

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149970 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **0614/76**
(22) Indleveringsdag: **16 feb 1976**
(41) Alm. tilgængelig: **19 aug 1976**
(44) Fremlagt: **03 nov 1986**
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: **18 feb 1975 US 550790**

(51) Int.Cl.⁴: **G 01 N 33/86**
// G 01 N 33/68
// C 08 L 89/00

(71) Ansøger: ***WARNER-LAMBERT COMPANY; Morris Plains, US.**

(72) Opfinder: **James E. *Turner; US, James R. *Butler; US.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co**

(54) **Lyofiliseret kollagenholdigt præparat til brug ved
bestemmelse af blodpladeaggregering samt
fremgangsmåde til fremstilling deraf**

DK 149970 B

0

Den primære hæmostatiske reaktion i legemet er adsorptionen af blodplader til subendotelial kollagen frigjort ved en læsion i et blodkar. Dette efterfølges umiddelbart af en storstilet sammenhobning eller aggregation af blodplader omkring læsionen under dannelse af en prop af blodplader, der forhindrer udsivning af blod og danner en matriks for skorpedannelsen.

Adskillige sygdomstilstande har relation til sammenhobning eller aggregering af blodplader. En formindskelse af blodpladernes aggregeringsevne kan eksempelvis føre til blødersygdomme og forstyrrelser af sårskorpedannelse. På den anden side kan en forøget tendens til blodpladeaggregering initiere uønsket blodkoageldannelse og eventuelt føre til myocardial infarkt eller andre intravaskulære blokeringsproblemer.

For at kunne diagnosticere en specifik blødning eller for at kunne bedømme sandsynligheden for fremtidige blødnings- eller sammenklumpningsproblemer, er det nødvendigt at vurdere patientens blodpladeaggregeringsevne. Dette foretages sædvanligvis in vitro ved bestemmelse af graden af blodpladeaggregering fremkaldt med forskellige aggregeringsmidler såsom adenosindiphosphat, epinephrin eller kollagen. Denne bestemmelse gennemføres sædvanligvis med et blodpladeaggregometer. Dette instrument måler den mængde lys, som passerer en prøve af blodpladerig plasma, som undergår aggregering.

Sædvanligvis anvendes kollagen til bestemmelse af aggregeringen, da dette stof indgår i den primære hæmostatiske reaktion in vivo. Imidlertid er egnede kollagenpræparater ikke kommercielt tilgængelige, og kun nogle få kliniske laboratorier fremstiller og anvender deres egne kollagenpræparater. Disse præparater er sædvanligvis suspensioner og ikke ægte opløsninger, og disse præparater har derfor ringe reproducerbarhed fra gang til gang. Endvidere mister de deres blodpladeaktivitet i tør tilstand og må derfor opbevares i form af en suspension ved 4°C. Som føl-

0

ge deraf er de kun stabile i nogle dage.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes et lyofiliseret kollagenholdigt præparat, som ved rekonstituering danner en ægte opløsning. Da graden af blodpladeaggregering som nævnt bestemmes ved måling af lystransmissionen gennem præparatet, er det væsentligt for opnåelsen af pålidelige resultater at arbejde med klare opløsninger fremfor suspensioner, idet suspensioner med forskellige mængder suspenderet materiale giver meget varierende måleresultater.

Den foreliggende opfindelse angår således et lyofiliseret kollagenholdigt præparat til anvendelse ved bestemmelse af blodpladeaggregering, hvilket præparat er ejendommeligt ved, at det indeholder opløseligt kollagen og kvægserumalbumin, og at det ved rekonstitution ved opløsning i vandige medier danner en klar opløsning og da har en koncentration på 5 til 100 μ g kollagen pr. ml og 0,5 til 70 mg kvægserumalbumin pr. ml og en pH-værdi fra 3,0 til 4,5.

Opfindelsen angår ligeledes en fremgangsmåde til fremstilling af lyofiliseret kollagenholdigt præparat, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at kollagen hydratiseres ved 4°C i en vandig opløsning af eddikesyre til opnåelse af en kollagenopløsning med en pH-værdi på mellem 3,0 og 4,5, hvorpå det hydratiserede materiale homogeniseres til dannelse af en ensartet opløsning, idet partikelformigt materiale eventuelt fjernes ved centrifugering af opløsningen ved 2500 G i 15 minutter, og det homogeniserede materiale fortyndes med en vandig opløsning af kvægserumalbumin i en sådan mængde, at der fås en koncentration på fra 5 til 1000 μ g kollagen pr. ml fortyndet opløsning, idet den fortyndede opløsning derefter lyofiliseres.

