



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **9000090**

Nederland

⑲ NL

⑤④ **Werkwijze voor het bereiden van een fibrinogeenconcentraat uit bloedplasma, inrichting voor het uitvoeren van deze werkwijze en werkwijze voor het bereiden van fibrinogeen uit het concentraat.**

⑤① Int.Cl.⁵: A23J 1/06, C07K 15/02.

⑦① Aanvrager: Harimex-Ligos B.V. te Loenen.

⑦④ Gem.: Ir. F.X. Noz c.s.
Algemeen Octrooibureau
Boschdijk 155
5612 HB Eindhoven.

②① Aanvraag Nr. 9000090.

②② Ingediend 15 januari 1990.

③② - -

③③ - -

③① - -

⑥② - -

④③ Ter inzage gelegd 1 augustus 1991.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Korte aanduiding: Werkwijze voor het bereiden van een fibrinogeenconcentraat uit bloedplasma, inrichting voor het uitvoeren van deze werkwijze en
5 werkwijze voor het bereiden van fibrinogeen uit het concentraat.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van fibrinogeenconcentraat uit bloedplasma door het bloedplasma af te koelen van een temperatuur boven 0 °C tot een eerste temperatuur
10 liggend tussen -10 °C en -40 °C, het aldus verkregen vaste materiaal te ontdooien tot nabij het vriespunt van water en het daarna fysisch scheiden van de vaste stof van de vloeibare hoofdfractie van het plasma te weten water. De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor het bereiden van fibrinogeen uit het aldus verkregen fibrinogeenconcentraat en
15 op een inrichting voor het bereiden van het fibrinogeenconcentraat.

Fibrinogeen is een in het bloedplasma oplosbaar eiwit, dat onder invloed van trombine in fibrine wordt omgezet waardoor bloedstolling ontstaat. In het Amerikaanse octrooischrift 4.741.906 is een werkwijze beschreven waarbij snippers vlees met behulp van een oplossing van
20 fibrinogeen met elkaar worden verbonden zodat grotere vleesbrokken ontstaan. Deze werkwijze kan met name worden toegepast in de vleesverwerkende industrie. Door deze industriële toepassing en de nog te verwachten verdere toepassingen is het noodzakelijk fibrinogeen op grote schaal, en daarom industrieel, te bereiden.

Thans wordt op kleine schaal fibrinogeen bereid door een afscheiding uit bloedplasma met behulp van chemische middelen die aan het bloedplasma worden toegevoegd zodat de daarin aanwezige eiwitten neerslaan en vervolgens worden gewonnen. In de voedingsmiddelenindustrie is het echter ongewenst te werken met uitgangsstoffen waaraan chemicaliën zoals
30 extractie- of oplosmiddelen zijn toegevoegd of die een behandeling hebben ondergaan bij verhoogde temperaturen boven 50 °C, waardoor de werking van fibrinogeen achteruitgaat. Daarom is gezocht naar een werkwijze voor het bereiden van fibrinogeen zonder dat additieven of hulpstoffen worden toegevoegd of dat een verhoogde temperatuur wordt toegepast.

35 Uit een artikel van A.M. Cucuianu e.a. gepubliceerd in Rev. Chir. Oncol. Radiol O R L Oftamol Stomatol SER OT-Rino-Laringol, 33 (2).

9000090

1988 blz. 81-88, getiteld: "Preliminary data on the preparation of a fibrin glue from the patient's plasma and its utilization in ORL Surgery" is een werkwijze bekend voor de bereiding van fibrinogeen door citraatbevattend plasma af te koelen tot -20 °C daarna langzaam ontdooien tot een
5 temperatuur tussen 0 °C en +4 °C en koud centrifugeren. Het rendement bij deze werkwijze is echter laag en kan aanzienlijk worden verhoogd met het toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding. Uit een artikel van W.D. Spotnitz e.a. gepubliceerd in AM Surg. 53 (8), 1987 460-462 getiteld
10 "Fibrin glue from stored human plasma an inexpensive and efficient method for local blood bank preparation." is een werkwijze bekend voor het afscheiden van fibrinogeen uit bloedplasma, waarbij met name de nadruk ligt op het voorkomen van therapeutisch ongewenste factoren in het verkregen eindproduct zoals hepatitis. Deze werkwijze wordt slechts op kleine schaal toegepast en vermeldt enkel dat wordt uitgegaan van
15 ingevroren vers plasma.

