

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 21511**

---

(54) Procédé, matériau et filtre contenant ce matériau pour la séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). G 01 N 33/48; B 01 D 39/02.

(22) Date de dépôt..... 8 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 9 octobre 1979, n° 129.482/79.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 17-4-1981.

---

(71) Déposant : Société dite : ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA, résidant au Japon.

(72) Invention de : Toru Kuroda, Yoshinori Takenaka et Nobuaki Tsuda.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein,  
20, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention concerne la séparation des leucocytes ou des lymphocytes d'une suspension contenant des leucocytes, plus particulièrement, elle concerne un matériau utilisé pour la séparation des leucocytes ou lymphocytes d'une suspension contenant des leucocytes, un procédé pour la mise en œuvre d'une telle séparation et un filtre contenant ledit matériau utilisé pour cette séparation.

Le terme "suspension contenant des leucocytes" utilisé ici désigne le sang et d'autres fluides du corps contenant des leucocytes. Ce terme doit être aussi interprété comme désignant le sang traité de façon physique, chimique et/ou biologique et d'autres fluides du corps tels que, par exemple, du sang dilué avec une solution physiologique et du sang comprenant un agglutinant tel que le dextran ou un glycogène hydroxyéthyle des érythrocytes.

A cause des récents progrès en hématologie et immunologie, des transfusions de composants sanguins, des tests de leucocytes, des inspections des antigènes de surface des leucocytes et des mesures des taux de sous-population de lymphocytes sont fréquemment réalisés et les résultats de ces tests sont utilisés pour diagnostiquer et soigner de nombreuses maladies. De plus, des tests pour classer et séparer des sous-tests tels que cellules T "aide et suppresseur" ("helper and suppressor T. Cells") ont été réalisés dans de nombreux hôpitaux et instituts de recherches.

Comme procédés conventionnels pour piéger et recueillir les leucocytes ou les lymphocytes applicables aux usages précités, on peut mentionner un procédé utilisant un agglutinant d'érythrocytes, un procédé de séparation par centrifugation et un procédé utilisant les propriétés d'adhérence des leucocytes ou des lymphocytes aux fibres.

Selon le procédé utilisant un agglutinant des érythrocytes, du dextran, du glycogène hydroxyéthyle ou d'autres agglutinants d'érythrocytes sont ajoutés au sang, on laisse le sang décanter pendant un certain temps, puis la partie surnageante riche en leucocytes est récupérée. Selon le procédé de séparation par centrifugation, le sang

est soumis à une séparation par centrifugation et une  
peau épaisse riche en leucocytes est recueillie, et selon  
le procédé de séparation par centrifugation à gradient  
de densité, une couche de sang est superposée à une couche  
5 de liquide ayant une densité de 1,077, les couches super-  
posées sont centrifugées et la couche contenant des  
lymphocytes est recueillie. En ce qui concerne le procédé  
utilisant les propriétés d'adhérence des leucocytes ou des  
lymphocytes aux fibres, on peut mentionner un procédé où  
10 les monocytes et les granulocytes adhèrent aux fibres,  
les hématocytes adhérant étant récupérés en utilisant une  
solution saline physiologique ou une solution saline  
physiologique tamponnée à l'acide phosphorique, et un  
procédé comprenant les étapes de préparer une fraction  
15 riche en leucocytes en utilisant un coagulant ou un  
séparateur à centrifugation, d'introduire la fraction riche  
en leucocytes dans une colonne remplie de fibres de nylon  
ou de laine de verre, de maintenir la fraction à 37°C pendant  
environ 30 minutes dans la colonne et enfin de récupérer  
20 les lymphocytes.

Cependant, ces méthodes connues ne sont pas  
satisfaisantes en ce que des quantités relativement impor-  
tantes d'érythrocytes et de plaquettes sont contenues  
dans les fractions recueillies de leucocytes ou de lympho-  
25 cytes. Si des quantités importantes d'érythrocytes et de  
plaquettes sont contenues, des erreurs importantes se  
produisent pendant les tests utilisant des leucocytes et  
des lymphocytes, et souvent ces tests sont impossibles  
à mener à bien.

30 Plus spécifiquement, dans le procédé utilisant  
un agglutinant des érythrocytes, le nombre d'érythrocytes  
incorporés peut aller jusqu'à 15 fois le nombre de leuco-  
cytes, et le nombre de plaquettes incorporées peut être  
plusieurs dizaines de fois plus important que le nombre  
35 de leucocytes. Dans le procédé de séparation par centri-  
fugation où l'on récupère une peau épaisse, le nombre  
d'érythrocytes et de plaquettes incorporés peut représenter  
jusqu'à 15 fois le nombre de leucocytes, et dans le procédé

de séparation par centrifugation à gradient de densité, le nombre de plaquettes incorporées peut être plusieurs fois plus important que le nombre de lymphocytes. Dans le procédé de séparation par centrifugation à gradient de densité, le nombre d'érythrocytes peut être réduit jusqu'au dixième du nombre des lymphocytes. Cependant, dans le cas où la densité est réduite dans certains des érythrocytes, comme dans le sang des malades, le nombre d'érythrocytes peut représenter jusqu'à 15 fois le nombre des lymphocytes. De plus, comme l'opération est compliquée et qu'un temps relativement long est requis pour l'achèvement de la séparation, les leucocytes obtenus sont endommagés et on observe souvent une réduction des fonctions des leucocytes ou une réduction du taux de survie des leucocytes. Dans le procédé utilisant l'adhérence des hématocytes aux fibres, le nombre d'érythrocytes ou de plaquettes peut souvent représenter jusqu'à 15 fois le nombre des lymphocytes ou des granulocytes.

En conséquence, le principal objet de la présente invention consiste à permettre la séparation des leucocytes ou des lymphocytes d'une suspension contenant des leucocytes avec une incorporation d'autres composants, tels que les érythrocytes et les plaquettes dans les suspensions recueillies riches en leucocytes ou en lymphocytes réduite au minimum.

Selon un premier aspect de la présente invention, on prévoit un matériau pour séparer les leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes comprenant un matériau fibreux ayant une couche de surface composée d'une substance qui se dissout dans l'eau petit-à-petit.

Selon un deuxième aspect de la présente invention, on prévoit un procédé de séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, qui comprend les étapes de mettre la suspension contenant des leucocytes en contact avec le matériau pour la séparation des leucocytes indiqué ci-dessus, pour ainsi piéger une partie importante des leucocytes dans le matériau pour la séparation des leucocytes, puis recueillir les leucocytes piégés dans le

matériau pour la séparation des leucocytes.

Selon un troisième aspect de la présente invention, on prévoit un filtre pour la séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, qui comprend  
5 le matériau pour la séparation des leucocytes indiqué ci-dessus, placé dans un récipient.

Selon un quatrième aspect de la présente invention, on prévoit un procédé pour préparer un filtre pour séparer les leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes,  
10 qui comprend les étapes de remplir un récipient de fibres ouvertes, mettre les fibres tassées en contact avec une solution d'enduit, débarrasser les fibres tassées de l'excès de solution d'enduit, puis sécher la solution d'enduit .

Selon un cinquième aspect de la présente invention, on prévoit un procédé pour séparer des lymphocytes d'une suspension contenant des lymphocytes ayant des quantités réduites de granulocytes et de monocytes, qui comprend les étapes de mettre en contact la suspension contenant  
20 les lymphocytes avec le matériau pour la séparation des leucocytes indiqué ci-dessus, pour ainsi piéger une partie importante des lymphocytes dans le matériau pour la séparation des leucocytes, puis recueillir les lymphocytes piégés dans le matériau pour la séparation des leucocytes.

Selon un sixième aspect de la présente invention, on prévoit un filtre pour la séparation des lymphocytes, qui comprend au moins un récipient rempli de fibres et ayant au moins deux orifices d'entrée et de sortie, ledit récipient ou lesdits récipients ayant une première  
30 partie composée de fibres ayant un diamètre moyen compris entre 5 et 20 microns, lesdites fibres ayant une densité globale ("bulk density") comprise entre 0,04 et 0,4 g/cm<sup>3</sup> et ayant une couche de surface composée d'une substance qui se dissout dans l'eau petit-à-petit, et une deuxième partie disposée  
35 en série par rapport à ladite première partie et composée de fibres ayant un diamètre moyen supérieur au diamètre moyen des fibres de ladite première partie, et compris entre 10 et 60 microns.

