



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 02 231 T2 2004.04.29**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 239 895 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 02 231.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/12661**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 988 792.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/043787**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.04.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61L 26/00**
A61K 35/14, A61L 24/00

(30) Unionspriorität:
AL990010 U 14.12.1999 IT

(73) Patentinhaber:
Sacchi, Maria Cristina, S. Michele, IT

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
**SACCHI, Cristina, Maria, I-15040 S. Michele, IT;
BELLANDA, Marco, I-15100 Alessandria, IT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GELS VON AUTOLOGEN BLUTPLÄTTCHEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Art der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Prozess zur Herstellung eines autologen Blutplättchengels und ein Kit zur Durchführung dieses Verfahrens.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Marx und Kollegen haben gezeigt, dass der Einsatz von Blutplättchenkonzentrat eine innovative Methode zur Modulation und Beschleunigung von Wundheilungsprozessen sowie von Knochenregenerationsprozessen (Oral surg., oral Med., Oral Path 1998, 85: 638-646) darstellt. Aus diesem Grund erarbeiteten diese Autoren ein Technik zur Isolierung und Präzipitation von Blutplättchen, bei der ein autologes Blutplättchenkonzentrat gewonnen wird, das weder toxisch noch immunoreaktiv ist. Diese Substanz ist in der Lage, die Wirkung der in den Blutplättchen enthaltenen Wachstumsfaktoren zu verstärken, die den an den Wundheilungsschritten beteiligten Stoffwechselweg in Gang setzen.

[0003] Gemäß dem Protokoll von Marx, welches auch den Gebrauch des Zellseparators mit einschließt, wird das Blutplättchenkonzentrat hergestellt aus einer 500 ml Probe von venösem Blut, die mittels eines Venenkatheters entnommen wird. Danach wird das Blutplättchenkonzentrat mit Kalziumchlorid und Rinder-Thrombin aktiviert, um ein Blutplättchengel herzustellen, das entweder mit autologer Spongiosa (Substantia spongiosa) und Kortikalis (Substantia corticalis) oder einer Knochenmatrix aus Biogläsern kombiniert werden.

[0004] In Italien kann die Technik nach Marx nicht durchgeführt werden, da Rinder-Thrombin kommerziell nicht mehr erhältlich ist. Darüber hinaus kann diese Methode, bei der sehr große Blutmengen eingesetzt werden, die wiederum spezielle Ausrüstung und Instrumente sowie erfahrenes Personal zur Herstellung des Blutplättchenkonzentrats erforderlich machen, nicht im Umfeld der medizinischen Chirurgie zur routinemäßigen Anwendung des Plättchengels eingesetzt werden.

[0005] In den Patenten USP5,585,007 und WO 98/11925 werden Methoden zur Blutplättchengelherstellung dargestellt. Obwohl diese Methoden im Vergleich zur Methode nach Marx bereits eine Verbesserung darstellen, da sie deutlich geringere Blutmengen (50-60 ml) benötigen, muss auch hier Rinder- oder Humanthrombin eingesetzt werden, damit sich das Blutplättchengel bildet. In dem Patent WO 96/27397 wird ein Plasma-Buffy-Coat-Konzentrat kombiniert mit Thrombin oder Batroxobin zur Bildung eines Plättchenwundklebeverschlusses dargestellt, wobei Thrombin bevorzugt wird. Bis heute kann humanes Thrombin ausschließlich durch die rekombinante DNS-Technik hergestellt werden. In Italien kön-

nen mit dieser Technik hergestellte Substanzen nur für In-Vitro-, nicht jedoch für In-Vivo-Experimente eingesetzt werden.

Technisches Problem

[0006] Es ergab sich die Notwendigkeit zur Herstellung eines Plättchengels, das nicht die Nachteile des derzeitigen Stands der Technik mit sich bringt, die mit dem Einsatz der Aktivatoren wie humanem oder Rinder-Thrombin verbunden sind.

Kurzdarstellung der Erfindung

[0007] Der Antragsteller hat unerwartet herausgefunden, dass es möglich ist, die zuvor erwähnten Nachteile zu vermeiden, indem Batroxobin anstatt von Thrombin als Aktivator eingesetzt wird.

