

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A01N 63/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580034873.3

[43] 公开日 2007年11月14日

[11] 公开号 CN 101072506A

[22] 申请日 2005.8.12

[21] 申请号 200580034873.3

[30] 优先权

[32] 2004.8.12 [33] US [31] 60/600,838

[32] 2004.10.20 [33] US [31] 60/619,930

[32] 2005.6.15 [33] US [31] 11/152,774

[32] 2005.8.5 [33] US [31] 11/197,310

[86] 国际申请 PCT/US2005/028559 2005.8.12

[87] 国际公布 WO2006/020773 英 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.12

[71] 申请人 塞尔菲乐有限公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 大卫·何 仙蒂·S·奥瑟尔

阿兰·S·鲁道夫

凯丝·A·莫斯可维奇 耶石华·帝

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所  
代理人 刘新宇 李茂家

权利要求书 8 页 说明书 123 页 附图 47 页

[54] 发明名称

制备冻干血小板的方法、包括冻干血小板的组合物和使用方法

[57] 摘要

本发明提供了制备冻干血小板的方法，通过这些方法制备的冻干血小板，由这些冻干血小板重构的血小板，将血小板用于治疗、诊断和研究目的的方法，和含有所述冻干血小板的试剂盒。

1. 一种在遭受出血的对象中治疗出血的方法，所述方法包括将含有冻干血小板的组合物给药至对象，其中给药至所述对象的血小板的量足以治疗出血。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中，所述给药包括将冻干血小板或者含冻干血小板组合物直接施用到出血位置。

3. 根据权利要求1所述的方法，其中，该出血来自于高压动脉。

4. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括在将其给药之前再水化该冻干血小板。

5. 根据权利要求1所述的方法，其中，所述给药包括将冻干血小板或者含冻干血小板组合物注射或者输注入该对象的血液系统中。

6. 根据权利要求5所述的方法，其进一步包括在将其给药之前再水化该冻干血小板。

7. 根据权利要求1所述的方法，其中，该方法为治疗急性出血的方法。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中，该出血由于伤口或者外伤。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中，该方法为治疗出血病症的方法。

10. 根据权利要求9所述的方法，其中，该出血病症为血友病。

11. 根据权利要求9所述的方法，其中，该出血病症为用于除出血疾病或者病症之外的疾病或者病症的治疗方案的副作用。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中，该出血病症为抗癌治疗的副作用。

13. 根据权利要求1所述的方法，其中，将血小板或者组合物给药至与出血位置紧密邻接的位置。

14. 根据权利要求1所述的方法，其中，该出血是由于手术而引起出血。

15. 一种治疗患有出血病症的对象的方法，所述方法包括将含有血小板、血小板衍生物或者二者的组合物给药至该对象，其中，在给药时，所述给药在不存在活性出血下进行。

16. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有先天性血友病。

17. 根据权利要求16所述的方法，其中，该对象患有血友病A。

18. 根据权利要求16所述的方法，其中，该对象患有血友病B。

19. 根据权利要求16所述的方法，其中，该对象患有血友病C。

20. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有获得性血友病。

21. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有具有抑制剂的血友病。

22. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有药物诱发的凝血病。

23. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有vWD。

24. 根据权利要求15所述的方法，其中，该对象患有肝或者肾功能障碍或者衰竭。

25. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法抵消了肝素或者低分子量肝素的不利血液凝固作用。

26. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法抵消了牛

胰蛋白酶抑制剂的不利血液凝固作用。

27. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法抵消了因子Xa抑制剂的不利血液凝固作用。

28. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法抵消了获得性因子X缺失的不利血液凝固作用。

29. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法治疗除因子I或者因子II的凝血因子缺失之外的凝血因子的缺失。

30. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法抵消了GPIIb/IIIa拮抗剂治疗的不利血液凝固作用。

