

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
 Registro de la Propiedad Industrial
 - 5 ENE. 1979
 Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.



11	NUMERO	10	AI
21	471839	ES	
22	FECHA DE PRESENTACION		
	18-7-78		

PATENTE DE INVENCION

471839

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
21	NUMERO		1-Agosto-1977		U.S.A.
	821-063				

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A61K/601N		

54 TITULO DE LA INVENCION

"METODO DE PREPARACION DE UNA SUSPENSION ESTABLE DE PLAQUETAS DE SANGRE".

71 SOLICITANTE (S)

**La Compañia norteamericana
 WARNER-LAMBERT COMPANY**

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

**201 Taber Road
 MORRIS PLAINS, NEW JERSEY 07950 (U.S.A.)**

72 INVENTOR (ES)

**1.- James E. Turner, norteamericano.
 2.- Michael B. Kanoff, norteamericano.**

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO S/Ref.: GNY:mjc
 N/Ref.: O.G. 34.394/PP

**POOR
 QUALITY**

Los laboratorios de hematología precisan normas y controles de referencia de plaquetas para mantener el control de calidad de su instrumentación y técnicas de recuento de plaquetas que bajo los métodos actuales de recuento incluyen

5. tanto los procedimientos manuales, tal como la microscopía por contraste de fase, como las técnicas automatizadas que utilizan contadores de partículas de tipo electrónico. Tanto el procedimiento manual como la técnica automatizada precisan la enumeración de plaquetas individuales.

10. En la actualidad, hay pocos laboratorios que utilicen suspensiones de plasma ricas en plaquetas que son preparadas recientemente para fines de control.

Las plaquetas de sangre son, sin embargo, difíciles de contar por microscopía de contraste de fase debido a

15. su pequeño tamaño (aproximadamente 2-4 micras), adicionalmente, las plaquetas tienen una fuerte tendencia a aglutinarse y formar agregados. Cuando se ponen las plaquetas en contacto con una superficie humectable, tal como de vidrio o plástico, pierden su forma oval o redondeada; aparecen numerosos

20. pseudópodos en la superficie de la membrana de la célula y al cabo de poco tiempo las plaquetas coalescen formando numerosos agregados amorfos. En consecuencia, esto hace difícil, si no imposible, el mantenimiento en el laboratorio de hematología clínica de una suspensión de referencia de plaquetas

25. reproducible.

Un control de referencia de plaquetas deseado debería consistir, obviamente, en una suspensión de plaquetas individuales. Con el fin de obtener tal suspensión estable de plaquetas individuales, es necesario inhibir completamente

30. la agregación de las plaquetas.

Se ha detallado una variedad de compuestos que inhiben la agregación de las plaquetas, pero este intento no ha tenido éxito en la preparación de suspensiones de plaquetas estables.

5. Hemos descubierto ahora que un método para inhibir con éxito la agregación de las plaquetas consiste en utilizar compuestos que fijen y estabilicen la membrana de las plaquetas formando degradaciones entre grupos funcionales de proteínas. Una familia de compuestos que realizarán este tipo de fijación son los aldehídos, tal como el glutaraldehído, que reacciona fácilmente con los grupos amino, imino, guanidilo, hidroxilo, carboxilo y SH de la molécula de proteína.
10. Otra familia de compuestos que hemos descubierto, capaces de formar degradaciones con las proteínas sobre la superficie de las plaquetas, son las sales de cromo, tal como el dicromato potásico. En presencia de agua, las sales de cromo forman complejos del tipo $-Cr-O-Cr-$ que se combinarán con los grupos reactivos de las cadenas de proteína adyacentes para llevar a cabo un efecto de degradación similar al de los aldehídos.
20. hídos.

El objeto de nuestra invención es usar aldehídos y mezclas de aldehídos y sales de cromo para preparar una suspensión estable de plaquetas de sangre individuales.

- Hemos descubierto que se obtiene unas condiciones óptimas para fijar las plaquetas cuando se añade el aldehído al plasma rico en plaquetas sin diluir a una concentración comprendida entre el 0,05 y el 0,20%. Igualmente, hemos descubierto que la presencia de las sales de cromo a concentraciones comprendidas entre el 0,20 y el 0,30% mejora la estabilidad de la suspensión de plaquetas.
25. óptimas para fijar las plaquetas cuando se añade el aldehído al plasma rico en plaquetas sin diluir a una concentración comprendida entre el 0,05 y el 0,20%. Igualmente, hemos descubierto que la presencia de las sales de cromo a concentraciones comprendidas entre el 0,20 y el 0,30% mejora la estabilidad de la suspensión de plaquetas.
30. bilidad de la suspensión de plaquetas.

