tejido nutritivo, 95 % de los linfocitos sobre-  
viven normalmente durante un período de solamente unas 24 a 48  
30 horas. Cuando están mezclados con el extracto líquido de esta in-

378451



vención, juntamente con un medio de tejido adecuado, se ha hallado que los linfocitos separados permanecen viables y sin cambio, durante hasta 14 días a la temperatura ambiente ( unos 25°C ).

5 Como agente separador para los leucocitos, el extracto líquido, aquí definido, de semillas de alholva, se agrega a sangre completa defibrinada y se mezcla concienzudamente. Se ha hallado que los eritrocitos sedimentan, mediante este procedimiento, sin aglutinación y que se retiene un concentrado rico en linfocitos juntamente con el extracto de semilla en la parte rica en leu-  
10 cocitos que sobrenada.

En un procedimiento preferido de separación de esta invención, se vierte sangre completa en una botella vacía estéril y se defibrina mediante agitación ligera o arremolinamiento con esferas pequeñas de cristal, y otro material inerte en partículas  
15 hasta que se forma un coágulo de fibrina. Se agrega y mezcla concienzudamente una cantidad adecuada del extracto líquido de semillas de alholva, por ejemplo, de entre 0,1 a unas 2 partes en volumen de extracto por una parte en volumen de sangre completa defibrinada. Los eritrocitos se dejan sedimentar y se retira la par-  
20 te de plasma rica en leucocitos que sobrenada, mediante un equipo aspirador de plasma que contenga un filtro apropiado para retirar granulocitos. Subsecuentemente, los linfocitos que permanecen en el medio básico de alholva se recogen en una botella estéril vacía que contenga un medio de cultivo de tejido nutritivo adecuado.

25 Usando el procedimiento precedente se ha hallado que, alrededor del 40 % en volumen del extracto líquido de las semillas de alholva, agregado a la sangre completa defibrinada, produce una sedimentación rápida de los eritrocitos dentro de un período de tiempo de unos 15 a unos 45 minutos. La materia resultante  
30 que sobrenada contiene, aproximadamente, 50 % a 85 % de linfoci-

378451



tos, indicando así que el principio activo en el extracto líquido sedimenta tanto granulocitos como eritrocitos. Usando un filtro adecuado, se retiran de la parte rica en leucocitos que sobrenada, entre 95 % a 98 % de los granulocitos restantes.

5           Para retirar los granulocitos restantes de los linfocitos, se usa un filtro adecuado tal como, por ejemplo, lana de vidrio siliconizada, esferas de vidrio, fibras de algodón o fibras de plástico sintético, por ejemplo, fibras de "Orlon", "Dracon" "Teflon" y "Nylon". Preferentemente, se usa una fibra poliamida  
10 "Nylon" frotada o restregada con detergente. Este fregado elimina el acabado existente en los tipos de "NYLON" obtenibles en el comercio. El uso de tal filtro de "Nylon" fregado para separar los linfocitos de los granulocitos, se ha descrito en detalle por Greenwalt et al., en "Transfusion", volumen 2, página 221-9  
15 (1962), que se cita aquí como referencia.

Pueden emplearse varios medios de cultivo de tejido nutritivo adecuados en la práctica de esta invención, conjuntamente con el medio básico del extracto líquido de semillas de alholva para la preservación de los linfocitos separados.

20           Son ejemplos de medios de cultivo de tejidos nutritivos adecuados las soluciones equilibradas de Hanks, "Proc. Soc'y. Exper. Biol. Med.," volumen 71, páginas 196-200 (1949) y de Earle, "J.Nat. Cancer Inst." volumen 4, páginas 165-212 (1943); los medios básicos de Eagle, "Science" volumen 122, páginas 501-504 y  
25 "J.Biol.Chem." volumen 214, páginas 839-52 (1955); los medios sintéticos de Puck, "J.Exptl. Med." volumen 108, páginas 945-55 (1958) y volumen 109, páginas 649-60 (1959) y las soluciones vitamínicas de Eagle "J.Biol.Chem.", volumen 226, páginas 191-206 (1957), todos los cuales se citan aquí como referencial