31. 根据权利要求15所述的方法，其中，给药在不存在导致出血的新外伤或者创伤下进行。

32. 根据权利要求15所述的方法，其中，该方法是对该对象恢复正常血液凝固性能的预防性方法。

33. 根据权利要求15所述的方法，其中，该组合物含有冻干血小板、血小板衍生物或其二者，或者含有再水化冻干血小板、血小板衍生物或其二者。

34. 根据权利要求15所述的方法，其中，给药包括向该对象递送足量的血小板、血小板衍生物或其二者，从而使血小板数达到约50,000血小板/微升至约500,000血小板/微升。

35. 一种体外组合物，其包括冻干血小板和全血、血浆或者全血或血浆的组分。

36. 根据权利要求35所述的组合物，其包括冻干血小板和新鲜血小板。

37. 根据权利要求35所述的组合物，其中，将该冻干血小板进行重构。

38. 根据权利要求35所述的组合物，其中，该冻干血小板为来自于公众血源的血小板。



39. 根据权利要求35所述的组合物，其中，该冻干血小板来自于正在经受或者预期经受可能影响该患者血液凝固活性的治疗的患者。

40. 一种确定含有血液或者血液组分的样品的血液凝固能力的方法，所述方法包括：

合并冻干血小板与新鲜血液或者血液组分，从而形成混合物；和

评价该混合物的表现一种或者多种血液凝固功能的一种或者多种生物学或者生物化学功能。

41. 根据权利要求40所述的方法，其中，该方法是诊断血液凝固系统疾病或者病症的方法。

42. 根据权利要求40的方法，其中，该冻干血小板得自于在其血液凝固系统中有或者怀疑有缺陷的患者。

43. 根据权利要求40所述的方法，其中，该新鲜血液或者血液组分得自于在其血液凝固系统中有或者怀疑有缺陷的患者。

44. 根据权利要求40所述的方法，其中，该方法是监控血液凝固系统疾病或者病症发展的方法。

45. 根据权利要求44所述的方法，其中该方法包括：

合并时间点为零时从患者获得的冻干血小板和后一时间点从患者中除去的血小板，从而形成混合物，和

确定该混合物的血液凝固能力。

46. 根据权利要求45所述的方法，其进一步包括在第二后来时间点除去第二量的血小板，将它们与冻干血小板合并，和确定该混合物的血液凝固能力。

47. 根据权利要求40所述的方法，其是监控用于患者的治疗方案对该患者血液凝固系统的影响的方法。

48. 一种试剂盒，其含有冻干血小板和影响血液凝固系统的至少一种物质。

49. 根据权利要求48所述的试剂盒，其中，该物质为药物。

50. 根据权利要求49所述的试剂盒，其中，该药物具有抗血小板活性。

51. 根据权利要求50所述的试剂盒，其中，该药物降低了患者血液凝固的能力。

52. 根据权利要求48所述的试剂盒，其中，该冻干血小板为来自于公众血源的血小板。

53. 根据权利要求48所述的试剂盒，其包括多个含有冻干血小板的容器。

54. 根据权利要求48所述的试剂盒，其包括多个含有两种或者更多种不同物质的容器。

55. 一种制备冻干血小板的方法，所述方法包括：

提供血小板，

将该血小板悬浮在含有至少一种糖的盐缓冲液中，从而形成第一组合物，

在冻结以上温度下将所述第一组合物培养至少足够的时间，以使至少一种糖与该血小板接触，

加入冷冻保护剂，从而制成第二组合物，

其中在将冷冻保护剂加入之前，对第一组合物不进行离心或者其它分离方法，和

冷冻干燥第二组合物，从而制成冻干血小板。

56. 根据权利要求55所述的方法，其进一步包括在高于50℃的温度下加热该冻干血小板至少10小时。

57. 根据权利要求55所述的方法，其进一步包括在高于75℃的温度下加热该冻干血小板至少18小时。

58. 根据权利要求55所述的方法，其进一步包括在80℃下加热该冻干血小板24小时。

59. 根据权利要求55所述的方法，其进一步包括将乙醇加入到该第二组合物或者该第一组合物和该第二组合物二者中。

60. 根据权利要求59所述的方法，其中，以1%(v/v)的量将乙醇加入到该第一组合物中，且乙醇以0.8%的量存在于该第二组合物中。

61. 根据权利要求55所述的方法，其中，该冷冻保护剂为人血清白蛋白或者Ficoll 400。