Se obtienen suspensiones superiores de plaquetas -- fijadas cuando son fijadas las plaquetas con ambos compues--
tos simultáneamente.

5. Se obtiene unas condiciones óptimas para fijar las plaquetas cuando se añade el glutaraldehído al plasma rico -- en plaquetas sin diluir a una concentración del 0,1 al 0,15%, preferiblemente al 0,1%, y dicromato potásico a un nivel del 0,25%.

10. El método para fijar las plaquetas de la sangre de acuerdo con nuestra invención es dado en los siguientes ejem--
plos.

EJEMPLO 1

Preparación de plasma rico en plaquetas.

15. Se extrajo sangre entera a través de agujas silico--
nadas en jeringas de plástico y se trasladó inmediatamente a un tubo de polipropileno que contenía un sexto en volumen de solución ACD (2,5 gr de citrato sódico, 1,3 gr de ácido cí--
trico, 2,0 gr de dextrosa, c.s. para 100 ml con agua). El tu--
bo fue tapado, invertido y centrifugado a 66 xg durante 25 --
20. minutos. El plasma rico en plaquetas fue retirado entonces --
de las otras células de la sangre por aspiración y transferi--
do a un tubo de polipropileno limpio.

EJEMPLO 2

Fijación de las plaquetas.

25. Método A:

A cada alícuota de 0,5 ml del plasma rico en pla--
quetas, preparado de acuerdo con el ejemplo 1, se añadió su--
cesivamente y con remoción suave 50 μ l de solución de dicro--
mato potásico al 2,5% y 10 μ l de solución de glutaraldehído
30. preparada diluyendo una solución madre de glutaraldehído al

25% con solución salina a una concentración comprendida entre el 5,0 y el 7,5%.

Método B:

- A cada alícuota de 0,5 ml del plasma rico en plaquetas preparado de acuerdo con el ejemplo 1, se añadieron sucesivamente y con remoción suave 0,5 ml de cloruro sódico 0,15%, 150 µl de solución de dicromato potásico al 2,5% y 2 ml de glutaraldehído al 4% que fue preparado diluyendo una solución madre al 25% con solución salina.
- 5.
10. Se comprobó la agregación de las plaquetas con un microscopio ligero echando una gota de suspensión sobre un porta-muestras siliconado y anotando el grado de agregación después del almacenamiento a temperatura ambiente por espacio de 0, 6 y 15 días.
15. Cuando se varió la concentración del glutaraldehído en ausencia de dicromato potásico (ejemplo 1, omitiendo la solución de dicromato), se consiguieron condiciones de fijación óptimas cuando la concentración de glutaraldehído fue del 0,1%. Las concentraciones de glutaraldehído superiores o inferiores al 0,1% aumentaron considerablemente la agregación de plaquetas y las concentraciones superiores al 0,15% de glutaraldehído dieron como resultado la formación de gel en el plasma rico en plaquetas.
20. Cuando se añadieron cantidades variables de glutaraldehído al plasma rico en plaquetas que contenía 0,25% de dicromato potásico, las suspensiones que contenían del 0,1 al 0,15% de glutaraldehído no mostraron agregación. No obstante, las concentraciones de glutaraldehído de más del 0,15% o más del 0,10% dieron como resultado una notable agregación de plaquetas y las concentraciones superiores al 0,2% gelifica-
- 25.
- 30.

ron el plasma rico en plaquetas.

Aunque el procedimiento de aldehido-dicromato estabiliza las plaquetas e impide la agregación, se observaron hilos fibrosos insolubles en un cierto número de suspensiones de plaquetas fijadas en un tiempo tan breve como 4 días después de la fijación y ello parece contribuir a la inestabilidad de las suspensiones. Los estudios microscópicos han mostrado las plaquetas atrapadas, o adheridas con estos hilos. Se mancharon estos hilos con ayuda de nigrosina lo que nos sugiere que los mismos eran de naturaleza proteica.