L'invention sera mieux comprise et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative qui va suivre faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemple illustrant des modes de réalisation préférés de l'invention et dans lesquels :

5                   - la figure 1 représente une vue de face d'un récipient utilisé pour mesurer le taux de dissolution d'une substance d'enduit ;

10                   - la figure 2 représente une vue de côté du récipient selon la figure 1 ;

                  - la figure 3 représente une vue de dessus du récipient selon la figure 1 ;

15                   - la figure 4 représente une vue schématique illustrant un dispositif expérimental utilisé pour la mesure du taux de dissolution d'une substance d'enduit ;

                  - la figure 5 représente des courbes illustrant les taux de dissolution de substances d'enduit typiques ;

20                   - la figure 6 représente une vue schématique en coupe d'un filtre pour la séparation des leucocytes constitué par remplissage d'un récipient par le matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention ;

25                   - la figure 7 représente une vue schématique d'un mode de réalisation du dispositif utilisé pour mettre en œuvre le procédé de séparation des leucocytes selon la présente invention ;

30                   - la figure 8 représente une vue schématique d'un autre mode de réalisation du dispositif utilisé pour mettre en œuvre le procédé de séparation des leucocytes selon la présente invention ;

35                   - la figure 9 représente une courbe illustrant la relation existant entre le taux de dissolution d'une substance d'enduit et la concentration en érythrocytes incorporés observée quand l'opération de séparation des leucocytes est menée en utilisant des fibres enduites de la substance d'enduit ;

- la figure 10 représente une vue schématique en coupe d'un mode de réalisation du filtre pour la séparation des leucocytes selon la présente invention avant la formation d'une couche d'enduit ;

5 - la figure 11 représente une vue schématique d'un mode de réalisation du dispositif utilisé pour la formation d'une couche d'enduit ; et

- la figure 12 représente une vue schématique d'un mode de réalisation des moyens utilisés pour éliminer  
10 l'excès de substance d'enduit.

Le matériau pour la séparation des leucocytes de la présente invention sera décrit en premier.

Le terme "matériau fibreux" signifie un matériau composé de fibres ayant une longueur bien plus grande que  
15 son diamètre moyen, et dont le diamètre moyen (D) est défini par l'équation suivante :

$$D \text{ (cm)} = 2 \sqrt{\frac{x}{\pi \rho y}}$$

où x représente le poids (g) des fibres, y représente  
20 la longueur (cm) des fibres et  $\rho$  représente la densité (g/cm<sup>3</sup>).

Le diamètre moyen du matériau fibreux n'est pas particulièrement critique, mais quand les monocytes et les granulocytes sont particulièrement séparés parmi les  
25 leucocytes, il est préférable que le diamètre moyen n'excède pas 60 microns et, pour piéger les leucocytes avec une efficacité élevée, il est particulièrement préférable que le diamètre moyen ne dépasse pas 10 microns. Du point de vue de l'efficacité de récupération des leucocytes piégés,  
30 il est préférable que le diamètre moyen soit compris entre 5 et 10 microns.

Le matériau fibreux utilisé n'est pas particulièrement critique, dans la mesure où il n'endommage pas les leucocytes et dans la mesure où une couche de substance  
35 d'enduit qui se dissout petit-à-petit dans l'eau peut y être formée. Par exemple, des fibres synthétiques telles que des fibres de polyacrylonitrile, des fibres de polyéther et des fibres de polyamide ; des fibres semi-

synthétiques telles que des fibres d'acétate de cellulose; des fibres de cellulose régénérée. telles que des fibres de rayonne obtenues à l'aide d'une solution de cuivre ammoniacale; des fibres naturelles telles que du coton ;  
5 et des fibres inorganiques telles que des fibres de verre peuvent être utilisées.

Dans la présente invention, il est indispensable que la couche de surface formée sur le matériau fibreux puisse se dissoudre dans l'eau petit-à-petit. Si cette  
10 propriété est exprimée en terme de taux de dissolution, il est préférable que le taux de dissolution de la couche de surface dans l'eau soit compris entre 0,3 et 1,0 mg/mn.cm<sup>2</sup>, particulièrement entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

Le terme "taux de dissolution" utilisé ici  
15 représente une valeur déterminée selon le procédé de mesure suivant.

Un récipient 25 illustré sur les figures 1 à 3, est utilisé pour la mesure. La figure 1 représente une vue de face du récipient, la figure 2 une vue de côté, et  
20 la figure 3 une vue de dessus dudit récipient. Ce récipient a une longueur interne (l) de 30 mm, une largeur interne (m) de 61 mm et une profondeur interne (n) de 15 mm, et des conduites d'amenée d'eau 20 ayant un diamètre interne (p) de 2 mm sont disposées aux centres des deux  
25 côtés dudit récipient à 5 mm au-dessus du fond interne dudit récipient.

Une couche d'enduit d'une substance que l'on doit mesurer, ayant une surface de 18,3 cm<sup>3</sup> et une épaisseur uniforme, est formée sur le fond interne dudit récipient.  
30 La substance que l'on doit tester est utilisée, dans une quantité telle que le poids total de la couche d'enduit qui peut être dissous est de 200 mg.

Le procédé pour former cette couche d'enduit n'est pas particulièrement critique. Par exemple, on  
35 peut utiliser un procédé dans lequel une substance soluble dans l'eau est enduite sur le fond interne du récipient (en principe, le récipient est composé du même matériau que le matériau fibreux) et un procédé dans lequel une substance



soluble dans l'eau est physiquement et/ou chimiquement maintenue sur le fond interne du récipient composé du même matériau que le matériau fibreux.

5 Un exemple de procédé d'enduisage du fond interne du récipient avec une substance soluble dans l'eau sera décrit ci-après.

10 En premier lieu, 2 ml d'une solution aqueuse contenant la substance que l'on doit tester à une concentration de 10 g/dl est placée dans le récipient et étendue sur la totalité du fond du récipient. Puis, le récipient est séché suffisamment à 37°C dans un incubateur, sans couvercle, de telle façon que la couche d'enduit souhaitée se forme. Quand on utilise une substance qui produit une  
15 couche d'enduit pouvant se craqueler facilement, des conditions douces, par exemple, un séchage à la température ambiante, sont utilisées et on doit prendre des précautions telles qu'une couche d'enduit homogène soit formée.

Puis, le récipient avec la couche d'enduit formée sur son fond interne est amené au dispositif de mesure  
20 représenté sur la figure 4. Dans la figure 4, les références 21, 22, 23 et 24 représentent un récipient ayant une couche d'enduit formée sur son fond interne, un gobelet rempli d'eau, une pompe et un agitateur, respectivement.

25 De l'eau maintenue à 30°C est introduite à un débit de 5 ml/mn dans le récipient 21 du gobelet 22, et la solution aqueuse contenant la substance que l'on doit tester, qui sort du récipient 21, est échantillonnée et la quantité de substance testée dissoute pendant une période de temps prédéterminée est mesurée. Pendant la  
30 mesure, le récipient 21 reste dans une position horizontale et l'eau dans le récipient 21 est toujours agitée par l'agitateur 24. L'agitation est réalisée par un mouvement horizontal en forme de 8 tel qu'un mouvement de va et vient de 3 cm par seconde est créé dans la direction d'écoulement de l'eau de y ( $y = 1,5 \cos 2\pi t(\text{cm})$ , où t représente le temps en seconde) et deux mouvements de va et vient de 2 cm sont créés dans la direction de x, perpendiculaire à la direc-  
35 tion d'écoulement de l'eau de y ( $x = -\sin 4\pi t(\text{cm})$ , où t

représente le temps en seconde). La solution contenant la substance à tester sortant du récipient est échantillonnée à des intervalles de temps de, par exemple, 4 minutes (correspondant à un écoulement d'eau de 20 ml) et l'on

5 représente le taux de dissolution par rapport au temps.

Les courbes représentant les taux de dissolution par rapport au temps des substances testées sont indiquées dans la figure 5. Dans cette figure, la courbe "a" correspond à une substance ayant un taux de dissolution élevé, tandis que les courbes "b" et "c" correspondent à des substances ayant des taux de dissolution inférieurs à celui de la substance correspondant à la courbe "a". Dans la présente invention, le taux de dissolution est défini comme une valeur calculée à partir de la quantité de la substance testée ayant une certaine surface ( $18,3 \text{ cm}^2$ ), qui est dissoute après un temps de dissolution de 8 minutes, zone où chaque courbe de dissolution présente une bonne linéarité. En d'autres termes, dans la présente invention, le taux de dissolution est défini par l'équation suivante:

20 Taux de dissolution =  $\frac{\text{quantité dissoute de substance au temps de dissolution de 8 minutes (mg)}}{8 \text{ minutes} \times 18,3 \text{ cm}^2}$   
(mg/mn.cm<sup>2</sup>) (mn.cm<sup>2</sup>)

25 (dans laquelle la quantité des substances testées dissoutes est mesurée selon le procédé indiqué ci-dessus).

L'effet d'empêchement de l'adhérence des érythrocytes ou des plaquettes sur le matériau pour la séparation des leucocytes peut être obtenu par la couche de surface (ci-après désignée sous le terme "couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes") pouvant être dissoute dans l'eau au taux de dissolution spécifique indiqué ci-dessus déterminé selon le procédé indiqué ci-dessus. On pense que la raison pour cela est la suivante, comme la couche de surface s'écoule petit-à-petit de la surface du matériau fibreux, les érythrocytes ayant une déformabilité élevée et les plaquettes qui sont petites et légères ne peuvent adhérer au matériau fibreux, mais les leucocytes ayant une déformabilité faible, un poids

relativement élevé et une forme sphérique relativement grande peuvent adhérer au matériau fibreux relativement facilement.

