(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) 145965 B

(21) Ansøgning nr. 5738/76
(22) Indleveringsdag 20. dec. 1976
(24) Løbedag 20. dec. 1976
(41) Alm. tilgængelig 23. jun. 1977
(44) Fremlagt 2. maj 1983
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 22. dec. 1975, 2557871, DE

(51) Int.Cl.³ A 61 K 35/14
C 12 N 5/00
F 25 D 25/00

(71) Ansøger LINDE AKTIENGESELLSCHAFT, D-62 Wiesbaden, DE.

(72) Opfinder Horst Chmiel, DE.

(74) Fuldmægtig Internationalt Patent-Bureau.

(54) Fremgangsmåde og apparat til dyb=
frysning af flydende biologiske
substanser.

DK 145965 B

Opfindelsen vedrører en fremgangsmåde og et apparat til dybfrysning af flydende biologiske substanser, især blod, blodbestanddele eller cellesuspensioner, ved hvilken substanserne før nedkølingen blandes med beskyttelsesadditiver til undgåelse af cellebeskadigelse af de biologiske substanser under dybfrysningen.

Konservering af biologiske substanser til forhindring af irreversible cellebeskadigelser udgør et vanskeligt problem, navnlig ved konservering af blod. Gennem nogen tid er blod foruden ved konventionelle opbevaringsmetoder også gjort holdbar ved dybfrysning og oplagring i flydende nitrogen, hvorved først en langtidskonservering er blevet muliggjort. En nødvendig forudsætning ved dybfrysemetoden er at blande blodet med et beskyttelsesadditiv, da integriteten af de røde blodlegemers cellemembran ellers beskadiges, og cellerne kan blive hæmolyserede under dybfryseprocessen, når blodet føres gennem temperaturområdet for indfrysning. For at undgå udvaskning af beskyttelsesadditiverne fra blodet efter optøningen før en transfusion, som det hidtil har været nødvendigt på grund af beskyttelsesadditivernes uforenelighed med organismen, undersøges nu til dags sådanne beskyttelsesadditiver som f.eks. HES (hydroxyethylstivelse), med hensyn til deres biologiske forenelighed.

Et af problemerne i forbindelse med forberedelsen af blodet til fryseprocessen består i at blande blodet og beskyttelsesadditivet så fuldstændigt og hurtigt som muligt, da det har vist sig, at cellernes overlevelsesprocent bliver desto større, jo større tilførselshastigheden for beskyttelsesadditiverne i blodet er. Tilførselshastigheden står i relation til indtrængnings- eller anlægshastigheden for beskyttelsesadditiverne i eller på cellemembranerne. Af væ-

sentlig betydning er det endvidere så vidt muligt for hver celle i suspensionen at opnå samme koncentrationsbetingelser for beskyttelsesadditiverne. Hidtidige fremgangsmåder, der frembringer blandingen af blod og beskyttelsesadditiv ved hjælp af rystning, tillader forekomsten af inhomogeniteter i blandingen og bevirker derfor en højere beskadigelsesandel for de røde blodlegemer ved nedfrysningen.

Med opfindelsen tilsigtes der tilvejebragt en fremgangsmåde til blanding af biologiske substanser og beskyttelsesadditiver med en tilsluttet emballering til dybfrysning af den fremkomne blanding, ved hvilken fremgangsmåde der opnås en forbedring af blandingsgraden med tilførsel af beskyttelsesadditivet med meget stor hastighed og i så vidt mulig ensartet koncentration.

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved, at beskyttelsesadditiverne forstøves, at de biologiske substanser inddryppes i forstøvningsstrålen, og at den således opnåede blanding fyldes på beholdere og dybfryses.

Opfindelsen beror på den erkendelse, at blandingshastigheden er proportional med mediernes kontaktoverflade ved blanding af to flydende medier. Dette betyder, at en volumenenhed må opdeles i mange små delvolumener for at opnå den størst mulige overflade. Forstøves derfor beskyttelsesadditivet, før den biologiske substans indføres i dråbeform, har beskyttelsesadditivet en større kontaktoverflade, hvortil kommer, at de enkelte dråber af beskyttelsesadditivet også i forhold til det ikke forstøvede volumen har en højere overfladeenergi. Disse dråber vil derfor bestræbe sig på at forbinde sig med andre fluidumpartikler for at formindske deres overfladeenergi. Endvidere kan forstøvningsstrålens kinetiske energi anvendes til blanding af de to medier.

Beskyttelsesadditivet kan fortrinsvis ved hjælp af en pumpe bringes op på et højt tryk på f.eks. 160 bar, og derefter forstøves fint i en dyse, hvorefter de biologiske substanser kan inddryppes midt i forstøvningsstrålen. Ved hjælp af pumpen opnås der nemlig en god doseringsmulighed for beskyttelsesadditivet, da der ved hver arbejdstakt af pumpen med ensartet arbejdshastighed stadig vil blive transporteret en nøje defineret mængde beskyttelsesadditiv. Endvidere muliggør det med pumpen frembragte høje tryk også en forstøvning af mere seje fluider. Dette er vigtigt, da beskyttelsesadditivet må tilføres den biologiske substans så vidt mulig i høj koncentration for at undgå en for høj volumenandel af beskyttelsesadditivet i forhold til den biologiske substans. Endvidere betinger en højere koncentration en lavere overfladespænding og dermed en bedre blandbarhed af medierne.

Beskyttelsesadditiverne kan ifølge endnu en udførelsesform for opfindelsen forstøves ved hjælp af ultralyd, idet inddrypningen af de biologiske substanser sker i midten af forstøvningsstrålen. Med dette formål kan der i området for beskyttelsesadditivets tilgang være en lydsender, der med sin lydudstrålingsflade vender mod den tilførte strøm af beskyttelsesadditiv. Den store energitæthed af det af lydsenderen fremkaldte lydfelt bevirker en fin forstøvning af beskyttelsesadditivet.

En yderligere fordelagtig udførelsesform for opfindelsen består i, at forstøvningen af beskyttelsesadditiverne gennemføres ved hjælp af en under tryk stående bæregas på en sådan måde, at allerede en gasstrøm med et relativt lavt gastryk på 0,5-1 bar også medriver sejtflydende fluider. En regulering af den kinetiske energi af forstøvningsstrålen ved en gi-

vet forstøvningsdyse er mulig på enkel måde ved hjælp af en tilgangsventil. En inddrypning af den biologiske substans i siden af forstøvningsstrålen giver da en god blanding af de to medier.

Som bæregas kan der fortrinsvis anvendes nitrogen, da denne gas hverken ændrer den kemiske sammensætning af beskyttelsesadditivet eller indvirker uheldigt på bestanddelene i den biologiske substans. Føres bæregassen endvidere før forstøvning gennem et filter, f.eks. et membranfilter, kan en inficering af den biologiske substans af kim i gassen undgås.

Apparatet til gennemførelse af fremgangsmåden er ejendommeligt ved en forrådsbeholder for beskyttelsesadditiver, en forrådsbeholder for de biologiske substanser og en forstøvningsenhed, hvilke to forrådsbeholdere gennem adskilte ledninger og reguleringsorganer står i forbindelse med forstøvningsenheden, og at der i ledningen fra forrådsbeholderen for beskyttelsesadditiver til forstøvningsenheden i givet fald er en pumpe.

Såfremt der i ledningen fra forrådsbeholderen for beskyttelsesadditivet til forstøvningsenheden er en pumpe, kan der før forstøvningen fremkaldes et højt tryk i beskyttelsesadditivet, der ved udnyttelse af dette tryk kan ledes til forstøvningsenheden og forstøves i denne. I stedet for at anvende en pumpe kan de to forrådsbeholdere anbringes på et højere niveau end forstøvningsenheden, så at tilledningen af beskyttelsesadditiv og de biologiske substanser til forstøvningsenheden kan ske automatisk. I begge tilfælde er forrådsbeholderne fortrinsvis udskiftelige, så at såvel beskyttelsesadditiverne som de biologiske substanser kan leveres som sterile enheder. Endvidere kan det samlede apparat være anbragt i et sterilt lukket kammer, så at faren for inficering af de biologiske substanser

herved undgås.

Til indføring af den biologiske substans i midten af forstøvningsstrålen har forstøvningsenheden fortrinsvis en dyse, i hvis hus der centralt er indskruet en forneden kegleformet indsats, der har en langs midteraksen forløbende, til forrådsbeholderen for de biologiske substanser sluttet ledning, og som har sådanne dimensioner, at der mellem den konisk tilspidsede side af dysens hus og den keglestubformede del af indsatsen er en ringspalte, der er forbundet med forrådsbeholderen for beskyttelsesadditiver gennem en sidekanal i huset.

Til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen under anvendelse af en bæregas har apparatet en forrådsbeholder for beskyttelsesadditiver, en forrådsbeholder for biologiske substanser, en forrådsbeholder for bæregas og en forstøvningsenhed, hvorhos forrådsbeholderne er forbundet med forstøvningsenheden gennem hver sin ledning.

