



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 288 316 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 35/18

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 61 K / 333 478 6 (22) 11. 10. 89 (44) 28.03.91

(71) siehe (73)
(72) Bräutigam, Ralf, Dipl.-Med.; Giese, Ralf, Dipl.-Med.; Strauss, Dorothea, Dr. sc. nat., DE
(73) Bezirksinstitut für Blutspende- und Transfusionswesen, Atzpodienstraße 1, O - 1130 Berlin, DE
(74) Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin, DE

(54) Verfahren zur Regenerierung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten

(55) Erythrozytenkonzentrat; Regenerierung; Sauerstoffmangelzustände; Inkubationslösung; 2,3 P₂G-Werte; ATP-Werte; Erythrozytenmorphologie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Regenerierung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten von Vertebraten. Das Verfahren kann insbesondere bei Massivtransfusionen, bei Austauschtransfusionen, bei autologen Transfusionen und bei Sauerstoffmangelzuständen in der klinischen Praxis angewendet werden. Erfindungsgemäß werden 1–8 Wochen konservierte Erythrozytenkonzentrate (EK) regeneriert, indem man zu einem beliebigen Volumen EK 20–40 Volumenanteile in % einer Inkubationslösung zusetzt, die 20–40 mmol/l Inosin, 20–40 mmol/l Pyruvat, 20–60 mmol/l Phosphat und 20–40 mmol/l NaCl sowie 40–80 mmol/l NaOH enthält (IPP/NaCl/NaOH-Lösung). Durch Zugabe der erfindungsgemäßen Lösung werden innerhalb von 60–90 min sowohl physiologische 2,3 P₂G- als auch physiologische ATP-Werte erreicht, ohne die Erythrozytenmorphologie zu beeinträchtigen.

Patentanspruch:

Verfahren zur Regenerierung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten (EK) durch Zugabe einer inosin-, pyruvat- und phosphathaltigen Inkubationslösung (IPP-Lösung), gekennzeichnet dadurch, daß man zu einem beliebigen Volumen Erythrozytenkonzentrat 20–40 Volumenanteile in % einer IPP-Lösung zusetzt, die 20–40 mmol/l Inosin, 20–40 mmol/l Pyruvat, 20–60 mmol/l Phosphat, 20–40 mmol/l NaCl und 40–80 mmol/l NaOH enthält (IPP/NaCl/NaOH-Lösung).

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Regenerierung gelagerter Erythrozytenkonzentrate für Transfusionszwecke. Das Verfahren kann insbesondere bei Massivtransfusionen, bei Austauschtransfusionen, bei autologen Transfusionen, bei Sauerstoffmangelzuständen und im Zusammenhang mit der Kryokonservierung angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten (EK) führt zu einer 2,3P₂G (2,3-Diphosphoglycerat)-Verarmung und einer teilweisen ATP (Adenosintri-phosphat)-Verarmung. Das ATP ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Konzentrationsunterschiede der Kationen zwischen Erythrozyt und Plasma, für die Aufrechterhaltung der spezifischen Zusammensetzung der organischen Bestandteile, für die Erhaltung des Hämoglobins im Funktionszustand und für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur. Die Hauptfunktion des 2,3P₂G besteht in der Regulation der Sauerstoffabgabe. Die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff verringert sich durch die Bindung von 2,3P₂G, wodurch die Sauerstoffabgabe an das Gewebe erleichtert wird. Um die physiologischen Funktionen des ATP und des 2,3P₂G zu gewährleisten, müssen die für den klinischen Einsatz vorgesehenen EK's auch physiologische Werte, was den ATP- und 2,3P₂G-Gehalt anbetrifft, aufweisen. Der physiologische ATP-Gehalt beträgt 60 mmol/mol Hb · Fe und der des 2,3P₂G 250 mmol/mol Hb · Fe.