Se fijaron suspensiones de plasma rico en plaquetas como en el ejemplo 2 por espacio de 30 minutos a 3 horas a cuatro temperaturas diferentes comprendidas entre 25°C y 56°C. Las plaquetas fijadas fueron centrifugadas, resuspendidas en una solución salina de albúmina de suero humano al 7,5%, y comprobadas microscópicamente para observar el grado de agregación producido durante un almacenamiento de tres meses a una temperatura ambiente.

Las plaquetas suspendidas en albúmina de suero humano preparadas por fijación a 37°C mostraron una mayor estabilidad que las plaquetas fijadas a 25, 45 ó 56°C, observándose una notable reducción en la estabilidad de las suspensiones de 25 y 56°C. El tiempo de fijación no tenía efecto importante sobre la estabilidad de las plaquetas a 37 y 45°C. Se observó la ausencia de hilos fibrosos en la totalidad de las preparaciones de plaquetas suspendidas en albúmina de suero humano.

Con el fin de determinar si las plaquetas fijadas podían ser estabilizadas resuspendiéndolas en diferentes se

5. soluciones de proteína, se fijaron plaquetas durante una hora a 37°C. Después de la centrifugación, las plaquetas fijadas fueron resuspendidas en plasma defibrinado, suero humano normal y soluciones salinas que contenían diferentes concentraciones (1,25% a 7,5%) de albúmina de suero humano.

10. Se observaron hilos fibrosos en la suspensión de plaquetas del plasma defibrinado, pero no en las preparaciones de plaquetas de albúmina de suero humano o de suero humano normal. No obstante, a continuación de un almacenamiento por espacio de dos semanas a temperatura ambiente, únicamente eran estables las plaquetas fijadas suspendidas en albúmina de suero humano.

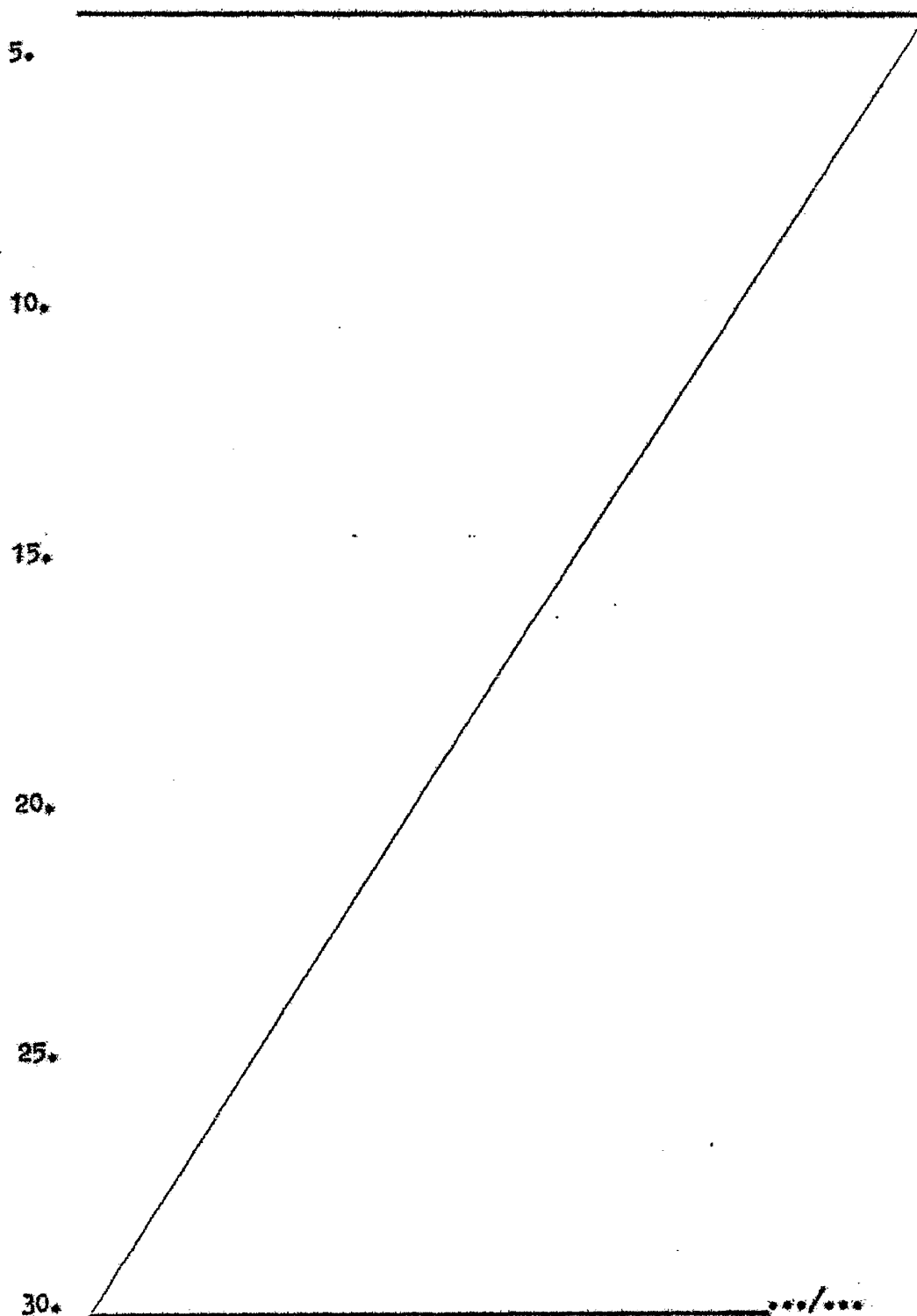
15. Con el fin de determinar si podían ser estabilizadas las plaquetas resuspendiéndolas en soluciones de naturaleza no proteica, las plaquetas fijadas fueron resuspendidas después de su centrifugación, en soluciones salinas que contenían diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido comprendidas entre el 0 y el 20%.

