

408177



Int. Cl.: A61K

Nº 408.177

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION

RESIDENCIA: 1740 Ridge Avenue, EVASTON, ILLINOIS

U.S.A.

ENUNCIADO: UN METODO DE MANUFACTURA DE UN MEDIO

PRESERVATIVO DE LA SANGRE MEJORADO.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 194.652 del 1.11.71.

MGS.-

408177

- 2 -



1                    Algunas unidades de recolección y preservación de  
sangre, normales, son especificadas en la farmacopea de  
los Estados Unidos (U.S.P.). Los recipientes, que pueden  
5 ser de vidrio o de plástico, y las unidades de infusión  
para llenar los recipientes, son especificadas respecti-  
vamente en la farmacopea estadounidense XVII, páginas 887  
y 923. Los recipientes para dosis individuales son de vi-  
10 drio I o tipo II, transparentes, incoloros, o de un mate-  
rial plástico adecuado, que cumpla con los requisitos de  
la farmacopea estadounidense. El volumen interno de los re-  
cipientes usualmente es suficiente para recoger medio li-  
tro (500 ml) de sangre para mezclarse con una solución an-  
ticoagulante contenida allí, de 70 a 125 ml. Por tanto,  
15 los recipientes tienen un volumen interno de mas de 500 ml  
proporcionándose el volumen adicional para la solución an-  
ticoagulante.

                  La farmacopea estadounidense contiene tambien dos  
soluciones anticoagulantes aprobadas. Estas son la solución  
de dextrosa y citrato anticoagulante (AC) y la solución de  
20 dextrosa fosfato y citrato anticoagulante (CPD), descritas  
respectivamente en la farmacopea estadounidense XVIII en  
las páginas 47 y 48-49. La ACD es una solución estéril de  
ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa en agua inyec-  
table. El ácido cítrico y el citrato de sodio proveen io-  
25 nes citrato para evitar la coagulación de la sangre, y la  
dextrosa sirve como fuente principal de energía para los  
glóbulos rojos. En las formulaciones aprobadas de ACD, la  
cantidad de dextrosa provista es 1,84 gramos por cada 500  
ml. de sangre entera. La dextrosa en la fórmula está basa-  
30 da en el monohidrato de dextrosa, pero la dextrosa puede

408177 - 3 -



1978

1 añadirse en forma anhidra, usando 1,68 gramos de dextrosa anhidra por cada 500 ml de sangre.

5 La solución anticoagulante CPD es una solución estéril de ácido cítrico, citrato de sodio, difosfato de sodio y dextrosa, en agua para inyección. El ácido cítrico y el citrato de sodio proveen iones citrato para evitar la coagulación. La dextrosa es monohidrato y se incorpora en una cantidad que corresponda a 1,79 gramos por 500 ml de sangre, o 1,63 gramos, si se añade como dextrosa anhidra.

10 Como se especifica en la farmacopea estadounidense la ACD preparada como "solución A" se usa en la cantidad de 75 ml por 500 ml de sangre completa, mientras que cuando se prepara como "solución B" se usa 125 ml por cada 500 ml de sangre. La CPD, como se especifica, se usa en la cantidad de 70 ml por cada 500 ml de sangre completa.

15 Al utilizar soluciones de azúcar anticoagulantes, acuosas (ya sea ACD o CPD), para mezclarse con sangre recientemente recogidas, es práctica común almacenar las mezclas de sangre-anticoagulante bajo refrigeración, pero sin congelación (o sea, almacenamiento a 1-6°C). Aunque los glóbulos rojos permanecen viables bajo esas condiciones de almacenamiento hasta por 21 días, sobreviviendo 70% o más de los glóbulos rojos a la administración en 24 horas, es bien reconocido que la calidad de la sangre se deteriora progresivamente. La administración de sangre fresca a pacientes es más conveniente, o la administración de sangre no almacenada durante más de una semana. Durante las segunda y tercera semanas de almacenamiento, se prefiere administrar la sangre en cantidades limitadas. Al final de los 21 días, es práctica corriente en los Bancos de



408177

1

Sangre de los Estados Unidos desechar la sangre o procesar la para obtener proteínas del plasma.

5

La sangre congelada, almacenada a temperaturas muy bajas (menos de  $-85^{\circ}\text{C}$ ), no sufre deterioración importante durante periodos de almacenamiento relativamente prolongados de hasta varios años. Sin embargo, debido al costo incrementado en la congelación y almacenamiento de la sangre en condición congelada, el uso de sangre congelada no ha sido una práctica comercial para el almacenamiento de la sangre. Más bien se ha investigado en busca de aditivos químicos para incorporarse a la solución anticoagulante, que sean capaces de mejorar la calidad de la sangre y prolongar el tiempo permisible de almacenamiento.

10

15

20

25

30

Se sabe que los glóbulos rojos contienen 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) y que este compuesto es un regulador importante de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina. Cuando el nivel de 2,3-DPG de los glóbulos rojos es demasiado bajo, la hemoglobina tenderá a retener el oxígeno, lo que interfiere con la liberación del oxígeno a los tejidos del cuerpo. Por tanto, es desafortunado que bajo el almacenamiento normal en un banco de sangre, el nivel de 2,3-DPG de los glóbulos rojos se deteriore rápidamente. Al administrar la sangre, el contenido de 2,3-DPG de los glóbulos rojos se restaura gradualmente a niveles normales pero pueden necesitarse 24 horas o más. Entre tanto, la sangre administrada puede ser inefectiva para el transporte de oxígeno y en realidad puede disminuir la eficiencia del transporte de oxígeno de todo el sistema circulatorio, dependiendo de la cantidad y edad de la sangre administrada. Los aditivos para las unidades de almacenamiento de san



408177

1

gre, capaces de aumentar, o por lo menos retardar la caída del 2,3-DPG en los glóbulos rojos, por tanto, ha sido objeto de investigación activa.