Thans is het mogelijk gebleken op industriële schaal fibrinogeenconcentraat met een hoog rendement af te scheiden uit bloedplasma door fysische scheidingen. Bij het verrichte onderzoek is gebleken dat met name de bewerking tussen het invriezen bij een eerste temperatuur van
20 ongeveer -20 °C en het afscheiden van fibrinogeen door bijvoorbeeld centrifugeren bij een temperatuur van ongeveer 0 °C van belang is. Deze van belang zijnde stap is verder in de tekst aangegeven als conditioneren.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt hierdoor gekenmerkt dat het ontdooien stapsgewijs plaatsheeft van de eerste temperatuur tot
25 een conditioneertemperatuur tussen -5 °C en -1 °C, waarna het vaste materiaal wordt verkleind en het verkleinde materiaal op een temperatuur wordt gebracht waarbij de hoofdfractie van het plasma, te weten water, vloeibaar wordt en de oplosbaarheid van fibrinogeen in de vloeistof zo laag mogelijk is, waarna vloeistof wordt afgescheiden van het
30 fibrinogeenconcentraat. De temperatuur waarop het verkleinde materiaal wordt gebracht zodat het grootste deel van het materiaal vloeibaar is, ligt bij voorkeur tussen -2 °C en 0 °C. Deze temperatuur moet worden bereikt door een geleidelijke temperatuursverhoging, waarbij het streven is te voorkomen dat plaatselijk het materiaal wordt oververwarmd tot
35 aanzienlijk boven 0 °C en deze geleidelijke temperatuursverhoging wordt bij voorkeur bereikt in een recirculatiesysteem waarin een warmtewisselaar

! 9000090

is opgenomen waarbij de gewichtsverhouding vers materiaal tot gerecirculeerd materiaal 1:1,5-5 bedraagt, zodat in het recirculatiesysteem het materiaal wordt verwarmd tot de temperatuur waarbij het fibrinogeenconcentraat door bij voorkeur centrifugeren, kan
5 worden afgescheiden van de vloeistof, te weten tot een temperatuur tussen -2 °C en 0 °C.

Het is aannemelijk, hoewel de uitvinding niet is beperkt door deze verklaring, dat door het conditioneren het te winnen eiwit, fibrinogeen, minder oplosbaar is in de vloeibare fase van het bloedplasma,
10 dan normaal zal worden verwacht bij de temperatuur waarbij de scheiding, zoals centrifugeren van het fibrinogeenconcentraat uiteindelijk wordt uitgevoerd.

De uitvinding heeft verder betrekking op een inrichting die wordt toegepast voor het uitvoeren van deze werkwijze.

15 De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van de volgende beschrijving, waarbij is verwezen naar de bijgevoegde tekening waarin:

fig. 1 schematisch de inrichting weergeeft voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding.

20 In fig. 1 is in een eerste stap, aangegeven met de verwijzingscijfers 1-9, de scheiding van bloedplasma uit bloed weergegeven, welke stap geen deel uitmaakt van de uitvinding en slechts als toelichting is bedoeld om een zo volledig mogelijk procédé te beschrijven.

25 Via leiding 3 wordt bloed, bij voorkeur afkomstig van slachtvee, met een temperatuur van ongeveer 4 °C toegevoerd aan centrifuge 1. Na centrifugeren wordt ingedikt bloed afgevoerd via leiding 4 en plasma met een pH van 7,7 bij een temperatuur van ongeveer 4 °C via leiding 5, toegevoerd aan een opslagvat 2 voor plasma, voorzien van een roerder 7, in
30 welk opslagvat 2 de pH van het plasma wordt ingesteld op een waarde van ongeveer 8,5 door aan het opslagvat 2 NaOH via leiding 6 toe te voeren in de vorm van een 30%-ige oplossing in water. Uit vat 2 wordt, regelbaar met klep 9 via leiding 8, plasma afgevoerd met een pH van ongeveer 8,5 en met een temperatuur van ongeveer 4 °C.

35 In een tweede stap wordt het fibrinogeen bevattend plasma verkregen in de eerste stap, verder verwerkt door het in te vriezen en te

9000090

conditioneren. Hiertoe wordt het plasma, verkregen uit de eerste stap, via leiding 11 toegevoerd aan een vriesinstallatie (platenvriezer) 12. In deze vriesinstallatie 12 wordt het plasma ingevroren tot een temperatuur tussen -10 °C en -40 °C, bij voorkeur bij een temperatuur van ongeveer -20 °C.