5 Si le taux de dissolution de la couche d'enduit est trop faible, la quantité de couche d'enduit s'écoulant du matériau fibreux est trop petite et l'effet indiqué ci-dessus est très lent. Au contraire, si le taux de dissolution de la couche d'enduit est trop élevé, la couche d'enduit s'écoule du matériau fibreux trop rapidement et  
10 le matériau fibreux perd sa couche d'enduit dans un intervalle de temps très court.

Ainsi, sous les conditions normales d'opération, il est préférable que le taux de dissolution de la couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes soit compris entre 0,3 et 1,0 mg/mn.cm<sup>2</sup>, et plus  
15 particulièrement entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>, comme il a été indiqué ci-dessus. Bien sûr, même si le taux de dissolution de la couche de surface n'est pas dans le domaine préféré, l'adhérence des érythrocytes et des  
20 plaquettes au matériau pour la séparation des leucocytes peut être empêchée en contrôlant de façon appropriée les conditions opératoires, telles que la quantité de sang, la quantité de solution de lavage et le débit.

Plus spécifiquement, au cas où la couche de surface a un taux de dissolution supérieur à 1 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau,  
25 c'est-à-dire, une couche de surface qui est dissoute dans l'eau dans un temps court, l'adhérence des érythrocytes ou des plaquettes au matériau pour la séparation des leucocytes peut être empêchée en augmentant l'épaisseur  
30 de la couche de surface formée sur la surface du matériau fibreux, en réduisant la quantité de sang traité, en augmentant le débit ou en diminuant la température. La raison en est que si la couche de surface formée sur la surface du matériau fibreux est dissoute dans le sang  
35 seulement pendant que les érythrocytes ou les plaquettes viennent en contact avec le matériau pour la séparation des leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes ne peuvent adhérer à la surface du matériau fibreux. Cependant, dans

les conditions réelles, l'épaisseur de la couche de surface formée sur la surface du matériau fibreux est limitée, et si le débit de sang est accru, les leucocytes tendent à s'échapper facilement du matériau pour la  
5 séparation des leucocytes et le taux de récupération des leucocytes décroît. Ainsi, il est préférable que le taux de dissolution de la couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes ne dépasse pas  
1 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

10 Au cas où la couche de surface a un taux de dissolution inférieur à 0,3 mg/mn.cm<sup>2</sup>, c'est-à-dire une couche de surface qui ne se dissout pas facilement dans l'eau même pendant une longue période de temps, si le  
15 taux de dissolution de la couche de surface dans le sang est augmenté grâce à des vibrations ou en élevant la température, les érythrocytes ou les plaquettes ne peuvent pas adhérer au matériau pour la séparation des leucocytes. Cependant, dans des conditions réelles, si des vibrations sont appliquées, les leucocytes tendent à s'échapper  
20 du matériau pour la séparation des leucocytes et le taux de récupération des leucocytes diminue, et si la température est élevée excessivement, le sang est facilement modifié. Ainsi, il est préférable que le taux de dissolution de la couche de surface soit d'au moins 0,3 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

25 Le matériau de la couche d'enduit pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes formés sur le matériau fibreux n'est pas particulièrement critique, dans la mesure où il n'endommage pas les leucocytes. Par exemple on peut mentionner la gélatine, la caséine, la polyvinylpyrrolidone,  
30 l'alcool polyvinylique et le polyvinyle méthyle éther.

Le procédé pour former une couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes n'est pas particulièrement critique. Par exemple on peut adopter un procédé dans lequel une substance soluble dans l'eau  
35 est enduite sur la surface du matériau fibreux et un procédé dans lequel une substance soluble dans l'eau est maintenue physiquement ou chimiquement sur la surface du matériau fibreux. Le procédé précédent comprenant les étapes d'en-

duire une substance soluble dans l'eau sur la surface d'un matériau fibreux sera décrit ci dessous à l'aide d'un exemple. Un enduit peut être formé en mettant en contact une solution isotonique d'une substance constituant la couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes avec la surface d'un substrat fibreux. La quantité de couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes appliquée à la surface du substrat est telle qu'au moins une couche monomoléculaire soit formée. Il n'est pas toujours indispensable que la couche de surface soit adsorbée dans le matériau fibreux. En résumé, la quantité d'enduit appliqué à la surface du matériau fibreux dépend de la quantité de sang, de la quantité de solution de lavage, du débit et d'autres conditions sous lesquelles le matériau de séparation résultant est en fait utilisé. De plus, un matériau de séparation formé par l'application d'une substance constituant une couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes à la surface du matériau fibreux et en séchant la surface enduite à l'avance peut être utilisé, et ce matériau de séparation est excellent pour maintenir des conditions de stérilité et facile à manipuler quand le matériau de séparation est réellement utilisé. Cependant, il est souvent préférable que la couche de surface présente à la surface du matériau fibreux soit conservée dans l'état humide quand le sang ou analogue est mis en contact avec le matériau pour la séparation des leucocytes.

Comme il est évident d'après ce qui précède, le matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention comprend un substrat fibreux et une couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes formée sur la surface du matériau fibreux.

Un filtre pour la séparation des leucocytes selon la présente invention, qui va être décrit ci-après, comprend un récipient rempli du matériau pour la séparation des leucocytes indiqué ci-dessus. Dans ce filtre, il est préférable que le matériau pour la séparation des leucocytes soit suffisamment ouvert et démêlé. Plus spécifiquement,

il est préférable que la densité globale du matériau pour la séparation des leucocytes soit comprise entre  $0,04 \text{ g/cm}^3$  et  $0,4 \text{ g/cm}^3$  à l'état sec. Si la densité globale est trop faible, les leucocytes ne peuvent être suffisamment  
5 piégés et le taux de récupération des leucocytes est réduit. D'autre part, si la densité globale est trop élevée, les leucocytes sont piégés suffisamment mais des inconvénients tels que la réduction du taux de récupération et l'augmentation du nombre des érythrocytes dans le filtre  
10 apparaissent. Il est particulièrement préférable que la densité globale soit comprise entre  $0,04 \text{ g/cm}^3$  et  $0,25 \text{ g/cm}^3$ .

Le filtre pour la séparation des leucocytes comprenant le matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention est construit, par exemple,  
15 comme il est illustré sur la figure 6. En se référant à la figure 6, un matériau pour la séparation des leucocytes 1 tel qu'indiqué ci-dessus est disposé dans un récipient 4 résistant à l'eau ayant des orifices 2 et 3 d'entrée et de sortie de liquide. Des tamis 5 et 6 sont  
20 disposés pour empêcher le matériau pour la séparation des leucocytes de s'échapper du récipient 4.

Le procédé de préparation de tels filtres pour la séparation des leucocytes comprenant un matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention sera  
25 décrit ci-après.

Le filtre pour la séparation des leucocytes peut être construit en constituant un matériau pour la séparation des leucocytes comprenant un matériau fibreux et une couche de surface qui peut se dissoudre petit-à-petit  
30 dans l'eau, formée sur les surfaces du matériau fibreux, et en plaçant le matériau pour la séparation des leucocytes dans un récipient. Cependant, quand le matériau pour la séparation des leucocytes est formé en enduisant un matériau fibreux avec une substance qui peut se dissoudre  
35 petit-à-petit dans l'eau, il est recommandé d'adopter le procédé suivant pour la préparation du filtre pour la séparation des leucocytes.

Un matériau fibreux est ouvert, puis placé dans un

réipient, une solution d'une substance d'enduit est amenée en contact avec le matériau fibreux, l'excès de substance d'enduit est éliminé de la surface du matériau fibreux, et le matériau fibreux enduit est alors séché, pour ainsi  
5 obtenir un filtre pour la séparation des leucocytes désiré .

Selon ce procédé de préparation de filtre, une couche de surface homogène est formée à la surface du matériau fibreux qui est suffisamment ouvert, et même des points d'intersection des fibres peuvent être enduits  
10 de façon satisfaisante. De plus, comme il n'est pas nécessaire d'appliquer une quelconque force mécanique externe après séchage à la couche de surface, des craquelures ou écailllements indésirés ne peuvent se produire sur la couche de surface.

15 Les conditions de préparation seront décrites ci-après en détail.

La formation d'une couche de surface à la surface du matériau fibreux dans le réipient peut être réalisée simplement en remplissant le réipient avec une solution  
20 de substance d'enduit ou en faisant circuler la solution de substance d'enduit dans le réipient. En résumé, il est suffisant que la solution de substance d'enduit soit amenée en contact avec la surface du matériau fibreux et avec la face interne du réipient. Avec quelques  
25 substances d'enduit, la réaction de la substance d'enduit avec le matériau fibreux peut être avancée à ce moment.