5

10

15

20

Un problema interrelacionado es el de mantener los niveles de ATP (trifosfato de adenosina) en la sangre almacenada la disminución en la calidad de la sangre almacenada habiéndose encontrado que se debe a la deterioración del contenido de ATP de los glóbulos rojos, así como a su contenido de 2,3-DPG. Se sabe que la adición de adenina ayuda a mantener los niveles de ATP en la sangre almacenada pero, desafortunadamente, la adición de adenina puede contribuir a la deterioración en los niveles de 2,3-DPG. Este efecto se ha encontrado que se desvía en cierto grado añadiendo también inosina, compuesto que parece tener también cierto valor al rejuvenecer la sangre con niveles subnormales de 2,3-DPG. También se ha descubierto que el piruvato mejora los niveles de ATP a un pH alcalino, o en combinación con la inosina mantiene o aumenta los niveles de DPG. También se ha mostrado que el pH alcalino (7 a 9) favorece los niveles incrementados de DPG.

25

30

De acuerdo con la presente invención, se incorpora dihidroxiacetona (DHA) a la solución anticoagulante, principalmente, con el propósito de aumentar y/o mantener el contenido de 2,3-DPG de la sangre recientemente recogida. La presencia de cantidades milimolares de DHA en la sangre almacenada, evita la deterioración rápida del contenido de 2,3-DPG, y tiende a mantener los glóbulos rojos a niveles casi normales de 2,3-DPG durante periodos mucho mayores, bajo condiciones de almacenamiento en refrigerador. La dihidroxiacetona es no tóxica y segura en su administración,



408177

1 en las cantidades requeridas para este propósito. Es proba-  
ble que la dihidroxiacetona entre en los glóbulos rojos, en  
donde es convertida en un metabolito normal o en una serie  
de metabolitos, incluyendo fosfato de dihidroxiacetona, -  
5 3 fosfato de D-gliceraldehído, 1,3-difosfoglicerato, 2,3-DPG  
o 3-fosfoglicerato.

Se cree que la invención es adaptable para usarse -  
con todas las formulaciones anticoagulantes actualmente co-  
nocidas, incluyendo las formulaciones experimentales, así -  
10 como a las que han sido aprobadas especialmente para uso ge-  
neral. Adicionalmente, la invención se extiende a las com-  
binaciones de agentes mantenedores o restauradores de cali-  
dad. Específicamente, la dihidroxiacetona puede ser usada en  
combinación con adenina o piruvato o inosina o ácido L-ascór-  
15 bico o L-ascorbatos o sus combinaciones. Las combinaciones  
deseables de aditivos incluyen dihidroxiacetona con adenina  
y piruvato o dihidroxiacetona con inosina y piruvato o dihi-  
droxiacetona con adenina, inosina y piruvato. Con estas com-  
binaciones, puede mejorarse la calidad de la sangre con res-  
20 pecto tanto a los niveles de ATP como de 2,3-DPG, durante -  
uno a veintiún días de almacenamiento, o puede aumentarse -  
el tiempo de almacenamiento en una a tres semanas, dando tien-  
po totales de almacenamiento de hasta 28 a 42 días a 1-6°C.

DESCRIPCION DETALLADA

25 Al poner en práctica la presente invención, se pre-  
fieren los tipos aprobados de recipientes para la recolec-  
ción y preservación de sangre. Se puede utilizar recipien-  
tes de vidrio o de plástico, con tal de que llenen los re-  
quisitos de la farmacopea estadounidense (véase la farma-  
30 copea americana XVIII, páginas 887 y 923). Los recipientes

4681777-



1

tendrán tamaños adecuados para recibir y almacenar un volumen predeterminado de sangre, tal como 1000 ml, 500 ml, etc. Típicamente, los recipientes tendrán un volumen interno adaptado para recibir 500 ml (medio litro) de sangre junto con 70 a 125 ml de solución anticoagulante. En otras palabras, los recipientes pueden tener un volumen interno de aproximadamente 570 a 625 ml. Los recipientes estarán equipados también con dispositivos para introducir la sangre fresca, a medida que se recoge, y para administrar la sangre en transfusión. Dichas unidades de transfusión e infusión usadas con las unidades de recolección y almacenamiento de sangre, deben cumplir los requisitos de la farmacopea estadounidense (véase la farmacopea estadounidense XVIII, página 887).

5

10

15

20

Como en la práctica establecida, la solución anticoagulante dentro de los recipientes contendrá una sustancia anticoagulante para evitar la coagulación de la sangre, y una fuente de energía derivada de azúcar para los glóbulos rojos. El anticoagulante preferido es "iones citrato" que puede ser suministrado por citrato de sodio o mezclas de ácido cítrico y citrato de sodio. Las cantidades que se van a emplear pueden ser iguales que en la práctica actual (véase la farmacopea americana XVIII, páginas 47-49).

25

30

La fuente de energía derivada de azúcar para los glóbulos rojos, de preferencia es dextrosa. Sin embargo, se sabe que otros azúcares son equivalentes a la dextrosa para este propósito, incluyendo la fructosa, la magnosa y la galactosa. La cantidad de dextrosa o de azúcar equivalente empleada, puede ser igual que en la práctica actual

408177



1 (véase la farmacopea estadounidense XVIII, páginas 47-48).  
Más específicamente, se puede utilizar alrededor de 1,7  
a 1,9 gramos de dextrosa basado en el monohidrato de dex-  
5 trosa, por 500 ml de sangre. Sin embargo, la dihidroxiace-  
tona, si se emplea a concentración suficiente, puede ser  
utilizada como fuente suplementaria o aún alternativa de  
energía para los glóbulos rojos. Las unidades mejoradas de  
la presente invención, por lo tanto, incluyen modalidades  
en las que se reduce el contenido de dextrosa o de azúcar  
10 equivalente, sustancialmente por debajo de los niveles es-  
tablecidos, como se explicará más completamente después.