An 2,3P₂G und ATP verarmte EK's sind bei Indikationen wie Massivtransfusionen, besonders bei Kindern, Transfusionen bei alten Patienten und Transfusionen bei Patienten mit kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen nicht einsetzbar. So stellten R. C. Dennis et al. (Surgery 77 [1975] 741–747) fest, daß ein 150% 2,3P₂G enthaltendes EK zu einer signifikant höheren Sauerstoffausnutzung des Gewebes und zu einer verbesserten myocardialen Funktion nach einer Operation führt im Vergleich zu einem nur 70% 2,3P₂G enthaltenden EK. E. Beutler (Vox Saug. 34 [1978] 113–115) weist darauf hin, daß bei schwerkranken Patienten die Kompensationsmechanismen der 2,3P₂G-Regeneration erliegen und für diese Patienten maximal 1 Woche gelagerte EK verwendet werden sollten.

Seit Anfang der 70er Jahre ist bekannt, daß sich gelagerte Erythrozytenkonzentrate durch Inkubation mit inosin-, pyruvat- und phosphathaltigen Lösungen (IPP-Lösungen) regenerieren lassen. Oski et al. (Blood 37 [1971] 52–58) inkubieren in einer IPP-haltigen Lösung, benötigen aber eine 2- bzw. 4stündige Inkubation bei +37°C, um 70 bzw. 150% des normalen 2,3P₂G-Gehaltes zu erreichen. C. Leber (Prom. A, 1987) und R. Bräutigam und R. Giese (Diplomarbeit 1987) verwenden IPP-Lösungen, mit denen bereits nach 2stündiger Inkubation normale 2,3P₂G-Werte erreicht werden können. Von Nachteil ist hier die hohe Osmolalität, vor allem auf Grund des hohen NaCl-Gehaltes dieser Lösungen (700 mosmol/kg). Das führt zur Zellschrumpfung, wodurch die Erythrozyten schlechter deformierbar sind und damit eine geringere Überlebensrate besitzen. Klinisch führt der Deformierbarkeitsverlust zu Lungenödemem und zu cardiogenen Schockzuständen.

Ebenfalls eine zu hohe Osmolalität hat die von Valeri et al. (Transfusion 22 [1982] 102–106) verwendete Inkubationslösung (500 mosmol/kg). Auch der pH-Wert dieser Inkubationslösung war mit 7,2 zu gering, um das EK wirksam zu neutralisieren. Weitere Versuche zur Aufrechterhaltung des 2,3P₂G-Spiegels bestanden bisher auch darin, den pH-Wert zu Beginn der Lagerung zu erhöhen (D. Strauss et al. in: VII. Int. Symp., Strukt. u. Funkt. d. Erythr., Akademie-Verlag, Berlin, 1975, 483–486), die Regenerierungslösungen mit entsprechenden Zusätzen, wie z. B. Dihydroxyaceton zu versehen (US-PS 3795581) und die Glycolyseenzyme zu beeinflussen (US-PS 4774088). Bei diesen Versuchen ist die Lagerdauer begrenzt, und der 2,3P₂G-Erhalt geht mit einem ATP-Verlust einher, was zu einer geringen Überlebensrate der Erythrozyten führt.

In der GB-PS 2000023 wird zur Aufrechterhaltung des 2,3P₂G-Gehaltes die Verwendung einer Resuspensionslösung (Zusatz direkt nach der Blutabnahme) in Kombination mit einer initialen Anhebung des pH-Wertes beschrieben. Hier wurden noch nach 28 d Lagerung normale 2,3P₂G-Werte gemessen, was allerdings einer kontinuierlichen Phosphatzufuhr, verbunden mit einem Ionenaustauscher, bedarf.

G. L. Moore et al. (Vox Saug. 53 [1987] 15–18) versahen bei –80°C gelagertes Citrat-Phosphat-Dextrose-Erythrozytenkonzentrat (CPD-EK) nach dem Auftauen mit einer Lösung, die Adenin, Ascorbat-2-phosphat, Natriumphosphat, Dextrose und Mannitol enthielt. Diese Lösung hatte einen pH-Wert von 11 und eine relativ hohe Osmolarität von 466 mosmol/l. Der 2,3P₂G-Gehalt konnte 21 d aufrechterhalten werden, wohingegen der ATP-Gehalt nur 62% betrug. Bei allen bisher bekannten Lösungen des Problems werden durch entsprechende Zusätze und/oder pH-Werterhöhungen entweder der 2,3P₂G-Gehalt oder der ATP-Gehalt auf Kosten des anderen längere Zeit aufrechterhalten, oder durch eine zu hohe Osmolarität der Inkubationslösungen wird die Erythrozytenmorphologie und damit die Überlebensrate negativ beeinflusst.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches Verfahren zur Regenerierung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten bereitzustellen, mit dem innerhalb kurzer Zeit und ohne großen Aufwand sowohl normale $2,3P_2G$ -Werte als auch normale ATP-Werte erreicht werden können, dabei eine ausreichende Überlebensrate der Erythrozyten garantiert ist und die Erythrozytenmorphologie nicht beeinträchtigt wird. Mit diesem Verfahren sollen gelagerte EK's innerhalb kurzer Zeit zur wirksamen klinischen Anwendung, besonders zu Transfusionszwecken, bereit sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Inosin-, pyruvat- und phosphatenthaltende Inkubationslösung (IPP-Lösung) bereitzustellen, durch deren Zusatz die gewünschte schnelle Regenerierung der gelagerten Erythrozytenkonzentrate innerhalb von 60–90 min erreicht wird, ohne andere wichtige Parameter zu beeinträchtigen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man zu einem beliebigen Volumen Erythrozytenkonzentrat bei $+37^\circ\text{C}$ 20–40 Volumenanteile in % einer Inkubationslösung zusetzt, die 20–40 mmol/l Inosin, 20–40 mmol/l Pyruvat, 20–60 mmol/l Phosphat, 20–40 mmol/l NaCl und 40–80 mmol/l NaOH enthält (IPP/NaCl/NaOH-Lösung).

Durch die erfindungsgemäße Auswahl dieser Lösung wird es möglich, den $2,3P_2G$ - und ATP-Gehalt 1–8 Wochen bei $+4^\circ\text{C}$ gelagerter Erythrozytenkonzentrate nach 60–90minütiger Inkubation mindestens auf Normalwerte zu erhöhen (Abb. 1). Ohne Zugabe von NaOH ist eine 2stündige Inkubation nötig, um physiologische Werte zu erreichen. Mit der erfindungsgemäßen Inkubationslösung können durch längere Inkubation auch hypernormale Werte erreicht werden. Ein hypernormaler $2,3P_2G$ -Gehalt bewirkt eine noch günstigere Sauerstoffabgabe ans Gewebe, bei 300–400% des normalen $2,3P_2G$ -Gehaltes treten jedoch toxische Effekte auf.

In Abb. 2 wird die Veränderung des intra- und extrazellulären pH-Wertes 21 Tage konservierter Erythrozyten durch die erfindungsgemäße Inkubationslösung dargestellt. Der für den Regenerierungsprozeß wirksame intrazelluläre pH-Wert beläuft sich auf etwa 7,1. Wenn die Inkubationslösung nur IPP enthält, erfolgt die Regenerierung lediglich bei einem pH-Wert zwischen 6,7 und 6,8. Aus Abb. 3 erkennt man, daß sich die mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) im oberen Bereich von Normwerttabellen bewegt (Frauen: 20,0–22,5 mmol/l; Männer: 18,5–21,0 mmol/l). Damit wird eine wichtige Zielstellung erreicht, da jetzt die Voraussetzungen für eine optimale Deformierbarkeit und Überlebensrate der Erythrozyten erfüllt sind. In Abb. 4 ist die morphologische Regenerierung dargestellt. Der erreichte Werte des morphologischen Index von $0,88 \pm 0,04$ zeigt, daß die Erythrozyten eine gute Überlebensrate haben, und sie somit ihrer physiologischen Funktion gerecht werden können.

Die Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit beträgt nach der Inkubation 312 ± 19 mosmol/kg, was dem physiologischen Wert von 300 mosmol/kg nahe kommt. Damit wird eine weitere Forderung an die Inkubationslösung erfüllt.

Die erreichte Hämolyserate von $0,21 \pm 0,07\%$ erfüllt ebenfalls die Anforderung für Transfusionen ($< 1\%$).

Durch die Anwendung der erfindungsgemäßen NaOH-enthaltenden Inkubationslösung mit verringertem Phosphat- und NaCl-Gehalt wird somit eine schnelle Regenerierung der EK's erreicht, wobei die Erythrozytenmorphologie erhalten bleibt. Die Erythrozyten können nach der Transfusion ihrer physiologischen Aufgabe gerecht werden. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren regenerierten EK's sind noch mindestens 7 Tage bei $+4^\circ\text{C}$ nachlagerbar, wobei alle wesentlichen Parameter annähernd erhalten bleiben.

Die Erfindung ist auch zur Regenerierung kryokonservierter EK anwendbar.

Ausführungsbeispiel

Ein CPD-stabilisiertes und SAGM-resuspendiertes Erythrozytenkonzentrat wird in einem 3fach Beutelsystem (FENWAL®) 3 Wochen bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert. 40 ml von diesem EK werden mit 30 Vol.-% (17 ml) der erfindungsgemäßen Inkubationslösung (30 mmol/l Inosin, 30 mmol/l Pyruvat, 45 mmol/l Phosphat, 31 mmol/l NaCl, 62 mmol/l NaOH) unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Box versetzt. Infolge der komplexen Wirkung der Inkubationslösung kann der ATP- und $2,3P_2G$ -Gehalt, wie in Abb. 1 ersichtlich, regeneriert werden. Aufgrund des geradlinigen Anstieges des $2,3P_2G$ -Gehaltes werden nach etwa 90minütiger Inkubation physiologische $2,3P_2G$ -Werte erreicht (250 mmol/mol Hb · Fe). Der physiologische ATP-Gehalt (60 mmol/mol Hb · Fe) wird bereits nach 30minütiger Inkubation erreicht. Ohne die Zugabe von NaOH ist eine 2stündige Inkubation nötig, um physiologische Werte zu erreichen.

