



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES	11 NUMERO 473.087	10 A1
21	23 FECHA DE PRESENTACION 5-9-1978	

5 MAR. 1979

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 27 40 053.9	6-9-1977	R.F.A.
P 28 20 603.3	11-5-1978	"
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL AGIK	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
64 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ERITROCITOS INTACTOS MODIFICADOS"		
71 SOLICITANTE (S) 1) STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE M.B.H. y 2) PROFESSOR DR.-KLAUS GERSONDE (File 688 AvK/IM)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 1) Kaiser-Wilhelm-Platz 1, Mülheim/Ruhr y 2) Preusweg 69, Aachen, ambos en la R.F.A.		
72 INVENTOR (ES) Prof. Dr. Yves-Claude Nicolau y Prof. Dr. Klaus Gersonde		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-69.794)		

1 Una de las misiones principales de los eritrocitos es el transporte de oxígeno molecular desde los pulmones a los tejidos periféricos. Los eritrocitos contienen en alta concentración hemoglobina (Hb) (30 pg por célula = 35,5g/100 ml de células), que forma con O₂ un aducto reversible. La presión parcial de oxígeno en los pulmones es de aproximadamente 100 Torr y en el sistema capilar de aproximadamente 70 Torr, frente a la que debe ser disociado O₂ por la hemoglobina cargada con oxígeno. En condiciones fisiológicas sólo puede ser descargada de oxígeno aproximadamente 25% de la hemoglobina cargada con oxígeno. Aproximadamente 75% se devuelve a los pulmones con la sangre venosa. Por consiguiente la mayor parte del aducto Hb-O₂ no es aprovechada para el transporte de O₂.

15 Efectos de intercambio o recíprocos de la hemoglobina con efectores alostéricos hacen posible una acomodación al requisito fisiológico de la máxima cesión de oxígeno a partir del aducto Hb-O₂ con simultáneo mantenimiento de la máxima presión parcial de oxígeno posible en el sistema capilar.

20 Las propiedades alostéricas de la hemoglobina son responsables de la forma sigmoide de la curva de fijación de oxígeno. Su presión de semisaturación (P_{O₂(1/2)}) es una escala de medida de la afinidad para O₂. La pendiente de la curva con forma de sigmoide en la zona de 40 a 60% de saturación representa el grado de la cooperación (cooperatividad) de los cuatro lugares de fijación de O₂ en la Hb (coeficiente de Hill: n = 2,8 a 3,2). Un aumento del coeficiente de Hill, es decir una inclinación más pendiente de la curva de fijación en forma de sigmoide o un desplaza-

1 miento de toda la curva de fijación a una mayor presión par-
cial de O_2 (el llamado "desplazamiento a la derecha") con-
duciría a una cesión facilitada de O_2 en el sistema capilar
y a un mejorado abastecimiento con oxígeno a los tejidos
5 circundantes. Un "desplazamiento a la derecha" es logrado
"in vivo" realmente por aumento de la concentración de
2,3-bisfosfoglicerato en los eritrocitos y su fijación a
hemoglobina. Por fijación de 2,3-bisfosfoglicerato a Hb se
disminuye la afinidad para O_2 y se aumenta la presión de
10 semisaturación de O_2 . El 2,3-bisfosfoglicerato, que es for-
mado en la derivación de glicólisis en eritrocitos, produ-
ce una lenta acomodación a déficit de O_2 .

El 2,3-bisfosfoglicerato aumenta la presión
de semisaturación de hemoglobina aislada agotada a pH 7,4
15 desde $PO_2(1/2) = 9,3$ Torr (37°C) y 4,3 Torr (25°C) hasta
 $PO_2(1/2) = 23,7$ Torr (37°C) y respectivamente 12,0 Torr
(25°C) (K.Imai y T. Yonetani, J. Biol. Chem. 250 (1975)
1093-1098). Una disminución considerablemente mayor de la
afinidad para O_2 , es decir un aumento de la presión de se-
20 misaturación de O_2 , fué alcanzado para hemoglobina aislada
mediante fijación de hexafosfato de inosita (ácido fitini-
co, IHP), que había sido aislado de tejidos vegetales (K.
Ruckpaul y colaboradores, Biochim. Biophys. Acta 236 (1971)
211-221). La fijación de IHP a hemoglobina aumenta la pre-
25 sión de semisaturación de O_2 hasta $PO_2(1/2) = 96,4$ Torr
(37°C) y respectivamente $PO_2(1/2) = 48,4$ Torr (25°C). El
IHP, igual que el 2,3-bisfosfoglicerato y otros polifosfa-
tos, no puede penetrar a través de la membrana de los eri-
trocitos.

30 Las vesículas de lípidos reflejan ciertas

1 propiedades de las membranas celulares. Son capaces de pene-
trar en la células o bien por fusión con la membrana de
plasma celular o bien por endocitosis (D. Papahadjopoulos y
colaboradores, Nature 252 (1976) 163-165). La fusión desem-
5 peña un importante papel en numerosos procesos de membranas,
por ejemplo en la transmisión sináptica, en la secreción,
en la formación de membranas de plasma (reunión) y en la
infección con virus de membranas. La fusión de las células
con vesículas de lípidos se observó tanto en cultivos celu-
10 lares como también en "fantasmas" de eritrocitos (membranas
de eritrocitos sin contenido celular).

Por tratamiento de células ML (cepa celular-
linfoma del ratón) con vesículas, que contenían IgG, con
elevada concentración de neutralización frente a virus
15 Cocksackie A-2L, las células eran protegidas contra subsi-
guiente infección con este virus. Gregoriadis y Buckland
(Nature 235 (1973) 252-253) utilizaron vesículas de lípi-
dos con el fin de incorporar invertasa en macrófagos de
ratón, que tenían un déficit de invertasa. No obstante, en
20 sayos "in vivo" no condujeron a ningún resultado inequívoco,
dado que las vesículas de lípidos son incorporadas sin
diferenciación en todas las células o son degradadas rápi-
damente en el hígado.

La utilización de vesículas de lípidos para
25 la incorporación de efectores alostéricos u otras sustan-
cias en eritrocitos no ha sido descrita hasta ahora. Nume-
rosos ensayos han demostrado que vesículas de lípidos pue-
den ser inyectadas sin peligro a animales.

Mientras que la influencia de IHP sobre la
30 estructura y la función de Hb aislado ha sido investigada

1 ampliamente, no existe ningún conocimiento acerca del efecto recíproco de IHP con hemoglobina en eritrocitos intactos, dado que hasta ahora no era posible introducir IHP en eritrocitos intactos.

5 Se ha encontrado ahora con sorpresa que con ayuda de vesículas de lípidos fluidas cargadas, que son capaces de fusionarse con la membrana de eritrocitos, es posible transportar efectores alostéricos tales como hexafosfato de inosita (IHP) en eritrocitos, en donde éste por causa de su mucho mayor constante de fijación desplaza al 10 2,3-bisfosfoglicerato de su lugar de fijación en la hemoglobina y es incorporado de modo irreversible. En estas condiciones la Hb existente en los eritrocitos pasa a una conformación alostérica con una afinidad para oxígeno importantemente más baja.

15 La disminución de la afinidad para O_2 , es decir el aumento de la presión de semisaturación de O_2 de hemoglobina en eritrocitos, aumenta la capacidad de los eritrocitos para disociar el O_2 fijado incluso frente a 20 más elevadas presiones parciales de O_2 y mejora por consiguiente la aportación de oxígeno a los tejidos.

Eritrocitos, en los que ha sido incorporado IHP, y que por lo tanto producen una mejorada aportación de oxígeno a los tejidos, pueden encontrar aplicación y 25 utilización en los siguientes casos:

- 1) En el caso de baja presión parcial de oxígeno en el aire respirable: escaladores de montañas a grandes alturas, astronautas en atmósfera pobre en O_2 .
- 2) En el caso de superficie de intercambio de O_2 reducida: 30 disminución del número de los alveolos pulmonares en el ca

- 1 so de enfisema pulmonar.
- 3) En el caso de resistencia aumentada contra difusión de O_2 en los pulmones: neumonía, asma.
- 4) En el caso de capacidad de transporte de O_2 reducida:
- 5 eritropenia, estados anémicos de todo tipo, derivación o desviación arteriovenosa.
- 5) En el caso de perturbaciones de la circulación sanguínea: arterioesclerosis, procesos tromboembólicos, infarto orgánico, estados isquémicos.
- 10 6) En el caso de alta afinidad de hemoglobina para oxígeno: mutaciones de hemoglobina, modificación química de aminoácidos con N en posición terminal en las cadenas de hemoglobina, por ejemplo Diabetes mellitus, déficit de enzimas en eritrocitos.
- 15 7) Para la aceleración de procesos de desintoxicación por abastecimiento mejorado de oxígeno.
- 8) Para la disminución de la afinidad de sangre conservada para oxígeno: transfusiones, estados de choque (shock).
- 9) Para mejorar la radioterapia de cancer.

20 Como efectores alostéricos para el transporte en los eritrocitos entran en consideración predominantemente los que tienen una afinidad para la hemoglobina más elevada que los efectores fisiológicos 2,3-bisfosfogliceratos y trifosfato de adenosina.

25 Especialmente se prefiere hexafosfato de inosita como efector alostérico.

30 Como efectores alostéricos entran en consideración también otros fosfatos de azúcares tales como pentafosfato de inosita, tetrafosfato de inosita, trifosfato de inosita, difosfato de inosita y difosfato de difosfati-

1 dil-inositol.

Otros efectores alostéricos adicionales son otros polifosfatos tales como trifosfatos de nucleótidos, difosfatos de nucleótidos, monofosfatos de nucleótidos y
5 ésteres de fosfato de alcoholes.

En el caso de determinadas mutaciones de hemoglobina, por ejemplo hemoglobina de "Zürich", pueden pasar a utilizarse en calidad de efectores alostéricos aniones orgánicos tales como ácidos policarboxílicos.

10 Finalmente también es posible que los efectores alostéricos sean aniones inorgánicos tales como hexa cianoferrato, fosfato y cloruro.

Como vesículas de lípidos se emplean mezclas de fosfatidicolina/fosfatidilserina/colesterina en la proporción molar de 10 hasta 5 : 4 hasta 1 : 10 hasta 3. Se
15 prefiere muy especialmente una proporción molar de 8 : 2 : 7. No obstante, también es favorable una proporción molar de 9 : 1 : 8 así como una de 8 : 4 : 7.

Como líquidos vehículos fluídos pueden entrar en consideración los líquidos vehículos usuales, especialmente líquidos vehículos fisiológicos tamponados, que son conocidos sin más explicaciones o se encuentran a disposición para un técnico en la materia, tales como por ejemplo tampón bis-Tris isotónico. (Tris = tri(hidroximetil)-
25 -aminometano).

Las vesículas de lípidos deben ser capaces de fusionarse con la membrana de los eritrocitos. Por medio de la incorporación de los efectores alostéricos en eritrocitos intactos se ha hecho posible que la hemoglobina existente en los eritrocitos se convierta a una confor-
30

1 mación alostérica, que cede oxígeno con una facilidad esencialmente mayor.

El presente invento hace posible poner a disposición eritrocitos modificados que garantizan un aprovechamiento mejorado de oxígeno de la sangre. Estos eritrocitos modificados se obtienen, incorporando en ello irreversiblemente efectores alostéricos con ayuda de vesículas de lipídos, fusionándose las vesículas de lípido con las membranas celulares de eritrocitos, y siendo fijados los efectores alostéricos a la hemoglobina en los eritrocitos.

Cuando, por ejemplo, se utiliza IHP como efector alostérico, primeramente las vesículas de lipídos son cargadas con el IHP y luego son fusionadas con los eritrocitos, siendo fijado el IHP a la hemoglobina, con lo cual se modifica la conformación alostérica de la hemoglobina y por consiguiente su afinidad para oxígeno.

La incorporación de la combinación de efectores alostéricos y vesículas de lipídos en los eritrocitos se efectúa de manera extracorporal. Por consiguiente, el invento abarca también medicamentos y la utilización de los eritrocitos modificados para combatir las más diversas enfermedades, que se han mencionado en lo que antecede.

En la aplicación y utilización, eritrocitos separados de sangre retirada son modificados por incorporación de la combinación de vesículas de lipídos con efectores alostéricos, y los eritrocitos modificados son introducidos de nuevo en el plasma sanguíneo.

Por lo tanto es posible, sin ninguna dificultad, obtener conservas de sangre o sangre con eritrocitos modificados, que pueden ser empleadas doquiera donde

1 sea necesario lograr una cesión acrecentada de oxígeno al torrente circulatorio final o aumentar el aprovechamiento de oxígeno por los tejidos.

5 Los eritrocitos modificados pueden ser introducidos también en la circulación sanguínea de un animal de sangre caliente, por vía intravenosa, en un líquido vehículo fisiológicamente apropiado.

Una forma especial de realización de la preparación de eritrocitos modificados se expone seguidamente.