En la práctica de la presente invención, la unidad  
de recolección y preservación de sangre debe contener por  
lo menos 5, y de preferencia por lo menos 10 milimoles de  
15 dihidroxiacetona por litro de sangre. Consecuentemente,  
cuando la unidad se destina recoger 500 ml de sangre, se  
incorporará por lo menos 2,5 y de preferencia 5 milimoles  
de dihidroxiacetona, en la solución anticoagulante acuosa.  
Aunque parece no haber ningún límite crítico superior so-  
20 bre el contenido de dihidroxiacetona, parece no haber ra-  
zón para pasar de 100 milimoles de dihidroxiacetona por  
litro de sangre. Cuando el recipiente se destina para re-  
coger 500 ml de sangre, por tanto, no será necesario incor-  
porar más de 50 milimoles de dihidroxiacetona a la solución  
25 anticoagulante. Cuando se está utilizando la dihidroxiace-  
tona para el mantenimiento del 2,3-DPG, y se provee una  
fuente de energía derivada de azúcar, como en la presente  
práctica, usualmente no será necesario emplear más de 30  
milimoles de dihidroxiacetona por litro de sangre, o 15  
30 milimoles por 500 ml de sangre.



408177

1 Sin embargo, como se explicó previamente, el conte-  
 nido de dextrosa o azúcar equivalente en la solución anti-  
 coagulante, puede reducirse. Por ejemplo, cuando la canti-  
 dad de azúcar se restringe a una cantidad equivalente a me-  
 5 nos de 2,0 gramos de monohidrato de dextrosa por litro de san-  
 gre, es conveniente incorporar de 20 a 100 milimoles de di-  
 hidroxiacetona por litro de sangre. En una modalidad prefe-  
 rida, la unidad de recolección y preservación de sangre es-  
 tá destinada a recibir y almacenar sustancialmente 0,5 li-  
 10 tros de sangre fresca. Por tanto, contendrá de 10 a 50 mili-  
 moles de dihidroxiacetona y menos dextrosa (o azúcar equiva-  
 lente) que la cantidad correspondiente a 1,0 gramos de mono-  
 hidrato de dextrosa. La fuente de energía derivada de azú-  
 car puede eliminarse por completo.

15 Como se indicó previamente, puede utilizarse la di-  
 hidroxiacetona en combinación con inosina, piruvato y adeni-  
 na o ácido L-ascórbico o L-ascorbatos, con cada uno de es-  
 tos ingredientes separadamente, o en combinaciones de aditi-  
 vos múltiples, tales como dihidroxiacetona con inosina y pi-  
 20 ruvato o dihidroxiacetona con adenina y piruvato. Las canti-  
 dades de estas sustancias que pueden ser utilizadas, se re-  
 sumen a continuación en la tabla A.

TABLA A

Gamas de aditivos

25	Sustancia	g/l de solución anticoagulan- te (75 ml/0,5 litro de sangre)	Milimoles/l. de sangre
	Dihidroxiacetona	3,45 - 69	5 - 100
	Inosina	10,3 - 61-8	5 - 30
	Piruvato de sodio	0,09 - 18,0	0,1 - 20
30	Adenina	0,11 - 1,10	0,1 - 1,0

En la Tabla precedente, se hace referencia al pi--



408177



1978

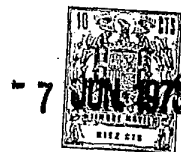
1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Loos y H.K. Prins, "Application of a mechanized method for the determination of different glycolytic intermediates in the routine quality control of red cells" en "Red Cell Metabolism and Function", edición G.J. Brewer, Plenum Press N. York, 1970 páginas 277 a 288. Este método utiliza el efecto catalítico de la DPG sobre la conversión enzimática de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. Añadiendo otras encimas se convierte el 2-fosfoglicerato a lactato, con oxidación concomitante de nicotamida-adenina-dinucléotido (forma reducida (NADH)). Este último compuesto fluoresce de modo que la velocidad de la reacción puede ser seguida por un fluorómetro. La muestra de sangre se diluye a 1:12,000 con amoníaco 0,001 molar, antes del análisis. Se utilizó un autoanalizador Technicon para efectuar automáticamente los análisis.

Se entenderá que el interior de las unidades de recolección y preservación de la sangre, incluyendo las soluciones anticoagulantes, debe ser estéril. Puede usarse esterilización por calor, como en la práctica actual, las unidades preparadas con las soluciones anticoagulantes en ellas siendo sometidas a tratamiento en autoclave. La dihidroxiacetona es estable a la esterilización por calor a pH 4, pero puede ocurrir cierta degradación a pH 5 o más. Cualquier pérdida de dihidroxiacetona en la esterilización por calor, puede ser compensada. Alternativamente, se puede utilizar otros métodos de esterilización, tales como filtración estéril.

Las unidades de recolección y preservación de sangre mejoradas, que quedan dentro del alcance de esta invención, son ilustradas adicionalmente por los siguientes ejemplos específicos.

438177



1

EJEMPLO I

5

10

Se disuelven las siguientes sustancias químicas en 800 ml de agua para inyección, U.S.P., y se añade agua para formar un litro de solución: ácido cítrico (anhidro) 7,3 gr. dihidrato de citrato sodio 22,0 gramos, monohidrato de dextrosa 24,5 gramos; dihidroxiacetona 12,0 gramos. Se filtra la solución a través de un filtro de poros de un tamaño de 0,8 micras. Se coloca la solución en una bolsa o frasco para sangre, en una relación de 75 ml de solución por 500 ml de sangre que se va a recoger. Se esteriliza tratando en autoclave a 115,5°C durante 20 minutos.