20. Las plaquetas fijadas dieron como resultado unas suspensiones estables al cabo de siete semanas solamente en concentraciones de dimetilsulfóxido del 10 al 20%; las concentraciones de menos del 7,5% dieron como resultado una agregación de plaquetas incrementada. Las resuspensiones de plaquetas fijadas en 20% de dimetilsulfóxido dieron como resultado unas preparaciones que fueron estables al menos durante 25. siete semanas.

N O T A

30. La Patente de Invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente legislación, deberá recaer sobre: "METODO DE PREPARACION DE UNA SUSPENSION

ESTABLE DE PLAQUETAS DE SANGRE[®], con Prioridad de la solicitud de Patente en U.S.A. n^o 821.063 de fecha 1 de Agosto de 1977, según las características esenciales de las siguientes:



REIVINDICACIONES

1.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre que consiste en añadir una cantidad de ion cromo a una cantidad de plasma rico en plaquetas y en añadir una cantidad de un aldehído orgánico a la mezcla de plasma rico en plaquetas-cromo.

2.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ion de cromo es el dicromato potásico y en el que el aldehído es el glutaraldehído.

3.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la concentración de aldehído está comprendida entre el 0,05 y el 0,20% y en el que la concentración de sales de cromo está comprendida entre el 0,2 y el 0,3%.

4.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el aldehído está presente en una concentración del 0,1 al 0,15% y el dicromato está presente a una concentración del 0,25%.

5.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, según la reivindicación 1, que consiste en: Añadir una sal de cromo a un plasma rico en plaquetas y añadir un aldehído orgánico al plasma rico en plaquetas-cromo; permitir la reacción de la suspensión así preparada por espacio de 30 a 180 minutos a una temperatura comprendida entre 18 y 45°C; retirar las plaquetas fijadas; y resuspender las plaquetas en una solución seleccionada del grupo consistente en albúmina de suero humano diluida con solución salina a una concentración del 0 al 7,5%, dimetilau-

fóxico diluido con solución salina a una concentración del 7,5% al 20% y solución salina.

5. 6.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, según la reivindicación 5, en el que la sal de cromo es el dicromato potásico y en el que el aldehído es el glutaraldehído.

10. 7.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, según la reivindicación 6, en el que la solución de resuspensión consiste en 20% de dimetilsulfóxido o en 1,25 a 7,5% de albúmina de suero humano.

8.- Método de preparación de una suspensión estable de plaquetas de sangre, según la reivindicación 7, en el que se permite la reacción de la suspensión durante 60 minutos aproximadamente.

15. 9.- "MÉTODO DE PREPARACION DE UNA SUSPENSION ESTABLE DE PLAQUETAS DE SANGRE".

Según queda sustancialmente descrito en la presen-

***/**

te Memoria que consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 18 JUL. 1978

WARNER-LAMBERT COMPANY

P.P.:

FRANCISCO GARCIA CABRERO
P. P.

Firmado: M.^a Dolores de Quera

5.