Opfindelsen forklares nærmere i de følgende eksempler.

35

0

Eksempel 1Fremgangsmåde til fremstilling af opløseligt kollagenholdigt præparatI. Fremstilling af sur kollagenopløsning

5 25 mg achillessenekollagen henstilles til hydratisering natten over ved 4°C i 25 ml 0,522 M eddikesyre. Blandingen overføres til en 50 ml homogeniseringsbeholder og homogeniseres under anvendelse af et "Virtis Super" 30 homogeniseringsapparat indstillet på skalainddelingen 10 80 i 30 minutter ved 5-8°C. Den fremkomne opløsning centrifugeres ved 2500 G i 15 minutter ved stuetemperatur. Såfremt der ikke konstateres noget bundfald i bunden af centrifugeglasset, omrøres opløsningen langsomt i 15 minutter og filtreres gennem et lag glasuld. Såfremt der findes bundfald, 15 kastes suspensionen bort.

II. Fortynding af kollagenopløsning

Den filtrerede opløsning indeholdende 1 mg kollagen pr. ml opløsning fortyndes med 0,2 vægt%, beregnet på basis af den samlede opløsning, vandig kvægserumalbuminopløsning, hvorved fås 8 µg kollagen pr. ml fortyndet opløsning. 20

III. Lyofilisering af fortyndet kollagenopløsning

1 ml portioner af den fortyndede kollagenopløsning lyofiliseres i 30 timer i passende medicinglas. Efter lyofiliseringen tilkapsles medicinglassene og opbevares ved 4°C. 25

IV. Rekonstituering af lyofiliseret kollagen

Til medicinglasset sættes 1 ml vand, og det henstilles ved stuetemperatur i 10 minutter. Derpå blandes indholdet i 10 sekunder i et hvirvelblendeapparat ved 30 middelhastighed. Den rekonstituerede opløsning bør have en pH-værdi på 3,0-4,5, fortrinsvis 3,8.

35

0

Eksempel 2Fremgangsmåde til fremstilling af pufret, opløseligt kollagenholdigt præparatI. Fremstilling af sur kollagenopløsning

5 Denne opløsning fremstilles analogt med den i eksempel 1, trin I anførte fremgangsmåde.

II. Fremstilling af 0,05 M glycin-HCl-puffer

3,7535 g glycin og 2,0 g kvægserumalbumin opløses i 900 ml destilleret vand. Opløsningen indstilles med 0,1
10 N saltsyre til en pH-værdi på 3,0-4,5, fortrinsvis 3,8, hvorpå opløsningen indstilles på et slutrumfang på 1000 ml med vand. Om nødvendigt genindstilles pH-værdien med yderligere saltsyre.

III. Fortynding af kollagenopløsning

15 Den filtrerede opløsning indeholdende 1,0 mg kollagen pr. ml opløsning fortyndes med glycinpuffer-kvægserumalbuminopløsningen til opnåelse af den ønskede koncentration af kollagen i opløsningen, fortrinsvis 8,ug kollagen pr. ml fortyndet opløsning.

IV. Lyofilisering af fortyndet kollagenopløsning

Lyofiliseringen gennemføres analogt med den i eksempel 1, trin III beskrevne fremgangsmåde.

V. Rekonstituering af lyofiliseret kollagen

25 Rekonstitueringen gennemføres under anvendelse af den i eksempel 1, trin IV beskrevne fremgangsmåde.

Analogt med den i eksempel 1, I, beskrevne fremgangsmåde fremstilles der en sur kollagenopløsning indeholdende 2,5 mg kollagen pr. ml opløsning. Opløsningen lyofiliseres analogt med den i eksempel 1, III, beskrevne fremgangsmåde med 7 vægt%, beregnet på basis af den samlede opløsning, kvægserumalbumin og uden anvendelse af kvægserumalbumin. Kun det lyofiliserede præparat indeholdende kvægserumalbumin kunne genopløses med efterfølgende opnåelse af fuldstændig blodpladeaggregering. Der er
30 imidlertid tale om meget små aggregater, som bevirker små oscillationer i aggregometerkurven, medens en ønsket egen-
35

0 skab ved et kollagenpræparat er dets evne til at danne
store blodpladeaggregater og store aggregometeroscillationer
som vist på tegningen med kollagenfremkaldte
blodpladeaggregeringsprofiler, hvor A repræsenterer en
5 normal blodpladeaggregering med store blodpladeaggregater
og dermed store aggregometeroscillationer, opnået ved et
kvægserumalbuminindhold på under 1 vægt%, beregnet på basis
af opløsningen, som anført i det følgende, og B repræsenterer
10 en normal blodpladeaggregering men med små blodpladeaggregater
og dermed små oscillationer, som opnået ved kvægserumalbuminindhold
på 7 vægt%, beregnet på basis af opløsningen.

