NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **316358** (13) B1

(51) Int Cl[7] B 01 D 21/26

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19972491	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.12.01, PCT/US95/15675
(22) Inng. dag	1997.05.30	(85) Videreføringsdag	1997.05.30
(24) Løpedag	1995.12.01	(30) Prioritet	1994.12.02, US, 348672
(41) Alm. tilgj.	1997.07.30		
(45) Meddelt dato	2004.01.19		

(71) Patenthaver Bristol-Myers Squibb Co,
100 Headquarters Park Drive, Skillman, NJ 08558, US

(72) Oppfinner Niels-Erik Holm, DK-3460 Birkerød, DK

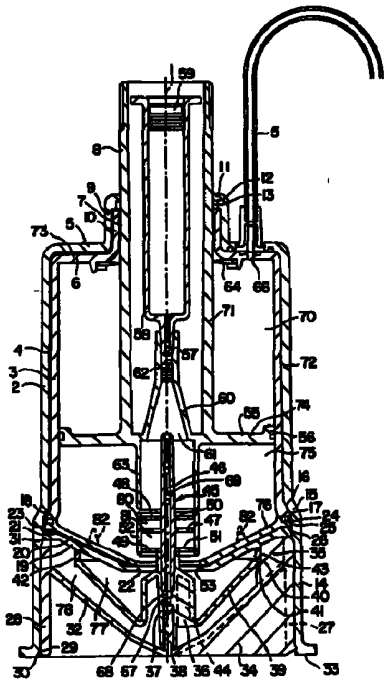
(74) Fullmektig Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Sentrifuge med ringformet filter**

(56) Anførte publikasjoner US 5061381, WO 9117778

(57) Sammendrag

En innretning for å separere komponenter som for eksempel fibrinmonomer fra blod ved sentrifugering omkring en sentral akse omfattende et første ringformet kammer (70) avgrenset av en ytre sylindrisk vegg (72) og en indre sylindrisk vegg (71), idet begge vegger er konsentrisk anordnet omkring en rotasjonsakse, og avgrenset av en toppvegg (73) og en bunnvegg (74) hvor bunnveggen er tildannet av et stempel (55) som kan forskyves inne i det første kammer Innretningen omfatter videre et andre kammer (75) under det første kammer og som kommuniserer med det første kammer gjennom en første passasje (4) og er avgrenset av den andre sylindriske vegg (72), bunnveggen (74) av det første kammer og en ytterligere bunnvegg (76). Innretningen omfatter også en kapsel (45) anordnet i det andre kammer og som inkluderer et flertall avdelinger for å motta respektive blandinger som fremmer separeringen.



TEKNISK OMRÅDE

Oppfinnelsen vedrører en sentrifugeinnretning for separering av en komponent, som fibrinmonomer fra plasma, idet systemet går ut på behandling av plasma med ett eller flere reagenser hvori reagensene tilføres et passende reaksjonskammer inneholdende det nevnte plasma og hvor disse reagenser da fjernes fra et ønsket produkt ved hjelp av en ny sentrifuge-filtrering og en fremgangsmåte for dette

TEKNIKKENS STAND

EP-PS nr 592 242 beskriver metoder og blandinger for et fullstendig nytt fibrintetningsmiddel som innebærer at et ønsket sted bringes i kontakt med en blanding omfattende fibrinmonomer og denne monomer omdannes til en fibrinpolymer samtidig med kontakttrinnet Betegnelsen «fibrin» er definert som fibrin I, fibrin II, og/eller des ββ fibrin

Videre er en metode kjent fra US patentansøkning med løpenummer (USSN) 155 984 for å separere en komponent, som fibrinmonomer fra blod Denne metode for separering av komponentene i en væske inneholdende flere komponenter med varierende spesifikke vekter innebærer trinnene med at blodet samles i et første kammer i en innretning, idet kammeret er avgrenset av en hovedsakelig aksial symmetrisk ytre og indre vegg Blodet underkastes en sentrifugering ved at innretningen roteres omkring symmetriaksen for kammeret, slik at det etableres en konsentrisk grenseflate mellom komponentene av blodet Minst en av komponentene i blodet som for eksempel plasma overføres deretter til et annet kammer i innretningen foretrukket ved at volumet av det første kammer reduseres under en fortsatt sentrifugering av innretningen Den hovedsakelig aksial symmetriske indre vegg er anordnet i det første kammer, slik at det sikres at alt blod underkastes en sentrifugal rotasjon nødvendig for separeringen Denne indre vegg har en radius tilpasset den ønskede rotasjonshastighet

I det annet kammer separeres en fraksjon med ikke-tverrbundet fibrinpolymer fra plasmaet ved hjelp av et egnet enzym og oppløses deretter på nytt til fibrinmonomer og overføres til en sprøyte gjennom et filter ved å redusere volumet av det annet kammer

Det viste seg imidlertid at separeringen av en komponent som fibrin I fra blodet bare ved filtrering i en innretning av den ovennevnte type ikke gir et tilfredsstillende resultat Dette skyldes hovedsakelig det faktum at det er vanskelig å sikre en tilfredsstillende separering av fraksjonen inneholdende fibrin I i det andre kammer, og følgelig går en forholdsvis stor mengde av innholdet i blodet av fibrin I tapt under den etterfølgende overføring av en væskefraksjon fra det annet kammer til det første kammer under det etterfølgende trinn i metoden

I den tidligere fibrinmonomermetode frembrakte også den ovenfor beskrevne behandling av fibrinogen i plasmaet med et passende enzym den ikke-tverrbundne fibrinpolymer i form av en tykk gelmasse ved bunnen av det annet kammer For å tilveiebringe den ønskede fibrinmonomeroppløsning var det nødvendig med en betydelig mengde av gjenoppløsende buffer kombinert med kraftig omrøring Dette resulterte i flere ulemper For det første krever foretrukne fibrinmonomermetoder, for eksempel for bruk som et fibrintetningsmiddel som i EP 592 242, konsentrerte fibrinmonomeroppløsninger, og den store mengde av gjenoppløsende buffer eller løsningsmiddel nødvendig for å oppløse gelmassen ga fortynnede oppløsninger som ikke virket så bra Videre kan den kraftige omrøring som er nødvendig for å oppløse gelmassen til en fibrinmonomeroppløsning bevirke skade på innretningen og selve fibrinet

En samtidig verserende patentansøkning med tittel «Method and Device for Separating a Component Such as Fibrin I From Blood Disease» («Fremgangsmåte og innretning for separering av en komponent som for eksempel fibrin I fra blodsykdom») inngitt samtidig med den foreliggende patentansøkning viser en oppfinnelse som inkluderer en metode som besørger separeringen av ikke-tverrbundet fibrinpolymer fra en plasmafraksjon i et sylindrisk kammer gjennomført under sentrifugering hvorved den ikke-tverrbundne fibrinpolymer avsettes på den ytre vegg av kammeret, hvoretter den resterende flytende fraksjon samlet i kammeret fjernes fra kammeret, og at fraksjonen med ikke-tverrbundet fibrinpolymer som er tilbake i kammeret hovedsakelig avsatt på veggen bringes til oppløsning ved tilsetning av et løsningsmiddel og ved sentrifugalomrøring

Etter som behandlingen av plasmaet med enzymet gjennomføres under fortsatt sentrifugering medfører sentrifugalkraften som virker på den resulterende ikke-tverrbundne fibrinpolymer at denne utfelles som en tynn gelfilm som kraftig kleber til omkretsveggene i kammeret Den resterende plasmavæske avsettes ved

bunnen av kammeret når sentrifugeringen stanses og kan fjernes ved hjelp av hvilke som helst passende midler Den ønskede fibrinmonomeroppløsning oppnås deretter ved å innføre en egnet gjenoppløsende bufferoppløsning i kammeret og underkaste bufferen i det gelbelagte kammer for sentrifugalomrøring Denne metode tilveiebringer fordeler fremfor tidligere metoder For det første er gjenoppløsningen av den ikke-tverrbundne gel ved hjelp av bufferoppløsningen ytterst effektiv delvis på grunn av det store overflateareal av det samme volum av fibringel sammenlignet med fibringelmassen tilveiebrakt i tidligere metode Følgelig kan gelen oppløses med små mengder av gjenoppløsende buffer og dette fører til en ønskelig konsentrert fibrinmonomeroppløsning Videre er virkningen av sentrifugalomrøringen på bufferoppløsningen inne i det gelbelagte kammer en forholdsvis skånsom metode som ikke bevirker noen skade på utstyret eller fibrinmonomerproduktet

Den samtidig verserende oppfinnelse inkluderer også en metode som innebærer tilførsel av blod, foretrukket i nærvær av et antikoagulasjonsmiddel til et første ringformet kammer i en innretning hvor det ringformede kammer er avgrenset av en sylindrisk ytre vegg og en sylindrisk indre vegg, idet begge vegger strekker seg koaksialt omkring en felles akse, så vel som av en toppvegg og en bunnvegg, hvor toppveggen eller bunnveggen er dannet av en stempelkropp som er forskyvbar inne i det første kammer, idet metoden videre innebærer en sentrifugering av innretningen omkring den nevnte felles akse for i vesentlig grad å separere blod i en cellefraksjon og en plasmafraksjon etterfulgt av at den resulterende plasmafraksjon overføres mens den påvirkes av stempelkroppen til et andre kammer avgrenset av en ytre sylindrisk vegg som strekker seg koaksialt med den nevnte felles akse, hvorved en fraksjon med ikke-tverrbundet fibrinpolymer bringes til å separeres i det andre kammer, mens et egnet enzym tilsettes Denne metode er karakterisert ved at den fibrinholdige plasmafraksjon utsettes for enzymet under sentrifugeringen, slik at den resulterende ikke-tverrbundne fibrinpolymer avsettes på den sylindrisk ytre vegg av det andre kammer, hvoretter den flytende fraksjon samlet ved bunnen av det andre kammer overføres under påvirkning av stempelkroppen til det første kammer, og at fraksjonen med ikke-tverrbundet fribrinpolymer som er tilbake i det andre kammer hovedsakelig avsatt på den sylindriske vegg bringes til oppløsning ved tilsetning av et løsningsmiddel og ved sentrifugalomrøring Deretter kan enzymet om ønsket fjernes og den således

fremstilte fibrinmonomeroppløsning overføres til en hvilken som helst ønsket mottakende beholder