10 Se obtienen eritrocitos modificados con cesión mejorada de oxígeno,

- a) disolviendo hexafosfato de inosita en una solución tampón isotónica, hasta que la solución esté saturada;
- b) suspendiendo en esta solución una mezcla de lípidos, que
15 contiene fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesteroína en la proporción molar de 10 hasta 5 : 4 hasta 1 : 10 hasta 3;
- c) sometiendo la suspensión obtenida a la desintegración con ultrasonidos o a un procedimiento de inyección;
- 20 d) centrifugando la mezcla y separando de este modo la suspensión sobrenadante, que contiene las pequeñas vesículas de lípidos enriquecidas con hexafosfato de inosita así como hexafosfato de inosita libre;
- e) suspendiendo después de ello eritrocitos humanos, que
25 previamente han sido separados por centrifugación del plasma sanguíneo, en la suspensión sobrenadante, que contiene las pequeñas vesículas de lípidos enriquecidas con hexafosfato de inosita así como hexafosfato de inosita libre;
- f) incubando la suspensión obtenida y fusionando de este
30 modo las vesículas con los eritrocitos; y

1 g) lavando los eritrocitos intactos, ahora modificados, con
 solución isotónica de sal común o con tampón isotónico y
 liberándolos cuantitativamente de hexafosfato de inosita
 libre existente en el exterior y suspendiéndolos en el plasma
 5 ma sanguíneo o en soluciones sustitutivas del plasma sanguí-
 neo.

El invento es explicado seguidamente hacien-
 do referencia a las figuras, siendo designadas por RBC cé-
 lulas sanguíneas rojas.

10 La figura 1 es una representación gráfica,
 que representa el aumento de la afinidad para O_2 de hemo-
 globina en los eritrocitos con el transcurso del tiempo de
 conservación a $4^{\circ}C$ (TC). La presión de semisaturación de O_2
 ($P_{O_2} (1/2)$) fué medida a $25^{\circ}C$ en ausencia de CO_2 .
 15 $P_{O_2} (1/2)$ RBC conservadas en ACD $\square\square\square$; RBC, que
 han sido conservadas en tampón bis-Tris isotónico 0,10 mo-
 lalar de pH 7,4, que contiene 0,154 moles/litro de NaCl $\ominus\ominus$
 $\ominus\ominus$.

20 La figura 2 representa el "desplazamiento a
 la izquierda" de las curvas de fijación de O_2 de hemoglobi-
 na en eritrocitos en función del tiempo de conservación a
 $4^{\circ}C$. Las RBC fueron conservadas a $4^{\circ}C$ en tampón bis-Tris
 isotónico, 0,10 molar de pH 7,4, que contiene 0,154 moles/
 litro de NaCl. Las isothermas de fijación fueron medidas a
 25 $25^{\circ}C$ en ausencia de CO_2 . _____: RBC, que han sido
 liberadas totalmente de polifosfatos; _____: RBC
 en el tiempo de valor mitad del empobrecimiento con poli-
 fosfatos ($\tau_{1/2} = 9$ d); -.-.-.-.-: RBC recientemente
 extraídas (recientes). La flecha indica la descarga de la
 30 hemoglobina bajo la presión parcial de O_2 de 30 Torr.

1 La figura 3 representa la dependencia respecto del pH de las curvas de fijación de O_2 a $25^\circ C$ en ausencia de CO_2 . Se conservaron RBC durante 17 días a $4^\circ C$ en tampón bis-Tris isotónico 0,10 molar de pH 7,4, que contiene 0,154 moles/litro de NaCl:-----, pH 7,72; : pH 7,42; -.-.-.-.-.: pH 7,08. La flecha indica la saturación (S) disminuida de la hemoglobina bajo una presión parcial de O_2 de 30 Torr.

10 La figura 4 representa el efecto Bohr de hemoglobina en eritrocitos a $25^\circ C$ en ausencia de CO_2 . Se conservaron RBC durante 17 días a $4^\circ C$ en tampón bis-Tris isotónico 0,10 molar de pH 7,4, que contiene 0,154 moles/litro de NaCl.

15 La figura 5 representa la incorporación irreversible de IHP en células sanguíneas rojas. La presión de semisaturación de O_2 de los eritrocitos fué medida a $25^\circ C$ en ausencia de CO_2 , antes y después de la incorporación de IHP inducida con V2, a pH 7,6. Las RBC fueron conservadas a $4^\circ C$ en tampón bis-Tris isotónico 0,10 molar de pH 7,4, que contiene 0,154 moles/litro de NaCl. $\circ-\circ-\circ$: curva de empobrecimiento con polifosfato de RBC; $\square \longleftrightarrow \square$: carga con IHP a pH 7,6 y conservación a $4^\circ C$ de la RBC cargada con IHP; $\triangle \longleftrightarrow \triangle$: carga con IHP a pH 7,6 y conservación a $37^\circ C$ de las RBC cargadas con IHP. La incorporación de IHP fué llevada a cabo en condiciones normalizadas.

25 La figura 6 representa el efecto Bohr de los eritrocitos cargados con IHP a $25^\circ C$ en ausencia de CO_2 . $\circ-\circ-\circ$: carga con IHP inducida por V2 a pH 7,6; $\square-\square-\square$: carga con IHP inducida por V2 a pH 7,8. Las RBC fueron conservadas a $4^\circ C$ en tampón bis-Tris isotónico 0,10 molar de

1 pH 7,4 que contiene 0,154 moles/litro de NaCl. La carga con IHP se efectuó en condiciones normalizadas.

La figura 7 representa la influencia de la composición de las vesículas sobre el "desplazamiento a la derecha" de las isothermas de fijación de O_2 , medida para 5 pH 7,6 a 25°C en ausencia de CO_2 . La carga con IHP se efectuó a pH 7,6 en condiciones normalizadas. Las células fueron suspendidas en tampón isotónico de pH 7,6. ---: las RBC fueron conservadas durante 19 días en tampón bis-Tris isotónico 0,10 molar de pH 7,4, que contenía 0,154 moles/litro de NaCl; -----: RBC después de la carga con IHP inducida por V1; -.-.-.-: RBC recientes; -----: RBC después de la carga con IHP inducida con V2. La flecha indica la saturación disminuida de la hemoglobina bajo la 10 presión parcial de O_2 de 30 Torr.

La figura 8 representa la estabilidad a 37°C de vesículas cargadas con IHP. O O O : vesículas V2; -----: vesículas V3.

La absorción de IHP por RBC inducida por vesículas se efectuó a pH 7,4 en condiciones normalizadas. 20 La $P_{O_2}^{(1/2)}$ de los eritrocitos cargados con IHP se midió a 25°C en ausencia de CO_2 .

La figura 9 reproduce la cinética de la incorporación de ^{14}C -colesterina desde vesículas en eritrocitos intactos. La incubación se efectuó a 37°C y pH 7,4 25 en tampón bis-Tris isotónico 0,1 molar, que contenía 0,154 moles/litro de NaCl.

La figura 10 reproduce la cinética de la incorporación de ^{14}C -colesterina desde vesículas V2 en eritrocitos intactos. La radioactividad fué medida en lípidos 30

1 de los eritrocitos, extraídos con Folch. La incubación se
efectuó en las condiciones mencionadas para la figura 9.

5 La figura 11 reproduce la cinética de la ab-
sorción de ^{14}C -colesterina por células Hela desde vesículas
de lípidos. La incubación se efectuó a 37°C en solución de
sal común tamponada con fosfato a pH 7,4.

10 La figura 12 reproduce la dependencia con el
pH de la absorción de ^{14}C -colesterina por células Hela des-
de vesículas. Las condiciones eran las mismas que en la fi-
gura 11.

La figura 13 reproduce la influencia del va-
lor de pH del medio de incubación sobre la presión de semi-
saturación de O_2 de eritrocitos cargados con IHP. La $\text{P}_{\text{O}_2} (1/2)$
fue medida a 25°C en ausencia de CO_2 .

15 La figura 14 reproduce la cinética de la car-
ga de eritrocitos con IHP inducida por V2 a pH 7,38, en pre-
sencia de IHP en el medio exterior. La incubación de RBC
con una edad de 57 días se efectuó en condiciones normaliza-
das. La $\text{P}_{\text{O}_2} (1/2)$ fue medida a 25°C en ausencia de CO_2 .

20 La figura 15 reproduce la influencia del
valor de pH del medio de incubación sobre el tiempo de va-
lor mitad de la incorporación de IHP inducida por V2. Las
RBC fueron incubadas en condiciones normalizadas con IHP
en el medio exterior. La $\text{P}_{\text{O}_2} (1/2)$ fue medida a 25°C en
25 ausencia de CO_2 .

La figura 16 reproduce la cinética de la
carga de eritrocitos con IHP inducida por V2 a pH 7,4, en
ausencia de IHP en el medio exterior. La incubación se efec-
tuó en condiciones normalizadas. La $\text{P}_{\text{O}_2} (1/2)$ se midió a
30 25°C en ausencia de CO_2 .

1 La figura 17 muestra las curvas de fijación
de O_2 antes y después de la carga con IHP inducida por V2
de eritrocitos a pH 7,4. La incubación se efectuó en condi-
ciones normalizadas a pH 7,6. La cesión de oxígeno por los
5 eritrocitos frente a la presión parcial de O_2 de 30 Torr,
crítica para el cerebro, se indica mediante flechas: a 25°C:
-----, eritrocitos de 41 días de edad (cesión de O_2
5%); -----, eritrocitos cargados con IHP (cesión de
 O_2 47%); a 37°C: -.-.-.-.-, eritrocitos de 41 días de
10 edad (cesión de O_2 21%); -...-...-...-: eritrocitos carga-
dos con IHP (cesión de O_2 80%). En ordenadas se representa
la saturación de O_2 (SAT) en %/.

El grado de la cesión de oxígeno por la he-
moglobina, contenida en los eritrocitos, en los capilares
15 depende no solamente de la presión parcial de O_2 de la san-
gre venosa, sino sobre todo de la afinidad de la hemoglobi-
na en las células rojas para oxígeno. Efectores alosféri-
cos contenidos dentro de los eritrocitos, los cuales regu-
lan la afinidad para oxígeno, son los protones Bohr, CO_2 y
20 compuestos orgánicos de fosfato, especialmente DPG (2,3-bis-
fosfoglicerato, efector natural alostérico) y ATP (trifos-
fato de adenosina).

El empobrecimiento de células rojas conser-
vadas con DPG y con ATP conduce a un aumento gradual de la
25 afinidad para oxígeno (S. Balcerzak y otros: Adv. Exp. Med.
Biol. 28 (1972) 433-447). Este es representado gráficamen-
te en la figura 1 mediante representación de la presión
parcial de O_2 en el caso de semisaturación (medida a 25°C)
en función del tiempo de conservación (eritrocitos conser-
30 vados a 4°C). Las isothermas de fijación de O_2 son medidas

1 en ausencia de CO_2 con valor constante de pH (pH 7,4), con
el fin de excluir las influencias de estos efectores alos-
téricos sobre la presión de semisaturación. El punto final
del empobrecimiento, dependiente del tiempo, con polifosfa-
5 to es definido por la $P_{\text{O}_2} = 4,2$ Torr, es decir la
presión de semisaturación de hemoglobina totalmente exenta
de polifosfato (agotada). El punto inicial, es decir la
 P_{O_2} de eritrocitos recientes, depende de la composi-
ción del medio de suspensión. A partir de estas curvas de
10 empobrecimiento con polifosfato se puede determinar un nue-
vo parámetro funcional de eritrocitos conservados, el lla-
mado tiempo de valor mitad del empobrecimiento con poli-
fosfato dentro de los eritrocitos. Este es de 9 días en
tampón bis-Tris isotónico 0,1 molar de pH 7,4 y de 12 días
15 en ACD (ácido cítrico-citrato de sodiodextrosa: solución
de conservación) en calidad de solución estabilizadora.

El empobrecimiento con polifosfatos en eri-
trocitos provoca un "desplazamiento a la izquierda" de las
isotermas de fijación de O_2 y por consiguiente una disminu-
20 ción de la capacidad de cesión de oxígeno.

El "desplazamiento a la izquierda" de la
curva de fijación de O_2 y la disminución de la capacidad
de cesión de oxígeno, medida a 25°C de eritrocitos conser-
vados a 4°C se representan en la figura 2. Bajo una presión
25 parcial de O_2 de 30 Torr se des-saturan en 11% eritrocitos
recientes, mientras que eritrocitos que están empobrecidos
a la mitad con polifosfatos, solo son des-saturados en 1%.