EJEMPLO II

15

20

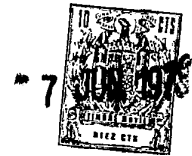
Se disuelve los siguientes productos químicos en 800 ml de agua para inyección U.S.P. y se añade agua para formar un litro de solución: ácido cítrico (anhidro) 3,0 gr. dihidrato de citrato de sodio 26,3 gramos; monohidrato de bisfosfato de sodio 2,22 gr. monohidrato de dextrosa 25,5 gramos; dihidroxiacetona, 12,9 gramos. Se filtra la solución a través de un filtro con un tamaño de poros de 0,8 micras. Se coloca la solución en una bolsa o frasco para sangre, en una cantidad de 70 ml de solución por cada 500 ml de sangre que se va a recoger. Se esteriliza - tratando en autoclave a 115,5°C durante 20 minutos.

EJEMPLO III

25

30

Se disuelven las siguientes sustancias químicas en 800 ml de agua para inyección U.S.P. y se añade agua para formar un litro de solución: dihidrato de citrato de sodio 31,0 gramos; monohidrato de bifosfato de sodio 0,041 gr. etahidrato de fosfato de sodio dibásico 0,344 gr. monohidrato de dextrosa 25,5 gr. dihidroxiacetona 12,9 gr. Se es



1           teriliza filtrando a través de un filtro con un tamaño de  
poros de 0,22 micras. Usando una técnica aséptica, se colo  
ca la solución en una bolsa o botella para sangre estéril  
en una proporción de 70 ml. de solución para 500 ml de san  
5           gre que se va a recoger.

EJEMPLO IV.

Se sigue los procedimientos de los ejemplos I, II  
y/o III, añadiendo adenina en la cantidad de 51,8 miligra  
mos a la solución acuosa.

EJEMPLO V

10           Se sigue el procedimiento de los ejemplos I, II,  
III y/o IV, añadiendo inosina en la cantidad de 20,6 gra  
mos, a la solución acuosa.

EJEMPLO VI

15           Se sigue el procedimiento de los ejemplos I, II,  
III, IV y/o V, añadiendo piruvato de sodio en la cantidad  
de 9,0 gramos a la solución acuosa.

EJEMPLO VII

20           Se sigue el procedimiento de los ejemplos I, II  
III, IV y/o V, omitiendo la dextrosa y añadiendo 22,1 gra  
mos adicionales de dihidroxiacetona a la solución.

EJEMPLO VIII

25           En los ejemplos III, IV, V, VI y VII, siempre que  
se especifica filtración estéril, se disuelve todas las  
sustancias químicas excepto la dextrosa y la dihidroxiace  
tona en 700 ml de agua y se lleva a un volumen final de  
800 ml (Solución A). Se disuelve la dextrosa y la dihidro  
xiacetona en 200 ml de agua, volumen final (solución B),  
puesto que la dihidroxiacetona puede dar una reacción de  
30           ennegrecimiento similar a la dextrosa. Se filtran las dos

408177

- 14 -



1 soluciones a través de un filtro con un tamaño de poros de  
0,8 micras, y se las coloca en bolsas o frascos separados  
para sangre. Las bolsas o frascos pueden ser conectados me  
5 diante tubos plásticos de calidad farmacéutica, y engrapa-  
dos ó sujetos de otra manera para facilitar su mezclado a  
séptico despues del tratamiento en autoclave. Se las este-  
riliza tratándolas en autoclave a 115,5 grados centígrados  
durante 20 minutos. Se mezclan asépticamente las dos solu-  
10 ciones antes de extraer la sangre. Se mezclan 60 mililitros  
de la solución A y 15 mililitros de la solución B para 500  
ml de sangre.

EJEMPLO IX

Se sigue el procedimiento de los ejemplos I, II,  
15 III, IV, V, VI, VII y/o VIII, pero se omite el ácido cítri-  
co y el citrato de sodio. Se añaden 2115 unidades U.S.P.  
de heparina.

EJEMPLO X

Utilizando niveles similares de adición y procedi-  
20 mientos similares a los descritos antes, puede emplearse  
dihidroxiacetona en otras formulaciones anticoagulantes ci-  
tadas en la literatura. Estas incluyen las siguientes:

1.- ACD (o CPD) - Adenina

Usando ACD o CDP con adenina se puede prolongar el  
25 tiempo de almacenamiento a 35-42 dias, con base en la so-  
brevivencia de eritrocitos in vivo, pero los niveles de  
DPG son disminuidos ligeramente en comparación con la ACD  
(CPD). El nivel usual de adenina que se va a añadir es 0,5  
milimol por litro de sangre. ref. C.B.Shields "Comparison  
30 Studies of Whole Blood Stored in ACD and CPD and with  
Adenine", Transfusión, vol. 3, páginas 1-8, 1969.



100177

1

2.- ACD (o CDP), pH 6 a 8 con o sin adenina.

Usando un pH de almacenamiento superior a 6, o preferentemente superior a 7 (pH alcalino 7-9) se favorece el mantenimiento de DPG. El nivel de ATP cae durante la primera semana o las dos primeras semanas de almacenamiento. Rf. B. Beutler, A. Meul y L.A. Wood, "The Depletion and Regeneration de 2,3-Diphosphoglyceric acid in stored red blood Cells", transfusion, Vol. 3, página 109, 1969. Tambien se puede añadir adenina como se describió antes,

5

10

3.- ACD (o CPD), adenina-piruvato pH 7-7,5

La adición de piruvato ayuda a evitar la caída de ATP. El nivel usual de piruvato es 0,1 milimol por litro de sangre. Mantiene el DPG durante 3 semanas. Ref. E. Beutler, "The Effect of storage conditions on 2,3-DPG Levels", trabajo presentado en la vigésima tercera reunión anual de American Association of Blood Banks, San Francisco, Octubre 29, de 1.970.