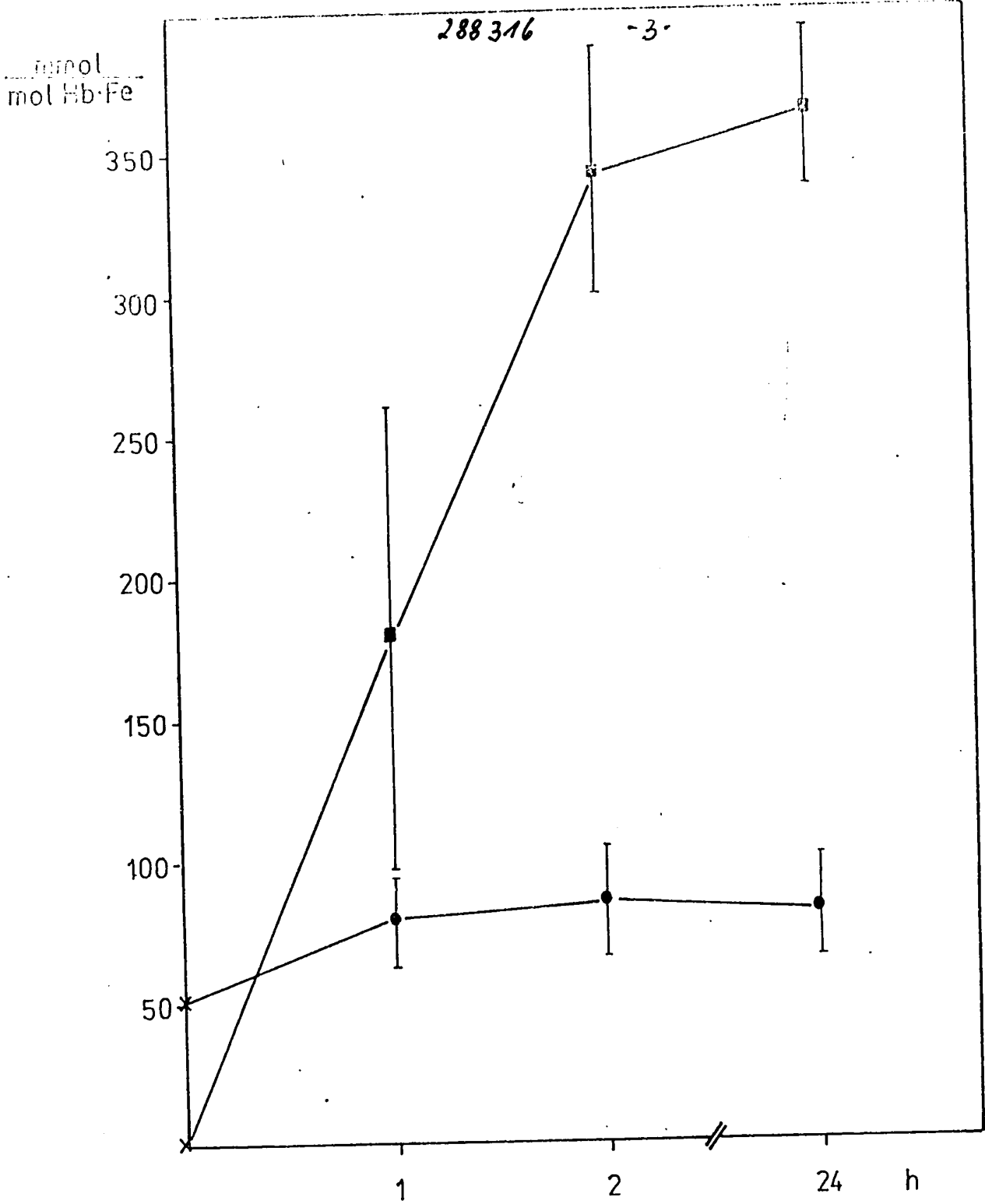


Abb. 1 ATP- und 2,3P₂G-Gehalt 21 d konservierter Erythrozyten während 2stündiger Inkubation mit Zusatz von IPP/NaOH/NaCl bei +37 °C sowie während 24stündiger Nachlagerung bei +4 °C in mmol/mol Hb×Fe