I dette tilfælde omfatter forstøvningsenheden fortrinsvis en konisk tilspidset dyse med en tilslutningsstuds for bæregassen, i hvilken dyse der centralt, kort før den mindste diameter i dysen ender et rør med tilslutning til forrådsbeholderen for beskyttelsesadditiver, hvorhos der på siden af dysen er en tilledning for de biologiske substanser, hvilken ledning fører til siden af forstøvningsstrålen.

Ifølge en foretrukket udførelsesform for opfindelsen er der i ledningen fra forrådsbeholderen for bæregassen til forstøvningsenheden et trykmåleorgan og et filter. Trykmåleorganet muliggør indstilling af en bestemt ønsket hastigheds- og gennemstrømningsværdi for bæregassen i forstøvningsenheden, så at der kan sikres en høj, ensartet strømningshastighed for bæregassen.

Ved en yderligere udførelsesform for apparatet

kan der være klembøjler til fastgørelse af foroven åbne plastposer, så at disse hænger sækagtigt ned fra forstøvningsenheden og kan optage blodblandingen. Efter fyldeoperationen tilsvejses plastposen og tilføres en dybfryseindretning.

Opfindelsen forklares nærmere i det følgende under henvisning til tegningen, hvor

fig. 1 viser et apparat til blanding af biologiske substanser og beskyttelsesadditiver ved hjælp af en pumpe,

fig. 2 en forstøvningsenhed for et beskyttelsesadditiv, der har fået et højt tryk ved hjælp af en pumpe,

fig. 3 et apparat til blanding af biologiske substanser og beskyttelsesadditiver ved hjælp af en bæregas, og

fig. 4 en tilsvarende forstøvningsenhed for beskyttelsesadditivet.

I fig. 1 er der vist en forstøvningsenhed 4 til blanding af biologiske substanser med beskyttelsesadditiver i et ikke vist sterilt, lukket rum, hvilken forstøvningsenhed gennem adskilte ledninger er forbundet med en forrådsbeholder 1 for beskyttelsesadditiver og en forrådsbeholder 2 for biologiske substanser. Begge forrådsbeholdere 1 og 2 er udskiftelige og kan leveres som sterile enheder. I ledningen fra forrådsbeholderen 1 for beskyttelsesadditivet til forstøvningsenheden 4 er der en pumpe 5 til fremkaldelse af et højt tryk i beskyttelsesadditivet, idet der med pumpen 5 kan transporteres en nøjagtig defineret mængde af beskyttelsesadditiv til forstøvningsenheden 4.

I fig. 2 er der vist en til dette apparat passende forstøvningsenhed, som har en dyse 6, i hvis hus der er indskruet en indsats 7, der er keglestub-

formet i sin nederste ende. Langs midteraksen af indsatsen 7 forløber der en ledning 8, der er tilsluttet forrådsbeholderen for den biologiske substans, hvilken ledning ender i den fra dysen 6 fremtrædende forstøvningsstråle. Indsatsen 7 har sådanne dimensioner, at der mellem dens keglestubformede del og væggen i dysen opstår en ringspalte 9, og at den ender lige før den mindste diameter af dysen. Gennem en sidekanal 10 i huset er ringspalten 9 forbundet med forrådsbeholderen for beskyttelsesadditiver.

Blandingsindretningen ifølge fig. 3 har til forskel fra blandingsindretningen ifølge fig. 1 yderligere en til forstøvningsenheden 11 sluttet gasflaske 3 for en bæregas, idet en pumpe for beskyttelsesadditivet herved kan undværes. I ledningen fra gasflasken 3 til forstøvningsenheden 11 er der et filter 17, der hindrer inficering af den biologiske substans af kim i bæregassen. Gennem ikke viste reguleringsorganer kan tilførslen af den biologiske substans og beskyttelsesadditiverne i forstøvningsenheden 11 reguleres, idet man ved aflæsning af trykket i ledningen fra gasflasken 3 til forstøvningsenheden 11 ved hjælp af en trykmåler 16 kan bestemme strømningshastigheden for bæregassen i forstøvningsenheden 11. Indstilles der bestemte værdier på reguleringsorganerne og på trykmåleren, opnås der en hurtig og ensartet blanding af de to medier.

I fig. 4 er der vist en til dette apparat svarende forstøvningsenhed, der i hovedsagen består af en konisk tilspidset dyse 12 med et centralt anbragt, ved enden ligeledes konisk tilspidset rør 14, der ender kort før den mindste diameter af dysen 12. I dysen 12 indføres bæregassen gennem

en tilslutningsstuds 13, medens røret 14 er forbundet med beholderen for beskyttelsesadditivet. En tilførselsledning 15, der fører til siden af den fra dysen fremtrædende forstøvningsstråle muliggør inddrypning af biologiske substanser i forstøvningsstrålen.

Som beskyttelsesadditiver, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kommer f.eks. følgende stoffer på tale: vandige opløsninger af hydroxyethylstivelse, højmolekylært dextran, gelatine, glycerol og polyvinylpyrrolidon.

Taleksempler.

Kendt teknik.

Ved en kendt teknik, der er beskrevet i en artikel af H. W. Krijnen et al. i Cryobiology 5, nr. 2, 1968, centrifugeres 500-600 ml blod, hvorefter det overliggende plasma fjernes, og der sker oplagring ved -30°C. Plasmaet erstattes af et kølebeskyttelsesmiddel, der består af 380 g glycerol, 29 g sorbitol og 6,3 g NaCl pr. liter vand. En aluminiumbeholder med en højde på 250 mm og en diameter på 59 mm fyldes med denne erythrocytsuspension, der er beriget med glycerol. Dybfrysningen sker ved neddykning i flydende nitrogen med en temperatur på -196°C i 10 minutter. Optøningen sker i et vandbad på 40°C under samtidig omrystning med en frekvens på 1 s^{-1} i 10 minutter. Vaskning sker med en vaskeopløsning, der i første trin pr. liter vand indeholder 175 g sorbitol og 8 g Nacl. I to yderligere trin vaskes der med fysiologisk kogesaltopløsning. Ved denne kendte fremgangsmåde opnås der i gennemsnit 92% overlevende, røde blodlegemer.

Fremgangsmåde ifølge opfindelsen.

Til dybfrysning af normalt menneskeblod blev der anvendt en 87% vandig glycerolopløsning med en viskositet på 145 cP, svarende til 0,145 Ns/m^2. Den maksimale tilførselshastighed for beskyttelsesmidlet androg 216 cm^3/s, som ved en dysediameter på 0,07 cm svarer til en volumenstrøm på 0,83 cm^3/s. Denne tilførselshastighed blev enten opnået ved hjælp af en i tilledningen fra forrådsbeholderen for beskyttelsesadditiv til forstøvningsenheden anbragt pumpe eller ved anvendelse af en bæregas. Bæregassens tryk blev indstillet på mellem 0,5 og 1 ato (ca. 1 bar), idet bæregassen til opnåelse af kimfrihed blev ført gennem et membranfilter.

Partikelstørrelsen i den forstøvede stråle efter forstøvningsenheden androg i begge tilfælde mindre end 0,1 mm, og forstøvningsstrålens spidsvinkel ved afgangen fra forstøvningsenheden var ca. 60°. I forstøvningsstrålen blev der inddryppet menneskeblod med en dråbestørrelse på stort set 2 mm. Koncentrationen af beskyttelsesadditivet i det samlede materiale androg under de forannævnte betingelser 15%.

Derefter blev den opnåede blanding af beskyttelsesadditiv og menneskeblod dybfrosset med en frysehastighed på $595^{\circ}C/min$. Indfrysningstiden fra $0^{\circ}C$ til $-196^{\circ}C$ androg 2 min. Den sluttelige temperatur blev holdt på $-196^{\circ}C$.

Under disse betingelser kunne andelen af overlevende, røde blodlegemer holdes på mindst 98%.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til dybfrysning af flydende biologiske substanser, især blod, blodbestanddele eller cellesuspensioner, ved hvilken substanserne før nedkøling blandes med beskyttelsesadditiver til undgåelse af cellebeskadigelse af de biologiske substanser under dybfrysningen, k e n d e t e g n e t ved, at beskyttelsesadditiverne forstøves, at de biologiske substanser inddryppes i forstøvningsstrålen, og at den således opnåede blanding påfyldes beholdere og dybfryses.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at beskyttelsesadditiverne ved hjælp af en pumpe bringes op på et højt tryk og derefter forstøves fint i en dyse, og at inddrypningen af de biologiske substanser sker i midten af forstøvningsstrålen.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at beskyttelsesadditiverne forstøves ved hjælp af ultralyd, og at inddrypningen af de biologiske substanser sker i midten af forstøvningsstrålen.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at forstøvningen af beskyttelsesadditiverne gennemføres ved hjælp af en under tryk stående bæregas i en forstøvningsenhed.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der som bæregas anvendes nitrogen, der før anvendelse ledes gennem et filter.

6. Apparat til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved en forrådsbeholder (1) for beskyttelsesadditiver, en forrådsbeholder (2) for de biologiske substanser og en forstøvningsenhed (4), hvilke to forrådsbehol-

dere (1, 2) gennem adskilte ledninger og reguleringsorganer står i forbindelse med forstøvningsenheden (4), og at der i ledningen fra forrådsbeholderen (1) for beskyttelsesadditiver til forstøvningsenheden (4) i givet fald er en pumpe (5).