15

20

4.- Bicarbonato-fosfato-dextrosa-adenina, alcalino pH (7-9).

Se puede mantener la DPG 5 o seis semanas, reemplazando el plasma por, "un medio artificial" que tenga los siguientes constituyentes en milimoles por litro de medio: bicarbonato de sodio 130; fosfato 10; dextrosa 55; adenina 1. Ref. L. Wood y E. Beutler, "Storage of erythrocytes in artificial media", transfusión, volumen 11, páginas 123, 133 1971.

25

30

5.- ACD (CPD) - Adenina - Inosina.-

La inosina mantiene niveles de DPG durante alrededor de cuatro semanas. La concentración usual de inosina es de 10 a 15 milimoles por litro de sangre. Referencia:

408177

-16 -



1

H.P. Sunn, M.H. May, W.F. Kocholaty, y C.E. Shields, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 48, páginas 311 a 321, 1969. Alternativamente, tambien se puede añadir inosina a un nivel inferior a la sangre, después de 2 a 3 semanas de almacenamiento. Se puede añadir adenina al comienzo del almacenamiento.

5

6.- ACD (o CPD) - adenina - inosina - piruvato

10

La inosina y el piruvato, juntos, cooperan para mantener los niveles de DPG durante alrededor de 5 semanas. Las concentraciones de inosina y piruvato son de 10 a 20 milimoles por litro de cada uno. Los experimentos de regeneración, en los que se incuba sangre vieja a 37°C muestran el efecto sinérgico del piruvato-inosina como se describe por F.A. Oski, S.P. Travis, H.D. Miller, M. Delivovispopadopoulos y E. Cannon en Blood, Volume n 37, páginas 52.58 1.971.

15

20

En términos generales, el método de esta invención, puede ser utilizado para afectar favorablemente el contenido de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) de los glóbulos rojos viables, mediante el simple procedimiento de poner en contacto los glóbulos rojos con una solución acuosa de dihidroxiacetona (DHA). La solución acuosa, que puede ser plasma o una mezcla de plasma con una solución anticoagulante, debe contener por lo menos 1,5 milimoles de dihidroxiacetona por litro de solución. Sobre la base de sangre completa que contiene aproximadamente un tercio de glóbulos rojos en volumen, el contenido de dihidroxiacetona será por lo menos alrededor de 1 milimol por litro de sangre.

25

30

Aunque no es crítico el límite superior del contenido de dihidroxiacetona, no hay necesidad de poner en con-

408177

- 17 -



1978

1 tacto los glóbulos rojos con grandes excesos de dihidroxia  
cetona. Por ejemplo, parece que se pueden obtener los efec  
5 tos máximos favorables de la dihidroxiacetona a concentra  
ciones en el intervalo de 7,5 a 150 milimoles por litro  
de solución. Sobre la base de los presentes datos, se pre  
fiere poner en contacto los glóbulos rojos con una solución  
acuosa que contiene alrededor de 7,5 a 75 milimoles de di-  
10 hidroxiacetona por litro de solución. Cuando se añade la  
dihidroxiacetona a sangre completa se añade preferentemen-  
te de 10 a 100 milimoles de dihidroxiacetona por litro de  
sangre. La evidencia disponible indica que el efecto ópti-  
mo para el mantenimiento o la restauración de los niveles  
de 2,3-DPG usualmente puede obtenerse dentro de esta esca-  
15 la. Cuando se está usando la dihidroxiacetona, como sus-  
tituto parcial o completo para el azúcar, son convenientes  
niveles de 20 a 100 milimoles de DHA/litro de sangre.

20 Cuando se desea aumentar el contenido de 2,3-DPG  
en los glóbulos rojos, ya sea elevarlo por encima del ni-  
vel normal o restaurarlo desde un nivel inferior a un ni-  
vel superior, los glóbulos rojos deben ser mantenidos en  
contacto con la solución de DHA durante un tiempo suficien  
te para aumentar su contenido de 2,3-DPG, al menos en 1,0  
micromoles por gramo de hemoglobina, sobre su contenido  
25 inicial de 2,3-DPG. El procedimiento adecuado para formar  
esta determinación se describe en Loos y Prins "Applica-  
tion of a Mechanized Method for the Determination of -  
Different Glycolytic Intermediates in the Routine Quali-  
ty Control of Red Cells", en Red Cell Metabolism and -  
Function, edición Brewer, Plenum Press, 1970, páginas 277  
30 a 288. Para la restauración del contenido de 2,3-DPG de

403177A



1 los glóbulos rojos que tienen sus niveles deprimidos, tal  
como un nivel inferior a 10 micromoles por gramo de hemo-  
globina, la cantidad de DHA empleada y el tiempo de reten-  
ción de preferencia son tales que se aumente el nivel de  
5 2,3-DPG de los glóbulos rojos por lo menos en 10 por cien-  
to sobre su valor inicial. Cuando el nivel de 2,3-DPG es  
deprimido adicionalmente, tal como a un nivel inferior a  
5 micromoles por gramo de hemoglobina, puede usarse la  
DHA para aumentar el contenido de 2,3-DPG de los glóbulos  
10 hasta en 100 a 500% o más del valor inicial.

Para obtener estos resultados, como se indicó an-  
tes, se prefiere incorporar por lo menos cinco, o de prefe-  
rencia por lo menos 10 milimoles de DHA a la sangre com-  
pleta que contiene los glóbulos rojos viables, con un ni-  
vel subnormal de 2,3-DPG. Usualmente la restauración máxi-  
15 ma de la 2,3-DPG puede obtenerse dentro de la escala de  
10 a 100 milimoles de DHA/litro de sangre.

En una aplicación de importancia comercial particu-  
lar, se añade la DHA a la sangre fresca inmediatamente  
20 después de la recolección de sangre fresca. Al poner en  
práctica esta modalidad del método, se puede emplear las  
soluciones anticoagulantes y los sistemas de recolección y  
de preservación descritas anteriormente. Simultáneamente  
con la extracción de la sangre e inmediatamente después  
25 de su introducción en el recipiente de recolección y pre-  
servación, se mezcla con ella de 5 a 50 milimoles de DHA  
por litro de sangre. La DHA debe estar disuelta en una so-  
lución estéril, tal como agua estéril, o una solución an-  
ticoagulante, acuosa que contenga dextrosa u otros ingre-  
30 dientes. La mezcla de la sangre en DHA se almacena enton-



1 ces a una temperatura inferior a 10°C de preferencia una  
temperatura dentro del intervalo de 1 a 6°C. Puede conti-  
nuar el almacenamiento como en la práctica actual durante  
5 21 dias. Al final de ese tiempo, la sangre contendrá sus-  
tancialmente más 2,3-DPG que la sangre almacenada bajo las  
mismas condiciones sin que los glóbulos rojos se hayan pue-  
to en contacto con DHA. El método permite tambien que se  
almacene sangre durante más de 21 dias, siendo tan buena  
o de mejor calidad con respecto al contenido de 2,3-DPG  
10 que la sangre almacenada mediante los métodos normales de la  
técnica anterior, tales como el uso de soluciones anticoa-  
gulantes de citrato-dextrosa, o soluciones anticoagulantes  
de citrato-fosfato-dextrosa.

15 El siguiente ejemplo ilustra la forma en que el mé-  
todo puede ser usado para restaurar el contenido de 2,3-  
DPG en sangre que tiene sus niveles agotados por almacena-  
miento.

#### EJEMPLO XI

20 Se combinó sangre humana con una solución anticoa-  
gulante normal, citrato-dextrosa (ACD), farmacopea estadou-  
nidense XVIII, página 47, de acuerdo al procedimiento re-  
comendado. Se almacenó la sangre durante dos semanas bajo  
refrigeración a 4°C. Como se mostró por determinación del  
nivel de 2,3-DPG, la sangre almacenada se deterioró desde  
25 un nivel inicial de 11, 50 micromoles de 2,3-DPG por gra-  
mo de hemoglobina, a un nivel, después de dos semanas de  
almacenamiento, de 0,26 micromoles por gramo de hemoglobi-  
na. Se añadió entonces DHA para dar a la sangre una concen-  
tración final de 20 milimoles de DHA por litro. Se incubó  
30 entonces la sangre durante 3 horas a 37°C y se efectuaron

408177

- 20 -



1 mediciones de la mejora en los niveles de 2,3-DPG durante este periodo. Los datos resultantes se resumen a continuación en la tabla C:

TABLA C

5 Incubación (tiempo horas)	2,3-difosfoglicerato (% de valor inicial)
0	100
0,5	448
1,5	488
3,0	600

10 El mecanismo de acción de la dihidroxiacetona no se comprende totalmente. Sobre la base del conocimiento previo parece que no hay razón para suponer que este compuesto afectará favorablemente al nivel de 2,3-DPG en la sangre. Dentro de los glóbulos rojos, cabe esperar que la dihidroxiacetona se convirtiera, por interacción con la ATP, en fosfato de dihidroxiacetona, que es un intermediario metabólico normal en la trayectoria de Embden-Meyerhoff. Este intermediario, por tanto, se esperaría que produjera en el metabolismo de glucosa a ácido pirúvico o láctico, lo que

15 ocurre continuamente durante el almacenamiento en el refrigerador de la sangre, debido a la presencia de glucosa añadida como fuente principal de energía. Sin embargo, no obstante esto, ocurre la deterioración rápida de la 2,3-DPG bajo condición de almacenamiento.

25 Suponiendo que se convierte la dihidroxiacetona en los glóbulos a fosfato de dihidroxiacetona que es un intermediario metabólico normal, no parece producirse ninguna reacción inusitada o adicional. Un mecanismo o interacción hasta ahora no reconocido parece estar involucrado. De

30



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

acuerdo con la trayectoria de Embden-Mayerhoff, el fosfato de dihidroxiacetona se convertiría primero a 3-fosfato de D-gliceraldehido. Si es así, el siguiente intermediario metabólico inferior sería el 1,3-difosfoglicerato, que como en el metabolismo normal de la glucosa, puede ser convertido ya sea en 3-fosfoglicerato o en 2,3-DPG. Sobre la base del conocimiento actual, por tanto, no se puede explicar por qué el 1,3-difosfoglicerato adicional que resulta de añadir DHA, produzca relativamente más 2,3-DPG (mediante la derivación alternativa), en lugar de 3-fosfoglicerato.

El siguiente ejemplo ilustra como puede usarse la DHA para aumentar el contenido de 2,3-DPG en los glóbulos rojos, in vivo.