$\bar{x} \pm s$, n = 11

●—●

ATP

■—■

2,3 P₂G

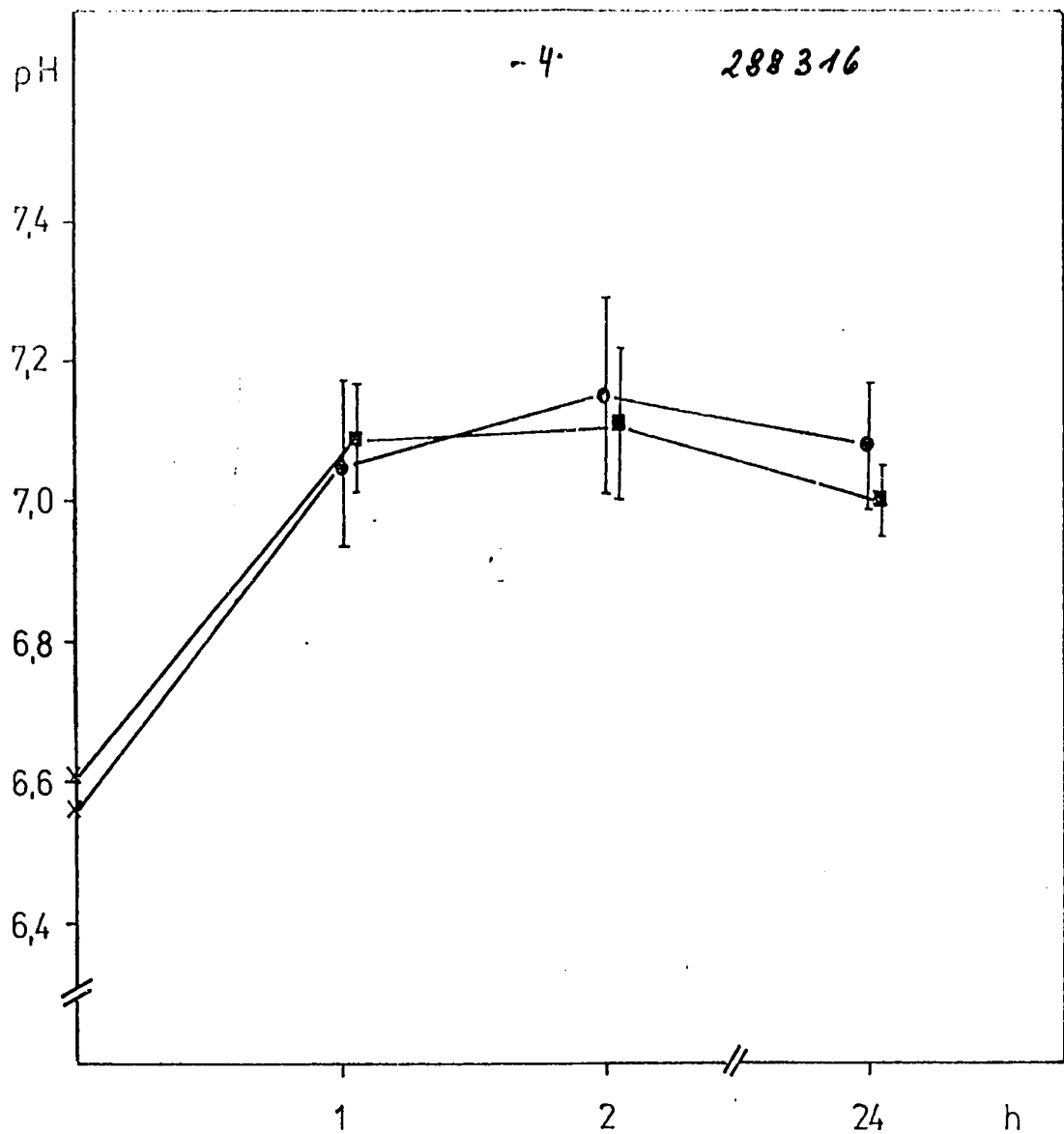


Abb. 2 Intra- und extrazellulärer pH-Wert 21 d konservierter Erythrozyten während 2stündiger Inkubation mit Zusatz von IPP/NaOH/NaCl bei +37 °C sowie während 24stündiger Nachlagerung bei +4 °C