62. 根据权利要求55所述的方法，其中，该冷冻保护剂为Ficoll 400。

63. 一种制备冻干血小板的方法，所述方法包括：

提供血小板，

将该血小板悬浮在含有100mM海藻糖和1%(v/v)乙醇的盐缓冲液中，从而制成第一组合物，

在37℃下将该第一组合物培养2小时，

加入Ficoll 400至最终浓度为6%(w/v)，从而形成第二组合物，

冷冻干燥该第二组合物，从而制成冻干血小板，和

在80℃下加热该冻干血小板24小时。

64. 通过以下方法制成的冻干血小板，该方法包括：

提供血小板，

将该血小板悬浮在含有至少一种糖的盐缓冲液中，从而制成第一组合物，

在冻结以上温度下，将该第一组合物培养至少足够的时间，以使至少一种糖与血小板接触，

加入冷冻保护剂，从而制成第二组合物，

其中在将冷冻保护剂加入之前，对该第一组合物不进行离心或者其它分离方法，和

冷冻干燥该第二组合物，从而制成冻干血小板。

65. 根据权利要求64所述的冻干血小板，其中，该血小板在室温下稳定至少六个月。

66. 再水化冻干血小板，其尺寸和粒度基本上等同于新鲜血小板。

67. 根据权利要求66所述的再水化血小板，其中，该血小板存在于进一步包括Ficoll 400的组合物中。

68. 根据权利要求66所述的再水化血小板，其中，该血小板没有得到活化。

69. 一种包括冻干血小板的试剂盒，其中，所述血小板通过以下方法生产，该方法包括：

提供血小板，

将该血小板悬浮在含有至少一种糖的盐缓冲液中，从而制成第一组合物，

在冻结以上温度下将该第一组合物培养至少足够的时间，以使至少一种糖与血小板接触，

加入冷冻保护剂，从而制成第二组合物，

其中在将该冷冻保护剂加入之前，对该第一组合物不进行离心或者其它分离方法，和

冷冻干燥该第二组合物，从而制成冻干血小板。

70. 根据权利要求69所述的试剂盒，其中，该试剂盒包括多于一个含有该冻干血小板的容器。

71. 根据权利要求69所述的试剂盒，其中，该试剂盒是含有与一升或者一品脱血液中的血小板量等量的冻干血小板的容器。

72. 根据权利要求69所述的试剂盒，其中，该试剂盒含有人类冻干血小板。

73. 根据权利要求69所述的试剂盒，其中，该试剂盒包括一个或者多个容器，各自含有 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个血小板。

74. 根据权利要求69所述的试剂盒，其中，该试剂盒包括一个或者多个用于局部接触伤口的含有血小板的绷带，其中，该绷带包含 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个血小板/ $\text{cm}^3$ 的意欲与伤口接触的绷带部分的表面区域。

## 制备冻干血小板的方法、包括冻干血小板的组合物和使用方法

### 对相关申请的交叉引用

本申请基于以下专利申请的公开并且要求享有以下专利申请的申请日的权益，它们的全部内容在此引入作为参考：提交于2004年8月12日的美国临时专利申请号60/600,838；提交于2004年10月20日的美国临时专利申请号60/619,930；提交于2005年6月15日的美国专利申请号11/152,774；和提交于2005年8月5日的美国专利申请号11/197,310。

### 技术领域

本发明涉及血液和血液制品领域。更具体而言，本发明涉及血小板和血小板组合物，特别是可用于治疗、诊断和研究目的的含有冻干血小板或者再水化冻干血小板的那些。

### 背景技术

血液是多种组分的复杂混合物。通常，可以将血液描述为包括四种主要成分：红血球、白血球、血小板和血浆。前三种是细胞或者细胞样组分，而第四种(血浆)是含有盐、蛋白质和其它许多身体功能必需要素的宽泛和可变混合物的液体组分。通过离心，可以将血液的组分彼此分离。一般，离心将导致大体积/质量的浓稠红血球迁移到离心管的底部。在红血球之上，可以发现相对较稀薄的白血球和血小板层，由于其带有白灰色，因此该层通称为“血沉棕黄层(buffy coat)”。在血沉棕黄层之上为液体血浆部分。