Après que la solution de substance d'enduit ait été amenée en contact avec la surface du matériau fibreux, l'excès de substance d'enduit est éliminé de la surface  
30 du matériau fibreux. Cette élimination est accomplie par centrifugation, procédé qui comprend les étapes d'appliquer une force centrifuge d'un séparateur centrifuge entièrement au réipient et de déplacer l'excès de substance d'enduit par cette force centrifuge. L'élimination peut  
35 également être accomplie par un procédé où l'excès de substance d'enduit est soufflé par de l'air comprimé, un procédé où l'excès de substance d'enduit est enlevé avec un solvant, et un procédé où le séchage à froid de la couche

d'enduit permet de séparer la substance d'enduit présente à la surface du matériau fibreux de la substance d'enduit présente hors de la surface du matériau fibreux. Du point de vue de l'uniformité de la couche de surface formée à la surface du matériau fibreux, de la facilité d'ajuster l'épaisseur de la couche de surface et du temps nécessaire pour la réalisation de l'étape de séchage, le procédé par centrifugation est bien préférable et est recommandé.

Dans ce procédé par centrifugation, il est préférable que la force centrifuge appliquée soit comprise entre 50 g et 500 g. Si la force centrifuge est inférieure à 50 g, la substance d'enduit n'est souvent pas uniforme dans le filtre. Si la force centrifuge dépasse 500 g, le matériau fibreux tend à se rétrécir. Cependant, on peut éviter la contraction des fibres simplement par l'application d'une force externe. En conséquence, une force centrifuge dépassant 500 g peut être appliquée.

Ce procédé peut être mis en œuvre seulement après que le récipient soit rempli de matériau fibreux. Si le procédé est mis en œuvre avant que le matériau fibreux remplisse le récipient, les fibres du matériau fibreux ouvert adhèrent les unes aux autres ou elles sont écrasées, et ainsi, on doit de nouveau ouvrir les fibres. De plus, un bon état ouvert ne peut être obtenu même en recommençant l'opération d'ouverture. Au contraire, si le procédé ci-dessus est mis en œuvre après le remplissage du récipient par le matériau fibreux ouvert, même quand la densité du remplissage du matériau fibreux est faible, le matériau fibreux ne peut pas se contracter à cause de la résistance de friction entre la paroi du récipient et le matériau fibreux ou de la force de remise en place des fibres emmêlées du matériau fibreux, et même si la contraction du matériau fibreux se produit, on peut facilement revenir à l'état initial en utilisant de l'air comprimé ou analogue.

L'épaisseur de la couche de surface est ajustée par la concentration de la solution de substance d'enduit ou par l'intensité de la force centrifuge et est déterminée de façon appropriée selon les propriétés physiques et chimi-



ques de la substance d'enduit et les propriétés du solvant utilisé. On peut utiliser tout procédé de séchage pour éliminer le solvant, tel que par exemple le séchage sous vide ou le séchage par air chaud. Les conditions de séchage sont telles que la substance d'enduit n'est ni modifiée ni dissoute.

Un mode de réalisation du procédé de séparation des leucocytes selon la présente invention est décrit ci-dessous.

En se référant à la figure 7, un filtre 7 pour la séparation des leucocytes est construit en remplissant un récipient du matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention. Dans ce mode de réalisation, le matériau pour la séparation des leucocytes dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes est préparé en formant une couche d'enduit pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes à la surface d'un matériau fibreux et est laissé dans l'état sec. En premier lieu, une solution physiologique 10 dans le récipient 9 est amenée dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes au moyen d'une pompe 8 pour humidifier la surface du matériau pour la séparation des leucocytes dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes. Puis, un conduit 11 est séparé du récipient 9 de la solution physiologique 10 et est connecté au récipient 12, et le sang 13 dans le récipient 12 est amené dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes. Dans ce filtre 7 pour la séparation des leucocytes, les leucocytes sont sélectivement piégés, mais le plasma, les érythrocytes et les plaquettes ne peuvent être piégés, au contraire ils passent à travers le filtre 7 pour la séparation des leucocytes et sont conduits dans le récipient 14. Le conduit d'entrée 11 est de nouveau connecté au récipient 9, et la solution physiologique 10 est forcée à s'écouler à travers le filtre 7 pour la séparation des leucocytes, pour ainsi sensiblement enlever et entraîner au loin le plasma, les érythrocytes et les plaquettes. En conséquence, le plasma et les érythrocytes ne demeurent pas dans le filtre 7 pour

la séparation des leucocytes et seules de très petites quantités de plaquettes y restent. En d'autres termes, seuls les leucocytes sont sélectivement piégés dans le filtre 7. Dans la figure 7, la référence 15 représente un orifice de sortie du filtre pour la séparation des leucocytes.

La figure 8 illustre un mode de réalisation du dispositif pour recueillir les lymphocytes seuls pour déterminer les antigènes de surface des leucocytes ou les sous-fractions des lymphocytes. Les monocytes et les granulocytes dans les leucocytes du sang sont piégés d'abord par un filtre 16 pour la séparation des monocytes et des granulocytes, et les lymphocytes sont piégés sélectivement dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes. Dans la figure 8, les références 10, 18 et 19 représentent un récipient, une huile silicone et un conduit d'entrée du filtre 7 pour la séparation des leucocytes, respectivement.

La technique pour piéger les leucocytes seuls sur le filtre sélectivement par un tel moyen simple n'est pas décrit dans l'art antérieur, et cela est possible pour la première fois en utilisant le matériau pour la séparation des leucocytes selon la présente invention.

Puis, les leucocytes piégés dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes sont récupérés tandis que l'on soumet le filtre à des chocs physiques ou analogues, pour ainsi récupérer les leucocytes à un taux de récupération élevé, tandis que les taux des érythrocytes et des plaquettes incorporés dans les leucocytes récupérés sont remarquablement réduits.

Dans le cas où les leucocytes sont séparés en utilisant un filtre rempli de fibres, de nombreux érythrocytes peuvent être éliminés par lavage du filtre dans une solution physiologique après le passage du sang à travers le filtre. Cependant, comme le nombre des érythrocytes contenus dans le sang est d'environ 1000 fois plus grand que le nombre de leucocytes, même si le nombre des érythrocytes qui restent dans le filtre est réduit,

leur nombre est compris entre plusieurs fois et des dizaines de fois le nombre de leucocytes piégés dans le filtre. Selon le procédé de séparation des leucocytes de la présente invention, comme le matériau pour la  
5 séparation des leucocytes comprend une couche d'enduit pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes formée sur le matériau fibreux, le nombre des érythrocytes qui restent dans le filtre pour la séparation des leucocytes peut être réduit à une valeur comprise entre  $1/15$  et  $1/5$   
10 du nombre des leucocytes piégés. La raison en est que, comme la couche d'enduit pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes a un bon taux de dissolution, la couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes est toujours dissoute petit-à-petit de la surface  
15 du matériau fibreux et les érythrocytes ayant une déformabilité élevée ne peuvent adhérer à la surface du matériau fibreux. D'autre part, on pense que les leucocytes qui ont une faible déformabilité et une possibilité d'adhérence élevée sont facilement piégés aux points d'intersection des  
20 fibres ou dans les espaces étroits formés parmi les fibres.

La relation entre le taux de dissolution de la couche de surface pour l'empêchement de l'adhérence des érythrocytes et le nombre d'érythrocytes incorporés lors de la séparation des leucocytes sera décrite ci-après.

25 La figure 9 représente une courbe illustrant la relation entre le taux de dissolution de la couche de surface dans l'eau et la concentration des érythrocytes incorporés. L'expérience pour la détermination de cette relation est menée selon la procédure suivante.

30 De la gélatine, de la caséine, de l'alcool polyvinylique, de la polyvinylpyrrolidone, du polyméthyle vinyle éther ou du saccharide est utilisé comme substance formant couche de surface. Des substances différentes en poids moléculaire ou assemblées en croix après enduisage  
35 sur le matériau fibreux sont aussi utilisées. Des fibres de polyacrylonitrile ayant un diamètre moyen de 8,2 microns sont utilisées pour le matériau fibreux. Les fibres sont suffisamment ouvertes et 0,26 g des fibres ouvertes sont

utilisées pour remplir un récipient ayant un diamètre de 10 mm et une longueur de 25 mm pour former un filtre. Chaque substance est enduite sur le matériau fibreux en formant une solution isotonique contenant 3,5% de substance d'enduit (la concentration est réduite à 2,5% quand la substance d'enduit donne une solution très visqueuse à une concentration de 3,5%) et en faisant circuler la solution à travers le filtre à un débit de 5 ml/mn pendant 5 minutes.

La séparation des leucocytes est menée selon la procédure suivante.

En premier lieu, 5 ml de sang est passé à travers le filtre à un débit de 1 ml/mn à 37°C, puis 20 ml de solution saline physiologique est passée à travers le filtre à un débit de 5 ml/mn. Puis, 2 ml de solution saline physiologique est passée à travers le filtre à une très grande vitesse pour recueillir les leucocytes piégés. La concentration des érythrocytes dans le liquide recueilli est déterminée et est notée en ordonnée comme la concentration en érythrocytes incorporés, tandis que le taux de dissolution des substances d'enduit déterminé selon le procédé indiqué ci-dessus est noté en abscisse, pour ainsi obtenir la courbe indiquée sur la figure 9.