5 Van de aldus verkregen blokken plasma kunnen schijven worden gezaagd die afmetingen kunnen hebben van 9 x 20 cm en een dikte van ongeveer 7-9 mm. Het vormen van de schijven heeft plaats met behulp van bijvoorbeeld een zaag 13. De schijven kunnen vervolgens worden geconditioneerd. Het is echter ook mogelijk een buffervoorraad van schijven op te slaan in koelcel

10 14 bij een temperatuur van ongeveer -20 °C, waarbij het bewaren in de vriescel bij voorkeur plaatsheeft in een verpakking van polyetheen. Het is verder mogelijk meerdere schijven in een verpakking te bewaren, bijvoorbeeld drie schijven, zodat uiteindelijk grote schijven worden bewaard in vriescel 14 met afmetingen van 27 x 20 cm en een dikte van 7-9

15 mm. Ook kan men de blokken plasma, verkregen in vriesinstallatie 12, direkt overbrengen naar conditioneercel 15. Het zal duidelijk zijn dat bij schijven de warmte-overdracht in de cel 15 makkelijker kan worden geregeld dan bij het gebruik van blokken die aanzienlijk grotere afmetingen hebben dan de schijven.

20 De blokken of schijven worden na eventueel bewaren in koelcel 14 bij ongeveer -20 °C indien nodig, ontdaan van het verpakingsmateriaal en toegevoerd aan conditioneercel 15. In de conditioneercel 15 wordt het materiaal verwarmd van een temperatuur zoals heerst in koelcel 14 of in vriesinstallatie 12, hetgeen bij voorkeur een temperatuur

25 is van ongeveer -20 °C, tot een temperatuur na het conditioneren, te weten een temperatuur tussen -5 °C en -1 °C. Belangrijk bij dit conditioneren is de eindtemperatuur en de tijd gedurende welke het conditioneren wordt uitgevoerd. De schijven moeten worden verhoogd van een temperatuur van ongeveer -20 °C tot een temperatuur dicht onder het vriespunt van water om

30 de schijven in de daarna volgende bewerking te verkleinen. Schijven met een temperatuur van ongeveer -20 °C zijn slechts moeilijk klein te maken, welke verkleining noodzakelijk is voor de verdere fysische scheiding tussen fibrinogeenconcentraat en plasmavloeistof. Bij de uitgevoerde experimenten is gebleken dat de manier van conditioneren van grote invloed is

35 op het rendement waarmee fibrinogeen wordt verkregen. Dit blijkt ook uit de hierna vermelde experimenten. Ten aanzien van de conditioneertijd geldt

9000090

dat een tijdsduur langer dan 24 uren het rendement nauwelijks verbetert en dat bij een tijdsduur vanaf 0,5 uur een aanzienlijke verhoging van het rendement wordt waargenomen. Daarom wordt het conditioneren bij voorkeur uitgevoerd gedurende een tijdsduur van 0,5 tot 48 uren, bij voorkeur
5 tussen 2 en 24 uren.

Na het conditioneren van de schijven of blokken in de conditioneer cel 15 worden de schijven bij een temperatuur tussen -5 °C en -1 °C, bij voorkeur met een temperatuur van ongeveer -2 °C in een derde stap toegevoerd aan wolf 21, hetgeen een voorbeeld is van een apparaat
10 voor het verkleinen van de schijven. Het kleingemaakte materiaal wordt dan volgens een bij voorkeur uit te voeren werkwijze via leiding 25 toegevoerd aan recirculatievat 22 voorzien van roerder 27. Het recirculatiesysteem bestaat uit recirculatievat 22, pomp 23, warmtewisselaar 24 en de betreffende leidingen zoals aangegeven in de tekening. De warmtewisselaar
15 24 wordt enerzijds via leiding 28 gevoed met verpompbaar fibrinogeen bevattend plasma met een temperatuur van ongeveer -2 °C en anderzijds wordt de warmtewisselaar 24 gevoed met water, waarbij toevoer 24a de omgevingstemperatuur heeft of iets hoger, te weten ongeveer 30 °C en bij afvoer 24b wordt water afgevoerd met een temperatuur die ongeveer 10 °C
20 lager is, te weten ongeveer 20 °C. Gemiddeld gesproken zal het fibrinogeen bevattend plasma 3-4 keer de cyclus doorlopen en dan via leiding 31 worden afgevoerd.

De vierde stap van de werkwijze heeft in principe plaats in de centrifuge 34. Hiertoe wordt het uit de derde stap verkregen
25 fibrinogeen bevattend plasma met een temperatuur van ongeveer 0 °C, bij voorkeur enigszins beneden 0 °C als vloeistof met hierin aanwezig vast fibrinogeen toegevoerd via leiding 31 aan opvangvat 32 voorzien van roerder 37, zodat een via klep 38 regelbare hoeveelheid via leiding 41 en pomp 33 via leiding 42 wordt toegevoerd aan centrifuge 34. Uit de
30 centrifuge wordt enerzijds resterend plasma afgevoerd en anderzijds wordt aan opslagvat 35, voorzien van roerder 47 het fibrinogeenconcentraat toegevoerd dat in opvangvat 35 wordt gehomogeniseerd en via leiding 45, regelklep 36 en leiding 46 wordt afgevoerd en verpakt en ingevroren om te worden bewaard tot gebruik. Desgewenst kan uit het concentraat
35 poedervormig fibrinogeen worden gewonnen.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van de

9 0 0 0 0 9 0

volgende voorbeelden.

Voorbeeld I.

Onder toepassing van de apparatuur zoals weergegeven in fig. 1 werd bloed, verkregen uit runderen, gescheiden in ingedikt bloed en plasma, waarbij het bloed eerst werd afgekoeld tot een temperatuur van 4 °C en daarna had de scheiding plaats met behulp van een centrifuge, zodat plasma werd verkregen met een pH van 7,7 en ingedikt bloed dat werd afgevoerd. Met behulp van 30%-ige NaOH werd het plasma gebracht op een pH van 8,5 en bij een temperatuur van 4 °C toegevoerd aan platenvriezer 12 waarin het plasma werd afgekoeld tot -20 °C. De aldus verkregen ingevroren blokken plasma werden in schijven gesneden met afmetingen van 9 x 20 cm en met een dikte van 8 mm.

Deze schijven werden geconditioneerd in een conditioneercel 15 gedurende 24 uren bij -2 °C. Vervolgens werden de geconditioneerde schijven bij een temperatuur van -2 °C toegevoerd aan een installatie voor het verkleinen van de schijven waartoe een "Wolf" werd gebruikt. De afvoer uit de "Wolf" 21 bedroeg 800 kg/uur fijngemaakt fibrinogeen bevattend plasma met een temperatuur van -2 °C. Dit fijngemaakte materiaal werd toegevoerd aan een circulatievat 22, waarin het werd gemengd met 2200 kg/uur uit warmtewisselaar 24 verkregen gerecirculeerd materiaal met een temperatuur van 0 °C. Zodoende werd uit het circulatievat 22, 3000 kg/uur fibrinogeen bevattend plasma afgevoerd met een temperatuur van -1 °C. De warmtewisselaar 24 werd als verwarmend medium gevoed met 6500 kg/uur water met een temperatuur van 30 °C, terwijl eenzelfde hoeveelheid water werd afgevoerd via leiding 24b met een temperatuur van 20 °C.

Via leiding 31 werd 800 kg/uur fibrinogeen bevattend plasma met een temperatuur van 0 °C toegevoerd aan opvangvat 32 en met behulp van pomp 33 toegevoerd aan centrifuge 34 waaruit 70 kg/uur fibrinogeenconcentraat werd verkregen dat werd toegevoerd aan opslagvat 35 en anderzijds werd 730 kg/uur resterend plasma uit de centrifuge verwijderd via leiding 44. Uit opslagvat 35 werd het gewenste eindprodukt, te weten fibrinogeenconcentraat afgevoerd via leiding 46 en tot slot ingevroren en verpakt.

Het rendement voor het winnen van fibrinogeen was bij deze uitvoeringsvorm 73,6%.

Voorbeelden II-V.

9000090

De werkwijze volgens de voorbeelden II-V werden op dezelfde wijze uitgevoerd als aangegeven in voorbeeld I, waarbij echter in de voorbeelden II en III het conditioneren werd uitgevoerd bij -2 °C gedurende een tijdsduur van respectievelijk 2 uur en 30 minuten. Het
5 rendement was dan respectievelijk 50,2% en 16,6%.

In voorbeeld IV werd de conditioneertijd geminimaliseerd, hetgeen inhoudt dat de temperatuur van het fibrinogeen bevattend plasma werd verhoogd van -20 °C tot -2 °C en zodra deze temperatuur was bereikt werd het materiaal verkleind. Bij een conditioneertijd van 0 uur was het
10 rendement 10,8%.

In vergelijkend voorbeeld V werd het conditioneren uitgevoerd bij -10 °C gedurende 18 uren en daarbij was het rendement 5,1%.