EJEMPLO XII

Se inyectó dihidroxiacetona, 25 mg/ml en cloruro de sodio 0,9%, a una dosis de 5 mg/kg. en una coneja blanca canadiense sana. Se extrajeron muestras de sangre (2 ml) en diversos momentos después de la inyección, y se analizaron para su contenido de 2,3-difosfoglicerato, como se describe en el texto, excepto que se empleó una dilución de 1:24,000, debido al nivel mayor de DPG en la sangre normal del conejo, en comparación con la sangre humana. Los datos se resumen en la tabla D.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

408177



1

TABLA D

Muestra de sangre tomada a:	2,3-difosfoglicerato (% del nivel previo a la inyección).
-----------------------------	---

5

1/2 hora antes de la inyección	100
1 hora después de la inyección	127
7 horas después de la inyección	124
24 horas después de la inyección	105

10

Por tanto, es evidente que la dihidroxiacetona puede ser administrada a seres humanos mediante infusión intravenosa en cantidades suficientes para aumentar apreciablemente el contenido de 2,3-DPG de los glóbulos rojos, con mejora resultante en el funcionamiento de los glóbulos.

EJEMPLO XIII

CPD-adenina-ascorbato-dihidroxiacetona

15

Los siguientes productos químicos se disuelven en 800 ml de agua para inyección según la farmacopea estadounidense y se agrega agua hasta un litro de solución: dihidrato de citrato sódico, 30,8 g; dextrosa (anhidra), 23,2 g; dihidroxiacetona, 14,7 g; adenina, 0,55 g; ácido L-ascórbico, 8,1 g y monohidrato de bifosfato sódico, 2,22 g. Se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 micras. Utilizando una técnica aséptica, se introducen 70 ml en bolsas de sangre estéril para la recogida de 500 ml de sangre. Las bolsas se embalan en botes metálicos bajo nitrógeno.

25

30

Alternativamente, para la esterilización térmica sin degradación del L-ascorbato ni la dihidroxiacetona, el preparado puede ser dividido en dos partes, que son estables al autoclave. Antes de extraer la sangre, se recombinan las dos partes. Esto se hace cómodamente manteniendo la

403177

-23 -



1

esterilidad utilizando dos bolsas de plástico conectadas por un tubo de plástico. Una de estas bolsas es un tubo piloto incorporado de 15 ml de capacidad. La otra es una bolsa de recogida de sangre de 500 ml. El procedimiento es:

5

Se prepara la solución para llenar la bolsa de sangre de 500 ml disolviendo los siguientes productos químicos en 800 ml de agua para inyección de la farmacopea estadounidense y agregando agua hasta un litro de solución: dihidrato de citrato sódico, 38,3 g; adenina, 0,68 g; ácido L-ascórbico, 11,1 g, monohidrato de bifosfato sódico, 2,76 g. Introducir 56,4 ml en una bolsa de sangre de 500 ml.

10

Preparar la solución para llenar el tubo piloto de 15 ml disolviendo los siguientes productos químicos en 800 ml de agua para inyección según la farmacopea estadounidense y añadiendo agua hasta un litro de solución: dextrosa (anhidra), 105,6 g y 66,9 g de dihidroxiacetona. El pH debe ser 3,8-4,2. Introducir 15,4 ml en el saco.

15

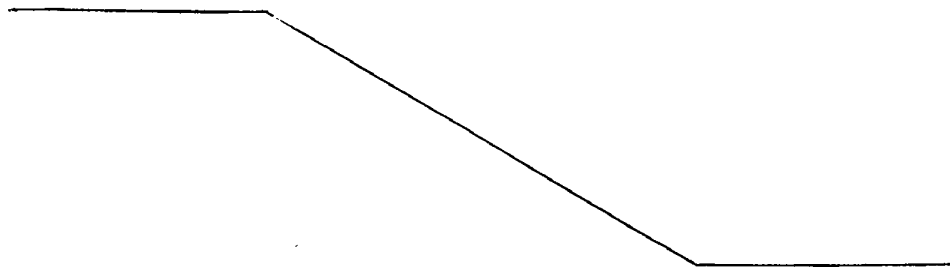
Tratar en autoclave la bolsa a 240°F (175°C) durante 20 minutos y después enfriar en agua. Introducir en botes metálicos bajo nitrógeno.

20

Los ensayos con composiciones preservativas como las que acabamos de describir (CPD-adenina-ascorbato-dihidroxiacetona) dieron los resultados indicados en las Tablas E y F.

25

30



408177



TABLA E

Niveles de 2,3-difosfoglicerato en 500 ml de sangre almacenada\* a 4°C durante 6 semanas en CPD-adenina con adición de L-ascorbato y dihidroxiacetona

1  
5  
10  
15

Semanas	2,3-Difosfoglicerato (% del inicial)	
	DHA más L-ascorbato	L-ascorbato solo
0	100	100
1	161	49
2	161	38
3	171	29
4	120	4
5	82	-
6	64	-

\* La sangre se mezcla una vez al día durante 6 días a la mañana durante el almacenamiento.

TABLA F

Efecto de la DHA y del ácido L-ascórbico sobre los niveles de 2,3-difosfoglicerato en sangre a 4°C\*

20  
25  
30

Semanas	2,3-DPG (% del inicial)		
	DHA	Acido L-ascórbico	DHA más ácido L-ascórbico
0	100	100	100
1	126	62	108
2	94	71	94
3	67	18	137
4	40	14	119
5	27	25	125
6	3	32	88

\* En las tres muestras de ensayo se utilizó sangre del mismo donador. Los niveles de aditivo fueron: DHA 20 mM y ácido L-ascórbico 5 mM. El anticoagulante fué CPD-adenina, pH 5,6.



1 Los preparados de ascorbato-DHA pueden ser utiliza-  
 dos con anticoagulantes como ACD, CPD, ACD-adenina, CPD-ade-  
 5 nina y similares. Las concentraciones de los otros ingre-  
 dientes son las indicadas anteriormente. (Véase la Tabla A  
 para los intervalos de concentración de la adenina). La Ta-  
 10 bla G dada a continuación compendia los intervalos preferi-  
 dos de DHA, ácido ascórbico y pH.