Dans la figure 9, A indique les résultats obtenus quand on utilise de la gélatine (insoluble dans l'eau) comme substance formant couche de surface, et B, C, D, E, F, G, H et I montrent les résultats obtenus quand on utilise les substances formant couche de surface, respectivement, de l'alcool polyvinylique (ayant un degré de polymérisation de 1200), de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 110000), du polyméthyle vinyle éther, de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 60000) ou de la polyvinylpyrrolidone (ayant un poids moléculaire de 36000) ou de la caséine, de l'alcool polyvinylique (ayant un degré de polymérisation de 500), de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 30000), du saccharide ou de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 4000 à 7000), et de la polyvinylpyrrolidone (ayant un poids molé-

culaire de 40000).

A partir des résultats indiqués dans la figure 9, on comprend aisément que si le taux de dissolution de la substance d'enduit dans l'eau est compris entre 0,3 mg/mn.cm<sup>2</sup> et 1,0 mg/mn.cm<sup>2</sup>, la concentration des érythrocytes incorporés est inférieure à 1000/microlitre. Pour maintenir la concentration des érythrocytes incorporés au dessous de 1000/microlitre, il est préférable que le taux de dissolution soit compris entre 0,4 mg/mn.cm<sup>2</sup> et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>. De plus, on comprendra aisément que même si la même substance d'enduit, par exemple la polyvinylpyrrolidone ou la gélatine, est utilisée, quand le taux de dissolution augmente ou décroît grandement en changeant le poids moléculaire ou par des liaisons croisées de la substance d'enduit, l'effet de réduction de la concentration des érythrocytes incorporés est réduit.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention en plus de détail afin de mieux éclaircir son mode de réalisation pratique, mais ils ne doivent en aucun cas être considérés comme limitant le cadre de la présente invention, parce que de nombreuses variations et modifications sont possibles.

Du sang additionné d'héparine constitué en ajoutant 5 unités d'héparine à 1 ml de sang recueilli sur un homme en bonne santé est utilisé comme échantillon sanguin dans chacun des exemples suivants. Dans ce sang, le nombre des érythrocytes est de 4 100 000 à 4 800 000 par microlitre de sang et le nombre des leucocytes est compris entre 5000 et 8500 par microlitre de sang (le nombre des lymphocytes est compris entre 25 et 45% du nombre total des leucocytes). Le nombre des plaquettes est compris entre 130 000 et 320 000 par microlitre de sang.

#### Exemple 1.

La séparation des leucocytes est menée en utilisant le dispositif expérimental représenté sur la figure 7. En premier lieu, 0,26 g de fibres de polyacrylonitrile ayant un diamètre moyen de 8,2 microns sont utilisées pour remplir un récipient ayant un diamètre de 10 mm et une lon-

gueur de 25 mm, et une solution saline aqueuse physiologique contenant 2,5 g g/dl de polyvinylpyrrolidone (ayant un poids moléculaire de 360000) ayant un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est placée dans le récipient  
5 pour former un filtre 7 pour la séparation des leucocytes. Puis, 3 ml de sang humain additionné d'héparine est passé à travers le filtre 7 à un débit de 1 ml/mn au moyen d'une pompe 8 et, 20 ml de solution saline physiologique est ensuite passée à travers le filtre 7 à un débit de 5ml/mn  
10 pour éliminer les érythrocytes. Puis, un injecteur contenant 2 ml de solution saline physiologique est attaché à l'orifice de sortie 15 du filtre 7 et la solution saline physiologique est injectée violemment dans le filtre 7 pour que les leucocytes piégés dans le filtre 7 s'échappent  
15 violemment du filtre 7. Quand on a examiné le liquide recueilli, on a trouvé que 40% des leucocytes sont récupérés et que le nombre des érythrocytes incorporés dans les leucocytes récupérés représente 1/5 du nombre des leucocytes récupérés, ce qui correspond à une concentration de 600 par  
20 microlitre.

#### Exemple comparatif 1.

L'essai est mené de la même manière qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près que de la polyvinylpyrrolidone (ayant un poids moléculaire de 40000) et ayant  
25 un taux de dissolution de 1,2 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est utilisée au lieu de la polyvinylpyrrolidone (ayant un poids moléculaire de 360000) et un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup>, qui est utilisée dans l'exemple 1. Les leucocytes sont récupérés à un taux de récupération de 42%, mais le  
30 nombre des érythrocytes incorporés est de 5,8 fois le nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 18000/microlitre.

#### Exemple comparatif 2.

L'essai est mené de la même manière qu'il a été  
35 décrit dans l'exemple 1 à l'exception près que la solution saline physiologique de polyvinylpyrrolidone n'est pas utilisée. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 44%, mais le nombre des érythrocytes

incorporés est de 7,6 fois le nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 25000/microlitre.

Exemple 2.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près qu'une solution saline physiologique aqueuse contenant 3,5 g/dl de caséine sodée ayant un taux de dissolution de 0,63 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est utilisée au lieu de la solution saline physiologique aqueuse contenant 2,5 g/dl de polyvinylpyrrolidone ayant un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 39%, et le nombre des érythrocytes incorporés est de 1/6 le nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 500/microlitre.

Exemple 3.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près qu'une solution saline aqueuse physiologique contenant 3,5 g/dl d'alcool polyvinyle (ayant un degré de polymérisation de 500) et un taux de dissolution de 0,61 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est utilisée au lieu de la solution saline physiologique aqueuse contenant 2,5 g/dl de polyvinylpyrrolidone ayant un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 42%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/8 du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 400/microlitre.

Exemple comparatif 3.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 3 à l'exception près que du polyvinylalcool (ayant un degré de polymérisation de 12000) et un taux de dissolution de 0,27 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est utilisé au lieu du polyvinylalcool (ayant un degré de polymérisation de 500) et un taux de dissolution de 0,61 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 40%, mais le nombre des érythrocytes incorporés est sensiblement égal au nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 3000/microlitre.

Exemple 4.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près qu'une solution aqueuse saline physiologique contenant 3,5 g/dl de gélatine (ayant un poids moléculaire de 60000) et un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau est utilisée au lieu de la solution saline aqueuse physiologique contenant 2,5 g/dl de polyvinylpyrrolidone ayant un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont récupérés à un taux de récupération de 38%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/29 du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 100/microlitre.

Exemple comparatif 4.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 4 à l'exception près qu'au lieu de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 60000) et un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau, on utilise un produit de décomposition (ayant un poids moléculaire de 4000 à 7000) obtenu par décomposition enzymatique de la gélatine ci-dessus, qui a un taux de dissolution de 1,15 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 40%, mais le nombre des érythrocytes incorporés représente 10 fois le nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 24000/microlitre.

Exemple 5.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 4 à l'exception près qu'au lieu de la gélatine (ayant un poids moléculaire de 60000) et un taux de dissolution de 0,62 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau, on utilise un produit de décomposition (ayant un poids moléculaire de 30000) obtenu par décomposition de la gélatine ci-dessus par chauffage, qui a un taux de dissolution de 0,93 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 40%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/7 du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 900/microlitre.

Exemple comparatif 5.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit



dans l'exemple 4 à l'exception près qu'après que les fibres ont été enduites avec la gélatine (ayant un poids moléculaire de 60000) et un taux de dissolution de  $0,62 \text{ g/mn.cm}^2$  dans l'eau, la gélatine à la surface des fibres est liée en croix et rendue insoluble dans l'eau par une solution aqueuse à 2% de glutaraldéhyde, puis les fibres enduites sont utilisées comme matériau de séparation. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 44%, mais le nombre des érythrocytes incorporés représente 5,4 fois le nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 18000/microlitre.

#### Exemple 6.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près qu'une solution saline aqueuse physiologique contenant 3,5 g/dl de polyméthyle vinyle éther ayant un taux de dissolution de  $0,57 \text{ mg/mn.cm}^2$  dans l'eau est utilisé au lieu de la solution aqueuse saline physiologique contenant 2,5 g/dl de polyvinylpyrrolidone ayant un taux de dissolution de  $0,62 \text{ mg/mn.cm}^2$  dans l'eau. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 40%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente  $1/5$  du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration de 700/microlitre.

#### Exemple 7.

La récupération des leucocytes est menée en utilisant le dispositif représenté sur la figure 8. Un filtre 7 pour la séparation des leucocytes est préparé en remplissant un récipient de 0,3 g de matériau pour la séparation des leucocytes, le récipient ayant un diamètre interne de 10 mm et une longueur de 25 mm. La préparation du filtre pour la séparation des leucocytes est menée selon la procédure suivante :

Comme il est illustré dans la figure 10, un conduit cylindrique 31 ayant une cavité interne ayant un diamètre interne de 10 mm et une longueur de 25 mm et des parties d'extrémité 32 et 33 creuses qui débouchent dans les ouvertures formées aux deux extrémités du conduit cylindrique 31, sont préparées et utilisées.