Uit deze gegevens blijkt dat het conditioneren gedurende 24 uren bij -2 °C een aanzienlijke verhoging van het rendement geeft ten opzichte van het achterwege laten van het conditioneren omdat het
15 rendement wordt verhoogd van 10,8% tot 73,6%.

Conditioneren bij -10 °C leidt niet tot enig resultaat, zelfs niet indien dit gedurende 18 uren plaatsheeft. Uit verdere proeven is gebleken dat conditioneren bij een temperatuur tussen -2 °C en -5 °C
20 vergelijkbare resultaten geeft.

9000090

Conclusies.

1. Werkwijze voor het bereiden van fibrinogeenconcentraat uit bloedplasma door het bloedplasma af te koelen van een temperatuur boven
5 0 °C tot een eerste temperatuur liggend tussen -10 °C en -40 °C, het aldus verkregen vaste materiaal vervolgens te ontdooien tot nabij het vriespunt van water en het daarna fysisch scheiden van de vaste stof van de vloeibare hoofdfractie van het plasma, te weten water, met het kenmerk, dat het ontdooien stapsgewijs plaatsheeft van de eerste temperatuur tot
10 een conditioneertemperatuur tussen -5 °C en -1 °C waarna het vaste materiaal wordt verkleind en het verkleinde materiaal op een temperatuur wordt gebracht waarbij de hoofdfractie van het plasma, te weten water, vloeibaar wordt en de oplosbaarheid van fibrinogeen in de vloeistof zo laag mogelijk is, waarna vloeistof wordt afgescheiden van het fibrinogeen-
15 concentraat.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat na het conditioneren de temperatuur wordt verhoogd tot een waarde tussen -2 °C en 0 °C door het verkleinde materiaal te roeren en te mengen in een recirculatiesysteem, waarbij de gewichtsverhouding vers materiaal tot
20 gerecirculeerd materiaal 1:1,5-5 bedraagt, waarbij in het recirculatiesysteem een warmtewisselaar is opgenomen.
3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het conditioneren plaatsheeft bij een temperatuur tussen -5 °C en -2 °C gedurende 0,5-48 uren.
- 25 4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het conditioneren plaatsheeft gedurende 2-24 uren.
5. Werkwijze volgens conclusie 1-4, met het kenmerk, dat het conditioneren plaatsheeft bij een temperatuur tussen -3 °C en -1,5 °C.
6. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat na het
30 conditioneren en verkleinen van het vaste fibrinogeenbevattende materiaal de recirculatie onder verwarmen plaatsheeft in een warmtewisselaar tot een afvoertemperatuur tussen -0,5 °C en 0 °C.
7. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat de recirculatieverhouding 1 deel geconditioneerd (vers) materiaal is op 2-4
35 delen gerecirculeerd materiaal.
8. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het

9000090

verwarmen plaatsheeft in een warmtewisselaar tegen water met omgevings-temperatuur.