El "desplazamiento a la izquierda" de las
curvas de fijación de O_2 de eritrocitos empobrecidos con
30 polifosfato provoca un perjuicio de la cesión de oxígeno

1 en los tejidos. Una transfusión masiva de sangre almacena-
 da (con déficit de DPG) conduce por consiguiente a una dis-
 5 minución del valor del pH de los músculos y a un aumento
 del nivel de lactato en el plasma, acompañados por una dis-
 minución de la presión sanguínea, conocida como "síndrome
 de transfusión" (S.V. Kevy y colaboradores, Adv. Exp. Med.
 Biol. 28 (1972) 511-516). Esta disminución del valor del
 pH compensa sólo parcialmente el "desplazamiento a la iz-
 10 quierda" representado en la figura 3. En el caso de una
 presión parcial de O_2 de 30 Torr un desplazamiento del va-
 lor de pH de 7,42 hasta 7,08 aumenta la cesión de oxígeno
 de las células rojas (que han sido almacenadas durante 17
 días a 4°C en tampón bis-Tris isotónico 0,1 molar de pH
 7,4) desde 1% hasta 5%; no obstante una cesión hasta de 11%,
 15 que es observada en el caso de células rojas recientes a
 pH 7,46, no puede ser producida por el efecto Bohr por sí
 sólo (véase fig. 2). La influencia del valor de pH sobre
 la afinidad de O_2 efecto Bohr de células rojas almacenadas,
 que están suspendidas en tampón bis-Tris o tampón Tris, iso-
 20 tónico 0,1 molar, se representa en la figura 4 para el mar-
 gen de pH 7,0 hasta 7,8. Las curvas de fijación de O_2 fue-
 ron medidas a 25°C en ausencia de CO_2 con eritrocitos, que
 habían sido mantenidos a 4°C durante 17 días. Estos eritro-
 citos envejecidos han perdido más de la mitad de su efecto
 25 de polifosfato sobre la afinidad de hemoglobina para oxígeno
 (véase fig. 1). El efecto Bohr - $\Delta P_{O_2} \Delta pH$
 corresponde a 0,53 protones por cada mol de $O_2^{(1/2)}$. El núme-
 ro de los protones Bohr cedidos con fijación de oxígeno es
 constante por lo menos hasta una edad de las RBC de 34 días,
 30 cuando ya se ha perdido 75% del efecto de polifosfato. Por

1 lo tanto, el almacenamiento, es decir el empobrecimiento con polifosfato, no tiene ninguna influencia sobre el efecto Bohr de los eritrocitos.

METODOS

5 Retirada y almacenamiento de sangre humana

De una persona de ensayo voluntaria, joven y sana, se tomaron 100 ml de sangre que fueron recogidos en un biomatriz de 250 ml (Biotest-Serum-Institut, Frankfurt am Main), que contenía 50 ml de ACD como estabilizador. Esta muestra fué conservada a 4°C.

10 Obtención y conservación de eritrocitos humanos

300 ml de sangre de una persona inicial de ensayo joven fueron recogidos en una bolsa de material sintético, que contenía heparina o citrato sódico para impedir la coagulación de la sangre. La muestra de sangre fué enfriada en un baño de hielo. El tratamiento ulterior se llevó a cabo a 4°C. Los eritrocitos fueron separados del plasma por centrifugación durante 20 minutos a 23500 x g (g = aceleración de la gravedad) (Sorvall, Typ RC-2B; rotor SS 34; 12000 rpm). Las células rojas envasadas fueron suspendidas en tampón bis-Tris isotónico de pH 7,4 (bis-Tris 0,10 M, NaCl 0,154 M) y centrifugadas. Esta operación de lavado fué repetida tres veces. Finalmente los eritrocitos sedimentados fueron suspendidos en 300 ml de tampón bis-Tris isotónico de pH 7,4 y almacenados a 4°C.

25 Medición del pH y ajuste de la suspensión de eritrocitos

Las células rojas mantenidas en tampón isotónico 0,1 molar de pH 7,4 o en ACD fueron centrifugadas a temperatura ambiente durante 2 minutos a 8000 x g (centrifuga Eppendorf, tipo 3200, 12000 rpm). La suspensión de eri

1 trocitos fué ajustada al deseado valor de pH mediante repe-
tido recambio del medio tampón. Las células fueron suspen-
didas en el tampón deseado y centrifugadas de nuevo. Esta
medida debe ser repetida hasta que se alcance un valor cons-
5 tante de pH.

La medición del pH se efectúa a 25°C con un electrodo de vidrio (Ingold, Frankfurt a.M., tipo 406-M3, a = 35 mm). La precisión de la medición del pH es de $\pm 0,02$ unidades.

10 Preparación de las vesículas de lípidos cargadas con IHP

Se disolvió IHP, por ejemplo entre la tempe-
ratura ambiente y 50°C, en tampón bis-Tris isotónico (bis-
-Tris 0,10 M, NaCl 0,154 M) de pH 7,4 hasta la saturación
(0,19 M). Una mezcla de lípidos consistente en fosfatidil-
15 colina (PC), fosfatidilserina (PS) y colesterina (Ch) en
la proporción molar de 8:2:7 (veáse tabla 1) fué suspendi-
da en esta solución y fué sometida a irradiación acústica
a aproximadamente 50°C bajo nitrógeno durante 45 minutos.
El margen de temperaturas para la preparación de la vesicu-
20 las está limitado sólo por el punto de congelación del tam-
pón y por la estabilidad térmica del polifosfato. La irra-
diación acústica se llevó a cabo por un desintegrador por
ultrasonidos (Schöller, tipo 125, Frankfurt a.Main) con
una sonda sumergible de titanio (10 kHz). La irradiación
25 acústica puede efectuarse de modo eficaz con energías si-
tuadas preferiblemente por encima de 100 W/cm^2 . Después de
la irradiación acústica, la suspensión de vesículas fué cen-
trifugada durante 1 hora a 100000 x g a 25°C en una ultra-
centrífuga (Beckmann, tipo L5-65, Rotor 60). La porción so-
30 brenadante contenía las pequeñas vesículas de lípidos con

1 un diámetro de 500 Å . Durante la formación de las vesículas, éstas encierran en sí la solución, en la que son suspendidos los lípidos.

TABLA 1

5 Composición de las vesículas de lípidos*

	<u>Vesículas</u>	<u>Proporciones molares</u>		
		PC	: PS	: CH
	V1	9	: 1	: 8
	V2	8	: 2	: 7
10	V3	8	: 4	: 7
	V4	8	: 0	: 7

* son útiles proporciones molares en el margen (VI-V3) de PC:PS:CH = 10-5 : 4-1 : 10-3.

15 La fosfatidilserina fué preparada a partir de cerebro de vacuno (Koch-Light, Inglaterra) y la fosfatidilcolina lo fué a partir de yema de huevo (Lipid Specialties, Boston, USA). La colessterina y la sal sódica de hexa fosfato de inosita fueron adquiridas de Merck (Darmstadt) 0

20 Sigma (München). Todos los lípidos fueron purificados por cromatografía en columna. Su pureza fué comprobada posteriormente mediante cromatografía en capa delgada.

25 1 n moles/litro de lípidos proporcionan 2×10^{11} vesículas de lípidos las cuales son provistas con membranas de lípidos de doble capa (pequeñas vesículas con un diámetro de 500 Å y menor). 2×10^{11} vesículas de lípidos fueron incubadas con 10^6 eritrocitos, pero también se utilizaron otras proporciones, que son mencionadas seguidamente.

30 Incorporación de hexafosfato de inosita en eritrocitos hu-

1 manos

Para ensayos "in vitro" se centrifugaron 200 μ l de suspensión de eritrocitos a temperatura ambiente durante 2 minutos a 8000 x g (centrífuga de Eppendorf, tipo 3200, 12000 rpm). Caso de que fuera necesario, las células sedimentadas fueron lavadas del modo arriba descrito y ajustadas al deseado valor de pH, y luego fueron suspendidas de nuevo en 200 μ l de tampón isotónico 0,1 molar con el deseado valor de pH. A la suspensión se le añadió un volumen igual de la suspensión de vesículas de lípidos con el deseado valor de pH. Los eritrocitos fueron incubados durante 1 hora a 37°C. Luego los eritrocitos fueron lavados varias veces con tampón isotónico 0,1 molar, hasta que se hubo alcanzado un valor constante de pH. Se llevaron a cabo ensayos de precipitación mediante Ca^{+2} con la porción sobrenadante, hasta que ya no pudo detectarse nada de IHP libre. Pueden utilizarse cualesquiera sistemas tampón, que sean eficaces en el margen de pH de 7 a 8 y que no perjudiquen las correctas propiedades estructurales, morfológicas y funcionales de los eritrocitos.

Medición de las curvas de fijación de O_2

Las curvas de fijación de O_2 fueron trazadas a 25°C con ayuda del rápido método de difusión (H.Sick y K. Gersonde, *Analyt. Biochem.* 32 (1969) 362-376 y H.Sick y K. Gersonde, 47 (1972) 46-56).

Resultados

Efecto Bohr de células rojas humanas almacenadas después de fusión con vesículas.

30

La presión de semisaturación de O_2 , la coo-

1 peratividad (n = 2,8) y el efecto Bohr de eritrocitos huma-
nos, que han sido mantenidos a 4°C durante 40 días en medio
tampón isotónico de pH 7,4 a 4°C y están parcialmente empo-
5 brecidos con polifosfatos, no son modificados esencialmente
después de incubación en tampón isotónico de pH 7,6 con las
vesículas V2 a 37°C durante 1 hora. La incubación de eritro-
citos con vesículas que tienen diferentes composiciones de
lípidos (V1 y V3) tampoco tiene ninguna influencia sobre
los parámetros de fijación de O₂ de la hemoglobina dentro
10 de los eritrocitos.

Efecto Bohr de células rojas sanguíneas humanas conservadas
después de la incorporación de hexafosfato de inosita indu-
cida por vesículas (V2).

El IHP, el más intenso efector alostérico de
15 hemoglobina hasta ahora conocido, disminuye la afinidad de
hemoglobina para oxígeno, reconocible por un "desplazamiento
a la derecha" de la curva de fijación de O₂. Eritrocitos
humanos, que no son capaces de sintetizar IHP, pueden ser
cargados con este polifosfato durante la fusión con vesicu-
20 las de lípidos, que contienen el efector.

Los ensayos de acuerdo con el invento aquí
descritos con el ejemplo de la incorporación de IHP, dis-
currirían en lo esencial en el mismo sentido con los tipos
mencionados en lo que sigue de efectores alostéricos así
25 como con sus mezclas, que no son capaces de atravesar la
membrana de eritrocitos.

Tales efectores alostéricos son, por ejemplo,
fosfatos de azúcares tales como pentafosfato de inosita,
tetrafosfato de inosita, trifosfato de inosita, difosfato
30 de inosita y difosfato de difosfatidil-inositol. Además de

1 ello, se pueden mencionar polifosfatos tales como trifosfa-
 tos de nucleótidos, difosfatos de nucleótidos, monofosfatos
 de nucleótidos, y ésteres de fosfato de alcoholes. Entran
 en consideración también aniones inorgánicos tales como he-
 5 xacianoferrato, fosfato y cloruro. Finalmente, pueden en-
 contrar utilización como efectores alostéricos, especialmen-
 te en el caso de hemoglobina, que tienen una mutación, tam-
 bién aniones orgánicos tales como ácidos policarboxílicos.
 Como ejemplo de una hemoglobina mutada se mencionará la "he-
 10 moglobina de Zürich" y como ejemplo de un ácido policarbo-
 xílico se mencionará ácido maleico.

Eritrocitos humanos, que habían sido manteni-
 dos durante 25 días a 4°C en medio tampón isotónico de pH
 7,4 ($P_{O_2} = 6,0$ Torr), fueron ajustados a pH 7,6
 15 ($P_{O_2}^{(1/2)} = 4,5$ Torr) y luego fueron incubados durante 1
 hora ($P_{O_2}^{(1/2)}$) a 37°C, en tampón Tris isotónico 0,1 molar de pH 7,6,
 que contenía 0,19 moles/litro de IHP, con vesículas V2, que
 habían sido cargadas con IHP. Después de incorporación de
 IHP en los eritrocitos subió drásticamente la presión de se-
 20 misaturación de O_2 ($P_{O_2} = 14,3$ Torr) en un factor de
 3,2 y sobrepasó el valor $P_{O_2}^{(1/2)}$ para eritrocitos recientes ($P_{O_2}^{(1/2)}$
 = 10,55 Torr) en un factor de 1,4.

Luego, estos eritrocitos cargados con IHP
 fueron mantenidos durante 6 días a 4°C en medio tampón iso-
 25 tónico de pH 7,6. La presión de semisaturación permaneció
 constante. Después de otros 4 días a 4°C fué modificado a
 7,28 el valor de pH de los eritrocitos cargados con IHP,
 subiendo nuevamente a 32,1 Torr la P_{O_2} . En otros en-
 sayos, eritrocitos lavados, que habían sido mantenidos du-
 30 rante 36 días a 4°C (más intensamente empobrecidos con DPG),

1 fueron ajustados a pH 7,6 y cargados con IHP del modo arriba descrito. También en este caso subió la $P_{O_2(1/2)}$ a 14,0 Torr. Las células cargadas con IHP fueron mantenidas a 37°C durante 2 días. Tampoco se comprobó ninguna modificación
5 de la afinidad para oxígeno después de almacenamiento a 37°C durante 2 días de estas células cargadas con IHP. A diferencia de eritrocitos normales, que durante el almacenamiento a 4°C manifiestan una disminución a la mitad de los polifosfatos fisiológicos, eritrocitos cargados con IHP no parecen
10 hidrolizar al IHP al menos durante un tiempo de 9 días, lo cual puede reconocerse por un valor constante de $P_{O_2(1/2)}$ (véase figura 5). Con los eritrocitos tratados de esta manera se pueden lograr por consiguiente tiempos de conservación esencialmente más largos.