30           Los medios de cultivo de tejido nutritivo usados aquí,

378451



5 contienen preferentemente una mezcla de soluciones de sal equilibra-  
brada, sales tampón, ácidos amino esenciales y nucleótidos u  
otras sustancias proteínáceas, vitaminas o coenzimas y azúcares  
monosacáridos. Suero sanguíneo o una fracción protéica del mismo  
puede también ser usado en el medio de cultivo de tejido nutriti-  
vo. Ciertas enzimas, por ejemplo, desoxiribonucleasa son útiles  
en el medio para la prevención de la formación de coágulos de leu-  
cocitos. Pequeñas cantidades de antibióticos, por ejemplo, Peni-  
cilina, Estreptomycina, Micostatina y sustancias análogas pueden  
10 ser agregadas al medio por sus efectos preservativos. Una pequeña  
cantidad de rojo fenol u otro indicador de pH puede, también,  
agregarse para que sirva como comprobación visible respecto al  
pH.

15 Otros ejemplos de medios de cultivo de tejido nutritivo  
adecuados que contienen mezclas de una variedad de componentes,  
han sido descritos en la patente estadounidense Nº 3.122.476  
ejemplo I, apartados A y B, en la patente estadounidense  
Nº 3.128.228, en las columnas 4 a 6 y en la patente estadouniden-  
se Nº 3.039.923, en la columna 2, capítulo titulado " Culture  
20 Medium", todas las cuales se citan aquí como referencia.

En la práctica de la invención que estamos describiendo,  
pueden emplearse varios tipos de equipo para manipulación de la  
sangre. El equipo comprendera, de un modo general, un recipiente  
de defibrinación, por ejemplo, una botella de 50 ml vacía, esté-  
ril, conteniendo esferas de vidrio, un recipiente de transferen-  
25 cia que puede ser una botella de 125 ml., vacía, estéril conte-  
niendo un medio de cultivo de tejido nutritivo adecuado, un jue-  
go para la aspiración de plasma y un juego colector de sangre.

Un ejemplo de juego para aspirar plasmas que puede ser  
30 usado en la práctica de la presente invención se describe en la

378451



patente estadounidense N° 2.934.069; ejemplos ilustrativos de juegos colectores de sangre que pueden ser usados en la práctica de esta invención se describen en las patentes estadounidenses Nos. 2.702.034, 3.004.536, 3.127.892, 3.187.750, Re. 25.129 y  
5 Re. 25.171.

Se comprenderá que la invención no se limita al uso de cualquier equipo o aparato particular, sobreentendiéndose que el precedente equipo para la manipulación de la sangre se ha descrito solamente a fines ilustrativos.

10 Los siguientes ejemplos ilustrarán más detalladamente la invención, si bien ésta no se limita a estos ejemplos específicos. Todas las partes y porcentajes citadas en ellos se entienden al peso si no se ha especificado de otra manera.

EJEMPLO 1

15 Semillas señas de Trigonella foenum graecum se molturan dos veces con un molinillo de café a un punto muy fino y se ponen en suspensión en una salina normal (0,9 %; 50-55 gramos por litro). Esta mezcla se refrigera a 5°C bajo constante agitación durante 24 horas. La mezcla se centrifuga, entonces, a alta velo-  
20 cidad durante 30 minutos y lo que sobrenada se decanta. Lo que sobrenada se diluye en un volumen igual de salina normal. Lo que sobrenada, tanto concentrado como diluido, puede ser usado para la separación de los leucocitos de la sangre completa sin aglutinación de los eritrocitos y puede ser empleado como medios básicos que prolongan la viabilidad de los linfocitos, durante alma-  
25 cenamiento.