TABLA G

Intervalos de aditivos y pH en un preservativo de la sangre  
a base de Ascorbato-DHA

<u>Sustancia</u>	<u>g/l de solución</u> <u>anticoagulante<sup>¶</sup></u>	<u>Intervalo</u>	
		<u>pH</u>	<u>Milimoles por</u> <u>litro de sangre</u>
Dihidroxiacetona	3,68-73,5	-	5-100
Acido ascórbico	0,71-28	-	0,5-20
pH	-	5-7	-

<sup>¶</sup> Utilizada en una proporción de 70 ml de anticoagulante por 500 ml de sangre, dando un total de 570 ml de sangre anticoagulada.

20 Sobre la misma base que la Tabla G, pueden obtenerse preparados a pH 5,4-5,8, DHA 10-20 g/litro de solución anticoagulante (o 13,6 a 27 milimoles por litro de sangre). Estos preparados contienen también preferiblemente de 0,11 a 1,10 g de adenina por litro de solución anticoagulante (o 0,1 a 1,0 mM/litro de sangre), junto con dextrosa y citrato a los niveles indicados en la farmacopea estadounidense.

25 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

30

408177-26



REIVINDICACIONES

1

1. Un método de manufactura de un medio preserva-  
tivo de la sangre mejorado, que consiste en seleccionar  
un envase para recibir y almacenar un volumen determina-  
do de sangre, colocar dentro de dicho envase un volumen re-  
lativamente pequeño de una solución preservativa acuosa  
estéril e incorporar a dicha solución dihidroxiacetona  
(DHA) en una cantidad comprendida entre 5 y 100 milimoles  
(mM) de DHA por litro de dicho volumen predeterminado de  
sangre.

10

2. Un método según la Reivindicación 1, en el que  
se incorpora a dicha solución de 10 a 30 mM de DHA por li-  
tro de dicho volumen predeterminado de sangre.

15

3. Un método según las Reivindicaciones 1 o 2,  
en el que también se incorpora a dicha solución una canti-  
dad de adenina comprendida entre 0,1 y 1,0 mM por litro de  
dicho volumen predeterminado de sangre.

20

4. Un método según las Reivindicaciones 1 o 2,  
en el que también se incorpora a dicha solución una cantidad  
de inosina comprendida entre 5 y 30 mM por litro de dicho  
volumen predeterminado de sangre.

25

5. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 o 3,  
en el que también se incorpora a dicha solución una cantidad  
de ácido L-ascórbico comprendida entre 0,5 y 20 mM por litro  
de dicho volumen predeterminado de sangre.

30

6. Un método según las Reivindicaciones 1 o 2,  
en el que también se incorpora a dicha solución una canti-  
dad de piruvato comprendida entre 0,1 y 20 mM por litro de  
dicho volumen predeterminado de sangre.

7. Un método según las Reivindicaciones 1 o 2, en

408177

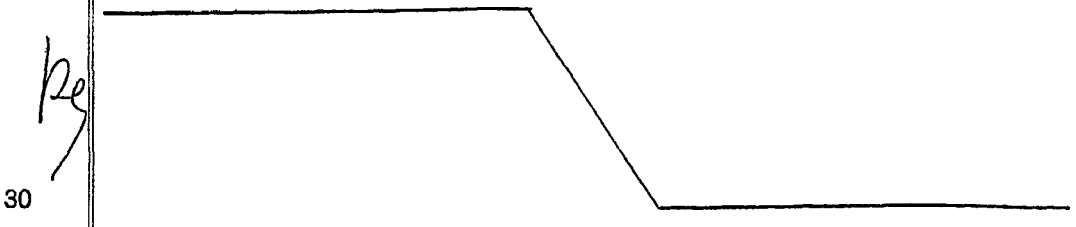


1 el que también se incorpora a dicha solución adenina y iones  
 5 piruvato, siendo incorporados respectivamente la adenina y  
 los iones piruvato citados en proporciones comprendidas en-  
 tre 0,1 y 1,0 mM de adenina y entre 0,1 y 20 mM de iones  
 5 piruvato por litro de dicho volumen predeterminado de sangre

8. Un método según las Reivindicaciones 1 o 2,  
 en el que también se incorpora a dicha solución inosina e  
 iones piruvato, siendo incorporados la inosina y los iones  
 10 piruvato citados, respectivamente, en proporciones compren-  
 didas entre 5 y 30 mM de inosina y entre 0,1 y 20 mM de iones  
 10 piruvato por litro de dicho volumen predeterminado de  
 sangre.

9. Un método según la Reivindicación 1, en el que  
 15 el envase seleccionado tiene el volumen necesario para re-  
 cibir y almacenar sustancialmente 0,5 litros de sangre fres-  
 ca además de la solución estéril que contiene, en el que la  
 solución proporcionada contiene dextrosa como fuente energé-  
 tica de los glóbulos rojos de la sangre y iones citrato para  
 20 evitar la coagulación de la misma y la dihidroxiacetona  
 (DHA) se incorpora a dicha solución en la proporción de  
 2,5 a 50 milimoles (mM).

10. Un método según la Reivindicación 5, en el que  
 la solución citada contiene dextrosa como fuente energética  
 25 de los glóbulos rojos de la sangre y iones citrato para evi-  
 tar la coagulación de la misma.



408177



1

11. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:  
UN METODO DE MANUFACTURA DE UN MEDIO PRESERVATIVO DE LA SANGRE MEJORADO.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintiocho páginas mecanografiadas.

Madrid, 31 octubre 1.972

BERNARDO UNGRIA

p.p.

10

15

20

25

30