[0008] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Prozess zur Herstellung eines Plättchengels, bei dem ein Plättchenkonzentrat mit einem anorganischen oder organischen Kalziumsalz und Batroxobin gemischt wird.

[0009] Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Kit zur Durchführung des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung, das im Einzelnen wie folgt beinhaltet:

- a) eine sterile Einweg-Kapsel aus transparentem Kunststoff oder Glasmaterial, ausgestattet mit einer Schraubverschlusskappe, deren oberer Teil aus einer perforierbaren Membran besteht, die mit einem entsprechenden sterilen Coating (Überzug) überzogen ist, wobei die besagte perforierbare Membran die Insertion einer Nadel ermöglicht, die auf einer Spritze sitzt, welche das Plättchenkonzentrat enthält und somit gleichzeitig den Luftkontakt mit dem Inneren der Kapsel vermeidet wird.
- b) zwei Injektoren, die aus der besagten perforierbaren Membran herausragen und das Kalziumsalz beziehungsweise Batroxobin enthalten.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0010] In den **Abb. 1** und **2** sind zwei bevorzugte Aufbauarten des Kits gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt.

[0011] In diesen Abbildungen repräsentiert im Einzelnen: **(3)** die sterile Wegwerfkapsel, **(4)** den Schraubverschluss, dessen oberer Teil aus einer perforierbaren Membran **(5)** besteht. **(1)** und **(2)** repräsentieren die beiden Injektoren, die aus der besagten perforierbaren Membran **(5)** herausragen. **(6)** schließlich repräsentiert die Spritze, die das Plättchenkonzentrat enthält und **(7)** stellt das Plättchengel dar, welches sich während des Reaktionsablaufs gebildet hat.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

1. Bevorzugte Prozessablaufsbedingungen gemäß der vorliegenden Erfindung

[0012] Vorzugsweise wird als anorganisches Kalziumsalz in dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung Kalziumchlorid eingesetzt, wohingegen bei Gebrauch eines organischen Kalziumsalzes Kalziumglukonat der Vorzug gegeben wird.

[0013] Das anorganische oder organische Salz ist in Form einer wässrigen Lösung enthalten, in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ bis 0,5M.

[0014] Gemäß eines bevorzugten Verfahrensaufbaus der vorliegenden Erfindung wird $8 \cdot 10^{-5}$ (80µM) Kalziumchlorid eingesetzt.

[0015] Ein darüber hinaus bevorzugter Aufbau bedingt den Einsatz von 0,23M Kalziumglukonat.

[0016] Das benutzte Batroxobin ist vorzugsweise in der Form einer wässrigen Lösung mit 1 internationalen Einheit an Thrombin und wird unter dem Handelsnamen Botropase® von Ravizza Farmaceutici S.p.A. vertrieben.

2. Methode zur Herstellung des Plättchenkonzentrates

[0017] Das in dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzte Plättchenkonzentrat wird aus Vollblut (Probe von 40-50ml venösem Blut, gesammelt in 20 ml Spritzen, die 4ml Natriumcitrat als Antikoagulans enthalten) durch eine 2-Phasen-Zentrifugation hergestellt, wobei ein Intermediärprodukt entsteht, welches plasmareich ist. Diese Methode ermöglicht eine Ausbeute von mindestens 80% der im Vollblut vorkommenden Blutplättchen.

[0018] Im Detail umfasst diese Technik die folgenden Schritte: Venöses Blut wird in 4 Röhrchen gesammelt und bei 180g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Behandlung liegen zwei Phasen vor: eine dunkle, bestehend aus präzipitierten roten und weißen Blutkörperchen am Röhrchenboden und eine klare, durchsichtige im oberen Teil des Röhrchens, bestehend aus plättchenreichem Plasma. Dieses Plasma wird entnommen und mithilfe einer Pasteurpipette auf weitere 4 Röhrchen verteilt und bei 580g für 20 Minuten zentrifugiert. Dank dieser schnelleren Zentrifugation (580g im Vergleich zu 180g) ist es möglich, ein Plättchensediment in Form eines kleinen dichten „Pellets“ am Röhrchenboden zu erhalten. Der flüssige Überstand besteht aus plättchenarmem Plasma.

[0019] Der Überstand an plättchenarmem Plasma wird bis auf ein geringes Aliquot (1,5ml) zur nochmaligen Suspendierung des „Pellets“ aus den Röhrchen entfernt. Man erhält so eine homogene Suspension.

[0020] Nach diesem Verfahren ist es möglich, eine Plättchenendkonzentration (von etwa 6 ml) zu erhalten, indem man die Plättchensuspension in den 4 Röhrchen zusammen gibt. Nach einer Ruhezeit von

etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur ist diese Plättchenkonzentration bereit zum Einsatz als Reaktant in dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung.

3. Membranen, die mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung gewonnen werden

[0021] Mit Hilfe des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung ist es möglich, eine Membran herzustellen, die neben dem Plättchengel ebenfalls aktive Inhaltsstoffe enthalten kann wie beispielsweise antibakterielle Agenzien, Desinfektionsmittel und/oder sterile Trägerstoffe usw.

[0022] Vorzugsweise besteht diese Membran im Wesentlichen aus dem autologen Plättchengel, das durch das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde. Gewonnen werden diese Membranen, indem einfach die überschüssige Flüssigkeit entfernt wird.

[0023] Findet die Plättchengelbildung in einer Plastik- oder Glas-Petrischale (wie sie zur Zellkultur benutzt werden) statt, ist es möglich, eine dünne Membran zu erhalten, da das Gel während der Aktivierung die Form der Petrischale annimmt.

[0024] In diesem Fall ist es möglich durch Entfernen der während der Gelbildung freigesetzten Flüssigkeit mithilfe beispielsweise einer Pasteurpipette eine flexibel formbare Membran mit gut definierter Kontur zu erhalten.

[0025] Die entfernte überschüssige Flüssigkeit, bestehend aus Batroxobin und Kalziumsalz wird zum plättchenarmen Plasma zugegeben, welches aus der zweiten Zentrifugation stammt, und führt nach 20-30 Minuten zur Bildung eines weiteren dicken Plättchengels.

4. Das Kit gemäß der vorliegenden Erfindung

[0026] Die **Abb. 1** und **2** stellen den bevorzugten Aufbau des Kits gemäß der vorliegenden Erfindung dar.

[0027] Im Einzelnen repräsentieren in diesen Abbildungen: **(3)** die sterile Wegwerfkapsel, **(4)** den Schraubverschluss, dessen oberer Teil aus einer perforierbaren Membran **(5)** besteht. Diese Membran ist mit einem sterilen Überzug versehen, wie er normalerweise in der pharmazeutischen Industrie und der Diagnostik gebraucht wird, wie beispielsweise in Form eines Aluminiumfilms oder eines anderen ähnlichen Materials. **(1)** und **(2)** repräsentieren die beiden Injektoren, die aus der besagten perforierbaren Membran **(5)** herausragen und enthalten das anorganische beziehungsweise das organische Kalziumsalz (besser 0,23 M Kalziumglukonat) und Batroxobin. **(6)** repräsentiert schließlich die Spritze, die das Plättchenkonzentrat enthält, und **(7)** stellt das Plättchengel dar, das sich während der Reaktion bildet.

[0028] Durch manuellen Druck auf den Verschluss des Injektors **(1)** wird der Austritt von Kalziumglukonat in einer Menge von 0,3 bis 0,5 ml aus dem Injek-

tor in die Kapsel (3) ermöglicht. Analog dazu führt ein manueller Druck auf den Verschluss des Injektors (2) zum Austritt von Batroxobin in einer Menge von 0,3 bis 0,5 ml. Die in **Abb. 1** dargestellte Kapsel (3) hat vorzugsweise eine Kapazität von 10 bis 20 ml, wobei dieselbe Kapsel des Kits wie in **Abb. 2** dargestellt die Erzeugung von Membranen mit einem Durchmesser von 3 bis 9 cm erlaubt, da die Kapsel selbst einen Durchmesser von 3,5 bis 10,0 cm haben kann.

[0029] Der Prozess gemäß der vorliegenden Erfindung, der mit dem zuvor erwähnten Kit durchgeführt wird, umfasst die folgenden Schritte:

- A) Beladung einer 10ml-Spritze (6) mit einem Plättchenkonzentrat mit einem Volumen im Bereich von 3 bis 9 ml;
- B) Entfernung des sterilen Überzugs von der perforierbaren Membran (5) und Einführen der Spritzennadel in die Kapsel (3) durch die perforierbare Membran (5) hindurch;
- C) Drücken der Verschlusskappen der Injektoren (1) und (2) in rascher Folge, die Kalziumglukonat beziehungsweise Batroxobin enthalten und Drücken des Spritzenkolbens (6) zur Entleerung des Spritzeninhaltes in die Kapsel (3);
- D) Sanftes Schütteln der Kapsel (3) mit einer rotierenden Bewegung für etwa 30 Sekunden;
- E) Aufdrehen des Schraubverschlusses (4) und Entnahme des so gebildeten Plättchengels (7).

Patentansprüche

1. Ein Prozess für die Herstellung eines Blutplättchengels, bei dem ein Blutplättchenkonzentrat mit Calciumchlorid und Batroxobin gemischt wird, wobei das besagte Blutplättchenkonzentrat mit Hilfe eines Verfahrens gewonnen wird, das wie folgt beinhaltet:

i.) Zentrifugation von 40-50 ml venösem Blut bei 180g für 20 Minuten, wobei zwei Phasen entstehen: eine dunkle, die präzipitierte rote und weiße Blutzellen am Boden des Zentrifugenröhrchens enthält und eine klare durchsichtige in der oberen Hälfte des selben Röhrchens, die aus blutplättchenreichem Plasma besteht.

ii.) Zentrifugation des gewonnenen blutplättchenreichen Plasmas bei 580g für 20 Minuten, wobei ein Blutplättchensediment in Form von „Pellets“ entsteht und ein flüssiger Überstand, der aus blutplättchenarmem Plasma besteht.

iii.) Suspension der besagten Pellets in einem Aliquot des besagten blutplättchenarmen Plasmas, das erforderlich ist, um eine Blutplättchenkonzentration von etwa 6 ml zu erhalten.

2. Ein Prozess zur Herstellung eines Blutplättchengels, der die Mischung eines Plättchenkonzentrates mit einem organischen oder anorganischen Calciumsalz und Batroxobin umfasst, wobei das besagte Plättchenkonzentrat mit einem Verfahren gewonnen wird, das wie folgt beinhaltet:

i.) Zentrifugation von 40-50 ml venösem Blut bei 180g

für 20 Minuten, wobei zwei Phasen entstehen: eine dunkle, die präzipitierte rote und weiße Blutzellen am Boden des Zentrifugenröhrchens enthält und eine klare durchsichtige in der oberen Hälfte des selben Röhrchens, die aus blutplättchenreichem Plasma besteht.

ii.) Zentrifugation des gewonnenen blutplättchenreichen Plasmas bei 580g für 20 Minuten, wobei ein Blutplättchensediment in Form von „Pellets“ entsteht und ein flüssiger Überstand, der aus blutplättchenarmem Plasma besteht.

iii.) Suspension der besagten Pellets in einem Aliquot des besagten blutplättchenarmen Plasmas, das erforderlich ist, um eine Blutplättchenkonzentration von etwa 6 ml zu erhalten.

3. Der Prozess gemäß Anspruch 2, wobei es sich bei dem besagten organischen Salz um Calciumgluconat handelt.

4. Der Prozess gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei das Calciumsalz in Form einer wässrigen Lösung vorliegt, in der es in einer Konzentration im Bereich von $5 \cdot 10^{-5}$ bis 0,5 M enthalten ist

5. Der Prozess gemäß den Ansprüchen 1, 2 oder 4, wobei eine Konzentration von $8 \cdot 10^{-5}$ bis 0,5 M (80 μ M) Calciumchlorid eingesetzt wird.

6. Der Prozess gemäß den Ansprüchen 2-4, wobei 0,23 M Calciumgluconat eingesetzt wird.

7. Der Prozess gemäß den Ansprüchen 1-6, wobei Batroxobin Thrombin in 1 internationalen Einheit/ml enthält.

8. Ein Kit zur Durchführung des Prozesses gemäß den Ansprüchen 1-7, bestehend aus:

a) einer sterilen Wegwerfkapsel (3) aus transparentem Plastik oder Glas, ausgestattet mit einem Schraubverschluss (4), dessen oberer Teil aus einer perforierbaren Membran besteht (5), überzogen mit einem passenden sterilen Überzug, der bei Gebrauch entfernt werden kann, besagter perforierbarer Membran (5), die die Insertion der Spritzennadel erlaubt (6), welche die besagte Plättchenkonzentration enthält und gleichzeitig vermeidet, dass das Innere der besagten Kapsel (3) mit Luft in Kontakt kommt.

b) zwei Injektoren (1) und (2) die aus der perforierbaren Membran (5) herausragen und zum einen ein Calciumsalz zum anderen Batroxobin enthalten.

9. Das Kit gemäß Anspruch 8, wobei die Kapazität der Kapsel (3) zwischen 10 und 20 ml liegt.

10. Das Kit gemäß den Ansprüchen 8 und 9, wobei die Kapsel einen Durchmesser von 3,5 bis 10,0 cm hat, was eine Membran mit einem Durchmesser von 3 bis 9 cm erlaubt.

11. Der Prozess zur Herstellung eines Blutplättchengels gemäß den Ansprüchen 1-7, durchgeführt mit dem Kit gemäß Anspruch 8, der die folgenden Schritte beinhaltet:

- A) Beladung einer 10-ml-Spritze (6) mit einem Plättchenkonzentrat im Bereich von 3 bis 9 ml;
- B) Entfernen des sterilen Überzuges von der perforierten Membran (5) und Einführen der Nadel der Spritze (6) in die Kapsel (3) durch die perforierbare Membran hindurch;
- C) Rasch nacheinander folgendes Pressen der Kapselinjektoren (1) und (2), die 0,23 M Calciumgluconat in 0,3-0,5 ml Wasser beziehungsweise 0,3 bis 0,5 ml Batroxobin mit einer Konzentration von 1 Internationalen Einheit/ml an Thrombin enthalten und Injizieren des Spritzeninhaltes in die Kapsel (3) durch Drücken des Spritzenkolbens (6);
- D) Leichtes Schütteln der Kapsel (3) durch eine rotierende Bewegung für etwa 30 Sekunden;
- E) Aufdrehen des Schraubverschlusses (4) und Entnahme des Plättchengels (7), das sich auf diese Weise gebildet hat, wobei das Ausgangsplättchenkonzentrat mit Hilfe eines Prozesses gewonnen wird, bestehend aus:
 - i.) Zentrifugation von 40-50ml venösem Blut bei 180g für 20 Minuten, wobei zwei Phasen entstehen: eine dunkle, die präzipitierte rote und weiße Blutzellen am Boden des Zentrifugenröhrchens enthält und eine klare durchsichtige in der oberen Hälfte des selben Röhrchens, die aus blutplättchenreichem Plasma besteht.
 - ii.) Zentrifugation des gewonnenen blutplättchenreichen Plasmas bei 580g für 20 Minuten, wobei ein Blutplättchensediment in Form von „Pellets“ entsteht und ein flüssiger Überstand, der aus blutplättchenarmem Plasma besteht.
 - iii.) Suspension der besagten Pellets in einem Aliquot des besagten blutplättchenarmen Plasmas, das erforderlich ist, um eine Blutplättchenkonzentration von etwa 6 ml zu erhalten.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

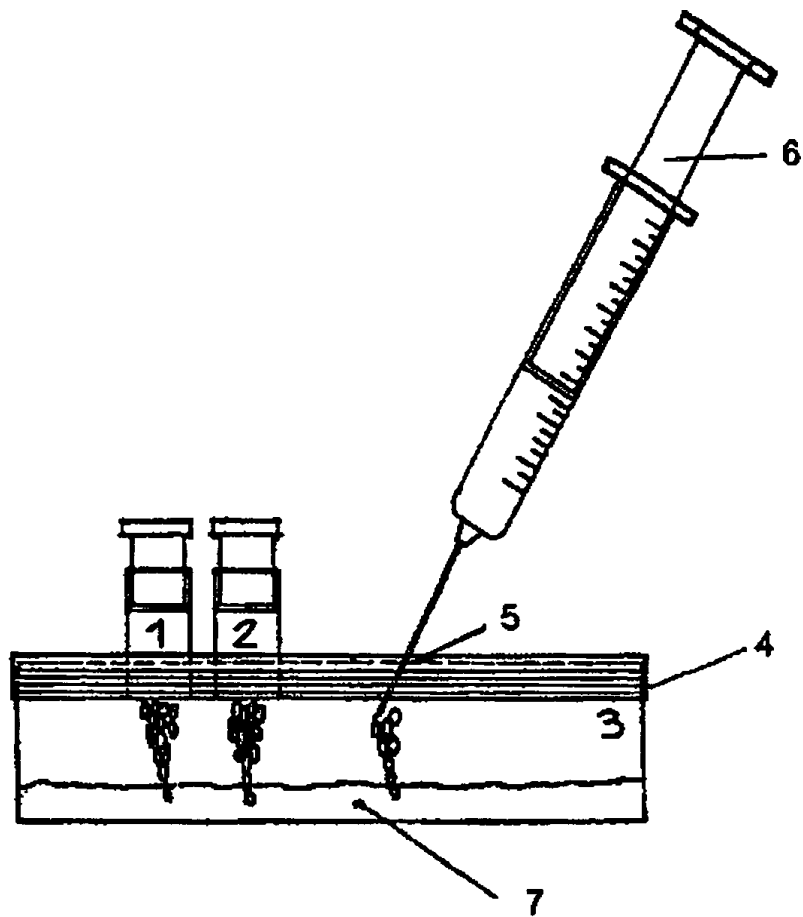


ABBILDUNG 1

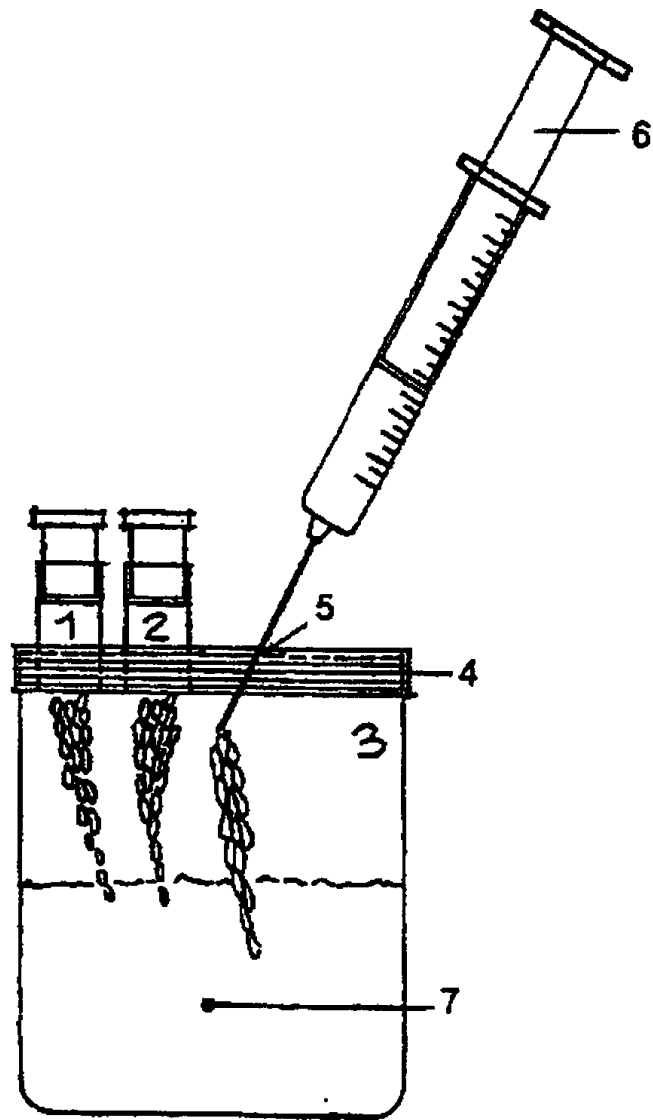


ABBILDUNG 2