EJEMPLO 2

Un gramo de semillas secas de alholva se moltura finamente en un molinillo eléctrico de café y se somete a extracción a  
30 la temperatura ambiente durante dos horas con 10 ml de salina

378451



fisiológica conteniendo 0,1 % de azida sódica. Después de refrigeración durante la noche, el extracto resultante se centrifuga y se filtra a través de lana de vidrio. La centrifugación y el filtrado se repiten hasta que lo que sobrenada esté claro. La sustancia que sobrenada, ya clara, es adecuada para la separación de leucocitos de la sangre completa y como un medio básico para el almacenamiento prolongado de linfocitos en condición viable y sin cambios.

EJEMPLO 3

10 Usando un juego colector de sangre esterilizado, se extraen directamente 25 ml de sangre venosa, los cuales se ponen en una botella de 50 ml vacía, estéril y que es, inmediatamente, desfibrinada mediante agitación suave con pequeñas esferas ( 5 mm de diámetro) de vidrio dentro de la botella durante aproximadamente 5 a 10 minutos. Con una jeringa estéril se agregan a la botella y se mezclan concienzudamente 25 ml del sobrenadante diluido, producto del ejemplo 1. Se dejan sedimentar, entonces, los eritrocitos dejando la botella quieta durante 30 a 40 minutos. La sustancia que sobrenada rica en leucocitos se retira mediante un juego de aspiración de plasma conteniendo un filtro de "Nylon" fregado. La aguja aspiradora del juego de aspiración se inserta a través del tapón en la botella de sangre desfibrinada y la aguja de tapón se inserta a través del tapón de una botella de transferencia de 125 ml estéril, vacía, conteniendo 25 ml de un medio de tejido nutritivo situado abajo. Una grapa de rodillos, tal como la descrita en la patente estadounidense No. 3.099.429, se abre entonces y se comienza la aspiración del plasma. El flujo se regula a, aproximadamente, una gota cada 4 a 5 segundos. Según la sustancia sobrenadada pasa a través del filtro, las fibras de "Nylon" fregadas eliminan sustancialmente todos los granulocitos restantes.

15

20

25

30

378451



Seguidamente, los linfocitos que permanecen en el medio básico de alholva se recogen en la botella de transferencia que contiene el medio de tejido nutritivo. Los linfocitos almacenados permanecen viables y sin cambios, en este medio, después de 14 días a

5 temperatura ambiente (alrededor de 25°C). Los mismos pueden ser enviados fácilmente por correo. En estudios de tipificación de tejidos en que se emplean éstos linfocitos almacenados después de un período de 14 días, se obtiene un 100 % de correlación por resultados de tests linfocitotóxicos previamente obtenidos. Estas

10 células almacenadas son también útiles para la cariotipificación en análisis de cromosoma, selección de trasplante de órganos y estudios de citogénica.

Se obtienen resultados de separación y de preservación sustancialmente similares cuando el concentrado de sustancia sobrenada, producto del ejemplo 1, se sustituye por la sustancia

15 sobrenadada diluida del ejemplo 1, llevando a cabo el procedimiento del ejemplo 2.

Composición del medio de tejido nutritivo mezclado con la sustancia sobrenadada filtrada del ejemplo 3:

20	<u>A-Sales</u>	<u>Moles/Litro</u>
	NaCl	1,53 X 10 <sup>-1</sup>
	KCl	5.36 X 10 <sup>-3</sup>
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.10 X 10 <sup>-5</sup>
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.70 X 10 <sup>-4</sup>
25	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.70 X 10 <sup>-5</sup>
	NaHCO <sub>3</sub>	1.23 X 10 <sup>-2</sup>
	Dextrosa	2.22 X 10 <sup>-2</sup>
	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	7.30 X 10 <sup>-5</sup>
	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	4.3 X 10 <sup>-6</sup>