Kurven C i figuren viser en aspirinhæmmet blodpladeaggregering
som omtalt i det følgende.

15 Lyofiliserede kollagenholdige præparater, fremstillet analogt
med fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1 og indeholdende 1-5
vægt%, beregnet på basis af den samlede opløsning, kvægserumalbumin,
rekonstitueres med vand eller 0,522 M eddikesyre. Præparaterne som
20 rekonstitueres med vand giver fuldstændig blodpladeaggregering,
men oscillationerne på kurven er små. Dette indicerer, at en
kvægserumalbuminkoncentration så lav som 1 vægt%, beregnet på
den samlede opløsning, stadig har en inhiberende virkning på
blodpladeaggregeringen. Præparaterne rekonstitueret med
25 eddikesyre bevirker ikke blodpladeaggregering, hvilket indicerer,
at eddikesyre bevirker en yderligere hæmning. Foruden tørring af
præparatet bevirker lyofiliseringen heldigvis også en fjernelse
af noget af eddikesyren og ændrer de med vand rekonstituerede
prøvers pH-værdi fra 2 til 4. Dette bevirker et mere aktivt produkt.
30 Formindskelsen af surhedsgraden ved lyofilisering til forskel
fra neutralisering med base forhindrer tillige en forøgelse af
ionstyrken og sikrer derved fuldstændig genopløsning af kollagenet
i vand.

35 Kollagenholdige præparater, der er fremstillet analogt med
fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1, og som in-

0
deholder kvægserumalbumin i koncentrationer fra 0,05 til
1,0 vægtprocent, beregnet på basis af den samlede opløsning,
lyofiliseres. Derefter foretages der forsøg med blodpla-
deaggregering, og resultaterne er anført i tabel I, for-
5 søg A-D. Som nævnt er graden af blodpladeaggregering
direkte knyttet til den procentvise lystransmission.

Det fremgår af tabel I, at aggregeringen ikke på-
virkes væsentligt af en kvægserumalbuminkoncentration op
til 1 vægt%, beregnet på basis af den samlede opløsning.
10 Der opnås imidlertid fuldstændig opløselighed for kolla-
genet med så lidt som 0,2 vægt%, beregnet på basis af den
samlede opløsning, kvægserumalbumin, hvorfor denne koncen-
tration anvendes i de efterfølgende forsøg.

For at bestemme den optimale kollagenmængde, som
15 er nødvendig til blodpladeaggregering, sættes forskelli-
ge mængder opløseligt kollagenholdigt præparat, fremstil-
let analogt med fremgangsmåden beskrevet i eksempel 1, I-IV,
og indeholdende 0,2 vægt%, beregnet på basis af den sam-
lede opløsning, kvægserumalbumin til human blodpladerig
20 plasma. Det konstateres, at 10 μ l, 20 μ l og 50 μ l af en
opløsning, der indeholder 2,5 mg kollagen pr. ml opløsning
tilsat til 1 ml blodplasma, fremkalder fuldstændig aggre-
gering. Der fremstilles derfor mere fortyndede kollagen-
opløsninger, som lyofiliseres og rekonstitueres med vand.
25 Graden af aggregering fremkaldt med 50 μ l af hvert præpa-
rat er ligeledes anført i tabel I, forsøg A-H. Endvidere
fremstilles yderligere fortyndinger af et opløseligt
kollagenholdigt præparat, fremstillet analogt med frem-
gangsmåden beskrevet i eksempel 1, I-IV og indeholdende
30 0,125 mg kollagen pr. ml opløsning med 1 vægtprocent, be-
regnet på basis af den samlede opløsning, kvægserumalbumin,
og de opnåede resultater er ligeledes anført i tabel I,
forsøg H(1)-(7).

0

Tabel I

Kollagen- og kvægserumalbuminkoncentrationens indvirkning på graden af blodpladeaggregering

	Antal mg kolla- gen pr. ml kol- lagenopløsning	Kvægserumalbumin (vægt%, beregnet på basis af kolla- genopløsningen)	Blodpladeaggregering (% transmission)
5	A 0,25	0,05	ingen rekonstituering
	B 0,25	0,10	ingen rekonstituering
	C 0,25	0,20	87
	D 0,25	1,0	84
	E 0,125	0,05	85
10	F 0,125	0,10	77
	G 0,125	0,20	76
	H (1) 0,125	1,0	84
	(2) 0,0625	1,0	82
	(3) 0,0313	1,0	78
	(4) 0,0156	1,0	76
	(5) 0,008	1,0	64
15	(6) 0,005	1,0	17
	(7) 0,004	1,0	21