Følgelig overholdes en aseptisk betingelse for oppsamling av oppløsningen Etter at fibrinmonomeren er blitt gjenoppløst kan den overføres til en mottakende beholder, som for eksempel en sprøyte for videre bruk som beskrevet i forbindelse med den tidligere teknikk Før overføringen kan enzymet fjernes ved hjelp av hvilke som helst passende midler

Den ovennevnte samtidig verserende ansøkning viser videre en innretning for separering av komponenter fra en væske ved hjelp av sentrifugering omkring en sentral rotasjonsakse, idet innretningen omfatter et første ringformet kammer avgrenset av en ytre sylindrisk vegg og en indre sylindrisk vegg, idet begge vegger er konsentrisk tilpasset omkring rotasjonsaksen, så vel som av en toppvegg og en bunnvegg, hvor toppveggen er tildannet av en stempelkropp som er forskyvbar inne i det første kammer, idet innretningen ytterligere omfatter et andre kammer som kommuniserer med det første kammer gjennom en første ledning, og som avgrenses av en ytre sylindrisk vegg konsentrisk tilpasset omkring rotasjonsaksen og av den nevnte pistolkropp og en bunnvegg, hvor det andre kammer er tilpasset til å ligge under det første kammer under sentrifugeringen, og hvor innretningen også omfatter blodtilførselsmidler for tilførsel av blod til det første kammer og tilførselsmidler for forskjellige blandinger for tilførsel av blandinger som fremmer separeringen så vel som mottakerinnretninger for tilkopling av minst en væskemottakende beholder, hvor mottakerinnretningene kommuniserer med det andre kammer gjennom en andre ledning I en foretrukket utførelsesform omfatter stempelstangen den indre vegg i det første kammer

Denne oppfinneriske innretning gjennomføres av fremgangsmåten i henhold til den samtidig verserende patentansøkning er karakterisert ved at den første ledning omfatter minst en kanal som strekker seg mellom en åpning ved toppveggen av det første kammer og en åpning ved bunnveggen av det andre kammer

Som et resultat tilveiebringes en innretning som er forholdsvis enkel og som uavhengig av stillingen av stemplet sikrer en lett og hurtig overføring av angjeldende fraksjoner fra et kammer til det annet kammer, og særlig av den flytende fraksjon fra det andre kammer til det første kammer etter separeringen av den fibrin i holdige fraksjon Det siste skyldes særlig det faktum at væsken blir automa-

tisk konsentrert ved bunnen av det annet kammer når sentrifugeringen stanses, hvorved den lett kan overføres til det første kammer ved hjelp av at stemplet beveges

I henhold til den samtidig verserende patentansøkning er det særlig foretrukket at i det minste den ene kanal strekker seg gjennom det indre av den ytre sylindriske vegg i både det første og det annet kammer med det resultat at innretningen er særlig enkel og lett å produsere

Videre kan åpningen av kanalen ved bunnveggen av det annet kammer være sentralt tilpasset i kammeret i forbindelse med en fordypning tildannet av bunnveggen Som et resultat blir den angjeldende flytende fraksjon lett og hurtig ledet direkte til innløpsåpningen av kanalen Alternativt kan hver kanal tildannes av et rør som strekker seg rettlinjet gjennom pistolkroppen og som er festet ved endene i henholdsvis toppveggen av det første kammer og bunnveggen av det annet kammer hvor den kommuniserer med kanaldeler som ender i det respektive kammer

Ytterligere kan det første og det annet kammer på en særlig enkel måte omfatte en felles ytre sylindrisk vegg formet av en ytre og en indre sylinder som tettende passer inne i hverandre og mellom seg avgrenser en aksialt forløpende kanal, og sylinderne kan avsluttes ved en ende med en endevegg omfattende en åpning som tillater passering av en stempelstang forbundet til stempelkroppen, idet stempelkroppen danner bunnveggen av det første kammer og separerer det nevnte første kammer fra det annet kammer, og hvor kanalen strekker seg mellom endeveggene av sylindrene til en åpning umiddelbart inntil stempelstangen

Ved å anvende en slik innretning og metode ble egnede reagenser for å lette separeringen og behandlingen av ønskede komponenter i blodplasma forhåndsinnført i det annet kammer For eksempel beskriver EP 592 242 at biotin-avidinopptakningssystemet fordelaktig kan anvendes for å fjerne batroxobin fra den ønskede oppløsning Det er nødvendig at biotin-batroxobin er tilstede i det andre kammer for å reagere med fibrinogenet i plasmaet og omdanne det til en fibrinmonomer (som umiddelbart omdannes til en fibrinpolymer) For deretter å oppta det biotinylerte batroxobin under anvendelse av biotin-avidinsystemet må avidin som for eksempel er bundet til agarose også være tilstede i det annet kammer I en lukket, automatisert sentrifugeinnretning må disse midler innføres i innretningen før blodbehandlingen Forhåndsinnføringen av det biotinylerte

batroxobin og avidin agarose i det samme kammer har medført vanskeligheter etter som den høye affinitet av avidinet for biotinet, som man er avhengig av for enzymopptagningen, forhindrer at tilstrekkelige mengder av enzymet som nødvendig først reagerer med fibrinogenet

En andre samtidig verserende patentansøkning med tittel «Centrifuge With Annular Filter» (sentrifuge med ringformet filter) beskriver en innretning lett å anbringe ett eller flere reagenser inne i et reaksjonskammer og å frigi disse reagenser med en ønsket sekvens Foretrukket, når de anvendes i en innretning av den type som er beskrevet i den tidligere nevnte samtidig verserende patentansøkning kan reagenser som et enzym og en enzymopptakende blanding frigis etter ønske For oppfylling av det nevnte formål tilveiebringes i samsvar med oppfinnelsen en innretning som er karakterisert ved at en kapsel er tilpasset i det andre kammer og omfatter et flertall avdelinger for å motta respektive blandinger som fremmer separeringen, og at kapselen omfatter lukkeinnretninger som lukker avdelingene og under innvirkning av stemplet er tilpasset til i sekvens å åpne for frigivelse av innholdene i avdelingene

En slik kapsel gjør det mulig på en enkel og lett måte å tilføre de substanser som er nødvendige for separeringen av fibrin I, idet kapselen foretrukket er forsynt med disse substanser på forhånd I tillegg tillater de anordnede avdelinger en jevn forut bestemt tilførsel av den mengde som det dreier seg om Batroxobinet blir foretrukket anbrakt i en avdeling i kjemisk forhold med biotin som sikrer at enzymet batroxobin lett kan opptas etter bruken ved hjelp av avidin, som derfor anbringes i den andre beholder i kjemisk forhold med agarose i form av forholdsvis store partikler Den høye affinitet av biotinet for avidinet sikrer at sammensatte biotinulerte batroxobin/avidin agarosepartikler deretter lett fjernes ved filtrering fra fibrin-I- oppløsningen Anbringelsen av de to substanser i sine respektive avdelinger gjør det også mulig lett å dosere substansene ved de ønskede tidspunkter ved å påvirke stemplet De ovennevnte substanser eller blandinger henholdsvis biotin-batroxobin, og avidinagarose kan anvendes i en hvilken som helst passende form, for eksempel frysetørket pulverform

I henhold til oppfinnelsen i den samtidig verserende patentansøkning med tittel «Centrifuge Reagent Delivery System» (reagens-tilførselssystem for sentrifuger) er det særlig foretrukket at kapselen omfatter et sentralt nav, koaksialt montert i det indre av det annet kammer og som bærer tre gjensidig adskilte radiale

skiver som danner delevegger i avdelingene og som har hovedsakelig identisk ytre omkretskontur, og at lukkeinnretningene er dannet av et hylseformet legeme som forskyvbart men tettende omgir de radiale skiver

For aktivering av det hylseformede forskyvbare legeme kan stemplet i henhold til oppfinnelsen fordelaktig omfatte et nedoverrettet skjørt som samvirker med det hylseformede legeme på kapselen slik at det hylseformede legemet forskyves trinnvis hvorved legemet i sekvens åpner for frigivelse av innholdende i de nevnte avdelinger inne i kapselen

I henhold til den nevnte oppfinnelse i patentansøkningen «Centrifuge Reagent Delivery System» (reagens-tilførselssystem for sentrifuger) kan kapselen være tilpasset i forbindelse med en aksial passasje til et tilliggende tredje kammer, hvor den ytre side av det hylseformede legeme av kapselen tettende butter mot sideveggen av den aksiale passasje i det minste etter en initial forskyvning av legemet, hvorved den nederste del av kapselen tillater en fri passering av væske fra det andre kammer til det tredje kammer etter en endelig forskyvning av det hylseformede legeme bevirket av stemplet ut fra sitt inngrep med omkretsen av den nederste delevegg På denne måte danner kapselen videre på en fordelaktig måte en del av innretningen og er til hjelp for denne i dens videre operasjon under separeringen av fibrin I

For videre å danne en integrert del av innretningen kan navet av kapselen i henhold til oppfinnelsen omfatte en aksial gjennomgående passasje og være festet på et oppover rettet fremspring sentralt anbrakt i bunnen av det nedre, tredje kammer, idet den gjennomgående passasje ved bunnen er i væskekommunikasjon med den ytre ringformede avdeling av det tredje kammer gjennom et kanalsystem, og den øvre ende av navet kan være tilpasset til tettende forbindelse til en aksial passasje i stempellegemet, slik at den forbindes til en væskemottakende beholder som kan festes dertil

For å fjerne ett eller flere reagenser fra den ønskede produktoppløsning bringes den resulterende fibrin-I-holdige væskefraksjon inn i en sprøyte gjennom et filter under innvirkning av stemplet Som et resultat presses oppløsningen av fibrin I gjennom filteret, mens enzymet og andre tilblandede substanser for påskynding av separeringen tilbakeholdes av filteret Det resulterende utbytte av fibrin I er imidlertid ikke fullt ut tilfredsstillende ved sammenligning med mengden av fibrin I tilstede i en blodprøve

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Et formål for den foreliggende oppfinnelse er derfor å tilveiebringe en fremgangsmåte som gjør det mulig å oppnå et høyere utbytte av fibrin I ved hjelp av en innretning av angjeldende type

For oppfyllelse av det nevnte formål tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for separering av en komponent som fibrin I fra blod, ved sentrifugering, omfattende tilførsel av blod tilblandet et antikoagulerende middel til et første ringformet kammer i en innretning, hvor det ringformede kammer er avgrenset av en sylindrisk ytre vegg og en sylindrisk indre vegg, idet begge vegger strekker seg koaksialt omkring en felles akse, så vel som av en toppvegg og en bunnvegg, hvor toppveggen eller bunnveggen er dannet av en stempelkropp som kan forskyves inne i det første kammer, innretningen sentrifugeres omkring den felles akse etterfulgt av at en resulterende væskefraksjon overføres under påvirkning av stempelkroppen til et andre kammer avgrenset av en ytre sylindrisk vegg, som strekker seg koaksialt med den felles akse, hvorved væskefraksjonen tilstede i det andre kammer bringes til å bli ytterligere separert ved hjelp av en fortsatt sentrifugering og tilsetning av egnede blandinger som fremmer separeringen og returen av den ikke-utnyttbare del til det første kammer, idet andelen av den flytende fraksjon som er tilbake i det andre kammer overføres til en væskemottakende beholder gjennom et filter eventuelt etter tilsetning av et løsningsmiddel, kjennetegnet ved at den del av væskefraksjonen som er tilstede i det andre kammer før overføringen til den væskemottakende beholder overføres i et tredje kammer som er koaksialt tilpasset de andre kammere, og at væsken som nå er tilstede i det tredje kammer bringes til å passere gjennom et ringformet filter under sentrifugeringen, slik at den går inn i en ringformet ytre avdeling tilpasset for tilkopling til den væskemottakende beholder

Videre oppnås nevnte formål ved en innretning for å gjennomføre fremgangsmåten som angitt i krav 1, omfattende et første ringformet kammer avgrenset av en ytre sylindrisk vegg og en indre sylindrisk vegg, idet begge vegger er konsentrisk anordnet omkring rotasjonsaksen, og av en toppvegg og en bunnvegg, hvor toppveggen og bunnveggen er dannet av en stempelkropp som er forskyvbar inne i det første kammer, idet innretningen ytterligere omfatter et andre kammer som kommuniserer med det første kammer gjennom en første passasje og er avgrenset av en ytre sylindrisk vegg konsentrisk tilpasset omkring rotasjons-

aksen, bunnveggen i det første kammer og en ytterligere bunnvegg, hvor det andre kammer er tilpasset for anbringelse under det første kammer under sentrifugeringen, og hvor innretningen også omfatter blodtilførselsinnretninger for å tilføre blod til det første kammer og tilførselsinnretninger for tilførsel av blandinger som fremmer separeringen så vel som mottakerinnretninger for forbindelse med minst en væskemottakende beholder, idet mottaksinnretningene kommuniserer med det andre kammer gjennom en andre passasje, kjennetegnet ved at den andre passasje kommuniserer med det andre kammer gjennom et tredje kammer som er koaksialt tilpasset i forhold dertil og omfatter enn passasje til det andre kammer som kan åpnes fra utsiden, det tredje kammer omfatter en indre avdeling og en ytre ringformet avdeling, idet avdelingene er forbundet med hverandre gjennom en radialt forløpende omkretspassasje hvori et ringformet filter er anordnet for å forhindre passasje av væske inneholdende uønskede bestanddeler anvendt for å fremme separeringen

I henhold til oppfinnelsen kan passasjen mellom det andre og det tredje kammer være koaksialt anordnet i forhold til de to kammere og er lukket ved hjelp av en kapsel som er vist i den tidligere nevnte samtidig verserende patentansøkning med tittel «Centrifuge Reagent Delivery System» (reagens-tilførselssystem for sentrifuger) Denne kapsel omfatter et sentralt nav koaksialt montert i det andre kammer og som bærer et flertall adskilte radiale skiver som danner skillevegger i et flertall avdelinger inne i kapselen, hvor skivene har identisk ytre omkretskontur, at avdelingene utover er lukket ved hjelp av et tettende, forskyvbart montert hylseformet legeme hvis utside er tilpasset til tettende å ligge an mot sideveggen av den aksiale passasje, idet den nederste skilleveggdannende skive i kapselen tillater en fri passasje av væske fra det andre kammer inn i det tredje kammer ved en aksial forskyvning av det hylseformede legeme ut fra sitt inngrep med omkretsen av den nederste skillevegg under påvirkning av stemplet Som et resultat oppnås en lett og enkel adkomst til angjeldende filter ved hjelp av en kapsel som allerede er anvendt for å tilføre de substanser som er nødvendige for å fremme separeringen av fibrin I inne i det andre kammer

Denne kapsel blir foretrukket aktivert ved hjelp av stempellegemet omfattende et nedoverrettet skjørt som strekker seg koaksialt med det hylseformede legeme i kapselen og som er tilpasset til inngrep med kapsellegemet når stempelkroppen presses ned slik at det derved i sekvens åpnes ved passende tidspunkter

for de respektive avdelinger i kapselen og til slutt at det åpnes for passasje av væske fra det andre kammer inn i det tredje kammer

For å lette overføringen av fibrin-I-oppløsningen til en væskemottakende beholder, som for eksempel en sprøyte, kan navet av kapselen i henhold til oppfinnelsen omfatte en aksial gjennomgående passasje og være festet på et oppoverstående fremspring sentralt anordnet i bunnen av det nedre tredje kammer, idet den gjennomgående passasje er i flytende kommunikasjon med den ytre ringformede avdeling i det tredje kammer gjennom et kanalsystem, idet den øvre ende av navet er tilpasset til tettende forbindelse til en passasje i stempelkroppen, slik at den blir forbundet med en væskemottakende beholder som kan festes den

I henhold til oppfinnelsen kan endelig navet av kapselen festes til fremspringet i bunnen av det tredje kammer ved hjelp av en hylse, som ved hver ende omgir navet henholdsvis fremspringet og hylsen kan omfatte en perifersk utoverstående veggdel, hvorved det ringformede filter festes mellom den ytre omkrets av den nevnte veggoverflate og bunnveggen i det andre kammer, hvorved den utoverstående veggdel av hylsen anordnes i en avstand fra bunnen av det tredje kammer og derved danner forbindelsen mellom den ytre ringformede avdeling og en aksialt forløpende kanal i forbindelse med den gjennomgående passasje i navet og som strekker seg mellom den ytre side av fremspringet og den tilliggende innside av hylsen Den resulterende innretning er spesielt enkel

Fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse dreier seg om forbedrede prosesser for separering og isolering av en individuell blodkomponent eller en oppløsning inneholdende en slik komponent Den foreliggende fremgangsmåte er imidlertid egnet for en hvilken som helst prosedyre som kan tilpasses enn sylindrisk sentrifuge, hvori en første oppløsning behandles med en eller flere katalysatorer eller reagenser under sentrifugering Andre blodprosedyrer som kunne dra nytte av en slik metode inkluderer, men er ikke begrenset til isolering av en hvilken som helst blodkomponent, som for eksempel

blodplaterikt plasma,

blodplatekonsentrat,

kryoprecipitert fibrinogen,

andre proteiner i plasma som for eksempel trombin, fibronectin og lignende

Foretrukket er blodet fra en enkelt giver og mest foretrukket er blodet fra den samme person til hvem blodkomponenten skal tilføres

Mens den foreliggende fremgangsmåte er beskrevet i det følgende i forbindelse med å frembringe en fibrinmonomeroppløsning skal rammen for oppfinnelsen som forstått av de fagkyndige på området ikke være begrenset til dette

Som anvendt heri refererer betegnelsen «sentrifugalomrøring» til den bevegelse av innretningen hvor den gjenoppløsende bufferoppløsning innføres for å gjenoppløse mellomproduktet, som for eksempel ikke-tverrbundet fibrin polymergel fra de ytre kammervegger Slik bevegelse eller sentrifugalomrøring kan inkludere sentrifugering for å sikre at alt det blottlagte overflateareal av gelen utsettes for den gjenoppløsende oppløsning og inkluderer foretrukket en slik sentrifugering etterfulgt av stopp- og startrotasjoner i den samme omdreiningsretning og/eller stopp- og startrotasjoner i motsatte omdreiningsretninger Typiske sentrifugalomrøringer inkluderer men er ikke begrenset til 5-30 sekunders rotasjoner, foretrukket 5-10 sekunders rotasjoner med 2 000-5 000 omdreininger pr minutt i gjentatte forover- bakoversykluser for en hvilken som helst ønsket tidsvarighet I den foreliggende fremgangsmåte foretrekkes 5-10 sekunders rotasjoner med omtrent 3 000 omdreininger pr minutt i gjentatte forover- bakoversykluser i 1-2 minutter Som nevnt i det foregående kan dette foregå ved en noe mer langvarig rotasjon, for eksempel 20 sekunder eller mer for initialt å fordele løsningsmidlet

Betegnelsen «fibrin» som anvendt heri referer til fibrin I, fibrin II eller des ββ fibrin

Den foreliggende innretning som omfatter det sentrifugale ringformede filtersystem omhandlet heri muliggjør en effektiv og nøyaktig metode for gjenvinning av et eller flere reagenser fra den ønskede produktoppløsning Dette er særlig kritisk i lukkede, fullstendige automatiserte sentrifuger for bruk ved blodseparerings-metoder hvori to eller flere reagenser må innføres i et reaksjonskammer på en sekvensmessig måte og derfor fjernes I de foretrukne fremgangsmåter og innretninger beskrevet heri for å frembringe en fibrinmonomerholdig oppløsning, for eksempel for bruk i et nytt fibrintetningsmiddel tilveiebringer den sekvensmessige innføring av biotinylert batroxobin etterfulgt av avidinagarose i det plasmaholdige kammer en meget sofistikert metode for fremstilling av en slik oppløsning

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Foretrukne utførelsesformer av den foreliggende innretning og fremgangsmåter skal nå beskrives med henvisning til tegningene hvori

Fig 1 er en aksial, snittegning gjennom en foretrukket utførelsesform av en innretning i samsvar med oppfinnelsen, og

Fig 2 illustrerer en andre utførelsesform av en innretning i henhold til oppfinnelsen

Fig 3 illustrerer en tredje utførelse av anordningen ifølge oppfinnelsen

Den foreliggende innretning er en lukket automatiserbar enkeltinnretning i stand til å omdanne helblod i ønskede blodkomponenter, foretrukket autologe komponenter nyttige for eksempel som fibrintetningsmidler

BESKRIVELSE AV FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER AV OPPFINNELSEN

Foretrukket anvendes det foreliggende ringformede filtersystem for sentrifuger med en innretning som dekket i de tidligere omtalte samtidig verserende patentansøkninger og beskrives derfor i det følgende med henvisning til en slik innretning Det skal imidlertid forstås at innretningen kunne anvendes i en hvilken som helst reaksjonskammerinnretning som krever fjernelse av ett eller flere reagenser

Innretningen i fig 1 i samvar med oppfinnelsen er oppbygget av deler som i vesentlig grad fremviser rotasjonssymmetri og innebærer at innretningen kan anbringes i et sentrifugeringsapparat på en enkel i og for seg kjent måte slik at den sentrifugeres omkring en sentral akse 1 I fig 1 omfatter en foretrukket utførelsesform av innretningen en ytre beholder 2 og en indre beholder 3 som er slik at de fullstendig passer inn i hverandre og overalt tettende butter mot det andre bortsett fra den del hvor en aksialt forløpende mellomliggende kanal 4 er anordnet Kanalen 4 tilveiebringes av et spor tildannet i den indre beholder 3 De to beholdere 2 og 3 omfatter deres respektive toppdeler henholdsvis 5 og 6 som avgrenser en sentral åpning 7 som tillater passering av en stempelstang 8 Omkring åpningen 7 omfatter de to beholdere aksialt forløpende deler henholdsvis 9 og 10 som strekker seg nær inntil den hule stempelstang 8 i en retning bort fra det indre av behol-

derne Den ytre beholder 2 butter mot den hule stempelstang langs en kort radialt forløpende flens 11 forsynt med en fordypning 12 som opptar en tetningsring 13

Som illustrert i fig 1 fortsetter kanalen 4 mellom den indre og den ytre beholder hele veien fra de ytre sylindriske vegger av den indre og den ytre beholder langs toppdelene 5, 6 og de aksiale deler 9 og 10 til åpningen umiddelbart under tetningsringen 13 i åpningen 7 Den aksiale del 10 av den indre beholder 3 som butter mot åpningen 7 er dimensjonert slik at en trang, men fri passasje til det indre av beholderne 2 og 3 består omkring den hule stempelstang 8

Den ytre beholder 2 omfatter en sylindrisk del med ensartet diameter, jfr fig 1 Sett i retning nedover i forhold til tegningen fortsetter denne del over i en sylindrisk del 14 med en litt større diameter gjennom en kort overgangsdel 15 som danner en indre overflate 16 med avkortet kjegleform Den indre beholder 3 ender på det sted hvor overgangsdelen 15 av den ytre beholder 2 fortsetter over i den sylindriske del 14 med en større diameter Den nedre ende av den indre beholder 3 omfatter en ytre overflate 17 med avkortet kjegleform tilpasset formen av den avkortede kjegleformede overflate 16 på innsiden av den ytre beholder 2 En ytre og en indre ringformet skål 19 henholdsvis 20, er anordnet umiddelbart under den nedre ende av den indre beholder 3 som slutter i en radial overflate 18 Disse skåler butter tett til hverandre bortsett fra det faktum at de mellom seg definerer en kanal 21 som strekker seg i et aksialt plan fra en sentral åpning 22 og forover til den indre side av den ytre beholder 2, hvor kanalen 21 kommuniserer med kanalen 4 mellom den ytre beholder 2 og den indre beholder 3 gjennom en aksialt forløpende del 23 Kanalen 21 og den aksiale kanaldel 23 er passende tilveiebrakt ved hjelp av et spor i den side av den indre skål 20 som vender mot den ytre skål 19 De to skåler 19 og 20 er formet med et slikt skrånende forløp at de omfatter hovedsakelig indre og ytre overflater med avkortet kjegleform, jfr fig 1, og derved heller nedover mot den sentrale åpning 22 Fig 1 viser også at den indre skål 20 omfatter en radial overflate 24 som butter mot den tilliggende radiale overflate 18 på den indre beholder 3 Den radiale overflate 24 av den indre skål 20 er forsynt med en fordypning 25 for å oppta en tetningsring 26

De to skåler 19 og 20 holdes i posisjon buttende mot den radiale overflate 18 av den indre beholder 3 ved hjelp av et lokk 27 som lukker den ytre beholder i nedover-retningen Dette lokk 27 omfatter en hylseformet omkretsdel 28 tilpasset til tett å butte mot innsiden av den ytre beholder 2 hvortil det er festet på en pas-

sende måte, for eksempel ved hjelp av sneppertvirkning ved inngrep mellom en omkretsribbe 29 på utsiden av hylsen 28 og et tilsvarende omkretsspor 30 på innsiden av den ytre beholder 2 En tettende forbindelse sikres ved hjelp av en tetningsring 31 i en omkretsfordypning 30 ved den ytre periferi av den ytre skål 19 Lokket 27 omfatter videre en forholdsvis tynn vegg 32 tilpasset til å danne den nedre bunn av innretningen i posisjonen vist i fig 1 Denne vegg 32 trekker seg hovedsakelig langs en kurs parallell med den ytre og den indre skål 19 og 20 på en slik måte at veggen 32 strekker seg fra innsiden av hylsen 28 i endel nærmere skålene 19 og 20 og nedover mot en del hovedsakelig i høyde med den nedre kant 33 av den ytre beholder 2 For å forsterke denne forholdsvis tynne vegg 32 er det anordnet en forsterkende radial ribbe 34 med jevne mellomrom, idet bare enn av disse ribber er vist i fig 1 Denne ribbe 34 er tildannet delvis med en del anbrakt utenfor veggen 32 og delvis med en del anbrakt innenfor veggen 32, jfr fig 1 Den siste del er gitt henvisningstall 35 og er formet slik at den butter mot undersiden av den ytre skål 19 med det resultat at den hjelper til med å opprettholde skålene 19 og 20 i en pålitelig stilling

En delingsinnsats 36 er presset inn mellom den ytre skål 19 og lokket 27 Denne delingsinnsats 36 omfatter en sentral rørlengde 37 Denne rørlengde er montert på en tapp 38 som rager aksialt innover og er tildannet i et stykke med veggen 32 av lokket 27 Denne rørlengde 37 er tildannet i et stykke med en perifer veggskål 39 som strekker seg utover fra rørlengden 37 på en slik måte at den til å begynne med heller noe nedover mot veggen 32 av lokket 27 hvoretter den strekker seg langs en kort aksial kurs, slik at den fortsetter i en kurs som strekker seg hovedsakelig parallelt med veggen 32 av lokket Veggskålen 39 slutter i en kort radialt forløpende periferi 40 som hviler på en skulder 41 på ribbedelene 35 på lokket 27 En ringformet filterenhet 42 er presset inn mellom den ytre periferi 40 av veggskålen 39 og undersiden av den ytre skål 19 Denne ringformede filterenhet 42 butter mot en hovedsakelig radialt formet overflate 43 på den tilliggende utside av den ytre skål 19

For å sikre en stabilitet i delingsinnsatsen 36 er forsterkende radiale ribber med henvisningstallet 44 videre tilpasset mellom rørlengden 37 og den omgivende veggskål 39

Reagenstilførselssystemet i henhold til den foreliggende oppfinnelse omfatter en kapsel gitt det generelle henvisningstall 45 festet i enden av rørlengden

37 av delingsinnsatsen 36 på motsatt side av lokket 27 En slik kapsel er egnet for selektivt å frigi midler inn i det andre kammer 75 Denne kapsel omfatter en langstrakt rørlengde 46 tildannet i et stykke med en ringformet skive 47 og bærer to ytterligere radiale ringformede skiver 48 og 49 Disse radiale ringformede skiver 48 og 49 er festet ved hjelp av friksjonspasning på hver sin side av den faststående ringformede skive 47 De løse ringformede skiver 48 og 49 er tilpasset ved deres respektive avstander fra den faststående ringformede skive 47 ved hjelp av henholdsvis omkretsskuldere 50 og 51 på rørlengden 46 De tre ringformede skiver 47, 48 og 49 har alle den samme ytre diameter og bærer langs sine respektive omkretser en omgivende forskyvbart montert hylse 52

Som illustrert i tegningen butter den nedre ringformede skive 49 mot den øvre ende av rørlengden 37 av delingsinnsatsen 36, hvorved posisjonen av kapselen 45 i den aksiale retning bestemmes Denne posisjon bestemmes videre på en slik måte at når den forskyves i aksial retning går den forskyvbare hylse 52 av kapselen inn i et tettende inngrep med sin nedre ende, jfr tegningen, med den innerste kant 53 på den ytre skål 19 i dennes sentrale åpning 22 I denne posisjon av hylsen 52 eksisterer det fremdeles en kommunikasjon mellom rommet inne i den indre skål 20, som omgir hylsen 52 og innløpsåpningen til kanalen 21 mellom den ytre skål 19 og den indre skål 20 Den aksiale lengde av den forskyvbare hylse 52 er tilpasset slik at inngrepet med den ytre skål 20 skjer før den øvre ende, jfr tegningen, av hylsen 52 går ut av inngrep med den faststående ring 47 under den aksiale nedoverforskyvning av hylsen 52 Den indre diameter av hylsen 52 er også tilpasset den ytre diameter av den aksialt forløpende del av den omgivende veggskål 39 av delingsinnsatsen 36 på en slik måte at en fortsatt nedoverforskyvning av hylsen 52 mot lokket 27 bevirker at hylsen 52 fast går til inngrep med delingsinnsatsen 36 når den først har frigjort seg fra den ytre skål 19 Lengden av den aksiale del av delingsinnsatsen 36 tilsvarer også den aksiale lengde av hylsen 52 på en slik måte at hylsen 52 i sin laveste posisjon blir hovedsakelig fullstendig opptatt av delingsinnsatsen 36

Som illustrert i tegningen omfatter den hule stempelstang 8 et omgivende stempel 55 inne i den ytre beholder 2 og den indre beholder 3, idet stemplet 55 er i tettende kontakt med innsiden av den indre beholder 3 ved hjelp av en tetningsring 56

En Luer-kopling 57 er tildannet inne i den hule stempelstang for å motta en vanlig sprøyte 58 med en plugg 59 med stempelvirkning for å virke på innholdet i sprøyten 58 Koblingen 57 er tildannet hovedsakelig som en rørlengde som kommuniserer med en sentral åpning 61 i stemplet 55 gjennom en avkortet kjegledel 60 Lengden av røret 57 er utstyrt med et radialt innoverstående steg 62 for å rette væsken som forlater sprøyten 58 bort fra en aksial bane og derved omkring lengden av røret 46 derunder inne i kapselen 45 Den sistnevnte rørlengde 46 har en slik lengde og slike dimensjoner at den tettende kan være i kontakt med lengden av røret 57 inne i den hule stempelstang 8 når stemplet 55 er i sin laveste posisjon nær lokket 27 For å fremme den ovennevnte tettende forbindelse er innsiden av rørlengden 57 tildannet med en gradvis minkende diameter ved enden inntil stemplet 55

Et aksialt utstående skjørt 63 er tildannet i et stykke med stemplet 55 omkring den sentrale åpning 61 i stemplet Dette skjørt 63 er tildannet med en slik diameter og en slik lengde at det ved en passende forskyvning av stemplet 55 kan aktivere den ovennevnte forskyvning av den forskyvbare hylse 52 av kapselen 45 inn i de nevnte posisjoner hvori den går i inngrep med den indre kant 53 av den sentrale åpning 22 gjennom de to skåler 19 og 20 etterfulgt av et inngrep med delingsinnsatsen 36

En elastisk ringformet leppetetning 64 er som vist festet omkring det hule stempel ved toppen inne i beholderne 2 og 3, jfr fig 1 Denne leppetetning 64 er tilpasset til å hindre en uønsket passasje av væske fra det indre av beholderne 2 og 3 til kanalen 4, men den tillater passering av væske når en kraft utøves gjennom stemplet 55

Som vist ved toppen av fig 1 er det anordnet en forbindelse til en slange 65 gjennom en åpning 66 i den ytre henholdsvis den indre beholder 2 og 3 Denne forbindelse er kjent og derfor ikke vist mer detaljert, men den tillater en avbrytelse av forbindelsen til slangen når dette ønskes I tillegg er det anordnet en åpning for unnslipping av luft med et passende filter på en konvensjonell måte og derfor verken vist eller beskrevet mer detaljert

En passasje 69 er anordnet fra området mellom delingsinnsatsen 36 og lokket 27 og hele veien oppover gjennom det indre av lengden av rørlengden 37 av delingsinnsatsen 36 og gjennom det indre av lengden av rørlengden 46 av kapselen 45 Denne passasje 69 tillater en overføring av væske til sprøyten 58 fra

det nevnte område når den sistnevnte rørlengde 46 koples til rørlengden 57 i det indre av stempelstangen 8 Passasjen 69 er anordnet i den nederste del av tappen 38 i lokket 27 ved at tappen 38 er tildannet med en plan aksial overflate, idet tappen ellers har et hovedsakelig sirkulært tverrsnitt Som et resultat er det dannet et rom mellom tappen og den tilliggende del av innsiden av rørlengden 37 Et område 67 er anordnet umiddelbart over tappen 38 hvor delingsinnsatsen 36 har en litt redusert indre diameter På denne måte er det mulig å anbringe et lite filter 68 umiddelbart over dette området, jfr fig 1, hvorved fluidet må passere dette filter før det går inn i rørlengden 46 av kapselen 45

Den beskrevne innretning omfatter et første ringformet kammer 70 , avgrenset innover av det hule stempel 8 som danner en sylindrisk indre vegg 71, og begrenset utover av en sylindrisk ytre vegg 72 tildannet av den ytre beholder 2 og den indre beholder 3 Når det er i vanlig bruksposisjon, jfr fig 1, er det ringformede kammer 70 oppover avgrenset av en toppvegg 73 dannet av bunnen 5 henholdsvis 6 av den ytre beholder 2 og den indre beholder 3 Nedover er det ringformede kammer 70 avgrenset av en bunnvegg 74 dannet av stemplet 55 Et andre kammer 75, som også kan betegnes som et reaksjonskammer, er avgrenset under stemplet 55, idet det andre kammer utover er avgrenset av den samme sylindriske ytre vegg 72, som det første kammer 70 Nedover er det andre kammer 75 avgrenset av en andre bunnvegg 76, dannet av den ytre skål 19 og den indre skål 20 Kapselen 45 er sentralt opptatt i det indre av det andre kammer 75 Et tredje kammer 77 er anordnet under den nevnte andre bunnvegg 76 og dette tredje kammer 77 er avgrenset av delingsinnsatsen 36 og den ringformede filterenhet 42 I tillegg kommuniserer dette tredje kammer 77, med det andre kammer 75 gjennom passasjen dannet av den sentrale åpning 22 i den ytre skål 19 og den indre skål 20 Endelig er det anordnet et fjerde kammer 78 under delingsinnsatsen 36, idet det fjerde kammer 78 , er avgrenset nedover av veggen 32 i lokket 27 og videre ved deler av hylsen 28 av lokket 27 og undersiden av den ytre skål 19

Som beskrevet i det foregående er innretningen primært egnet for separering av en komponent, som for eksempel fibrinmonomer fra blod, og for dette formål blir det annet kammer 75 og foretrukket det øvre kammer 80 i kapselen 46 på forhånd fylt med et egnet enzym, som for eksempel batroxobin Som det forstås fra EP-PS nr 592 242, kan et hvilket som helst trombin-lignende enzym anvendes Slike enzymer inkluderer trombin i seg selv eller et hvilket som helst annet mater-

al med en lignende aktivitet, som for eksempel «Ancrod», «Acutin», «Venyyme», «asperase» , botropase», «crotabase», «flavorxobin» og »gabonase» samt det foretrukne «batroxobin» Batroxobin kan kjemisk bindes til biotin som er en syntetisk substans som tillater at batroxobinet kan opptas på en vanlig kjent måte ved hjelp av avidin i en avidin-agarosesammensetning Følgelig finnes avidin-agarose i det nederste kammer 81 i kapselen Både biotinbatroxobinsammensetningen og avidin-agarosesammensetningen fylles forholdsvis lett inn i de respektive kammere 80 og 81 inne i kapselen 45 før denne kapsel anbringes inne i innretningen

Til slutt anordnes en sprøyte 58 inneholdende en pH-4 buffer fremstilt fra et acetat fortynnet med eddiksyre og egnet for å motta fibrin I

En ytterligere buffer kjent fra teknikkens stand kan også anvendes Det gjenoppløsende buffermiddel kan være en hvilken som helst sur bufferoppløsning foretrukket slike som har pH mellom 1 og 5 Egnede eksempler inkluderer eddiksyre, ravsyre, glucuronsyre, cysteinsyre, crotonsyre, itakonsyre, glukonsyre, maursyre, asparginsyre, adipinsyre og salter av hvilke som helst av disse syrer Ravsyre, asparaginsyre, adipinsyre og salter av eddiksyre, for eksempel natriumacetat foretrekkes Oppløseliggjøringen kan også gjennomføres ved en nøytral pH ved hjelp av et chaotropt middel Egnede midler inkluderer urea, natriumbromid, guanidinhydroklorid, KCNS, kaliumjodid og kaliumbromid Konsentrasjoner og volum av slik syrebuffer og slikt chaotropisk middel er som beskrevet i EP-PS nr 592 242

Under eller umiddelbart etter tilførsel av blod skyves stempelstangen 8 så langt inn i det indre av innretningen at den forskyvbare hylse 52 av kapselen 45 beveges nedover til et tettende inngrep i den gjennomgående passasje gjennom bunnveggen 76 og til det andre kammer 77 Som et resultat åpnes samtidig adgang til biotinbatroxobinsammensetningen inne i det øverste kammer 80 i kapselen

Når innretningen er ferdig for bruk mates en blodprøve inn i det første kammer gjennom en nål (ikke vist) og slangen 65 på en konvensjonell måte, idet blodprøven på en konvensjonell måte også er blitt tilblandet et antikoagulerende middel Under tilførselen av blodet gjennom slangen 65 og åpningen 66 inn i det indre av det første kammer 70 fjernes luft fra kammeret på en konvensjonell måte Etter tilførselen av blod fjernes slangen 65 og åpningen 66 lukkes tett Deretter anbringes innretningen med blodet i en sentrifuge som blant annet fremmer den

tettende sammenpressing av de forskjellige deler Sentrifugen bringer innretningen til å rotere omkring rotasjonsaksen 1 Som et resultat av sentrifugeringen separeres blodet i det første kammer 70 i en plasmafraksjon som avsettes innenfor den resterende del av blodet, idet den resterende del inneholdende de røde og de hvite blodceller Som beskrevet i EP-PS nr 592 242 kan blodplatene være tilstede i den ene eller den annen fraksjon etter ønske ved at hastighet og tid for sentrifugeringen varieres

Når grenseflaten mellom plasmaet og den resterende del av blodet er blitt stabilisert, d v s når separeringen er fullstendig, igangsettes en reduksjon av volumet av det første kammer 70 ved hjelp av stempelstangen 8 og følgelig trekkes stemplet 55 ut Som et resultat passerer først et mulig indre lag av luft gjennom kanalene 4 og 21 inn i det andre kammer 75 og en ytterligere bevegelse av stemplet 55 medfører at plasmaet også passerer til det andre kammer 75 Bevegelsen av stemplet 55 stanses når hele laget av plasma er blitt presset inn i det andre kammer 75, d v s når grenseflaten mellom plasmafraksjonen og den resterende del av blodet har nådd den indre vegg 71 i det første kammer 70

I det andre kammer 75 kommer plasmafraksjonen i kontakt med enzymet batroxobin med det resultat at fibrinmonomer, som umiddelbart polymeriseres til en ikke-tverrbundet fibrinpolymer, frigis fra plasmafraksjonen Denne prosess gjennomføres mens innretningen sentrifugeres kontinuerlig med det resultat at fibrinpolymer separeres effektivt fra den resterende del av plasmafraksjonen, idet fibrinpolymeren dannes ved reaksjonen med biotin-batroxobinsammensetningen og avsettes som et viskøst lag langs den sylindriske ytre vegg 72 Når denne separering er fullført stanses sentrifugeringen hvorved den resterende forholdsvis flytende del av plasmafraksjonen lett kan presses tilbake inn i det første kammer 70 ved hjelp av at stemplet 55 først løftes for overføring av luft fra det første kammer 70 til det andre kammer 75 etterfulgt av at stemplet 55 presses ned Denne overføring kan gjennomføres forholdsvis lett og hurtig før det viskøse lag med fibrinpolymer når åpningen til kanalen 21 Ytterligere forholdsregler kan eventuelt tas for å forhindre at det viskøse lag når innløpet av kanalen 21 for hurtig, for eksempel ved å anordne en ring av oppstående tenner 82 vist ved stiplede linjer ved bunnen 76 Denne sentrifugerings/tømmeprosedyre kan gjennomføres to eller flere ganger etter behov for å få så mye som mulig av det flytende plasma ut fra fibrinpolymeren

Når først den resterende del av plasmafraksjonen er blitt trykket ut fra det andre kammer 75 blir den forskyvbare hylse 52 av kapselen 45 forskjøvet videre nedover på en slik måte at det skaffes adkomst til det laveste kammer 81 Samtidig eller i forbindelse med den sistnevnte forskyvning av hylsen presses pluggen 59 i sprøyten 58 helt ned ved hjelp av en spindel som virker fra utsiden på en slik måte at pH-4 bufferen overføres til det andre kammer 75, noe som kan gjøres mens en sentrifugalomrøring igangsettes Tilsetningen av pH-4 bufferen medfører at fibrinpolymer oppløses deri, og nærværet av avidin-agarosesammensetningen i det nedre kammer 81 inne i kapselen 45 sikrer at biotinbatroxobin-sammensetningen bindes på en konvensjonell måte av avidinet En fortsatt forskyvning av stemplet 55 bevirker at den forskyvbare hylse 52 på kapselen 45 kommer i inngrep med delingsinnsatsen 36 og går ut av inngrep med bunnveggen 76 med det resultat at det etableres fri adgang til det tredje kammer 77 Som et resultat kan innholdet i det andre kammer 75 flyte fritt nedover inn i det tredje kammer 77 Foretrukket gjennomføres gjenoppløsningen under sentrifugalomrøring som innebærer sentrifugering og en serie av stopp- og start av forover/bakover omrøringsbevegelser

En fortsatt sentrifugering medfører at fibrinmonomeroppløsningen kan separeres i det tredje kammer gjennom den ringformede filterenhet 42 som holder tilbake de forholdsvis store partikler av agarose og batroxobinet bundet dertil via biotin-avidinopptakningssystemet Når fibrinmonomeroppløsningen har passert inn i det nederste fjerde kammer 78 som et resultat av den ovennevnte sentrifugering stanses denne sentrifugering og fibrin-I-oppløsningen overføres lett til sprøyten 58 ved hjelp av en fornyet tilbaketrekking av pluggen 59 hvor da den øverste ende av rørlengden 46 av kapselen 45 kommer i kontakt med rørlengden 47 som danner forbindelsen med sprøyten 58

Da fibrinpolymer separeres fra plasmafraksjonen i det andre kammer 75 under en fortsatt sentrifugering og da fibrinmonomeroppløsningen separeres i det tredje kammer 77 ved at den sentrifugeres er det mulig å oppnå et forholdsvis høyt utbytte av fibrin I fra angjeldende blodprøve

Oppfinnelsen er blitt beskrevet med henvisning til en foretrukket utførelsesform Mange modifikasjoner kan imidlertid gjøres uten at oppfinnelsens ramme fravikes

Fig 2 illustrerer eksempler på slike modifikasjoner, etter som fig 2 illustrerer en annen utførelsesform av oppfinnelsen som mer eller mindre tilsvarer utførelsesformen av oppfinnelsen vist i fig 1 Utførelsesformen i fig 2 omfatter et første kammer 90, og et andre kammer 91 separert ved hjelp av et stempel 92, som omfatter en hul stempelstang 93 som avgrenser det første kammer innover Utover avgrenses de to kammere av en del av et hovedsakelig rørformet element 94 som danner en ytre sylindrisk vegg 95 for de to kammere 90 og 91 Oppover avgrenses det første kammer 90 av en toppvegg 85 som i sin tur dannes av et topplokk festet til det rørformede element 94 ved hjelp av en ring 86 som er skrudd inn i det rørformede element 94 Toppveggen 85 avgrenser en gjennomgående åpning for passasje av den hule stempelstang 93 Nedover avgrenses det andre kammer 91 av en bunnvegg 96 dannet av en perifer indre flens i det rørformede element 94 På siden inntil det andre kammer 91 omfatter det rørformede element 94 en avkortet kjegleoverflate 97 som heller bort fra stemplet 92 mot midten av det andre kammer 91 Bunnveggen 96 avgrenser en sentral gjennomgående passasje 98 til et tredje kammer 99 Det tredje kammer 99 avgrenses av en delingsinnsats 100 og en ringformet filterenhet 101 som er satt inn mellom bunnveggen 96 og delingsinnsatsen 100 og fører til et fjerde ringformet kammer 102 Det fjerde kammer 102 er avgrenset mellom et koppformet lokk 103 festet til det rørformede element 94 ved hjelp av gjenger Lokket 103 holder ved hjelp av mellomliggende ribber på 103 delingsinnsatsen 100 i sentral posisjon inne i det rørformede element 94 under sammenpressing av den ringformede filterenhet 101

En kapsel 105 er festet på en sentral og oppoverstående tapp 104 på delingsinnsatsen 100 Kapselen 105 omfatter en rørformet del 106 med skiveformede ringer 107, 108 løst festet derpå, og som avgrenser kammeret for de nevnte enzymer antydet ved bokstavene BB henholdsvis AA, ved hjelp av en forskyvbart anordnet hylse De skiveformede ringer er festet i de ønskede gjensidige avstander på rørlengden 106 ved hjelp av skuldre formet derpå ved at den ytre perifen av det rørformede element 106 har minskende diameter nedenfra og oppover

Gjennomgående kanaler 115 og 116 er anordnet fra toppen av det første kammer 90 til bunnen av det andre kammer 91 Disse kanaler er tilveiebrakt ved de respektive bestemte lengder av røret 117 henholdsvis 118 som strekker seg parallelt med rotasjonsaksen for innretningen og er festet ved endene i tilhørende åpninger i toppveggen 95 og bunnveggen 96 Kanalforbindelsen mellom disse

respektive rørlengder og kammerne tilveiebringes av passende boringer og plugger festet den Rørlengdene 117 og 118 strekker seg gjennom deres respektive åpning i stemplet 92 Tetningsringer er anordnet overalt for å forhindre lekkasje

En kopling 120 er festet sentralt inne i stemplet 92 for kopling til en sprøyte 121 inne i den hule stempelstang 93 og til den øvre ende av rørlengden 106 i kapselen 105 Koplingen 120 bærer et skjørt 122 som står ut i det andre kammer 91 og påvirker den forskyvbare hylse 110 på kapselen 105 Som illustrert er den ytre diameter av denne hylse 110 tilpasset diameteren av den gjennomgående passasje 98 nedover til det tredje kammer 99 på en slik måte at hylsen 110 styres og avgrenses av bunnveggen 96 i en hvilken som helst posisjon og følgelig også i en laveste posisjon hvori kapselen 105 ikke er i inngrep med den nederste skiveformede ring 109 i kapselen og tillater passasje av fluid fra det andre kammer 91 nedover i det tredje kammer 99 En kanal 123 strekker seg fra det fjerde kammer 102 og passerer sentralt oppover gjennom tappen 104 på delingsinnsatsen 100 og videre oppover gjennom det rørformede element 106 av kapselen 105 hvorved fluid tillates å komme inn i sprøyten 121 derfra

Innretningen i fig 2 anvendes på fullstendig den samme måte som innretningen i fig 1 hvorved midler selvfølgelig også er anordnet for tilkopling av en slange for blodtilførselen

De beskrevne deler som danner en del av de forskjellige innretninger fremstilles lett fra egnede plastmaterialer ved hjelp av sprøytestøping og de angjeldende innretninger er også forholdsvis billige og egnet for å kastes etter bruk

Oppfinnelsen er blitt beskrevet med henvisning til foretrukne utførelsesformer av innretningen Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen kan imidlertid lett gjennomføres i et laboratorium under aseptiske betingelser ved hjelp av en kopp som kan lukkes av et lokk Plasma og enzym fylles inn i koppen og ved blanding og etter sentrifugering separeres den ikke-tverrbundne fibrinpolymer på bunnen eller veggen av koppen som beskrevet i det foregående Etter å ha fjernet den resterende plasmafraksjon oppløses den ikke-tverrbundne fibrinpolymer på nytt ved tilsetning av et løsningsmiddel så vel som ved sentrifugalomrøring som beskrevet i det foregående

EKSEMPEL

140 ml helblod og 20 ml natriumnitrat antikoaguleringsmiddel (USP) ble innført i det første kammer 70 i innretningen beskrevet i det foregående Denne kombinasjon ble sentrifugert i 2 minutter med omtrent 6 000 omdreininger pr minutt for å tilveiebringe en separering av plasma og blodceller Under fortsatt sentrifugering for å opprettholde separasjonen ble stemplet hevet slik at den innerste fase, d v s plasmaet, ble overført i det andre kammer 75 Omtrent 60 ml plasma ble overført Dette ble behandlet med 30 enheter av biotinulert batroxobin som ble innført i det andre kammer 75 via det øvre kammer 80 i kapselen 45 som tidligere beskrevet Plasmaet og abroxobinet ble blandet ved en lavere hastighet, for eksempel omtrent 2 000 til 3 000 omdreininger pr minutter og deretter sentrifugert i 9 minutter ved 9 000 omdreininger pr minutt

Den ikke-tverrbundne fibrinpolymergel ble utfelt som et tynt gellag på sylinderveggene og rotasjonen ble stanset Det resterende plasmafluid (serum) ble så ført tilbake i det første kammer 70 Dette ble etterfulgt av to ytterligere 1 minutters sentrifugering ved 9 000 omdreininger pr minutt for å fjerne så mye som mulig av serumet i gelen Etter hver slik 1 minutts sentrifugering ble overskudd av serum overført til det første kammer 70

Deretter ble en bufferoppløsning omfattende 3,5 ml av en 0,2 M natriumacetat (pH 4,0) oppløsning inneholdende 24 mm kalsiumklorid innført i det annet kammer 75 via sprøyten 58 Ved dette tidspunkt ble det gjennomført en sentrifugalomrøring bestående av 5 - 10 sekunders roteringer hver ved omtrent 3 000 omdreininger pr minutt i gjentatte forover/bakover sykluser i 2 minutter for å oppløse fibrinpolymergelen og tilveiebringe en fibrinmonomerholdig oppløsning Til den således fremstilte oppløsning ble avidinagarose tilsatt via det nedre kammer 71 i kapselen 45 Dette ble etterfulgt av en ytterligere sentrifugalomrøring bestående av 5 - 10 sekunders rotasjoner ved hver omtrent 3 000 omdreininger pr minutt i gjentatte forover/bakover sykluser i 5 minutter Den resulterende oppløsning inneholdt fibrinmonomer pluss et kompleks av avidin-agarose biotinbatroxobin

Denne oppløsning ble overført i det tredje kammer 77 og sentrifugalfiltrert gjennom et 20 μm «Porex» ringfilter i 1 minutt ved 9 000 omdreininger pr minutt

Den resulterende fibrinmonomeroppløsning ble samlet i sprøyten 58 som tidligere beskrevet og inneholdt omkring 25 mg/ml fibrinmonomer

Den således dannede fibrinmonmeroppløsning (fibrin I i dette tilfelle) ble repolymerisert til et fibrin-tetningsmiddel ved påføring på et punkt som trengte slikt setningsmiddel sammen med en 0,75 M natriumkarbonat/bikarbonatbuffer i et forhold fibrin I buffer på 5 1

PATENTKRAV

1 Fremgangsmåte for separering av en komponent som fibrin i fra blod, ved sentrifugering, omfattende tilførsel av blod tilblandet et antikoagulerende middel til et første ringformet kammer (70) i en innretning, hvor det ringformede kammer er avgrenset av en sylindrisk ytre vegg (72) og en sylindrisk indre vegg (71), idet begge vegger (72, 71) strekker seg koaksialt omkring en felles akse, så vel som av en toppvegg (73) og en bunnvegg (74), hvor toppveggen (73) eller bunnveggen (74) er dannet av en stempelkropp (55) som kan forskyves inne i det første kammer (70), innretningen sentrifugeres omkring den felles akse etterfulgt av at en resulterende væskefraksjon overføres under påvirkning av stempelkroppen (55) til et andre kammer (75) avgrenset av en ytre sylindrisk vegg (72), som strekker seg koaksialt med den felles akse, hvorved væskefraksjonen tilstede i det andre kammer (75) bringes til å bli ytterligere separert ved hjelp av en fortsatt sentrifugering og tilsetning av egnede blandinger som fremmer separeringen og returen av den ikke-utnyttbare del til det første kammer (70), idet andelen av den flytende fraksjon som er tilbake i det andre kammer (75) overføres til en væskemottakende beholder gjennom et filter eventuelt etter tilsetning av et løsningsmiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at den del av væskefraksjonen som er tilstede i det andre kammer (75) før overføringen til den væskemottakende beholder overføres i et tredje kammer (77) som er koaksialt tilpasset de andre kammere (70, 75), og at væsken som nå er tilstede i det tredje kammer (77) bringes til å passere gjennom et ringformet filter (42) under sentrifugeringen, slik at den går inn i en ringformet ytre avdeling tilpasset for tilkopling til den væskemottakende beholder

2 Innretning for å gjennomføre fremgangsmåte som angitt i krav 1, omfattende et første ringformet kammer (70) avgrenset av en ytre sylindrisk vegg (72) og en indre sylindrisk vegg (71), idet begge vegger (72, 71) er konsentrisk anordnet omkring rotasjonsaksen, og av en toppvegg (73) og en bunnvegg (74), hvor toppveggen (73) og bunnveggen (74) er dannet av en stempelkropp (55) som er forskyvbar inne i det første kammer (70), idet innretningen ytterligere omfatter et andre kammer (75) som kommuniserer med det første kammer (70) gjennom en første passasje (4) og er avgrenset av en ytre sylindrisk vegg (72) konsentrisk tilpasset omkring rotasjonsaksen, bunnveggen (74) i det første kammer (70) og en

ytterligere bunnvegg, hvor det andre kammer (75) er tilpasset for anbringelse under det første kammer (70) under sentrifugeringen, og hvor innretningen også omfatter blodtilførselsinnretninger for å tilføre blod til det første kammer (70) og tilførselsinnretninger for tilførsel av blandinger som fremmer separeringen så vel som mottakerinnretninger for forbindelse med minst en væskemottakende beholder, idet mottaksinnretningene kommuniserer med det andre kammer (75) gjennom en andre passasje, k a r a k t e r i s e r t v e d at den andre passasje kommuniserer med det andre kammer (75) gjennom et tredje kammer (77) som er koaksialt tilpasset i forhold dertil og omfatter enn passasje til det andre kammer (75) som kan åpnes fra utsiden, det tredje kammer (77) omfatter en indre avdeling og en ytre ringformet avdeling, idet avdelingene er forbundet med hverandre gjennom en radialt forløpende omkretspassasje hvori et ringformet filter (42) er anordnet for å forhindre passasje av væske inneholdende uønskede bestanddeler anvendt for å fremme separeringen

3 Innretning som angitt i krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at passasjen mellom det andre (75) og det tredje kammer (77) er koaksialt anordnet i forhold til de to kammere (75, 77), og er lukket ved hjelp av en kapsel omfattende et sentralt nav koaksialt montert i det andre kammer (75) og som bærer et flertall gjensidig adskilte radiale skiver som danner delevegger i et flertall avdelinger i kapselen, hvor skivene har en identisk ytre omkretskontur, idet avdelingene er lukket utover ved hjelp av et avtettende, forskyvbart montert hylseformet legeme, hvis utside er tilpasset til tettende og ligge an mot sideveggen av den aksiale passasje i alle sine stillinger, idet den nederste deleveggdannende skive i kapselen tillater en fri passasje av væske fra det andre kammer (75) inn i det tredje kammer (77) ved en aksial forskyvning av det hylseformede legeme ut av sitt inngrep med omkretsen av den nederste delevegg under innvirkning av stemplet

4 Innretning som angitt i krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at stempelkroppen (55) omfatter et nedoverrettet skjørt som strekker seg koaksialt med det hylseformede legeme av kapselen og er innrettet til inngrep med legemet når stempelkroppen (55) presses nedover, slik at det i sekvens med passende tidspunkter åpner for de respektive avdelinger i kap-

selen, og til slutt åpner for passasje av væske fra det andre kammer (75) inn i det første kammer (70)

5 Innretning som angitt i krav 3 eller 4,
karakterisert ved at navet av kapselen omfatter en aksial gjennomgående passasje og er festet på et oppoverrettet fremspring sentralt anordnet i bunnen av det nedre tredje kammer (77), idet den gjennomgående passasje er i væskekommunikasjon med den ytre ringformede avdeling i det tredje kammer (77) gjennom et kanalsystem, og at den øvre ende av navet er tilpasset til tettende forbindelse til en passasje i stempelkroppen (55), slik at den kan forbindes med en væskemottakende beholder som kan festes deri

6 Innretning som angitt i krav 5,
karakterisert ved at navet i kapselen er festet til fremspringet i bunnen av det tredje kammer (77) ved hjelp av en hylse som ved hver ende omgir navet og henholdsvis fremspringet, idet hylsen omfatter en perifersk utoverragende veggdel, idet det ringformede filter (42) er festet mellom den ytre omkretsen av veggoverflaten og bunnveggen i det andre kammer (75), hvorved den utoverragende veggdel av hylsen er anordnet i en avstand fra bunnen av det tredje kammer (75), og dermed danner forbindelsen til den ytre ringformede avdeling og en aksialt forløpende kanal til den gjennomgående passasje av navet mellom innsiden av fremspringet og den tilliggende innside av hylsen

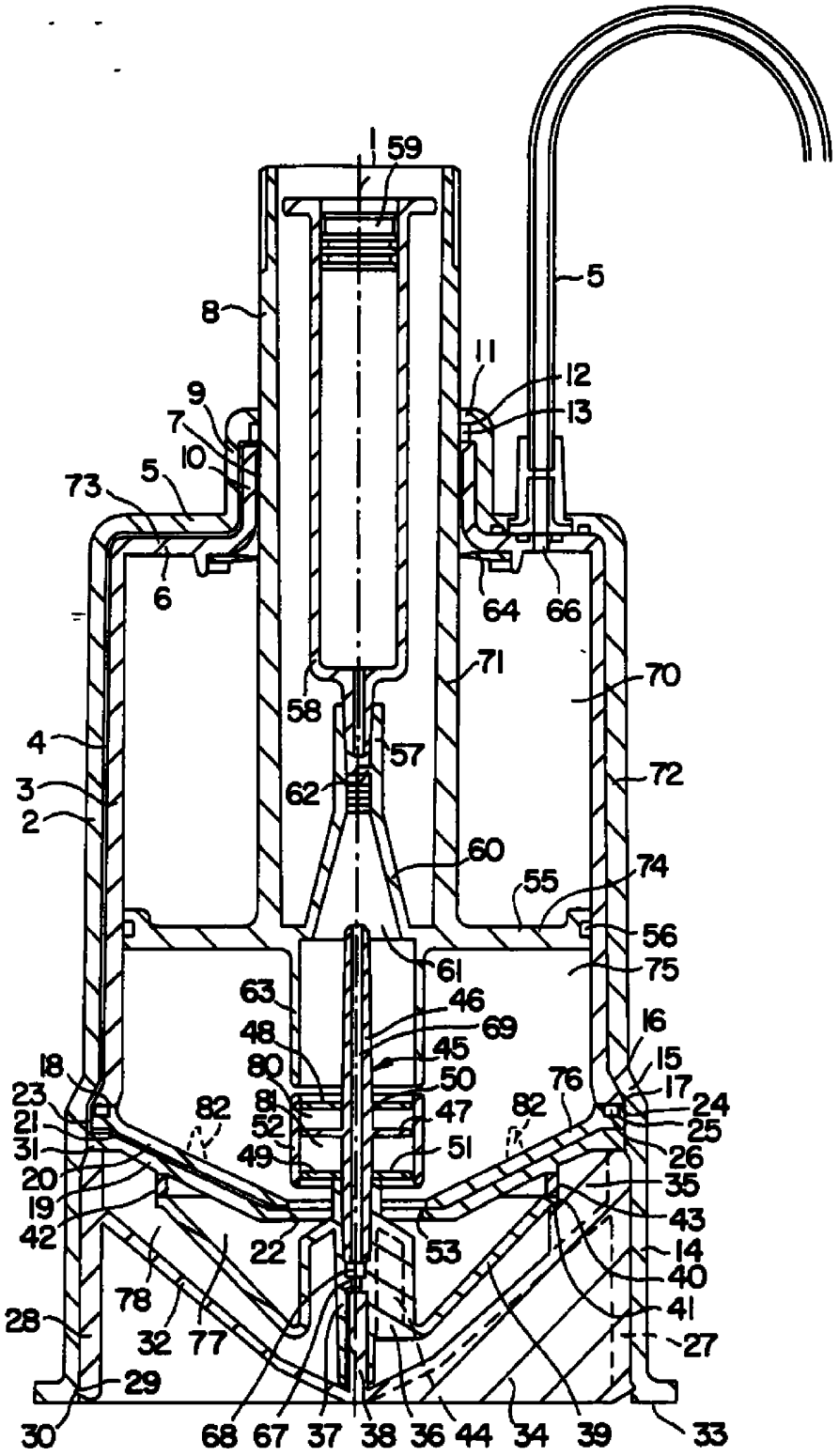

1
59
5
8
11
12
13
9
7
10
73
5
6
64
66
71
70
58
57
4
3
2
62
72
60
74
55
56
61
75
63
46
69
48
45
16
80
50
15
18
81
47
76
17
23
82
82
24
21
52
25
31
49
51
26
20
35
19
43
42
22
53
14
40
78
41
28
32
77
27
29
30
68
67
37
38
36
44
34
39
33

FIG. 1

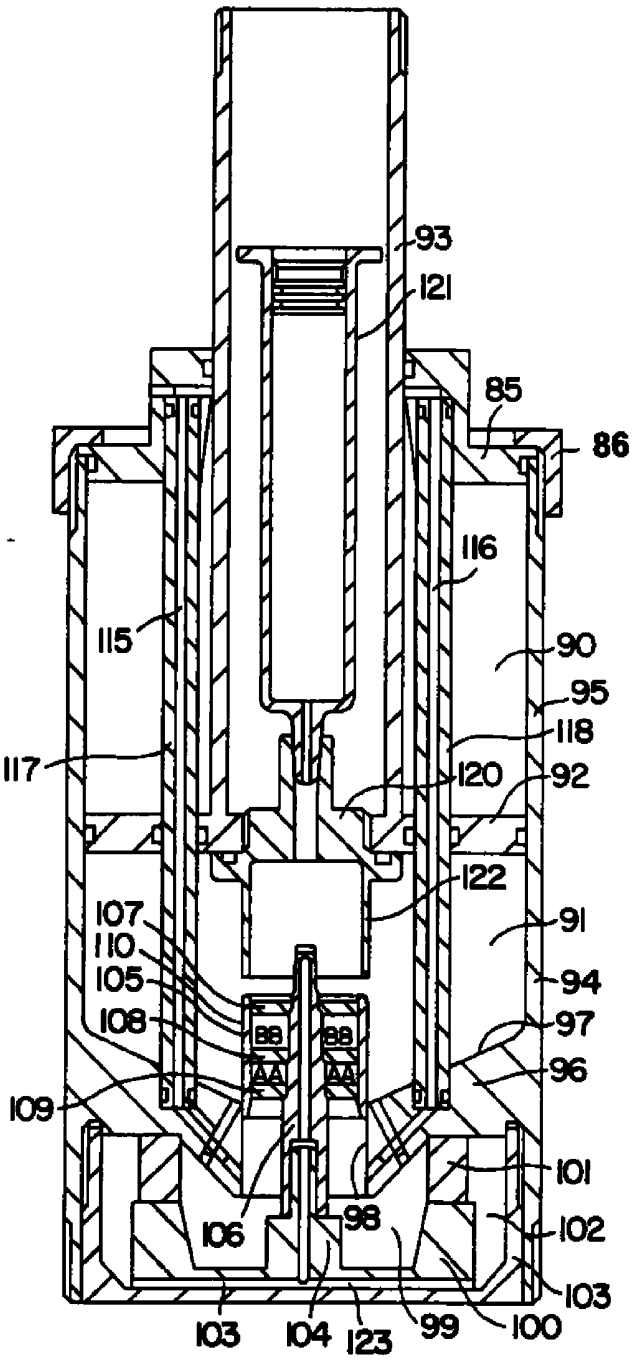

93
121
85
86
116
115
90
95
118
117
120
92
122
107
110
105
91
94
108
97
96
109
101
106
98
102
103
103
104
123
99
100

FIG. 2

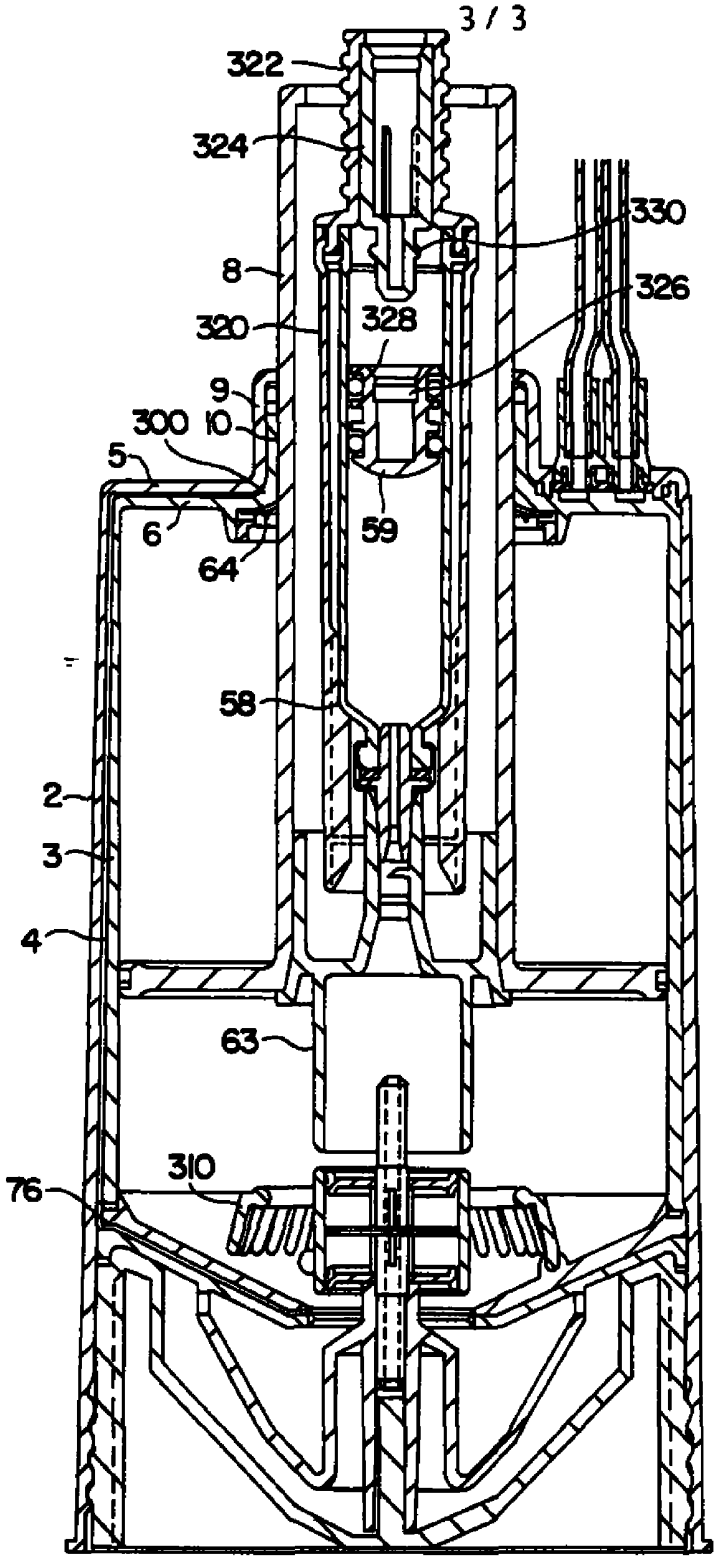


FIG. 3