

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

18 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
		21-3-78

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 27 13 742.4	29-3-77	Rep. Federal Alemana
P 27 44 019.3	30-9-77	" " "
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA LA AGLUTINACION DE LINFOCITOS"		
71 SOLICITANTE (ES)		
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 77/B 005 K)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Marburg/Lahn, República Federal Alemana.		
72 INVENTOR (ES)		
Prof. Dr. Wolfgang Ax, Dr. Hartwig Wilhelm Bauer y Sabine Schottler.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ (P.- 68.233)		

1 La invención se refiere a un procedimiento para  
la aglutinación de linfocitos de la sangre periférica en  
lo que se refiere a su importancia o significado diagnósti-  
co para la detección de enfermedades, que van acompañadas  
de una capacidad modificada de aglutinación de los linfoci-  
5 tos.

E.J. Field y E.A. Caspary comprobaron en 1970 en  
Lancet ii, página 1337, un comportamiento electroforético  
modificado de linfocitos de pacientes de cáncer después de  
la adición de factor encefalitógeno. Según D. Sabolovic y  
10 otros Br. J. Cancer, 1975, volumen 32, páginas 28 a 32, los  
linfocitos manifiestan una capacidad de aglutinación dife-  
rente después de adición de histona F2A1, según que se  
empleen linfocitos de pacientes con enfermedades malignas  
o de donantes sanos.

15 Tanto el factor encefalitógeno como también las  
fracciones de histona no son compuestos definidos inequí-  
vocamente. Sus propiedades están influidas por los proce-  
dimientos para su preparación.

20 En lo que se refiere a la importancia o signifi-  
cado de la detección de linfocitos modificados frente a la  
norma se establece por lo tanto la misión de poder reali-  
zar el procedimiento para la aglutinación de linfocitos  
con sustancias químicas definidas. La capacidad de aglu-  
25 tinación de los linfocitos de la sangre ha de ser un cri-

1 terio o indicación de la presencia de enfermedades malignas.

Por parte de Sabolovic y otros (1975) se intentó ya reemplazar histona por poli-L-arginina y por poli-L-lisina. La poli-L-lisina se manifestó como inadecuada, en  
5 las condiciones utilizadas por Sabolovic, para aglutinar linfocitos.

Según la invención se ha hallado ahora sorprendentemente que con poli-lisina o poli-ornitina no sólo puede conseguirse una aglutinación de linfocitos de la sangre periférica, sino que además de esto la aglutinación permite una afirmación diagnóstica digna de confianza sobre la  
10 presencia de enfermedades malignas.

Objeto de la invención es por consiguiente un procedimiento para la aglutinación de linfocitos, que se caracteriza porque una dispersión de  $10^5$  ml<sup>-1</sup> linfocitos en un medio acuoso fisiológicamente compatible se mezcla con por lo menos 0,01 mg/ml de polilisina o con por lo menos 0,1 µg/ml de poli-ornitina y la mezcla se mantiene por lo menos durante 20 minutos a 20 hasta 40°C, convenientemente  
15 en una atmósfera saturada con humedad.

Si durante un tiempo de incubación de 20 a 120 minutos aparece una aglutinación, ésta se valora como indicación diagnóstica de la presencia de enfermedades malignas.  
20

1 Si se emplea poli-lisina en el sentido de la inven-  
ción, se prefiere una con un peso molecular de 1.000 a —  
100.000, especialmente una poli-lisina con un peso molecu-  
lar de 1.000 a 4.000. Se emplea ventajosamente poli-L-lisi-  
5 na que es obtenible como sal, por ejemplo como bromhidrato  
o clorhidrato, en forma ampliamente estable. Si se emplea  
poli-ornitina, se prefiere poli-L-ornitina, especialmente  
poli-L-ornitina con un peso molecular comprendido entre  
40.000 y 60.000, preferentemente 53.000.

10 Los linfocitos se aíslan de la sangre periférica  
según procedimientos conocidos en sí. Dado que la suspen-  
sión de linfocitos que se ha de emplear ha de estar lo más  
libre posible de otros componentes particulares de la san-  
gre, se recomienda el aislamiento sobre un gradiente.

15 La sangre obtenida de la persona de ensayo se ha-  
ce incoagulable tal como usualmente, por ejemplo por me-  
dio de adición de una sustancia anticoagulante, tal como  
heparina. A partir de esta sangre se obtienen los linfo-  
citos según un procedimiento conocido. Por ejemplo, la -  
20 muestra de sangre se vierte sobre una columna llena con  
perlas de vidrio, sobre la que permanecen adheridas célu-  
las adherentes. A partir del eluato pueden obtenerse los  
linfocitos mediante centrifugación en gradiente. Sin embar-  
go, se puede renunciar también a la adsorción de las célu-  
25 las adherentes a perlas de vidrio y utilizarse inmediata-

1 mente la centrifugación en gradiente.