7. Apparat ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at forstøvningsenheden (4) har en dyse (6), i hvis hus der centralt er indskruet en forneden keglestubformet indsats (7), der har en langs midteraksen forløbende, til forrådsbeholderen (2) for de biologiske substanser sluttet ledning (8), og som har sådanne dimensioner, at der mellem den konisk tilspidsede side af dysens (6) hus og den keglestubformede del af indsatsen (7) er en ringspalte (9), der er forbundet med forrådsbeholderen (1) for beskyttelsesadditiver gennem en sidekanal (10) i huset.

8. Apparat til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge krav 4 eller 5, k e n d e t e g n e t ved en forrådsbeholder (1) for beskyttelsesadditiver, en forrådsbeholder (2) for biologiske substanser, en forrådsbeholder (3) for bæregas og en forstøvningsenhed (11), og at forrådsbeholderne (1, 2, 3) er forbundet med forstøvningsenheden (11) gennem hver sin ledning.

9. Apparat ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at forstøvningsenheden (11) omfatter en konisk tilspidset dyse (12) med en tilslutningsstuds (13) for bæregassen, i hvilken dyse der centralt, kort før den mindste diameter i dysen ender et rør (14) med tilslutning til forrådsbeholderen (1) for

beskyttelsesadditiver, og at der på siden af dysen er en tilledning (15) for de biologiske substanser, hvilken ledning fører til siden af forstøvningsstrålen.

10. Apparat ifølge krav 8 eller 9, k e n d e t e g n e t ved, at der i ledningen fra forrådsbeholderen (3) for bæregassen til forstøvningsenheden (11) er et trykmåleorgan (16) og et filter (17).

11. Apparat ifølge ethvert af kravene 6-10, k e n d e t e g n e t ved, at forstøvningsenheden (4, 11) har klembøjler til fastgørelse af plastposer.

Fremdragne publikationer:

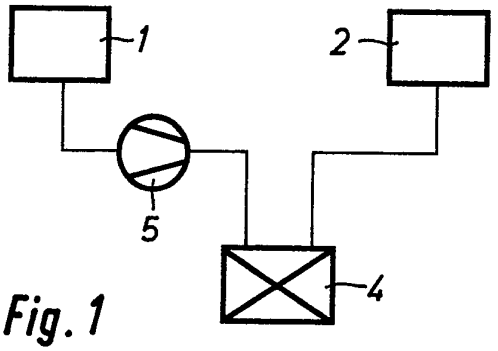


Fig. 1

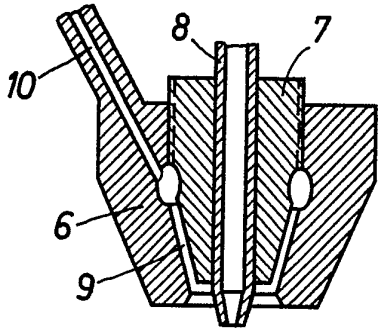


Fig. 2

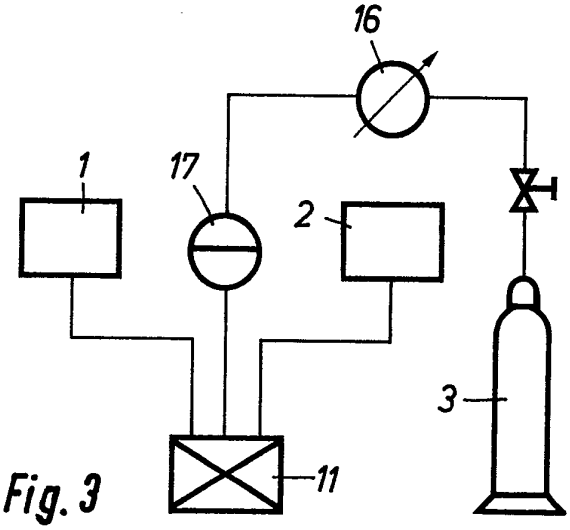


Fig. 3

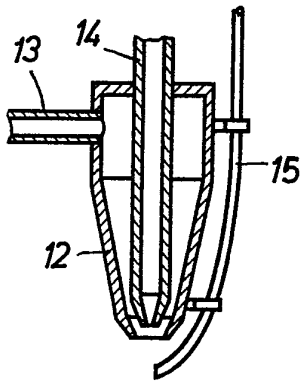


Fig. 4