378451



	<u>B-Aminoácidos</u>	<u>Moles/Litro</u>
	dl-Álfa alanina	$4.30 \times 10^{-4}$
	l-arginina	$6.00 \times 10^{-4}$
	Asparraguina	$1.10 \times 10^{-4}$
5	l-ácido aspártico	$3.40 \times 10^{-4}$
	l-cistina·HCl	$1.30 \times 10^{-4}$
	l-ácido glutámico	$7.50 \times 10^{-3}$
	l-glutamina	$2.05 \times 10^{-3}$
	Glicina	$1.00 \times 10^{-3}$
10	l-histidina	$1.90 \times 10^{-4}$
	Hidroxi-prolina	$1.10 \times 10^{-4}$
	l-isoleucina	$2.20 \times 10^{-4}$
	l-leucina	$6.60 \times 10^{-4}$
	l-lisina·HCl	$5.70 \times 10^{-4}$
15	l-metionina	$1.60 \times 10^{-4}$
	l-fenilalanina	$2.30 \times 10^{-4}$
	l-prolina	$2.50 \times 10^{-4}$
	l-serina	$4.80 \times 10^{-4}$
	l-treonina	$3.80 \times 10^{-4}$
20	l-triptófano	$7.30 \times 10^{-4}$
	l-tirosina	$3.30 \times 10^{-4}$
	l-valina	$3.30 \times 10^{-4}$
	<u>C-Vitaminas:</u>	
	Acido ascórbico	$2.80 \times 10^{-4}$
25	α-tocoferol fosfato	$4.60 \times 10^{-7}$
	Biotina	$8.10 \times 10^{-7}$
	Calciferol	$5.00 \times 10^{-7}$
	Pantotenato cálcico	$2.10 \times 10^{-6}$
	Cloruro de colina	$8.30 \times 10^{-5}$

378451

10



	<u>C-Vitaminas: (continuación)</u>	<u>Moles/Litro</u>
	Acido folínico	2.11 X 10 <sup>-6</sup>
	Meso-inositol	4.70 X 10 <sup>-5</sup>
	Menadiona	1.10 X 10 <sup>-6</sup>
5	Nicotinamida	4.10 X 10 <sup>-6</sup>
	Acido nicotínico	4.00 X 10 <sup>-6</sup>
	Piridoxal hidrocioruro	2.40 X 10 <sup>-6</sup>
	Piridoxina hidrocioruro	2.40 X 10 <sup>-6</sup>
	Acido p-aminobenzóico	7.20 X 10 <sup>-6</sup>
10	Riboflavina	5.30 X 10 <sup>-7</sup>
	Acido dl-tioctico	9,70 X 10 <sup>-6</sup>
	Tiamina hidrocioruro	5.90 X 10 <sup>-7</sup>
	Vitamina A	6.10 X 10 <sup>-6</sup>
	<u>D-Nucleotidos y otras sustancias</u>	
15	Adenina hidrocioruro	5.50 X 10 <sup>-5</sup>
	Acido adenilico	5.40 X 10 <sup>-6</sup>
	d-ribosa	9.30 X 10 <sup>-5</sup>
	Glutation	3.30 X 10 <sup>-6</sup>
	Guanina hidrocioruro	3.30 X 10 <sup>-5</sup>
20	Hipoxantina	3.70 X 10 <sup>-5</sup>
	Timidina	2.10 X 10 <sup>-5</sup>
	Uracilo	4.50 X 10 <sup>-5</sup>
	Xantina	3.2 X 10 <sup>-5</sup>
	Sodio adenosinatrifosfato	5.4 X 10 <sup>-5</sup>
25	Sodio piruvato	1.00 X 10 <sup>-3</sup>
	Heparina	1000 unidades/litro*
	Fitoheماغلوتينina P**	0.25 ml./litro*
	Penicilina potásica G	100,000 unidades/litro*
	Dihidroestreptomocina sulfato	150,000 µg./litro*



378451



CUARTA.- Método según la reivindicación tercera, caracterizado en que dicho filtrado comprende el pasaje de la sustancia rica en leucocitos, que sobrenada, a través de un filtro de fibra sintética de poliamida "Nylon".

5

QUINTA.- " METODO PARA PROLONGAR LA VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS QUE HAN SIDO SEPARADOS DE LA SANGRE PARA FACILITAR SU TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO ".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de quince hojas foliadas y mecanografiadas, por una sola de sus caras.

10

Madrid, 10 de Abril de 1.970

P.A. de BAXTER LABORATORIES INC.

Victor Gil Vega