Der opnås fuldstændig aggregering med præparaterne indeholdende 0,250 mg kollagen/ml opløsning og 0,125 mg kollagen/ml opløsning, forsøg C-D og E-H. Ved afprøvning af de seks seriefortyndinger, forsøg H(2)-(7), af opløsningen med 0,125 mg kollagen/ml opløsning i 1 vægt%, beregnet på basis af opløsningen, kvægserumalbumin for blodpladeaggregeringsaktivitet, viser det sig, at en kollagenkoncentration på 8 µg/ml fremkalder et optimalt, men ikke maksimalt blodpladeaggregeringsniveau. Under disse forsøgsbetingelser er det optimale blodpladeaggregeringsniveau hos normale individer omtrentlig 60% transmission, hvilket tillader påvisning af store afgivelser over og under den normale værdi.

Det konstateres ved stabilitetsforsøg, at det opløselige kollagenholdige præparat ifølge opfindelsen er stabilt i mindst 8 måneder ved stuetemperatur, i op til 2 uger ved 45°C og i mindst 9 måneder ved 4°C. Stabiliteten efter rekonstituering er 3 timer ved stuetemperatur.

0

Det er kendt, at aspirin og visse andre lægemidler inhiberer blodpladeaggregering som illustreret i den tidligere omtalte figur. Derfor gennemføres et forsøg til bestemmelse af, hvorvidt det er muligt med det kollagen-

5 holdige præparat med en koncentration på 8 μ g kollagen/ml opløsning at skelne mellem normal blodpladeaggregering og anormal blodpladeaggregering. Blodpladerigt plasma fås fra tre frivillige forsøgspersoner før og efter indtagelse af aspirin, hvorefter blodpladeaggregeringen afprøves.

10

Det fremgår af de i tabel II anførte data, at præparatet indeholdende opløseligt kollagen er i stand til at påvise in vivo aspirininhibering af blodpladeaggregering i alle prøverne.

15

Tabel II

In vivo virkning af aspirin på blodpladeaggregering

Donor	Transmission i %	
	Inden aspirinindtagelse	Efter aspirinindtagelse
1	62	24
20 2	55	13
3	62	20

25

0

P a t e n t k r a v .

1. Lyofiliseret kollagenholdigt præparat til anvendelse ved bestemmelse af blodpladeaggregering, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder opløseligt kollagen og kvægserumalbumin, og at det ved rekonstitution ved opløsning i vandige medier danner en klar opløsning og da har en koncentration på 5 til 1000 μ g kollagen pr. ml og 0,5 til 70 mg kvægserumalbumin pr. ml og en pH-værdi fra 3,0 til 4,5.
2. Lyofiliseret præparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at koncentrationen af kollagen er ca. 8 μ g pr. ml.
3. Lyofiliseret præparat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at den ønskede pH-værdi er opnået ved hjælp af eddikesyre.
4. Lyofiliseret præparat ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at den rekonstituerede opløsning er pufret med en glycin-puffer.
5. Fremgangsmåde til fremstilling af lyofiliseret kollagenholdigt præparat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at kollagen hydratiseres ved 4^oC i en vandig opløsning af eddikesyre til opnåelse af en kollagenopløsning med en pH-værdi på mellem ca. 3,0 og ca. 4,5, hvorpå det hydratiserede materiale homogeniseres til dannelsen af en ensartet opløsning, idet partikelformigt materiale eventuelt fjernes ved centrifugering af opløsningen ved 2500 G i 15 minutter, og det homogeniserede materiale fortyndes med en vandig opløsning af kvægserumalbumin i en sådan mængde, at der fås en koncentration på fra ca. 5 til ca. 1000 μ g kollagen pr. ml fortyndet opløsning, idet den fortyndede opløsning derefter lyofiliseres.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at der som fortyndingsmiddel anvendes en 0,2%'s vandig kvægserumalbuminopløsning.

35

0

7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g-
n e t ved, at koncentrationen indstilles på 5 til 10 μ g
kollagen pr. ml fortyndet opløsning.

5 · 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g-
n e t ved, at koncentrationen indstilles på 8 μ g kollagen
pr. ml fortyndet opløsning.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g-
n e t ved, at der som syre anvendes 0,522 M eddikesyre.

10 n e t ved, at materialet homogeniseres ved 5-8°C.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g-
n e t ved, at fortyndingen af det filtrerede materiale
udføres med en glycin-kvægserumalbumin-puffer med en
pH-værdi mellem 3,0 og 4,5.

Fremdragne publikationer:

