

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1045/2007**

(51) Int. Cl.⁸: **A61M 1/36** (2006.01)

(22) Anmeldetag: **06.07.2007**

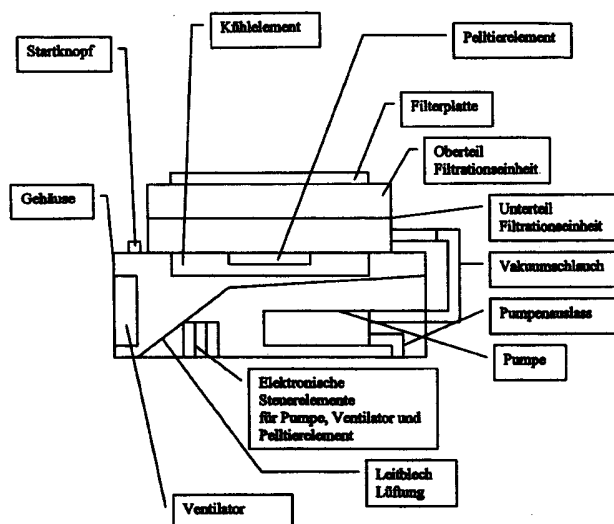
(43) Veröffentlicht am: **15.01.2009**

(73) Patentinhaber:

TECHNOCLONE GESELLSCHAFT M.B.H.
A-1235 WIEN (AT)

(54) **PLASMAFILTRATION**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung von Blutplasma für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, insbesondere Gerinnungsparameter. Um die Messung zu verbessern, wird das Blutplasma mittels Unterdruck durch ein Filter gesaugt.



- 10 -



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung von Blutplasma für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, insbesondere Gerinnungsparameter. Um die Messung
5 zu verbessern, wird das Blutplasma mittels Unterdruck durch ein Filter gesaugt.

(Fig. 1)

NACHGEREICHT

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aufbereitung von Blutplasma vor der Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, wie z.B. Gerinnungsparameter und Thrombinparameter, die Erfindung bezieht sich auch auf eine Vorrichtung, mit der das Verfahren durchgeführt werden kann.

5

Zur Durchführung verschiedener Analysen wird zunächst aus dem Blut eines Patienten Plasma gewonnen. Dies erfolgt in den meisten Fällen durch Zentrifugation. Das dabei erhaltene Plasma bildet im Stand der Technik die Grundlage für verschiedene Labortests. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass im Blut vorhandene Mikropartikeln durch die Zentrifugation nicht selektiert werden, sondern im Plasma verbleiben. Es hat sich nun herausgestellt, dass diese Mikropartikeln die Messwerte bei der Bestimmung von diversen Blutparametern verfälschen.

10

Es besteht somit der Bedarf an einer Lösung dieses Problems, eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung von Blutwerten zu erlangen, die von den Mikropartikeln nicht verfälscht sind.

15

Dieses Ziel wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art dadurch erreicht, dass das aus dem Blut erhaltene Plasma filtriert wird, bevor es auf einen bestimmten Parameter hin analysiert wird.

20

Dieses Ziel wird durch eine Vorrichtung der eingangs genannten Art dadurch erreicht, dass ein Filter vorgesehen ist, durch den das Plasma in einen Auffangbehälter gelangt, und einer Vakuumpumpe, die ausgelegt ist, auf der einen Seite des Filters einen Unterdruck zu erzeugen.

25

Bevorzugte Ausführungsformen beinhalten, dass das Filter für Mikropartikel im wesentlichen undurchlässig ist, dass das Filter eine Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 μm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 μm (Mikrometer) aufweist, dass der Unterdruck -50 mbar bis -1000 mbar, vorzugsweise -300 mbar bis -600 mbar beträgt, dass das Beaufschlagen des Filters mit Unterdruck zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten dauert.

30

Die Vorrichtung zur Aufbereitung von Blutplasma für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, insbesondere Gerinnungsparameter, ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen Filter, einen hinter dem Filter angeordneten Auffangbehälter und eine Vakuumpumpe aufweist, wobei die Vakuumpumpe mit dem Raum hinter dem Filter verbunden ist.

Bevorzugte Ausführungsformen beinhalten, dass das Filter eine Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 μm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 μm (Mikrometer) aufweist, dass der Auffangbehälter eine Mikrotiterplatte ist, dass der Auffangbehälter Eppendorf Tubes sind, dass der Filter, der Auffangbehälter und die Vakuumpumpe in einer gemeinsamen Einheit integriert sind, dass unterhalb des Filters ein Kühlelement, vorzugsweise ein Peltierelement, zur Kühlung des Filtrervorganges vorgesehen ist.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnung näher erläutert. Dabei zeigt

die Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, die Fig. 2 eine erfindungsgemäße Vorrichtung im Detail.

Die Gewinnung von Plasma aus antikoaguliertem (Citrat 0,011mM) Vollblut erfolgt üblicherweise durch Zentrifugation nach DIN 58905 (15 min, bei mindestens 2500g). Das hierbei erhaltene Plasma wird als thrombozytenarmes Plasma (PPP) beschrieben und zur Durchführung von verschiedenen Labortests, insbesondere von Gerinnungsanalysen verwendet. In diesem PPP sind jedoch unterschiedliche Mengen an Mikropartikeln (membranöse Vesikel aus Zellen, 0,1 bis 1 μm groß, in einer Anzahl von ~ 4.000 bis $\sim 60.000/\mu\text{l}$) enthalten, die verschiedene Gerinnungsteste beeinflussen, insbesondere die Thrombingenerierung. Es ist somit wünschenswert, für solche Laboranalysen mikropartikelfreies Plasma zu verwenden.

Mikropartikel können aus dem Plasma zwar durch Ultrazentrifugation des Plasmas ($100.000 \times g$ für 60 min^1) entfernt werden. Diese Prozedur ist jedoch zeitaufwendig und auch dadurch beeinträchtigt, dass nicht sichergestellt werden kann, dass beim Aufnehmen des mikropartikelfreien Plasmas unterschiedliche Mengen an Mikropartikel mit aufgenommen werden. Weiters sind Mikropartikel beschrieben, welche dieselbe Dichte wie Plasma haben und daher durch Zentrifugation nicht getrennt werden können².

Für die Trennung von Plasma und Mikropartikeln allenfalls einsetzbare Filtrationseinheiten über welche eine größere Anzahl von Proben über Filterplatten in dazupassende Auffangplatten filtriert werden können sind zwar beschrieben, doch werden
5 hierzu diese Filtrationseinheiten an die in Labors üblichen Membranvakuumumpumpen angeschlossen. Für die dazu nötigen Schlauchleitungen, Sicherheitsflaschen, die Pumpe selbst und Absperrhähnen wird relativ viel Platz gebraucht. Die für die Filtration verwendeten Parameter sind nicht standardisiert und bleiben dem Anwender überlassen.

- 10 Ziel der vorliegenden Erfindung ist es eine einfache Apparatur zu gestalten, die die rasche und standardisierte Trennung von Plasma und Mikropartikel gestattet.

In dem der Erfindung zugrunde liegenden Vorrichtung (Fig. 1) wird eine Filtrationseinheit bestehend aus einem Membranfilter, welches luftdicht auf einem Auffanggefäß aufliegt, so
15 mit einer Vakuumpumpe verbunden, dass in dem Auffanggefäß ein Unterdruck entsteht, mit dessen Hilfe das Plasma durch den Membranfilter gesaugt wird und das Filtrat in dem Auffanggefäß erhalten wird. Die Dauer der Filtration wird durch eine mit der Vakuumpumpe verbundene Steuereinheit festgelegt und der Filtrationsdruck durch eine Einstellung eines Ventils. Zur Kontrolle des Filtrationsdruckes ist in dem System ein
20 Druckmesser eingebaut. Dadurch entsteht eine kompakte Bauweise, welche nur wenig Platz benötigt und durch die Festlegung von Zeit und Druck eine Standardisierung der Filtration ermöglicht. Die Vakuumpumpe ist unempfindlich gegenüber Flüssigkeiten und kann gegebenenfalls zusammen mit dem Schlauchsystem bei Bedarf mit einer Waschlösung gereinigt werden. Der Filteraufsatz und die Auffangplatte für die Proben
25 können bei Bedarf über ein Peltierelement im Boden des Filteraufsatzes gekühlt werden.

Die Filtrationseinheit besteht aus einem Gehäuse mit seitlichen Abdeckungen, auf dem handelsübliche Filteraufsätze, z.B. von der Firma Pall, montiert werden können. Zur Stromversorgung der Pumpe und der übrigen Bauteile dient ein Netzgerät.

30

Das Gehäuse enthält folgende Bauelemente: Einen Schalter zum Starten des Filtrationsvorganges und eine Buchse zur Stromversorgung, eine Vakuumpumpe, die den Unterdruck für die Filtration erzeugt, Vakuumschläuche vom Filteraufsatz zur Pumpe und

von der Pumpe zur Auslassöffnung, ein elektronisches Bauelement zur Steuerung der Vakuumpumpe. In einer bevorzugten Ausführung ist ein Peltierelement zur Kühlung des Filteraufsatzes vorgesehen, das mit einem elektronischen Bauelement zu seiner Steuerung dient. Weiters kann ein Axiallüfter zur Kühlung des Kühlkörpers in die Gehäusewand
5 eingebaut sein, sowie ein elektronisches Bauelement zur Steuerung des Axiallüfters.

Ablaufbeschreibung einer Filtration:

Der Filteraufsatz wird mit Auffangplatte und Filterplatte bestückt. Die Proben werden in
10 die Filterplatte pipettiert, der Startknopf wird gedrückt und die Filtration startet automatisch. Nach Ende der Filtration wird der Druckausgleichsknopf betätigt, der Filterplattenhalter kann abgehoben und die Auffangplatte mit den Proben entnommen werden.

15 Sollte es zu einer Verschmutzung des Filteraufsatzes, der Schläuche oder der Pumpe kommen, kann die Verschmutzung bei laufender Pumpe mit einer Waschlösung aus dem Filteraufsatz zur Auslassöffnung abgesaugt werden.

Die Fig. 1 zeigt in schematischer Weise eine erfindungsgemäße Plasmafiltriervorrichtung,
20 deren Elemente in einer gemeinsamen Einheit integriert sind.

Die Fig. 2 zeigt etwas detaillierter, in einem gemeinsamen Gehäuse integriert eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Filterung von Blutplasma mit einem Filter, einem unterhalb des Filters angeordneten Auffangbehälters, einem Distanzblock und einer
25 Öffnung, über die der Bereich unterhalb des Filters mit Vakuum beaufschlagt werden kann.

Im unteren Teil der Einheit ist eine Vakuumpumpe untergebracht, die mit einer Steuerung verbunden ist. Im oberen Bereich des unteren Teils der Einheit befindet sich ein
30 Kühlelement, vorzugsweise ein Peltierelement, das mit Kühlrippen thermisch verbunden ist und zur Einstellung einer bestimmten Temperatur für das zu filternde Plasma mit der Steuerung verbunden ist. Ein Lufteinlass auf der linken Seite mit einem Ventilator sorgt dafür, dass die vom Peltierelement erzeugte Wärme weggeblasen werden kann. Über ein

Interface, beispielsweise eine Tastatur können die Parameter für das Verfahren eingestellt werden.

Bezugszeichen der Fig. 2:

- 5
 Vorrichtung 1,
 Multiwell-Filterplatte 2,
 Filter 3,
 Auffangbehälter 4,
 10 Dichtung zwischen Ober- und Unterteil 5,
 Absperrhahn 6,
 Vakuumschlauch 7,
 Distanzblock 8,
 Alugehäuse 9,
 15 Steuerung 10,
 Vakuumpumpe 11,
 Lufteinlass 12,
 Lüfter 13,
 Interface 14
 20 Peltierelement 15,
 Temperatursensor 16,
 Temperatursensor 17

25 Beispiele:

Wenn verschiedene normale Plasmen unter Zuhilfenahme des beschriebenen Gerätes von Mikropartikel getrennt werden, können typischerweise folgende Ergebnisse erhalten werden:

Probennummer	Mikropartikelgehalt unfiltriert	Mikropartikelgehalt filtriert	Prozent der entfernte Mikropartikel %
1	33.454	1.531	95,42%
2	6.976	1.177	83,12%

3	62.895	1.391	97,78%
4	3.248	741	77,16%
5	8075	1.494	81,49%
6	20.202	4.272	78,85%

Einsatz von Mikropartikel freiem Plasma für Gerinnungsanalysen:

- 5 Die folgende Tabelle zeigt verschiedene Parameter, wobei unter PPP die Ergebnisse aufgelistet sind, die sich auf das thrombozytenarme Plasma nach der Zentrifugation beziehen, und unter MPFP (micro particle filtered plasma) jene, die am gefilterten Plasma vorgenommen wurden:

Parameter	PPP	MPFP	Differenz
Fibrinogen mg/dl	285±73	290±74	ns
aPTT (Reagenz 1) sec	38,9±2,9	39,5±2,3	ns
aPTT (Reagenz 2) sec	36,9±3,9	38,2±3,4	ns
aPTT (Reagenz 3) sec	36,0±3,5	38,2±3,4	p<0,05
FVIII %	127±30	126±30	ns
PT (Reagenz 1) %	113±19	114±22	ns
PT (Reagenz 2) %	157±31	161±32	ns
PT (Reagenz 3) %	110±11	113±14	ns
TGA Peak Thrombin nM	331±40	222±26	p<0,05
TGA AUC nM thrombin	4163±129	3641±233	p<0,05
Lupus LCA Index	47,4±7	34,8±6	p<0,05

- 10 Aus diesen Daten ergibt sich, dass die Messung der Parameter, insbesondere einzelne Gerinnungsparameter wie aPTT, Thrombingenerierung (TGA) und Lupus-Teste durch das Vorhandensein von Mikropartikel stark beeinflusst werden. Die Abweichungen zeigen, dass durch die Erfindung zuverlässigere Ergebnisse erreicht werden können, die nicht mehr vom Gehalt des Blutes bzw. Plasmas an Mikropartikeln abhängen.

Mikropartikelfreies Plasma hergestellt mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung eignet sich ganz allgemein zum Einsatz in der Labordiagnostik, insbesondere in der Gerinnungsdiagnostik und zum Einsatz für die Bestimmung der Thrombingenerierung.

5

Referenzliste:

- (1) Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1842-1843.
- 10 (2) Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 2004;53:210-230.

Der Inhalt beider oben genannten Veröffentlichungen wird durch Bezugnahme vollständig in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

15

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufbereitung von Blutplasma für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, insbesondere Gerinnungsparameter, dadurch gekennzeichnet, dass das Blutplasma mittels Unterdruck durch ein Filter gesaugt wird.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Filter eine Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 μm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 μm (Mikrometer) aufweist.
10
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Unterdruck -50 mbar bis -1000 mbar, vorzugsweise -300 mbar bis -600 mbar beträgt.
15
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Beaufschlagen des Filters mit Unterdruck zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten dauert.
- 20 5. Vorrichtung zur Aufbereitung von Blutplasma für die Bestimmung eines oder mehrerer Blutparameter, insbesondere Gerinnungsparameter, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen Filter, einen hinter dem Filter angeordneten Auffangbehälter und eine Vakuumpumpe aufweist, wobei die Vakuumpumpe mit dem Raum hinter dem Filter verbunden ist.
- 25 6. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Filter eine Durchlassgrenze zwischen 0,05 und 1,5 μm (Mikrometer), vorzugsweise zwischen 0,1 bis 1,2 μm (Mikrometer) aufweist.
- 30 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Auffangbehälter eine Mikrotitrierplatte ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Auffangbehälter Eppendorf Tubes sind.
- 5 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Filter, der Auffangbehälter und die Vakuumpumpe in einer gemeinsamen Einheit integriert sind.
- 10 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass unterhalb des Filters ein Kühlelement, vorzugsweise ein Peltierelement, zur Kühlung des Filtrervorganges vorgesehen ist.

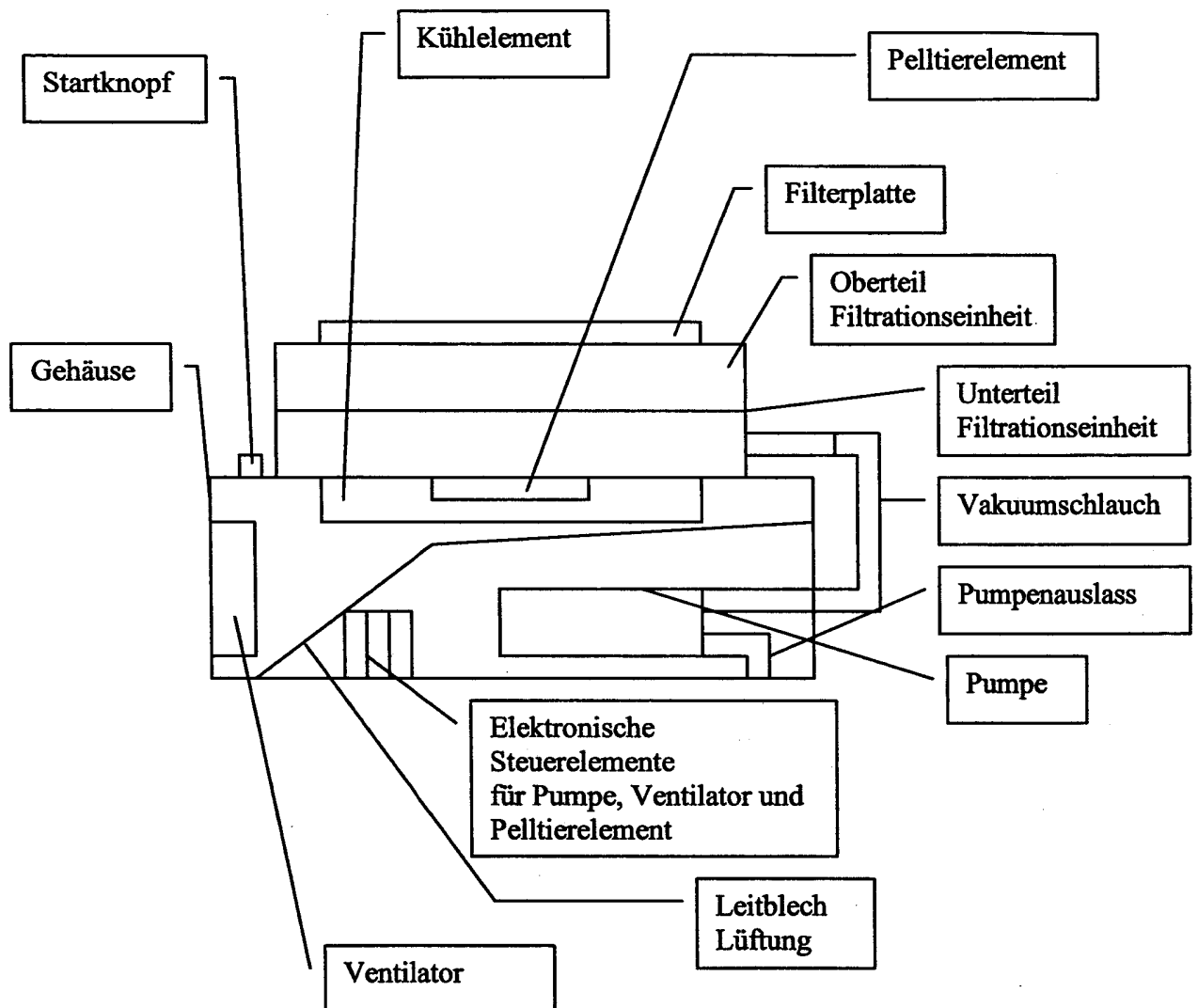


Fig. 1



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : A61M 1/36 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: A61M 1/36C4F		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): A61M		
Konsultierte Online-Datenbank: EPODOC		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 6. Juli 2007 eingereichten Ansprüchen 1-8,10 erstellt.		
Kategorie ⁷⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
Y	EP 1733748 A1 (Shanghai Jiangxi Blood Technology Co. Ltd.) 20. Dezember 2006 (20.12.2006) <i>Zusammenfassung; Fig. 1; Absätze 0028,0029;</i> --	1-3,5,6
Y	EP 0578086 A1 (Terumo Kabushiki Kaisha) 12. Jänner 1994 (12.01.1994) <i>Fig. 11; Seite 8, Zeile 57 - Seite 9, Zeile 16;</i> ----	1-3,5,6
Datum der Beendigung der Recherche: 28. Jänner 2008		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. HÖRZER
⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		