Otros procedimientos adecuados para la obtención de linfocitos están descritos por ejemplo en:

Johnson G.J. y P.S. Russel, Nature 208, página 343, (1965);  
A. Boyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 77, (1966); J.  
5 J. Oppenheimer, B.G. Leventhal, E.M. Hersh, Journal Immuno-  
log. 101, páginas 262 a 270, (1968); J.J. Twomey, O. Shar-  
key, Journal Immunolog. 108, páginas 984 a 990, (1972).

10 Todos los linfocitos obtenidos y purificados de esta manera pueden llevarse a la aglutinación con poli-I-lisina en las condiciones del procedimiento mencionado anteriormente.

15 En el laboratorio diagnóstico se recomienda la realización de la aglutinación de linfocitos en una llamada placa de ensayo. Esta constituye por lo general una placa fabricada a base de material sintético, que tiene una o varias filas de cavidades. Si en tales cavidades se mezclan suspensiones de linfocitos con poli-lisina, puede observarse la aglutinación por microscopio.

20 Debido a la mejor posibilidad de comprobación microscópica se recomienda el empleo de placas de ensayo de material sintético ópticamente irreprochable, por ejemplo poliestireno transparente, en el que el fondo de las cavidades está estructurado como placa lisa. Las placas están  
25 destinadas por lo general para un sólo uso. En un tamaño de

1 aproximadamente 60 x 80 mm tales placas de ensayo tienen aproximadamente 60 cavidades.

5 Suspensiones de linfocitos mezcladas con diferentes concentraciones de poli-lisina o poli-L-ornitina permiten una diferenciación en el diagnóstico mediante la iniciación más precoz o más tardía de la aglutinación. Si se mezclan  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^7$  linfocitos con 0,01 a 0,1, preferentemente con 0,05 mg/ml de una poli-lisina, preferentemente de una poli-L-lisina de peso molecular 1.000 a 4.000, por término medio de 3.400, y se mantiene durante 30 a 60 minutos a 30 hasta 40°C, durante el tiempo de observación solamente se aglutinan linfocitos de 10 pacientes con enfermedades malignas, tales como tumor bronquial, carcinoma de colon, carcinoma de recto, tumor de las glándulas tiroides, carcinoma de estómago, carcinoma 15 de mama, carcinoma de páncreas, linfoma maligno y de portadores de enfermedades malignas comparables. Lo mismo ocurre, si  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^7$  linfocitos se mezclan con 0,001 a 0,1, preferentemente con 0,01 mg/ml de una poli-ornitina, preferentemente de una poli-L-ornitina de peso 20 molecular 40.000 a 60.000, por término medio de 53.000, y se mantiene durante 30 a 60 minutos a 30 hasta 40°C.

25 Las aglutinaciones que están fuera de estos tiempos y condiciones indicados no se valoran como las que son debidas a enfermedades malignas. Es evidente

1 que no existe una seguridad de 100 % de la indicación diagnóstica. Tal como se conoce para cada procedimiento diagnóstico existen también en éste resultados erróneo-positivos o erróneo-negativos. Sin embargo, están por lo general en el margen de en cada caso 2 a 3 %.

5 El procedimiento de la aglutinación de linfocitos puede realizarse de manera especialmente simple, si la poli-lisina o poli-ornitina está presente ya en el recipiente de prueba y los linfocitos en la suspensión acuosa se añaden a la poli-lisina o poli-ornitina previamente dis-  
10 puesta. Para esto es adecuado un llamado sistema de ensayo, que consta de las placas de ensayo de material sintético, mencionadas anteriormente, en las cuales está presente poli-lisina en una cantidad de 0,1 a 1  $\mu$ g o poli-ornitina en una cantidad de 0,001 a 1  $\mu$ g en cada una de las cavidades.  
15

Para la preparación de tales placas de ensayo, que contiene la poli-lisina o poli-ornitina, se vierte por ejemplo por cada una de las cavidades una solución de poli-lisina o de la poli-ornitina en agua destilada, de ma-  
20 nera que después del secado queda la cantidad mencionada anteriormente de la poli-lisina o de la poli-ornitina por cada una de las cavidades. El procedimiento de aglutinación puede realizarse tal como está descrito anteriormente mediante adición de la dispersión de linfocitos.

1                    Una placa de ensayo de material sintético con ca-  
vidades, en la que están contenidos por cada una de las ca-  
vidades 0,1 a 1  $\mu$ g de una poli-lisina de peso molecular  
1.000 a 4.000, por término medio de 3.400, ó 0,001 a 1  $\mu$ g  
de una poli-L-ornitina de peso molecular 40.000 a 60.000,  
5                    por término medio de 53.000, en cada caso en forma seca,  
constituye especialmente el objeto de la presente inven-  
ción. De manera similar a la poli-lisina o poli-ornitina  
propriadamente dichas, tales placas de ensayo cargadas con  
poli-lisina o poli-ornitina se almacenan convenientemente  
10                    a temperaturas inferiores a 0°C con exclusión de humedad.

                    En los ejemplos siguientes se explica más deta-  
lladamente la invención. Se manifiesta a modo de ejemplo  
la preparación de linfocitos adecuados y la realización  
del procedimiento de aglutinación.

15

Ejemplo 1 :

6 ml de sangre venosa mezclada con heparina se diluyen a 1  
2 con solución de Hank y se aplican sobre un gradiente de  
dos capas, constando cada una de ellas de 5 ml de solución  
20                    de diferente densidad.

                    La capa A (arriba) consta de las sales sódica,  
cálcica, magnésica y metilglucamínica del ácido metrizoico  
RONPACON<sup>(R)</sup> (Cilag-Chemie GmbH, Alsbach) y de un copolíme-  
ro, de alto peso molecular, de sacarosa y epíclorohidrina

25

18028

1 FICOLL<sup>(R)</sup> (Pharmacia, Uppsala) con la densidad de 1,077.

La capa B (abajo) consta de las sustancias mencionadas anteriormente, pero con la densidad de 1,119.

5 La dilución de la sangre, aplicada sobre el gradiente, se centrifuga durante 20 minutos con 800 g (g = fuerza de la gravedad). El anillo de linfocitos que se encuentra sobre A se sifona, se lava tres veces en solución de Hank y el número de linfocitos se ajusta a  $6 \times 10^6$ /ml.

10 La poli-L-lisina (peso molecular 3.400, Sigma, Munich) se disuelve en 0,145 moles/litro de NaCl, pH 7,0, (0,05 mg/ml). 10  $\mu$ l de esta solución se incuban con el mismo volumen de la suspensión de linfocitos en placas para ensayo microscópico (Greiner, Nürtingen) durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda y a continuación se valoran con microscopio.

15

Ejemplo 2:

Se prepara una suspensión de linfocitos, tal como en el ejemplo 1. Poli-L-ornitina (peso molecular 53.000, Sigma, Munich) se disuelve en 0,145 moles/litro de NaCl, pH 7,0, (0,01 mg/ml). 10  $\mu$ l de esta solución se incuban con el mismo volumen de la suspensión de linfocitos en placas para ensayo microscópico (Greiner, Nürtingen) durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda y a continuación se valoran con microscopio.

25  
18028

- REIVINDICACIONES. -

5 Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Procedimiento para la aglutinación de linfocitos, que se caracteriza porque una dispersión de por lo menos  $10^5 \text{ml}^{-1}$  linfocitos en un medio acuoso fisiológicamente compatible, se mezclan con por lo menos 0,01 mg/ml de poli-lisina o con por lo menos 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de poli-ornitina y la mezcla se mantiene a 20 hasta 40°C durante  
15 por lo menos 20 minutos.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque se emplea poli-lisina con un peso molecular de 1.000 a 100.000.

20 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque se emplea poli-ornitina con un peso molecular de 1.000 a 100.000.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque se emplea poli-L-ornitina con un peso molecular de 40.000 a 60.000.

25 5ª.- Procedimiento según la reivindicación

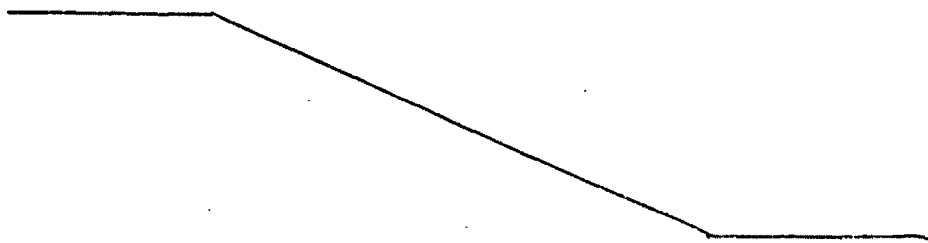
1ª, que se caracteriza porque  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos/ml de un medio acuoso, fisiológicamente compatible, se mezclan con 0,05 mg/ml de una poli-lisina de peso molecular 1.000 a 4.000 y se mantienen a 30 hasta 40°C durante 30 a 60 minutos.

6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^7$  linfocitos/ml de un medio acuoso fisiológicamente compatible se mezclan con 0,001 a 1 mg/ml de poli-L-ornitina de peso molecular 40.000 a 60.000 y se mantienen a 30 hasta 40°C durante 30 a 60 minutos.

7ª.- Dispositivo para la realización del procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza por una placa de ensayo, usual en el comercio, fabricada de material sintético transparente, que contiene por cada una de las cavidades 0,1 a 1 µg de poli-lisina o 0,001 a 1 µg de poli-L-ornitina.

8ª.- PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA LA AGLUTINACION DE LINFOCITOS.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-

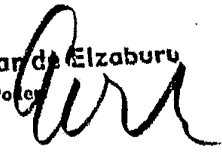


tecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 07. JUL. 1978

P.A.  
Oscar de Elzaburu  
Por Poder



5

22068

FB.