Comme matériau fibreux 34, on utilise 0,26 g de fibre de polyacrylonitrile ayant un diamètre moyen de 8 microns. Les fibres sont suffisamment ouvertes avant d'être utilisées.

La partie d'extrémité 32 est reliée au conduit cylindrique 31, et un tamis 35 est disposé pour éviter que les fibres s'échappent du conduit cylindrique 31. Les fibres ouvertes remplissent uniformément le conduit cylindrique 31 et un autre tamis 36 est placé. La partie d'extrémité 33 est alors placée sur le conduit 31 et y est fixée.

Puis, comme il est indiqué dans la figure 11, le filtre ainsi formé 39 est relié à un dispositif pour la circulation d'une substance d'enduit 37 au moyen d'une pompe 38.

Une solution à 7% en poids de gélatine (ayant un poids moléculaire de 110000) et un taux de dissolution de 0,49 mg/mn.cm<sup>2</sup> est utilisée comme substance d'enduit 37, et on fait circuler la solution à travers l'intérieur du filtre 39 à un débit de 5 ml/mn à la température ambiante pendant environ 2 minutes au moyen de la pompe 38. Pendant cette circulation, le filtre 39 est tappoté légèrement pour éliminer l'air du filtre.

Puis, comme il est indiqué dans la figure 12, une entretoise 41 est disposée dans le tube de centrifugation 40, où le filtre 39 est disposé verticalement. La séparation par centrifugation est menée à température ambiante pendant 5 minutes sous une force centrifuge de 350 g en utilisant un séparateur de centrifugation du type à rotor oscillant pour éliminer l'excès de solution de gélatine. Puis, le filtre est placé dans un sécheur à vide et séché à la température ambiante pendant 24 heures. Après la séparation par centrifugation, les fibres dans le conduit 31 ne sont pas contractées, et après séchage, une couche d'enduit de gélatine est formée sur toute la surface du matériau fibreux (un échantillon des fibres enduites est préparé et observé dans un microscope électronique du type à transmission).

Un filtre 16 pour la séparation des monocytes et des granulocytes illustré par la figure 8, est préparé en remplissant un récipient ayant un diamètre interne de 10 mm

et une longueur de 75 mm par 0,88 g de fibre de polyamide sous forme d'une toison ayant un diamètre moyen de 20,8 microns.

En se référant à la figure 8, une solution saline physiologique 10 est introduite dans le filtre 16 pour piéger les monocytes et les granulocytes et dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes au moyen de la pompe 8, puis, le conduit 11 d'entrée est transféré au récipient 12 et 5 ml de sang humain 13 additionné d'héparine maintenu à 37°C est versé dans le filtre 16 pour piéger les monocytes et les granulocytes, à un débit de 1 ml/mn. Puis, le conduit 11 d'entrée est transféré au récipient 17, et une huile de silicone 18 passe à un débit de 1 ml/mn pour transférer le sang qui est resté dans le filtre 16 vers le filtre 7 pour la séparation des leucocytes. Puis, le filtre 16 pour piéger les monocytes et les granulocytes est enlevé et 20 ml de solution saline physiologique 10 est versée à un débit de 5 ml/mn dans le filtre 7 pour la séparation des leucocytes par le conduit 19 d'entrée pour laver le filtre 7. Puis, le filtre 7 pour la séparation des leucocytes est enlevé et un injecteur rempli de 2 ml de solution saline physiologique est attaché au conduit 19 d'entrée du filtre 7 pour la séparation des leucocytes. La solution saline physiologique dans l'injecteur est alors violemment injectée dans le filtre 7 pour entraîner rapidement les leucocytes piégés dans le filtre 7 hors de ce même filtre. Quand le liquide recueilli est examiné, on trouve que les lymphocytes sont recueillis à un taux de récupération de 15%, et que le taux d'incorporation des monocytes et des granulocytes est de 8% par rapport aux lymphocytes. Le nombre des érythrocytes et des plaquettes incorporés représente chacun 1/10 du nombre des lymphocytes recueillis. La concentration des érythrocytes est de 75/microlitre.

#### Exemple comparatif 6.

L'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 1 à l'exception près que les fibres de polyacrylonitrile ne sont pas enduites avec la solution aqueuse de gélatine. Les lymphocytes sont recueillis à un taux de

récupération de 14%, et le taux d'incorporation de monocytes et de granulocytes dans les lymphocytes est de 6%, mais le nombre des érythrocytes incorporés représente 14 fois le nombre des lymphocytes recueillis et le nombre des plaquettes  
5 incorporées représente 4/10 du nombre des lymphocytes recueillis. La concentration des érythrocytes est de 10000/microlitre.

Exemple comparatif 7.

Un filtre pour la séparation des leucocytes est  
10 préparé en faisant passer un faisceau de filament de polyacrylonitrile ayant chacun un diamètre moyen de 8 microns dans l'état étendu à plat à travers un récipient rempli d'une solution aqueuse à 7% en poids de la même gélatine que celle utilisée dans l'exemple 7, puis les surfaces  
15 enduites des fibres sont séchées avec de l'air chaud et les fibres sont enroulées. Puis, les fibres sont suffisamment séchées et ondulées, et sont ouvertes en utilisant une machine à carder. L'opération d'ouverture est menée de façon convenable, mais l'enduit de gélatine est séparé ici  
20 et là des surfaces des fibres (la séparation est observée grâce à des microscopes électroniques du type à transmission et à balayage).

Exemple comparatif 8.

Des fibres de polyacrylonitrile ayant un diamètre  
25 moyen de 8 microns sont ouvertes et trempées dans une solution aqueuse à 7% en poids de la même gélatine que celle utilisée dans l'exemple 7. Les fibres sont retirées de la solution, centrifugées et ouvertes. Cependant, comme le séchage n'est pas mené avant l'ouverture, l'opération d'ouverture ne  
30 peut être menée de façon convenable car les fibres sont liées les unes aux autres. Ainsi, les fibres sont séchées à 50°C pendant 16 heures puis elles sont de nouveau ouvertes. Lors de l'examen des fibres aux microscopes électroniques du type à transmission et à balayage, on a remarqué que  
35 l'enduit de gélatine était séparé ici et là de la surface des fibres.

Exemple 8.

Dans le même dispositif expérimental que celui utilisé

dans l'exemple 1, l'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 7 à l'exception près que de la caséine est utilisée au lieu de la gélatine. Le taux de dissolution de la caséine utilisée dans cet essai est de 0,43 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les lymphocytes sont recueillis à un taux de récupération de 18%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/5 du nombre des lymphocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration en érythrocyte de 180/microlitre.

Exemple 9.

En utilisant le même dispositif expérimental que celui utilisé dans l'exemple 7, l'essai est mené de la même façon qu'il est décrit dans l'exemple 7 à l'exception près qu'une solution aqueuse contenant 3,5 g par litre d'alcool polyvinylique est utilisée au lieu d'une solution aqueuse contenant 7 g/dl de gélatine. Le taux de dissolution de l'alcool polyvinylique utilisé dans cet essai est de 0,77 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Les lymphocytes sont recueillis à un taux de récupération de 16%. Le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/4 du nombre des lymphocytes recueillis ce qui correspond à une concentration en érythrocytes de 200/microlitre.

Exemple 10.

En utilisant le même dispositif expérimental que celui utilisé dans l'exemple 7, 3,3 g de fibres de polyester sous forme de toison ayant un diamètre moyen de 8,5 microns sont utilisés pour remplir un récipient ayant un diamètre interne de 18 mm et une longueur de 100 mm, et une solution aqueuse saline physiologique contenant 2 g/dl de polyvinylpyrrolidone est utilisée pour remplir le récipient pour former un filtre pour la séparation des leucocytes. Le taux de dissolution de cette polyvinylpyrrolidone est de 0,5 mg/mn.cm<sup>2</sup> dans l'eau. Puis, 100 ml de sang humain additionné d'héparine est passé à travers le filtre pour la séparation des leucocytes ainsi réalisé à un débit de 5 ml/mn, et 200 ml de solution saline physiologique est alors passée à travers le filtre à un débit de 10 ml/mn pour éliminer les érythrocytes. Puis, 100 ml de solution physiologique contenant du plasma

est passés à travers le filtre à un débit de 10 ml/mn et les leucocytes dans le filtre sont recueillis en soumettant le filtre à une force physique externe. Quand le liquide recueilli est examiné, on s'aperçoit que les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 54% et que le nombre des érythrocytes incorporés représente 1/13 du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration en érythrocyte de 200/microlitre.

Exemple 11.

L'essai est mené sous les mêmes conditions que celles de l'exemple 10 à l'exception près que 6 g de fibres de polyester ayant un diamètre moyen de 13,5 microns sont utilisés comme substrat fibreux. Les leucocytes sont recueillis à un taux de récupération de 40%, et le nombre des érythrocytes incorporés représente 2/5 du nombre des leucocytes recueillis, ce qui correspond à une concentration en érythrocytes de 800/microlitre.