15 Además de ello, las células sanguíneas rojas cargadas con IHP manifiestan un efecto Bohr más intenso que las células no tratadas (véase figura 6).

En ausencia de CO_2 , el efecto Bohr de eritrocitos, que habían sido incubados con vesículas V2 cargadas con IHP en presencia de IHP libre a pH 7,6 y habían sido
20 ajustados al deseado valor de pH por lavado con el oportuno tampón isotónico 0,1 molar, es $-\Delta P_{O_2(1/2)} \Delta pH = 1,20$ protones por mol de O_2 . El dato de protonés Bohr de eritrocitos cargados con IHP es tres veces mayor que en células
25 sanguíneas rojas recientes, normales. Por lo tanto, células cargadas con IHP hacen más eficaces a la cesión de oxígeno en los tejidos y a la absorción de oxígeno en los pulmones. La incorporación de IHP con vesículas V2 cargadas con IHP en presencia de IHP libre es mucho más eficaz a pH 7,8.
30 Después de que el valor de pH de las células cargadas con

1 IHP ha sido modificado a 7,4, puede observarse la subida
 teóricamente esperada a $P_{O_2} = 35$ Torr (véase figura
 6). Por otro lado, el efecto Bohr después de la incorpora-
 5 ción a pH 7,8 parece hacerse menor ($- P_{O_2} / pH =$
 $0,9$ protones por mol de O_2).

Influencia de la composición de vesículas sobre la absor-
ción de hexafosfato de inosita por eritrocitos humanos.

El "desplazamiento a la derecha" de la curva
 de fijación de O_2 es una medida de la cantidad de IHP absor-
 10 bida por eritrocitos humanos. Por consiguiente la presión
 de semisaturación de O_2 , medida en condiciones normalizadas,
 es una expresión del rendimiento de la incorporación de IHP.
 Este rendimiento de la absorción de IHP depende ampliamen-
 te de la composición de lípidos de las vesículas.

15 En la figura 7 se representa el "desplaza-
 miento a la derecha" de la curva de fijación de O_2 para las
 vesículas V1 y V2 después de incubación a pH 7,6. Las vesí-
 culas V2 manifiestan el más intenso "desplazamiento a la
 derecha" con una descarga de 14% a 30 Torr. Eritrocitos de
 20 19 días de edad no manifiestan ninguna descarga con esta
 presión de O_2 , mientras que células sanguíneas rojas recién
 tes se descargan hasta 5%. La incorporación de IHP con ayu-
 da de vesículas V2 mejora la cesión de oxígeno de las célu-
 las sanguíneas rojas normales a 30 mm de Hg en un factor de
 25 aproximadamente 3. Las vesículas V2 y V3 producen una igual
 absorción de IHP por eritrocitos y por lo tanto iguales
 "desplazamientos a la derecha" de las curvas de fijación
 de O_2 . En ausencia de IHP en el medio exterior, las vesícu-
 las V1, V2 y V3, que han absorbido IHP, no se diferencian
 30 en lo que se refiere a su tiempo de valor mitad de la absor

1 ción; $1/2$ es de 30 minutos. Las vesículas V1 y V3 muestran sólo menos de la mitad del efecto IHP, medido para vesículas V2 dializadas, cargadas con IHP.

5 Esto permite reconocer una estabilidad disminuida de las vesículas V1 y V3. En la figura 8 se representa la diferencia en la estabilidad entre vesículas V2 y V3. El tiempo de valor mitad de la estabilidad es, en el caso de las vesículas V2, de aproximadamente 3 días, y en el caso de las vesículas V3, de aproximadamente 1,5 días.

10 Incorporación de las vesículas en las células sanguíneas

La absorción de las vesículas de lípidos en eritrocitos intactos fué vigilada con las vesículas V1, V2 y V3 marcadas con ^{14}C -colesterina o ^{14}C -fosfatidilcolina. Esto fué comparado con la absorción de las mismas vesículas en células Hela cultivadas. La radioactividad fué medida tanto en los eritrocitos intactos (por solubilización y blanqueo con un juego de reactivos Lumac) como en sus extractos de lípidos totales (Folch). La incorporación fué vigilada durante un tiempo de 4 horas. Los resultados se representan en la figura 9 y en la figura 10. La figura 9 muestra los datos para las vesículas V1, V2 y V3 con eritrocitos intactos. El medio de incubación contenía 10 ml de RBC (células sanguíneas rojas) y 10 ml de vesículas cargadas con IHP en tampón bis-Tris isotónico 0,1 molar de pH 7,4. Se tomaron y contaron partes alícuotas después de 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. El tiempo de valor mitad de la incorporación es de 45 minutos para las vesículas V2 (que muestran también la máxima radioactividad en las RBC) y de 35 minutos para las vesículas V1 y V3. Hay que resaltar que la radioactividad encontrada en las RBC

1 no significa indispensablemente la absorción de vesículas,
ya que es bien sabido, (B.Bloj y D.Zilversmit, Biochemistry
16 (1977) 3943-3948) que es intercambiada colessterina entre
vesículas y eritrocitos. En los extractos de lípidos en RBC
5 (véase figura 10) se encontró un valor $t_{1/2}$ de 30 minutos
en el caso de utilizarse vesículas V2. Cuando se incorporan
vesículas V2 y V3 en células Hela, resulta el mismo cuadro
(véase figura 11). La incubación de las células Hela con
las vesículas se efectuó en las condiciones arriba descri-
10 tas. En otra serie de ensayos se incubaron células Hela con
vesículas que contenían ^{14}C -colessterina en tampones isotó-
nicos con diferentes valores de pH entre 7 y 8. La figura
12 muestra que las variaciones de pH entre 7 y 8 tenían só
lo poca influencia sobre la incorporación del lípido marca-
15 do en las células.

El tiempo de valor mitad de la absorción de
radioactividad por los eritrocitos era la misma, cuando és
tos habian sido incubados con vesículas marcadas radioacti-
vamente, que el tiempo de valor mitad de la absorción de
20 IHP por eritrocitos, que habían sido incubados con vesícu-
las dializadas, cargadas con IHP (figura 16). Esto es una
demostración adicional de que no sólo se había medido el
intercambio de lípidos entre células sanguíneas y vesícu-
las, sino también el fusionamiento de las vesículas con
25 las células sanguíneas.

Los cromatogramas en capa delgada del extrac-
to de lípidos de los eritrocitos mostraron el enriquecimien-
to de los lípidos de membranas de RBC con los lípidos de
las vesículas.

30 Optimo aparente de pH de la absorción de IHP inducida por

1 V2 mediante células sanguíneas rojas humanas almacenadas

La absorción de IHP por eritrocitos lavados depende del valor de pH del medio de incubación. La representación gráfica de la $P_{O_2}^{(1/2)}$ de eritrocitos cargados con IHP en función del valor de pH del medio de incubación (véase figura 13) muestra un claro óptimo del pH de la absorción de IHP en el margen de valores de pH de 7,4 a 7,5. La disminución de $P_{O_2}^{(1/2)}$ por encima de pH 7,5 corresponde a la curva del efecto Bohr representada en la figura 6 y se encuentra en correlación con la disminución de la afinidad de IHP para hemoglobina. Por debajo de pH 7,4, la drástica disminución de $P_{O_2}^{(1/2)}$ permite reconocer una limitada absorción de IHP, de manera que no se observa el valor teóricamente esperado de $P_{O_2}^{(1/2)}$ para hemoglobina totalmente convertida por IHP fijado. La variación del valor del pH del medio tampón a 7,4 después de incubación a pH 7,8 aumenta el valor de $P_{O_2}^{(1/2)}$ de hemoglobina dentro de los eritrocitos a valores de 30 hasta 40 Torr a 25°C, tal como se representa en la figura 6. La incubación a pH 7,8 y el cambio por tamponamiento a diferentes valores de pH conducen a un aumento de $P_{O_2}^{(1/2)}$ a lo largo de todo el margen de pH. Este resultado permite obtener la conclusión de que la incorporación de IHP en eritrocitos es más eficaz por encima de pH 7,4, aunque también es eficaz con valores de pH más bajos.

25 Cinética de la absorción de IHP por células sanguíneas rojas humanas conservadas.

La figura 14 muestra la disminución en función del tiempo de la afinidad de eritrocitos para oxígeno después de incubación con vesículas V2 cargadas con IHP en

1 solución 0,19 molar de IHP a pH 7,35. El aumento de P_{O_2} (1/2)
alcanza su valor mitad del máximo después de 4 minutos.
La cinética de la absorción de IHP, medida como aumento de
 P_{O_2} , depende del valor de pH del medio de incubación.
5 En la figura 15 se registra el tiempo de valor mitad de la
incorporación de IHP en función del valor de pH. La absor-
ción de IHP es a un valor de pH bajo (pH 7,3) una reacción
más lenta y a un valor de pH más elevado (pH 7,7) una reac-
ción más rápida. El más corto tiempo de valor mitad de la
10 absorción con elevado valor de pH corresponde a la mayor
cantidad del IHP incorporado en los eritrocitos (véanse fi-
gura 6 y figura 13).

La cinética de la incorporación de IHP es
influida de un modo intenso por la presencia de IHP libre
15 en el medio exterior. La eliminación de IHP libre por diá-
lisis o filtración a través de gel de la suspensión de ve-
sículas conduce a una prolongación del tiempo de valor mi-
tad de la absorción de IHP a 30 minutos a pH 7,4 (véase fi-
gura 16).

20 Concentración de ATP en eritrocitos cargados con IHP

El contenido de trifosfato de adenosina (ATP)
que poseen los eritrocitos, tiene gran interés desde el pun-
to de vista de la conservación de células sanguíneas rojas y
del mantenimiento del funcionamiento correcto. La concen-
25 tración de ATP fué medida en células sanguíneas rojas, en
las que vesículas V2 vacías y vesículas V2 cargadas con IHP
habían sido incorporadas en las condiciones descritas. To-
das las mediciones fueron llevadas a cabo en tampón bis-Tris
isotónico 0,1 molar de pH 7,4. La concentración de ATP fué
30 medida con el sistema luciferina-luciferasa:

1 mas condiciones hemoglobina cargada sólo hasta 53% con O_2 .
Aproximadamente un 60% de la hemoglobina en los eritrocitos
ha fijado IHP después de la fusión con los eritrocitos de
las vesículas cargadas con IHP.

5 En condiciones fisiológicas (a 37°C) se cal-
cula a pH 7,4 una presión de semisaturación de O_2 de 60 Torr
para eritrocitos cargados con IHP. Bajo una presión parcial
de O_2 crítica de 30 Torr en el cerebro 80% de la hemoglobi-
na cedería el oxígeno fijado desde eritrocitos tratados con
10 vesículas, mientras que eritrocitos no tratados, normales,
cederían en estas condiciones sólo 20 a 25% del oxígeno. La
afinidad efectiva de los eritrocitos puede ser hecha variar
entre estos dos límites o bien por medio de variación de la
concentración de IHP en las vesículas de lípidos o bien por
15 medio de variación de la proporción de eritrocitos tratados
a eritrocitos no tratados en la sangre.

Este resultado muestra que el método, propues-
to según el invento, de la incorporación de IHP en los eri-
trocitos, hace posible una disminución intensa y regulada
20 de la afinidad para oxígeno de hemoglobina en células intactas.
Los eritrocitos cargados con IHP de este modo son espe-
cialmente idóneos para la regulación del abastecimiento de
oxígeno a los tejidos en los casos arriba mencionados.

Acomodación de ratas y perros a grandes alturas

25 Una rata con un peso corporal de 200 g y un
volumen de sangre de 14 ml ($P_{O_2} = 14,0$ Torr a 25°C y
pH 7,4) fué mantenida en una cámara bajo una presión parcial
de O_2 en disminución. Con una presión parcial de O_2 de 120
Torr correspondiente a una altura de 13.200 metros la rata
30 tropezaba y caía al suelo como consecuencia del déficit de

1 oxígeno en los músculos de las extremidades. Luego la presión de oxígeno en la cámara fué llevada de nuevo rápidamente al valor normal, después de lo cual la rata se comportó de manera normal. De este animal se tomó 1 ml de sangre.

5 Los eritrocitos fueron aislados y cargados con IHP del modo arriba descrito. Los eritrocitos cargados con IHP fueron suspendidos de nuevo en el plasma ($P_{O_2(1/2)} = 28,0$ Torr a 25°C y pH 7,4) y fueron luego transferidos de retorno a la rata. Después de que se hubo disminuido entonces la presión

10 parcial de O_2 , la rata tropezaba y caía al suelo a 100 mm de Hg (aproximadamente 14.200 metros de altura). Este tratamiento provocó por consiguiente una elevación en + 8% del límite superior de la altura. El ensayo de acomodación a la altura fué repetido 24 horas más tarde con esta rata y condujo al mismo resultado.

En otro ensayo, un perro con un peso corporal de 9 kg y un volumen de sangre de 630 ml ($P_{O_2(1/2)} = 10,8$ Torr a 25°C y pH 7,4) fué mantenido en una cámara bajo una presión parcial de O_2 en disminución. A una presión parcial

20 de O_2 de 140 Torr (= 12.200 metros de altura) el perro tropezaba y caía al suelo. Luego la presión de O_2 en la cámara fué llevada con rapidez nuevamente al valor normal, después de lo cual el perro se comportaba de modo normal. De este perro se tomaron 100 ml de sangre. Los eritrocitos fueron

25 aislados y cargados con IHP del modo descrito bajo "métodos". Los eritrocitos cargados con IHP fueron suspendidos de nuevo en suero ($P_{O_2(1/2)} = 15,0$ Torr a 25°C y pH 7,4) y luego fueron transferidos de retorno al perro. Después de la disminución de la presión parcial de O_2 el perro cayó

30 al suelo a 110 Torr (= 13800 metros de altura). Este trata-

1 miento provocó por consiguiente una elevación de + 13% del límite superior de la altura. Esta altura superior fué medida a lo largo de 2 días con el mismo resultado.

5 Ambos animales estaban llenos de vida y en buen estado, cuando fueron observados finalmente 4 meses (en el caso de las ratas) y 1 mes (en el caso de los perros) tras los ensayos.

Eritrocitos humanos con una mutante de hemoglobina de elevada afinidad para O_2

10 Una paciente de 19 años con una mutante de hemoglobina de estructura desconocida (Hb_{Mainz}) con alta afinidad para oxígeno donaba sangre. A $25^{\circ}C$ y pH 7,4 sus eritrocitos recientes manifestaban un valor de $P_{O_2(1/2)}$ de 7,5 Torr. Por consiguiente la aportación de oxígeno a los tejidos había sido disminuida a 50%. Por causa del déficit de oxígeno en sus tejidos esta paciente recibió cada 6 semanas transfusiones de sangre. La carga de estos eritrocitos con IHP del modo descrito bajo "métodos" tuvo como consecuencia de la $P_{O_2(1/2)}$ hasta 18,7 Torr. Esto muestra que la alta afinidad de la sangre de esta paciente para oxígeno puede ser disminuida según el procedimiento conforme al invento a valores que se encuentran por encima del valor normal de eritrocitos recientes y corresponden a un aumento de la aportación de oxígeno de + 23% de un intercambio completo de sangre.

25

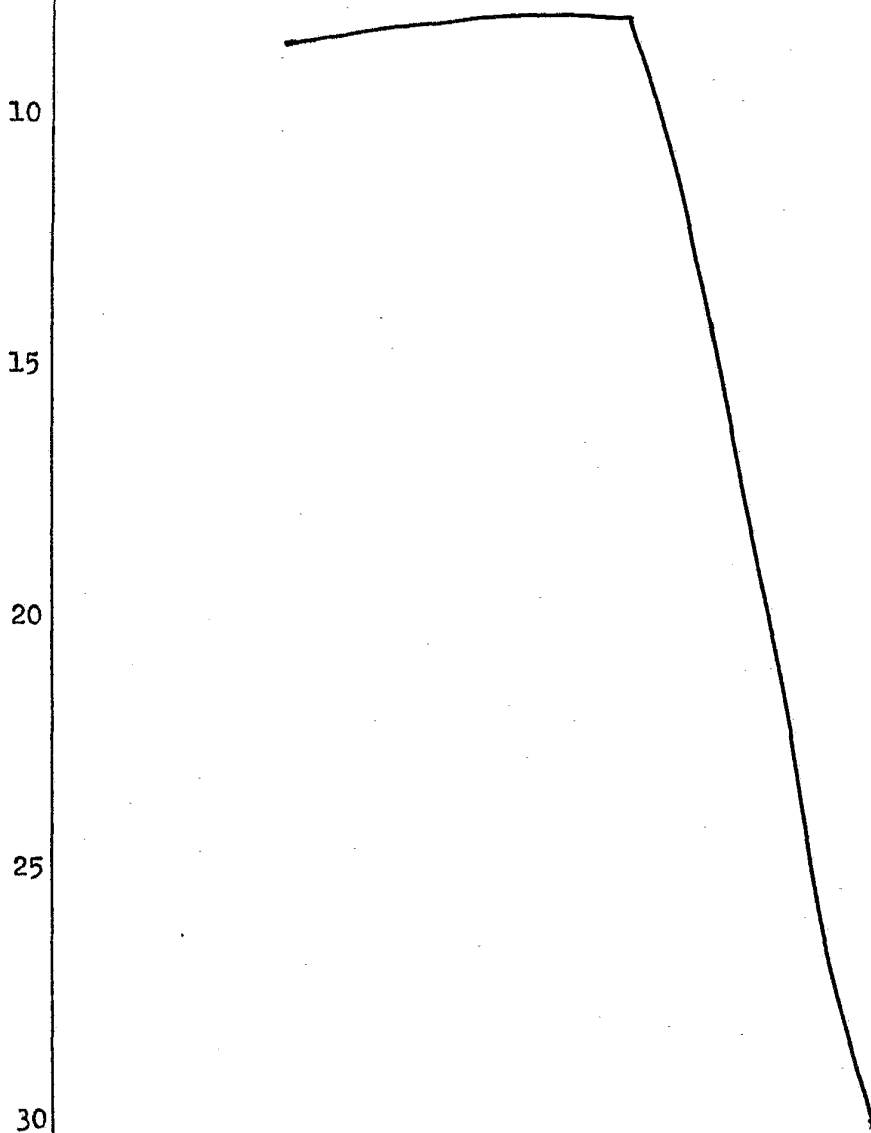
DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1 En ordenadas se representa la presión de semi saturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$, y en abscisas, el tiempo de almacenamiento de los eritrocitos a $4^{\circ}C = TC$.

30

- 1 Figs. 2 y 3: En ordenadas se representa la saturación = S
- Fig. 4 : En ordenadas se representa la presión de se-
misaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$.
- 5 Fig. 5 : En ordenadas se representa la presión de
semisaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$, y en absci-
sas, el tiempo de almacenamiento de los eri-
troцитos a 42°C = TC, significando II la in-
corporación de IHP y DP la degradación de
los polifosfatos.
- 10 Fig. 6 : En ordenadas está representada la presión
de semisaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$.
- Fig. 7 : En ordenadas se representa la saturación = S
- Fig. 8 : En ordenadas se representa la presión de
semisaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$, y en absci-
sas, el tiempo de almacenamiento de las ve-
sículas a 37°C = TV.
- 15 Fig. 9 : En abscisas está representado el tiempo de
incubación = TI, significando Cm, coleste-
rina marcada y V, vesículas.
- 20 Figs. 10 y 11: En abscisas se representa el tiempo de in-
cubación = TI, y en la figura 11, V signi-
fica vesículas.
- Fig. 12 : O significa las vesículas V3 marcadas con
 ^{14}C -colesterina y X, las vesículas V2 mar-
cadas.
- 25 Figs. 13 y 14: En ordenadas se representa la presión de
semisaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$, y en las
abscisas de la figura 14, el tiempo de in-
cubación a 37°C = TI.
- 30 Fig. 15 : En ordenadas está representado el tiempo de

- 1 semiincubación = TS.
- Fig. 16 : En ordenadas se representa la presión de semisaturación de $O_2 = P_{O_2(1/2)}$, y en abscisas, el tiempo de incubación a $37^{\circ}C = TI$.
- 5 Fig. 17 : En ordenadas se representa la saturación de $O_2 = SAT$.



REIVINDICACIONES

1

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 preparación de eritrocitos intactos modificados, que garantizan una cesión mejorada de oxígeno de la sangre, y a los que son incorporados irreversiblemente efectores alostéricos con ayuda de vesículas de lípidos y estos efectores alostéricos son fijados a la hemoglobina en los eritrocitos, caracterizado por que se incorporan de modo irreversible vesículas de lípidos cargadas con efectores alostéricos en fluidos vehiculos en el interior de los eritrocitos, y se fijan los efectores alostéricos a la hemoglobina en los eritrocitos.

15 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque a), se disuelve hexafosfato de inosita en una solución tampón isotónica, hasta que esté saturada la solución, b) se suspende en esta solución una mezcla de lípidos que contiene fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colessterina en la proporción molar de 10 hasta 5 : 4 hasta 1 : 10 hasta 3, c) se somete la suspensión obtenida a la desintegración con ultrasonidos o a un procedimiento de inyección, d) se centrifuga la mezcla y de este modo se separa la suspensión sobrenadante, que contiene las pequeñas vesículas de lípidos enriquecidas con hexafosfato de inosita así como hexafosfato de inosita libre, e) se suspenden

30
27108



1 después de ello eritrocitos humanos, que previamente han
sido separados por centrifugación del plasma sanguíneo, en
la suspensión sobrenadante, que contiene las pequeñas vesicu
5 las de lípidos enriquecidas con hexafosfato de inosita así
como con hexafosfato de inosita libre, f) se incuba la sus
pensión obtenida y de este modo se fusionan las vesículas
con los eritrocitos, y g) se lavan los eritrocitos intac
tos, ahora modificados, con solución isotónica de sal común
o con tampón isotónico y se les libera cuantitativamente
10 de hexafosfato de inosita libre existente en el exterior y
se les suspende en el plasma sanguíneo o en soluciones sus
titutivas de plasma sanguíneo.

15 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª y 2ª, caracterizado porque el efector alostérico es hexa
fosfato de inosita.

20 4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª y 2ª, caracterizado porque los efectores alostéricos
son fosfato de azúcares tales como pentafofosfato de inosita,
tetrafosfato de inosita, trifosfato de inosita, difosfato
de inosita y difosfato de difosfatidil-inositol.

25 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª y 2ª, caracterizado porque los efectores alostéricos
son polifosfatos tales como trifosfatos de nucleótidos, di
fosfatos de nucleótidos, monofosfatos de nucleótidos y és
teres de fosfato de alcoholes.

6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª y 2ª, caracterizado porque los efectores alostéricos son
aniones orgánicos tales como ácidos policarboxílicos.

7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª y 2ª, caracterizado porque los efectores alostéricos son

1 aniones inorgánicos tales como hexacianoferrato, fosfato y
cloruro.

5 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª a 7ª, caracterizado porque las vesículas de lípidos son
mezclas de fosfatidilcolina/fosfatidilserina/colesterina en
la proporción molar de 10 hasta 5 : 4 hasta 1: 10 hasta 3.

10 9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª, 3ª y 8ª, caracterizado porque el efector alostérico es
hexafosfato de inosita y las vesículas de lípidos son una
mezcla de fosfatidilcolina/fosfatidilserina/colesterina en
la proporción molar de 8 : 2 : 7.

10ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
ERITROCITOS INTACTOS MODIFICADOS".

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an
tecede, representado en los dibujos que se acompañan y para
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y seis hojas es
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 18.ENE.1979

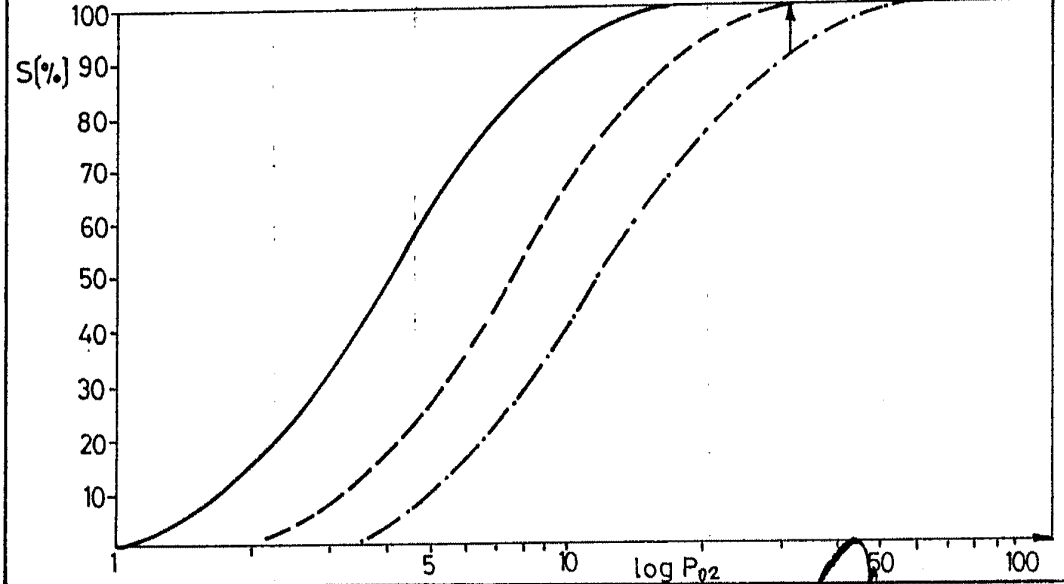
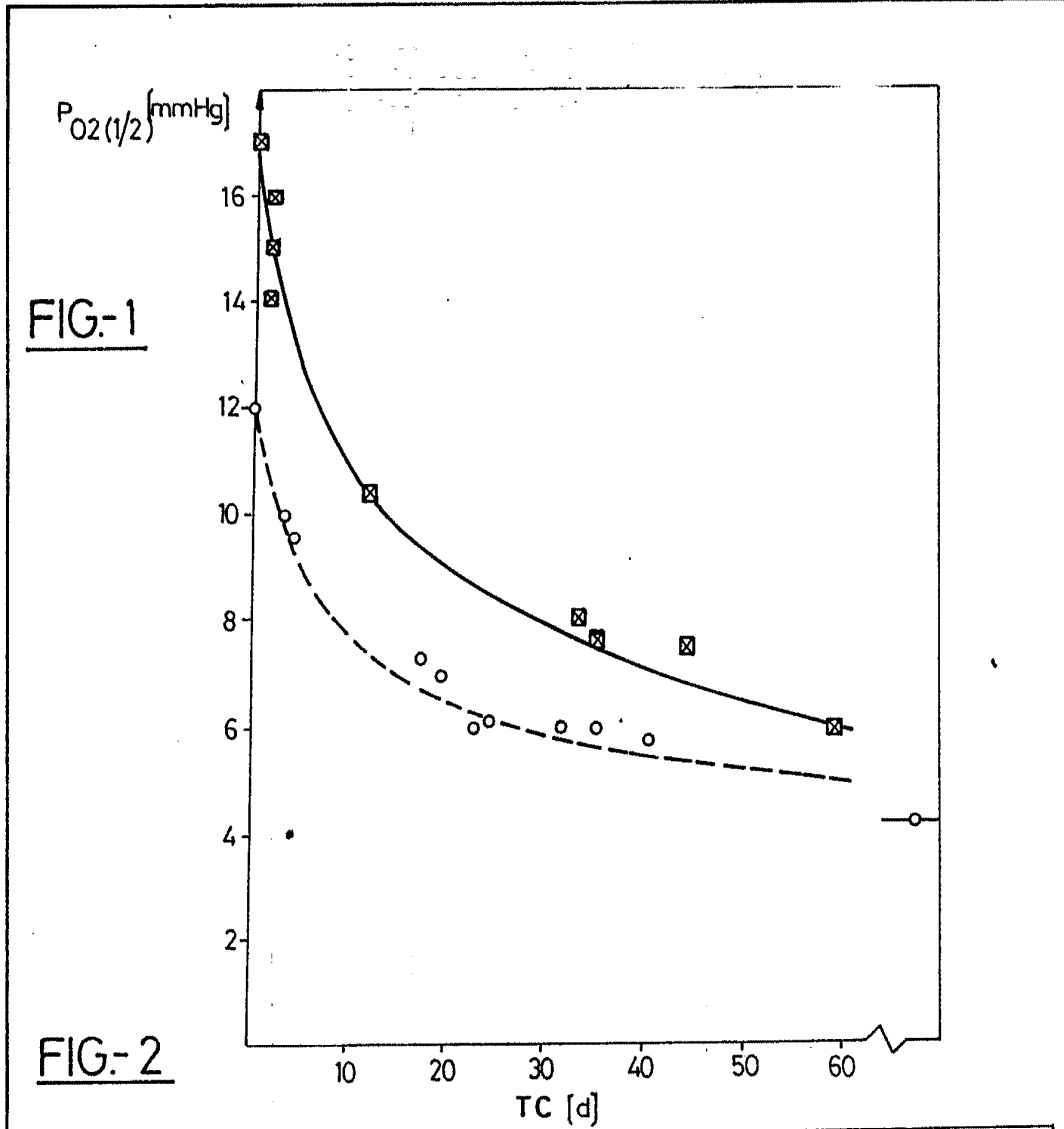
P.A.

Fernando de Elizaburu
Per Poder.

20

25

30
26108



Fernando de Elzaburu
Por Pedro.

FIG.- 3

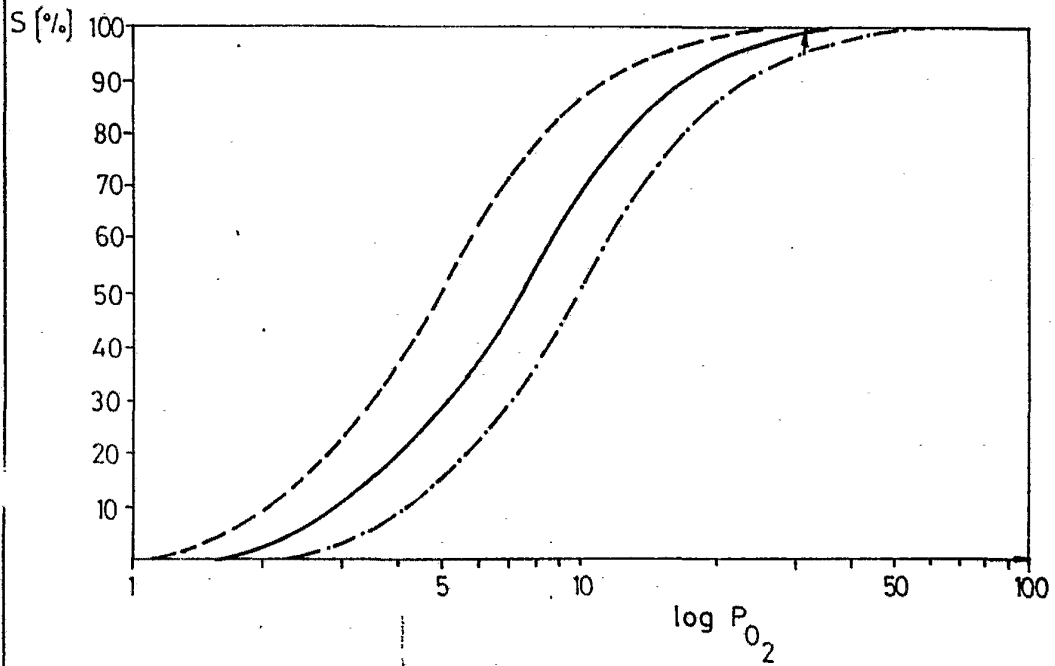
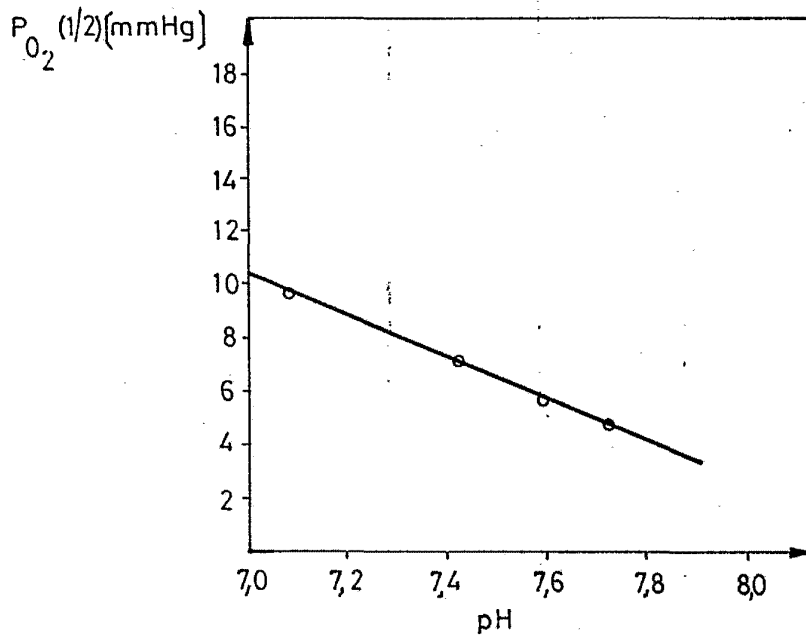
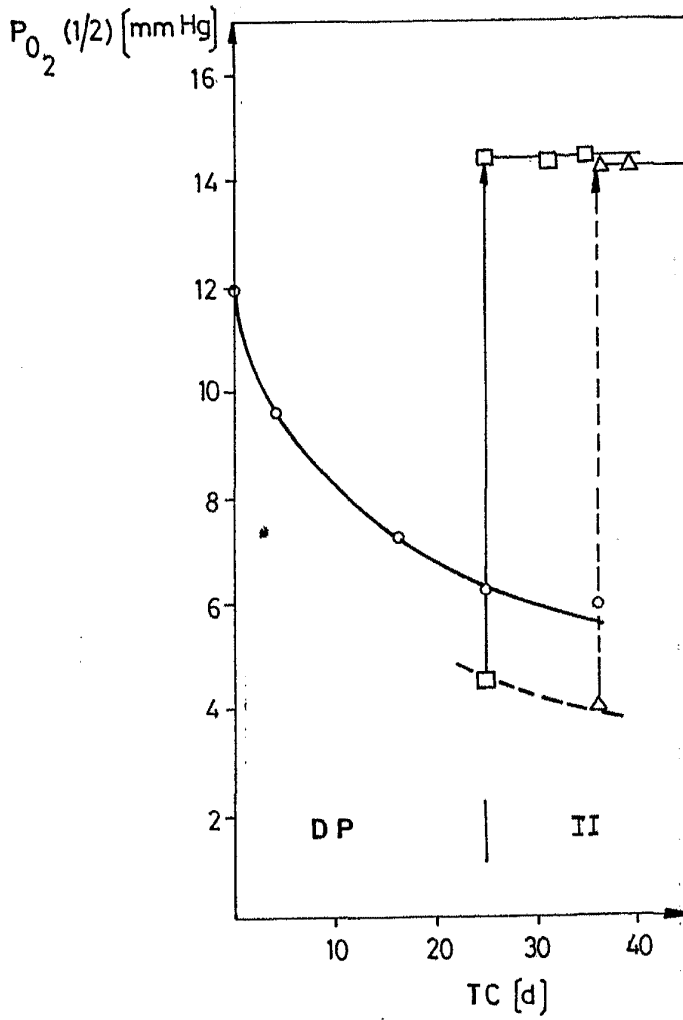


FIG.- 4

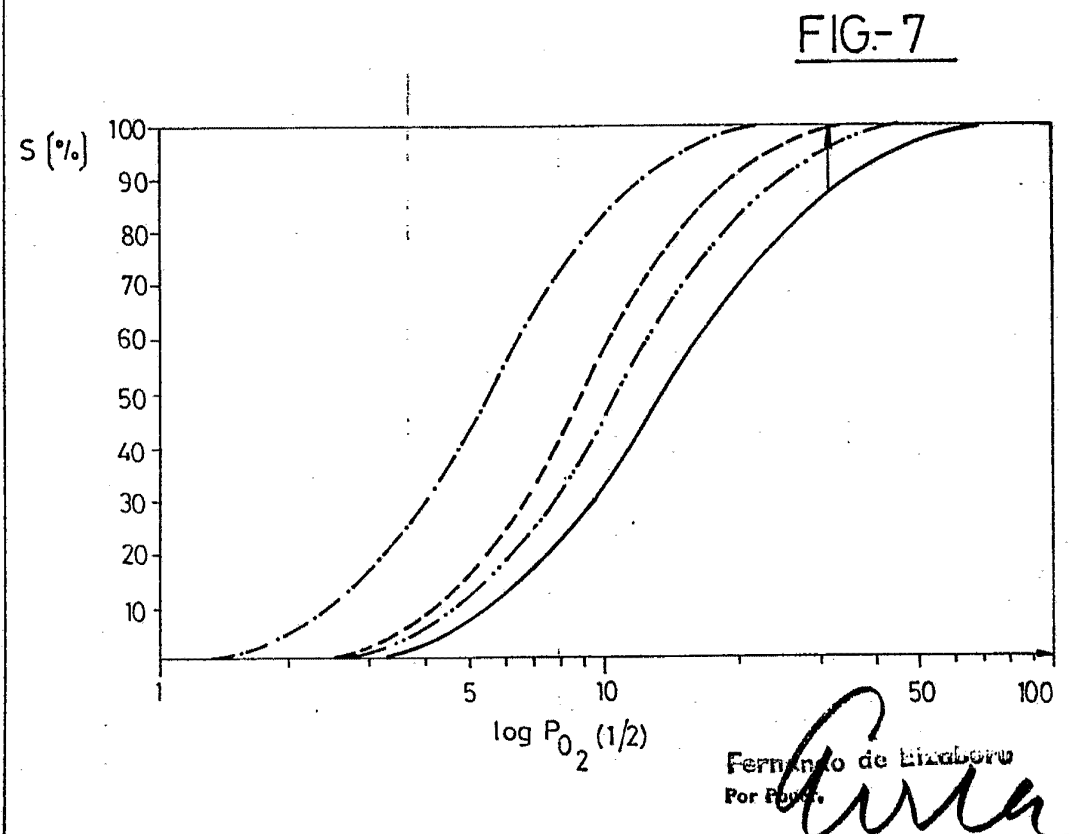
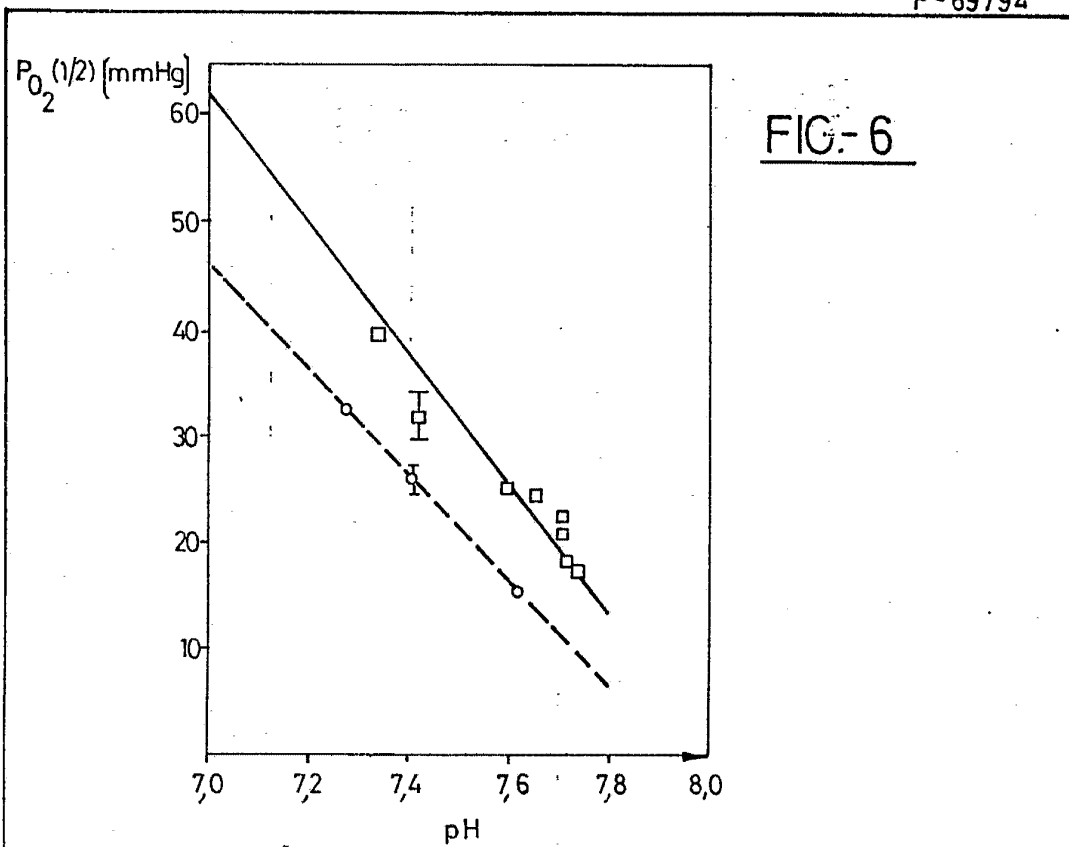


Fernando de Alzoburu
Por Poder

FIG.-5



Fernando de Lizaburu
Por Poder



$P_{O_2} (1/2)$ (mm Hg)

FIG- 8

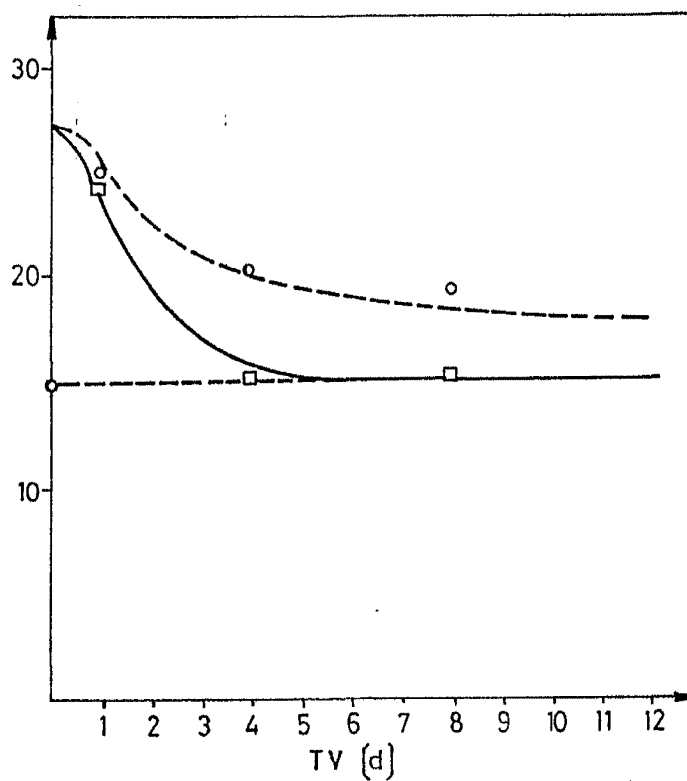
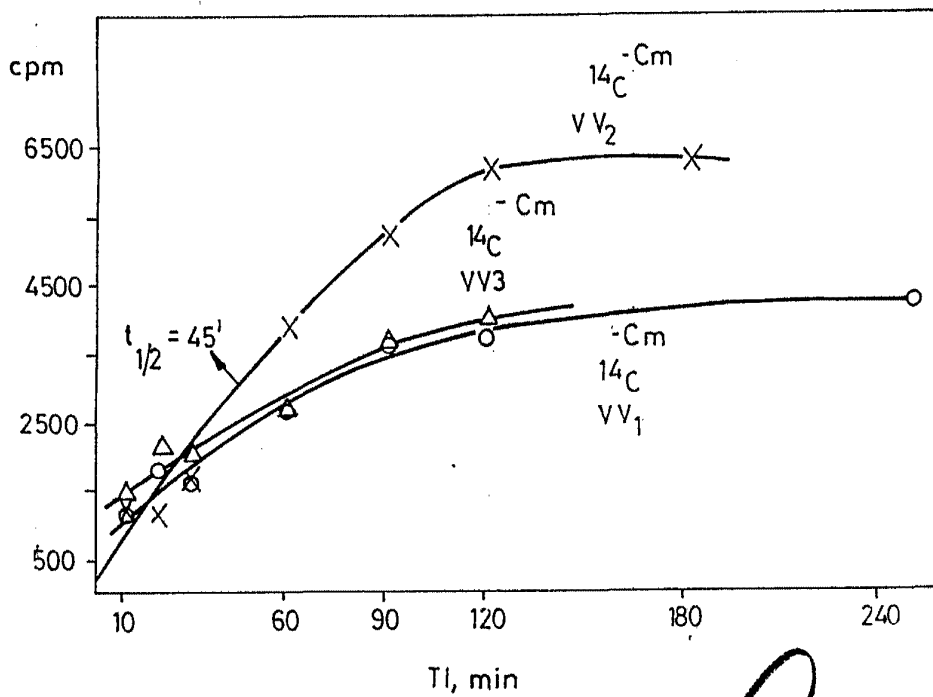
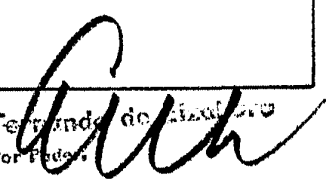
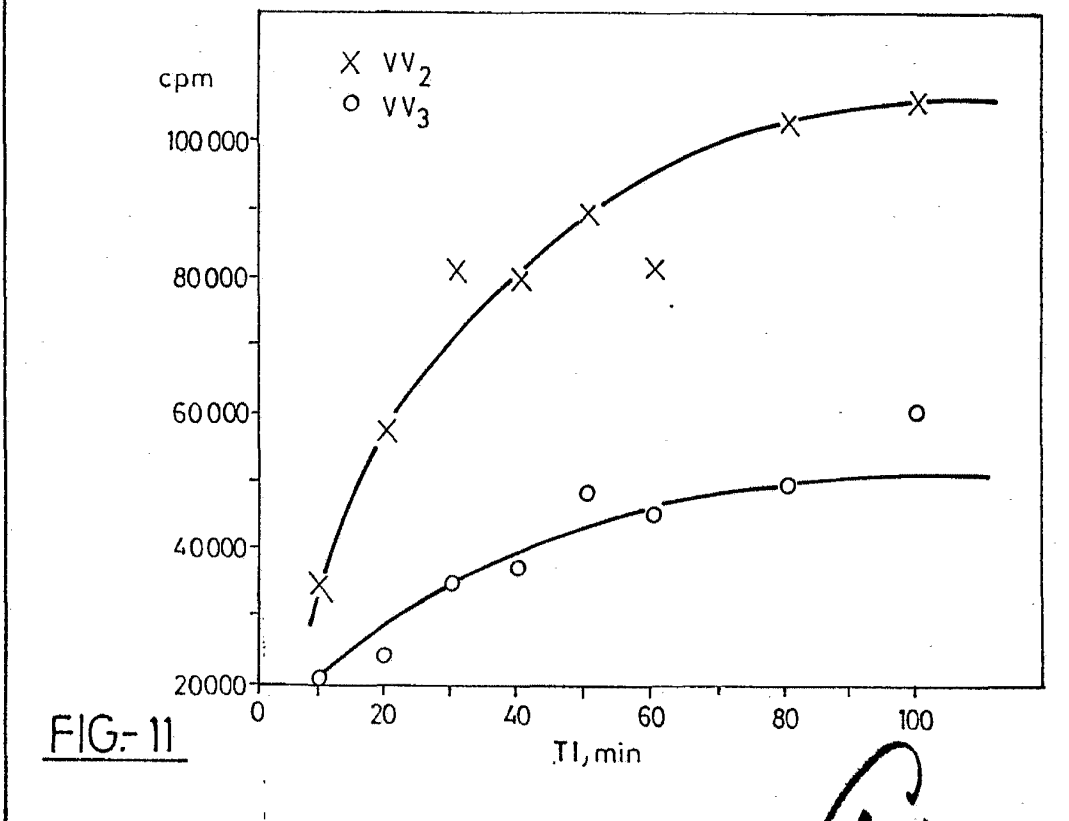
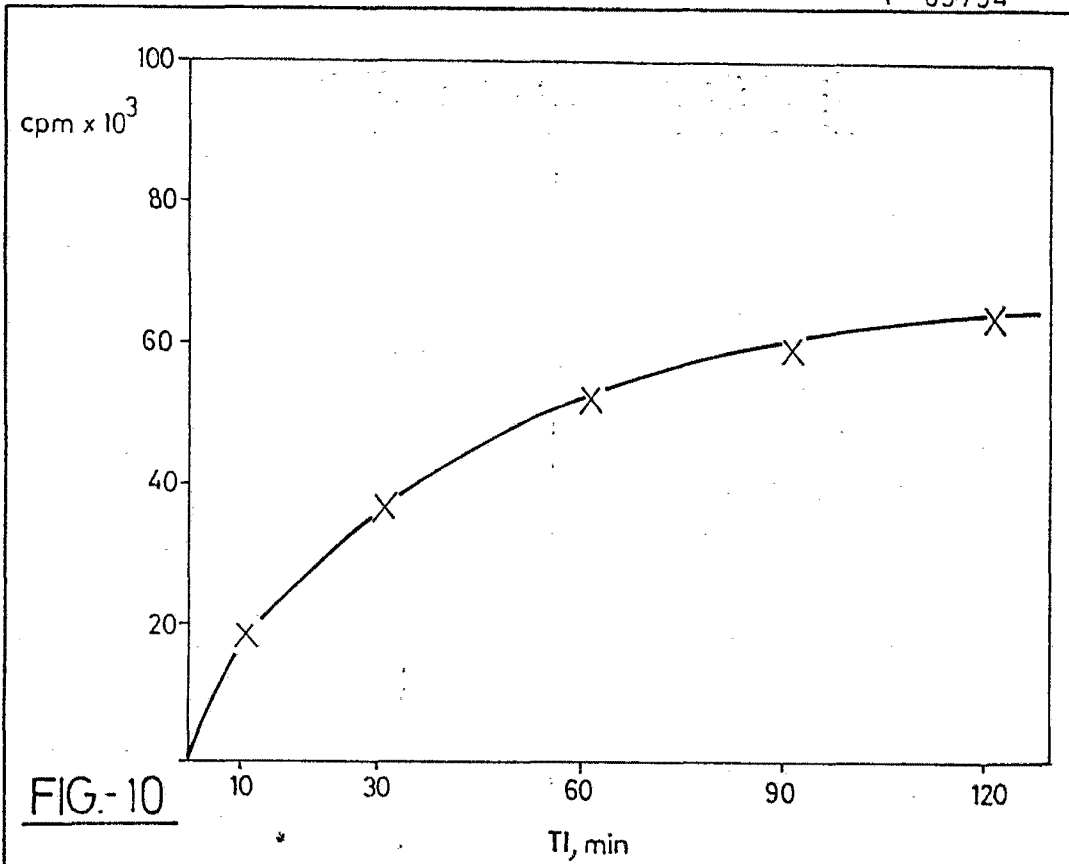


FIG- 9



Fernando de Alencar
 For Peder





Fernando de Elzabur
Por Pedro

FIG: 12

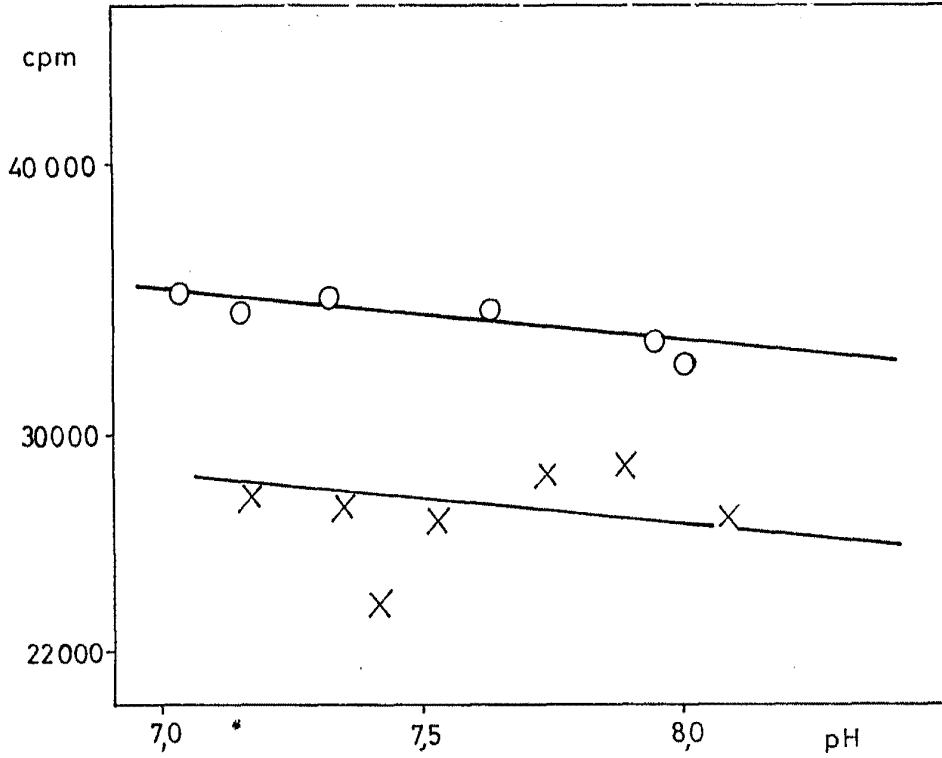
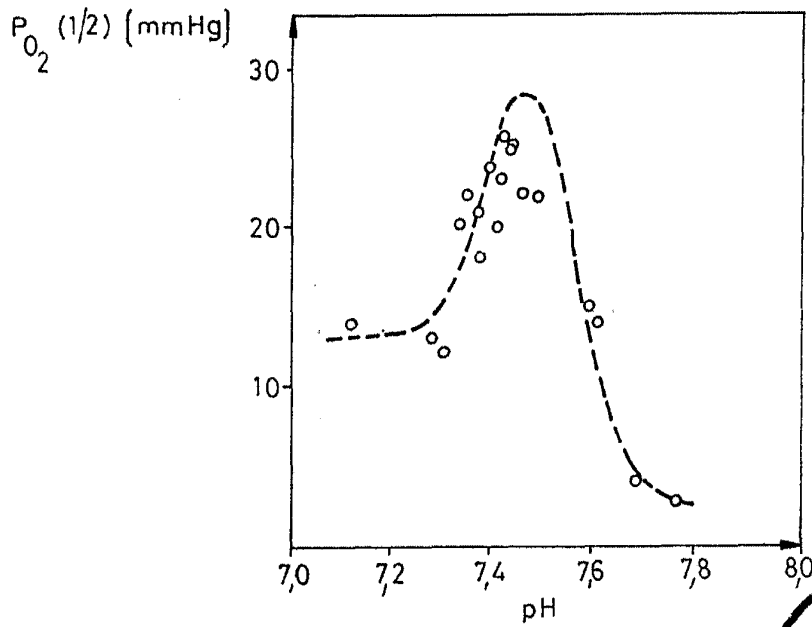


FIG- 13



Fernando de Elizauri
Por Fidei.

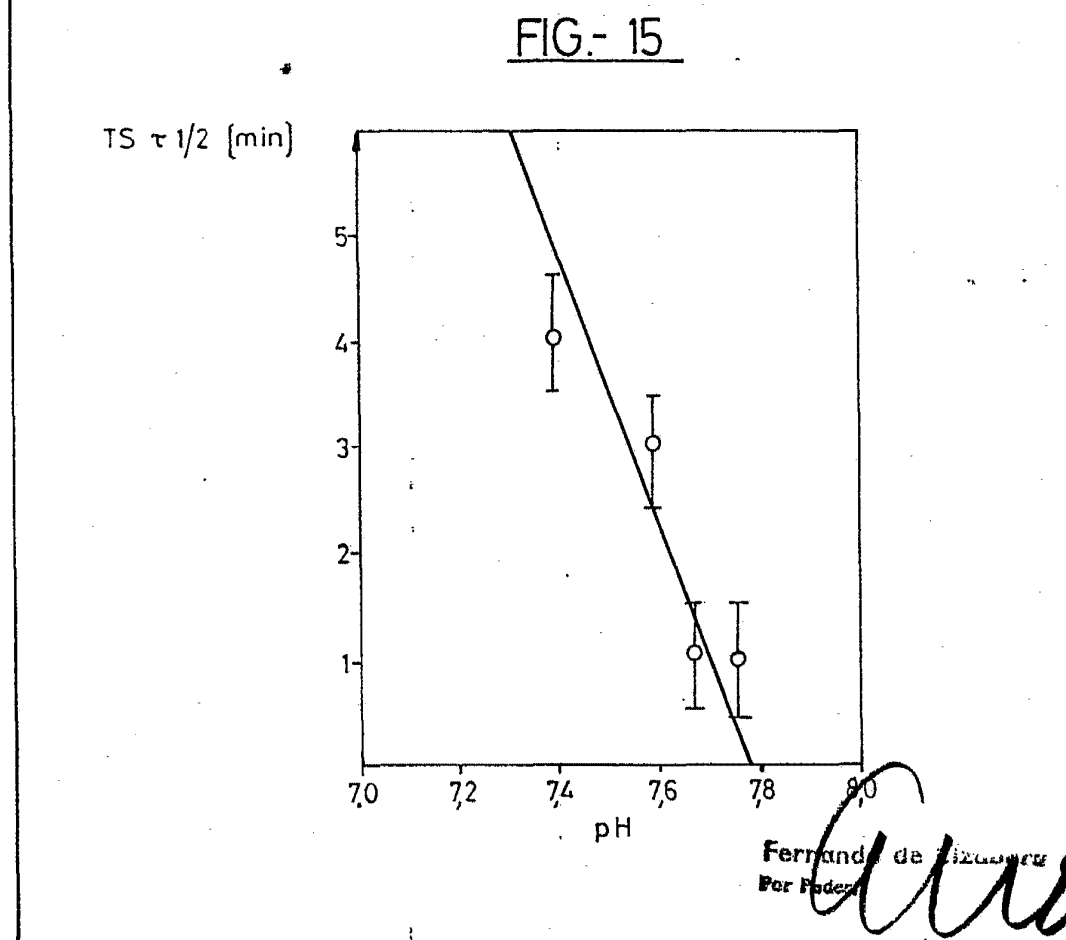
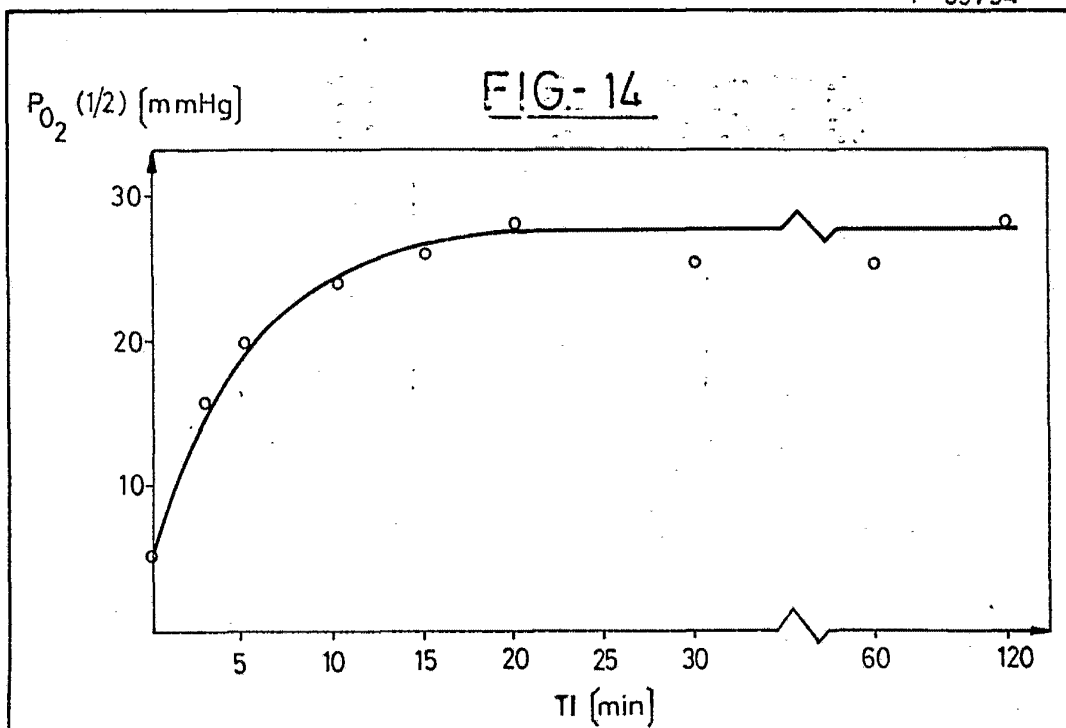


FIG-16

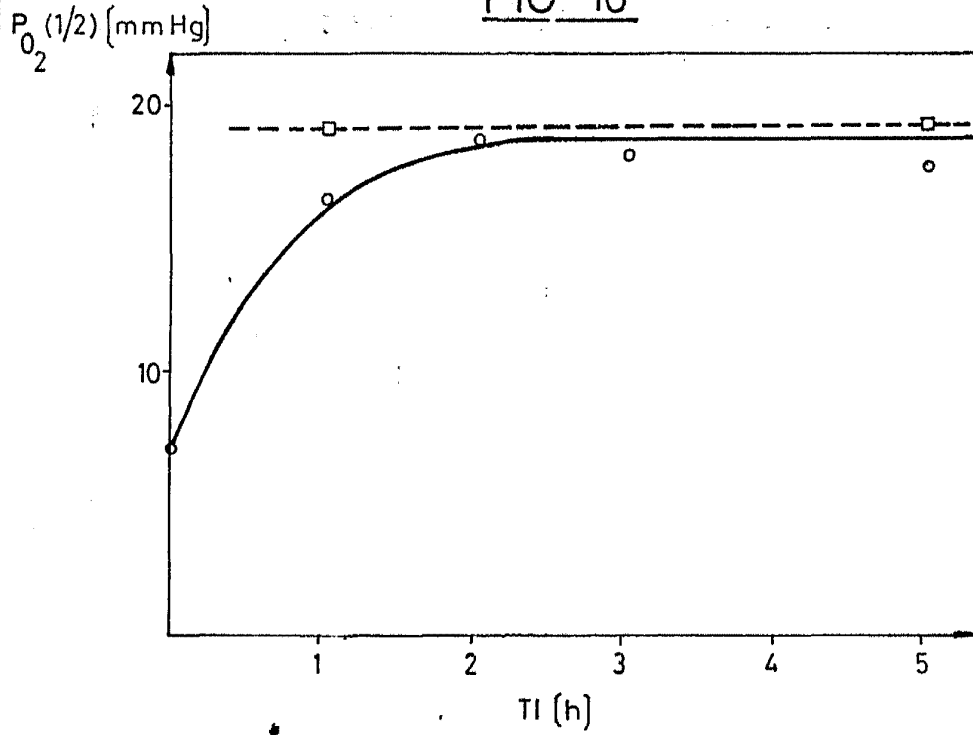
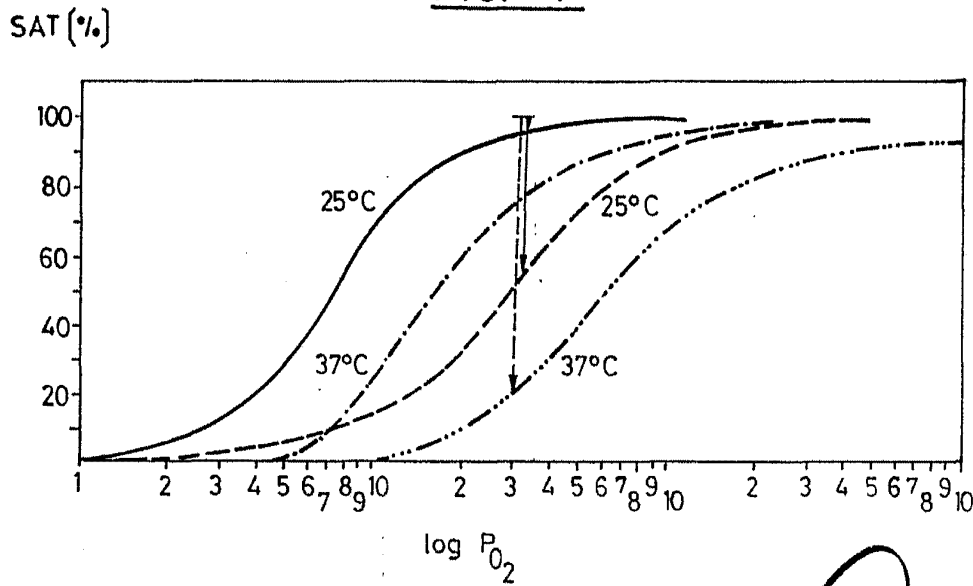


FIG-17



Fernando de Elzore
Per Fedco