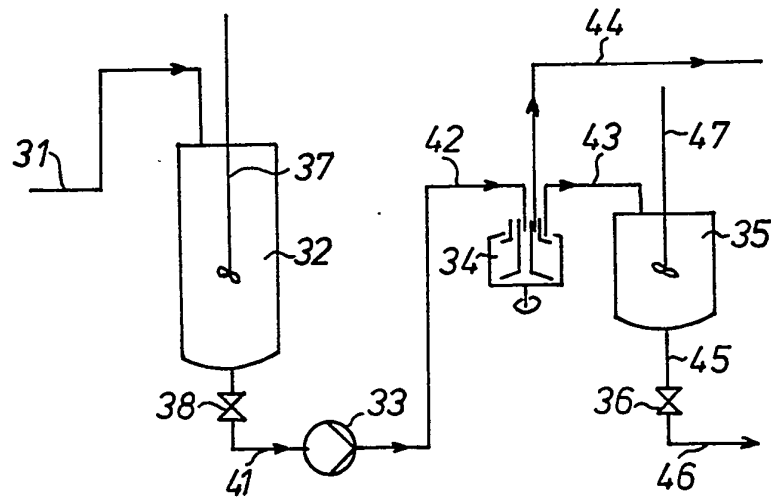
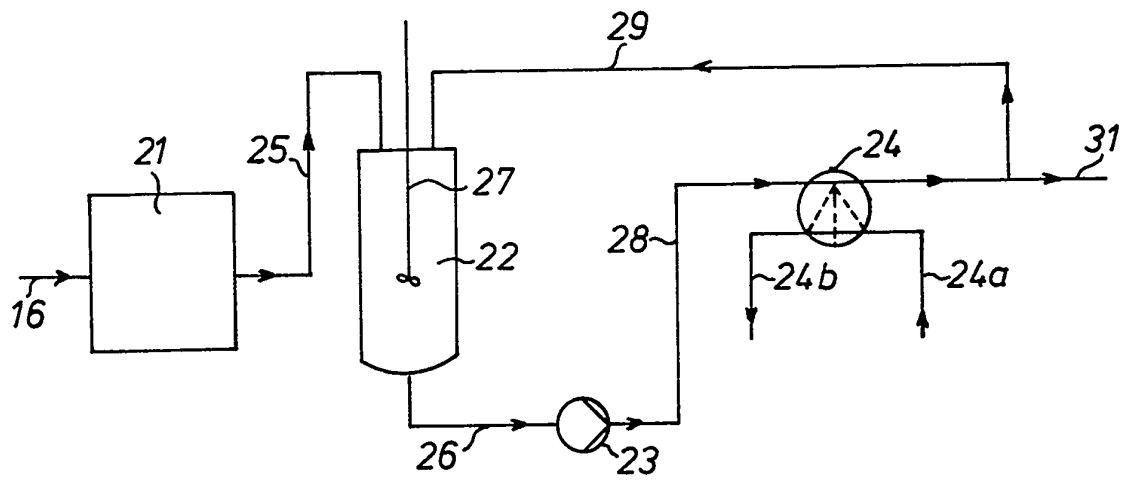
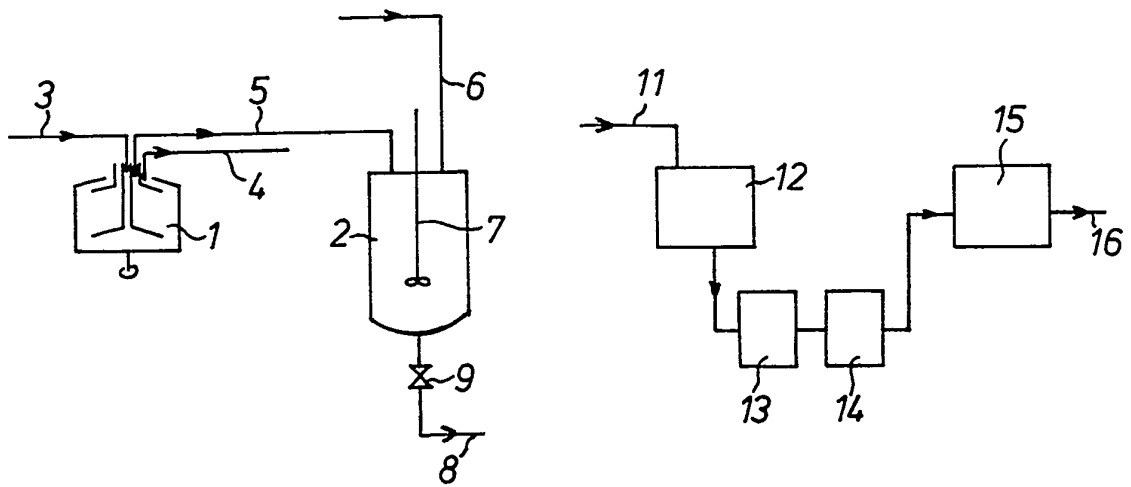
5 9. Werkwijze volgens conclusies 1-8, met het kenmerk, dat fibrinogeenconcentraat wordt afgescheiden uit het geconditioneerde fibrinogeen bevattende materiaal bij een temperatuur van 0 °C door centrifugeren.

10 10. Werkwijze voor het bereiden van fibrinogeen uit een water bevattend fibrinogeenconcentraat door water uit het concentraat te verwijderen en vast fibrinogeen te winnen, met het kenmerk, dat een fibrinogeenconcentraat wordt gebruikt zoals bereid volgens de werkwijze van conclusies 1-9.

15 11. Inrichting voor het uitvoeren van een werkwijze volgens conclusie 1, bestaande uit een toevoer aan een verkleiner van vast materiaal, een afscheider voor fibrinogeenconcentraat, met het kenmerk, dat voor de verkleiner conditioneerapparatuur is opgesteld.

12. Inrichting volgens conclusie 11, met het kenmerk, dat de inrichting overeenkomt met de achtereenvolgende onderdelen zoals weergegeven in de tekening.

9000090



9000090