$\bar{x} \pm s$, n = 11

- extrazellulärer pH-Wert
- intrazellulärer pH-Wert

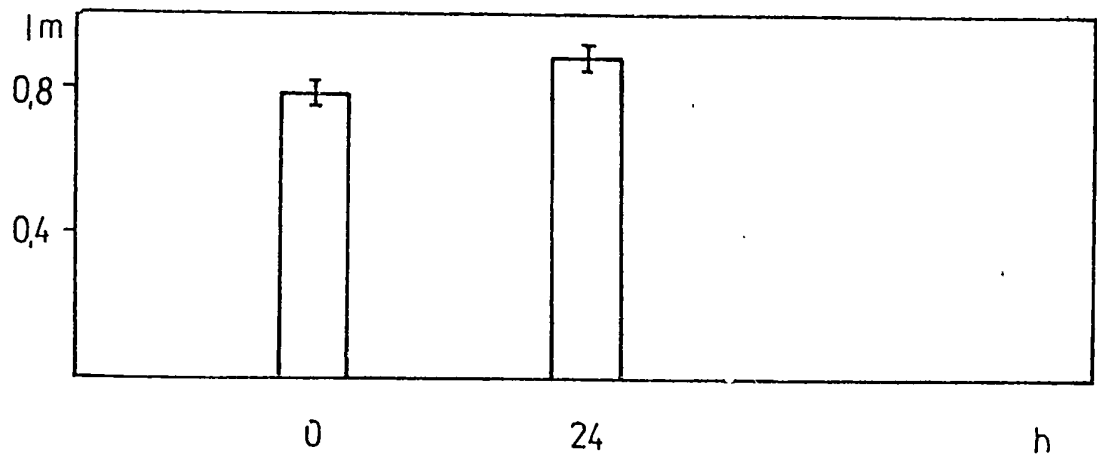
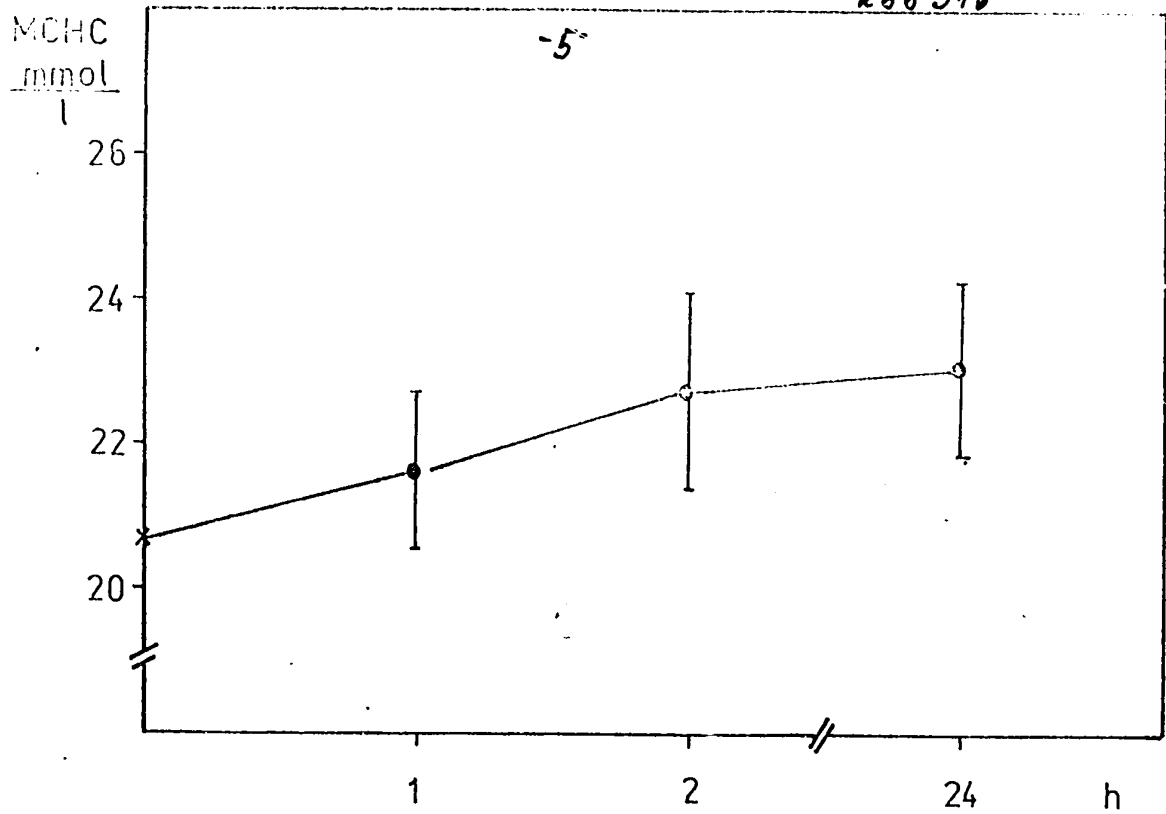


Abb. 3

und 4 Verhalten der MCHC und des morphologischen Index 21 d konservierter Erythrozyten während 2stündiger Inkubation mit Zusatz von IPP/NaOH/NaCl bei +37 °C sowie während 24stündiger Nachlagerung bei +4 °C

$\bar{x} \pm s$, n = 11