Comme il est évident d'après les exemples précédents, quand les leucocytes sont recueillis d'une suspension contenant des leucocytes selon le procédé pour la séparation des leucocytes de la présente invention, le nombre des érythrocytes incorporés dans les leucocytes recueillis peut être réduit de façon drastique, et le nombre des plaquettes incorporées peut être également réduit. De plus, la séparation peut être accomplie par des opérations simples et le temps requis pour l'achèvement de la séparation peut être réduit. Ainsi, les leucocytes ne sont pas influencés par le traitement de séparation. Il a été confirmé que les leucocytes recueillis selon la présente invention peuvent être utilisés pour divers tests et examens cliniques en toute confiance.

Bien entendu l'invention n'est nullement limitée aux modes de réalisation décrits et représentés qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier elle comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs combinaisons si celles-ci sont exécutées suivant son esprit et mises en œuvre dans le cadre de la protection comme revendiquée.

## R E V E N D I C A T I O N S

1. Matériau pour séparer les leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, caractérisé en ce qu'il comprend un matériau fibreux ayant une couche de surface composée d'une substance qui se dissout dans l'eau petit-à-petit.

5 2. Matériau selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite substance de couche de surface est dans l'état sec.

3. Matériau selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite substance enduite sur ledit  
10 matériau fibreux a un taux de dissolution dans l'eau compris entre 0,3 et 1 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

4. Matériau selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit taux de dissolution dans l'eau est compris entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

15 5. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite substance enduite sur ledit matériau fibreux comprend au moins une substance sélectionnée dans le groupe comprenant l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthyle vinyle éther, la  
20 caséine et la gélatine.

6. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit matériau fibreux comprend au moins un matériau sélectionné dans le groupe comprenant les fibres synthétiques, les fibres semi-synthétiques,  
25 les fibres de cellulose régénérée, les fibres naturelles et les fibres inorganiques.

7. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit matériau fibreux a un diamètre moyen de fibre qui ne dépasse pas 60 microns.

30 8. Matériau selon la revendication 7, caractérisé en ce que le diamètre moyen des fibres est compris entre 5 et 10 microns.

9. Matériau pour la séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, caractérisé en ce qu'il  
35 comprend des fibres synthétiques ayant un diamètre moyen de

5 fibre compris entre 5 et 10 microns, lesdites fibres synthétiques ayant une couche de surface en alcool polyvinyle et/ou en gélatine, qui a un taux de dissolution dans l'eau compris entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup> et est à l'état sec.

10 10. Procédé de séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, mettant en œuvre le matériau pour séparer les leucocytes selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mettre la suspension contenant des leucocytes en contact avec ledit matériau pour la séparation des leucocytes, pour ainsi piéger une partie importante des leucocytes de la suspension contenant des leucocytes dans le matériau pour la séparation des leucocytes, puis recueillir les  
15 leucocytes piégés dans le matériau pour la séparation des leucocytes.

20 11. Filtre pour la séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, caractérisé en ce qu'il comprend un matériau fibreux placé dans un récipient, ledit matériau fibreux étant enduit avec une substance qui se dissout dans l'eau petit-à-petit.

25 12. Filtre selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit matériau fibreux remplit le récipient précité avec une densité globale comprise entre 0,04 et 0,4 g/cm<sup>3</sup>.

30 13. Filtre selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend un matériau fibreux ayant un diamètre de fibre moyen compris entre 5 et 10 microns et en ce qu'il remplit ledit récipient avec une densité globale comprise entre 0,04 et 0,25 g/cm<sup>3</sup>, ledit matériau fibreux ayant une couche de surface composée d'une substance qui a un taux de dissolution dans l'eau compris entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

35 14. Filtre selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit matériau fibreux est composé de fibres synthétiques et remplit ledit récipient dans l'état sec, et en ce que la substance d'enduit est de l'alcool polyvinyle et/ou de la gélatine.



15. Procédé de préparation d'un filtre pour la séparation des leucocytes d'une suspension contenant des leucocytes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de remplir un récipient de fibres ouvertes, mettre les fibres tassées  
5 en contact avec une solution d'enduit, débarrasser les fibres tassées de l'excès de solution d'enduit, puis sécher la solution d'enduit.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'excès de solution d'enduit est éliminé des fibres  
10 tassées en appliquant une force centrifuge à la solution d'enduit.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la force centrifuge représente au moins 50 fois la force de gravitation.

18. Procédé pour séparer des lymphocytes d'une suspension contenant des lymphocytes ayant des quantités réduites de granulocytes et de monocytes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de faire passer une suspension contenant les lymphocytes à travers le filtre pour la séparation des  
20 leucocytes précités, pour ainsi piéger une partie importante des lymphocytes dans le filtre pour la séparation des leucocytes, puis recueillir les lymphocytes piégés dans le filtre pour la séparation des leucocytes.

19. Filtre pour séparer les lymphocytes d'une suspension  
25 contenant des lymphocytes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un récipient rempli de fibres ayant au moins deux orifices d'entrée et de sortie, ledit récipient ou lesdits récipients ayant une première partie composée de fibres ayant un diamètre moyen compris entre 5 et 20 microns,  
30 la densité globale desdites fibres étant comprise entre 0,04 et 0,4 g/cm<sup>3</sup> et lesdites fibres ayant une couche de surface composée d'une substance qui se dissout dans l'eau petit-à-petit, et une seconde partie disposée en série par rapport à ladite première partie et composée de fibres ayant  
35 un diamètre moyen supérieur au diamètre moyen des fibres de la première partie et compris entre 10 et 60 microns.

20. Filtre selon la revendication 19, caractérisé en ce que la substance soluble dans l'eau enduite sur les fibres

dans la première partie est à l'état sec.

21. Filtre selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que la substance soluble dans l'eau enduite sur les fibres dans la première partie a un taux  
5 de dissolution dans l'eau compris entre 0,3 et 1 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

22. Filtre selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit taux de dissolution dans l'eau est compris entre 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>.

23. Filtre selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisé en ce que la substance soluble dans l'eau enduite sur les fibres comprend au moins une substance  
10 sélectionnée dans le groupe comprenant l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthylevinyle éther, la caséine et la gélatine.

24. Filtre selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisé en ce que les fibres comprennent au moins un des types de fibres sélectionnées parmi les fibres synthé-  
15 tiques, les fibres semi-synthétiques, les fibres de cellulose régénérée, les fibres naturelles et les fibres  
20 inorganiques.

25. Filtre selon l'une des revendication 19 à 24, caractérisé en ce que les fibres dans ladite première partie ont un diamètre moyen de fibre compris entre 5 et 10 microns et une densité globale comprise entre 0,04 et  
25 0,25 g/cm<sup>3</sup>.

26. Filtre selon la revendication 20, caractérisé en ce que les fibres dans ladite première partie ont une couche de surface en alcool polyvinylique et/ou en gélatine ayant un taux de dissolution dans l'eau compris entre  
30 0,4 et 0,9 mg/mn.cm<sup>2</sup>, ont un diamètre moyen de fibres compris entre 5 et 10 microns, et une densité globale comprise entre 0,04 et 0,25 g/cm<sup>3</sup>

Pl. 1/6

Fig. 1

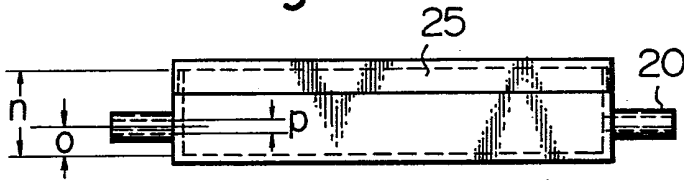


Fig. 2

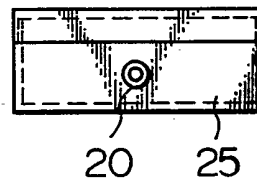


Fig. 3

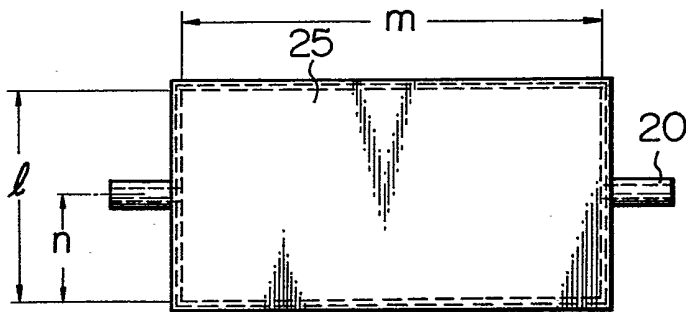
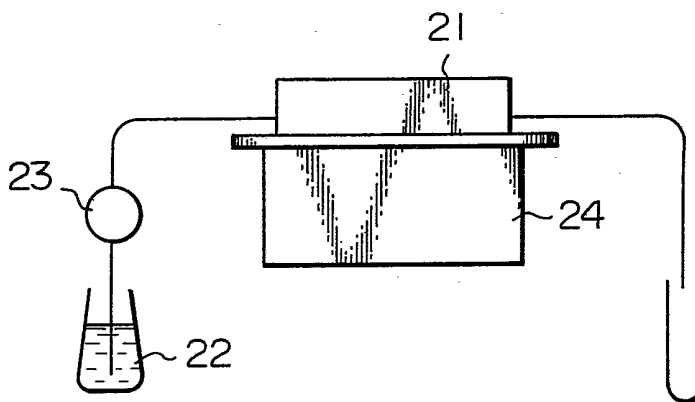
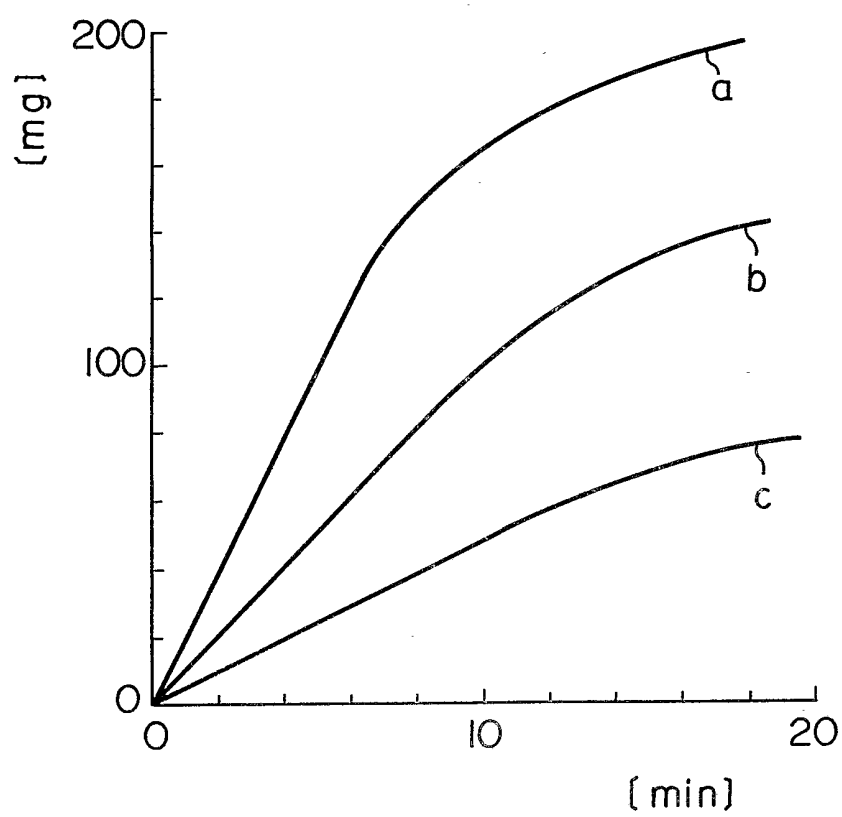


Fig. 4



Pl. 2/6

Fig. 5



Pl. 3/6

Fig. 6

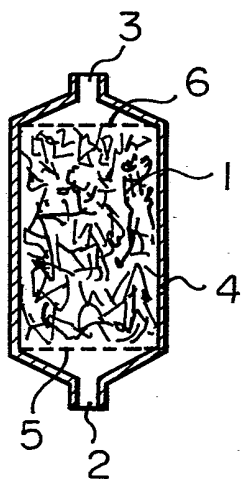
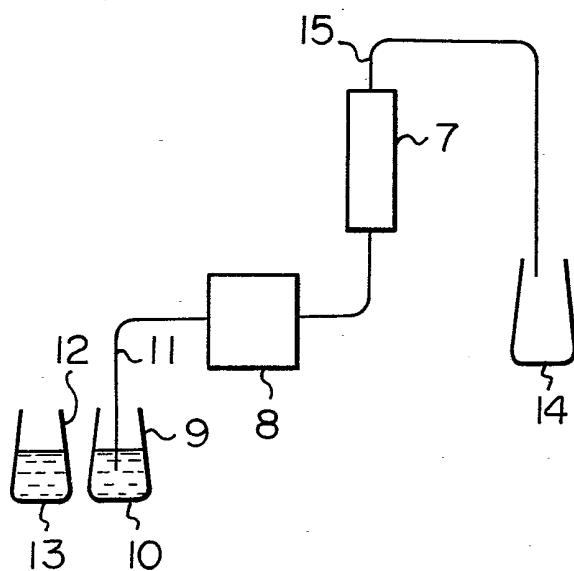


Fig. 7



पृ. 4/6

Fig. 8

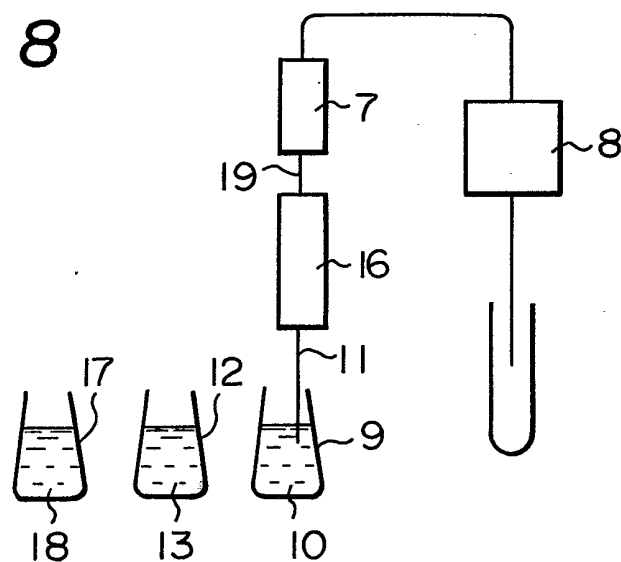
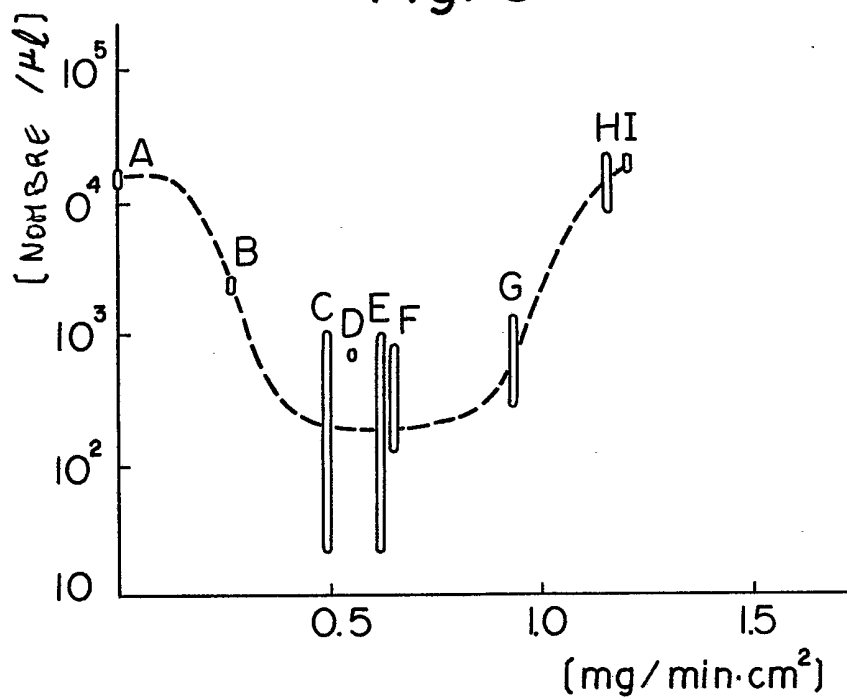


Fig. 9



पृ. 5/6

Fig. 10

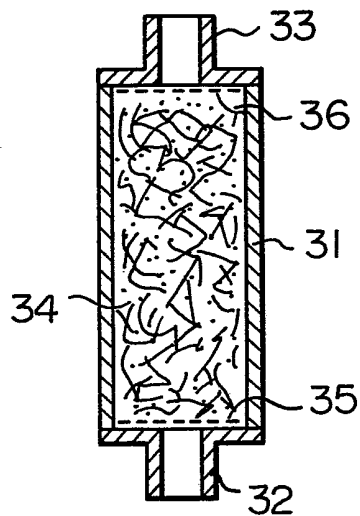
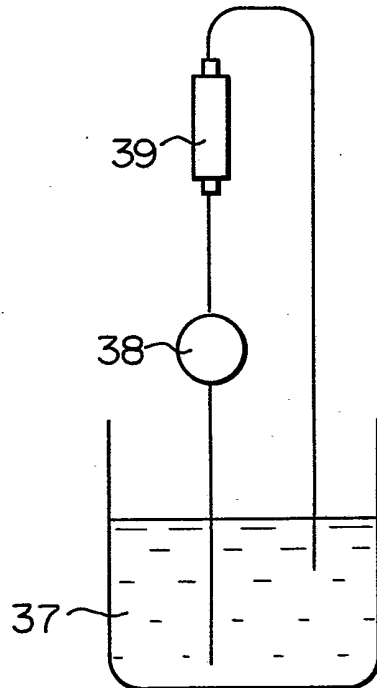


Fig. 11



Pp. 6/6

Fig. 12