红血球，通常还称为红细胞，负责将氧气从肺运载到细胞以供细胞代谢过程中使用，和将废物二氧化碳从细胞运载到肺

中而得以排出。红血球不具有细胞核，因此它是在健康个体中不断得到更换的短寿血液细胞组分。由红血球构成的血液体积的百分比称为血细胞比容，该数字通常用于表明存在一种或者多种血液系统的或影响血液系统的疾病或者病症。对于女性，正常的血细胞比容值为37%~47%，对于男性，该值为40%~54%。通常将红血球输血给需要它们的患者，比如患有慢性贫血的那些或者遭受损伤或外伤或者进行手术，从而导致血液损失的患者。此外，通常将红血球用于治疗由多种疾病或者病症所引起的贫血。

白血球，通常还称为白细胞，是负责防止身体受到异物伤害的有核细胞。通常白血球起抗衡病原生物比如细菌、真菌和病毒或者可能对身体有害的物质比如蛋白毒素的功能。然而，在某些个体中，白血球对显然无害的物质比如花粉设置保护反应，从而导致过敏性反应。实际上，在一些情形中，白血球对身体自身的细胞或者蛋白质会不适当地反应，从而导致自身免疫疾病和破坏身体组织，这在某些环境中可以是致命的。其中，经纯化的白血球在治疗对抗生素疗法无响应的患者中已得到使用。

血小板，通常还称为凝血细胞，是小的、不规则成形的源于巨核细胞的血液组分，它们在骨髓中形成并且涉及凝固过程，由此有助于防止身体由于不仅受到外伤或者伤害而且同样由于正常生理活动而产生过度出血。实际上，血小板在正常止血中是至关重要的，它提供了防止血液流出受损伤的血管的第一道防线。血小板通常通过粘附在血管内壁和与存在于血浆中或者由血液的其它细胞组分释放的凝固系统的组分相互作用而发挥其功能。经纯化的血小板在治疗患有异常血小板功能(血小板功能不全)和低血小板数(血小板减少)的患者中已得到使用。浓缩

血小板通常用于在受伤之后或者获得性血小板功能缺失(例如,在绕道手术(bypass surgery)期间产生的那些)期间控制出血。正常流通的血小板数为,每微升( $\mu\text{l}$ )血液150,000~450,000个血小板。

当突然发生伤口流血时,血小板就聚集在伤口处并且通过形成凝块力图阻断血液流动。存在两种一般的凝块形成机制。在一种机制中,当血液暴露于空气中时凝块开始形成。血小板感受空气的存在并且与血纤蛋白原反应,从而开始形成纤维蛋白。所得纤维蛋白形成将血细胞俘获在其中的网状网络。在另一种一般的机制中,受伤害的血管释放出提高受伤区域中血小板粘性的化学信号。该粘性血小板粘附在受伤害区域并且逐渐形成血小板堵塞。同时,血小板释放出一系列促使血液中其它因子增强血小板堵塞的化学信号。在血小板和其加强之间,形成坚固的凝块,当受伤害区域愈合时其起贴片的作用。

为血小板凝胶形式的血小板已经被广泛用于促进伤口愈合中,并且结合自体纤维蛋白胶原,已经表明自体血小板凝胶可以改善手术期间的止血和降低替换上行主动脉手术中的输血需求(Christenson和Kalangos, 2004)。Costasis Surgical Hemostat (Costatis®)。已经表明,牛凝血酶、牛胶原和作为血纤蛋白原和血小板源的血浆的组合物在兔肾和脾脏的体内出血模型中作用良好(Prior等人, 1999)。然而,其它研究表明,当单独使用时,血小板凝胶不是一种有效的止血剂(Wajon等人, 2001)。尽管存在关于血小板和它们作为止血剂作用的相互矛盾的发现,但是,几乎无疑的是血小板微粒的前凝血性质(pro-coagulant nature); 它们的主要组分,通常被忽视,逐渐被认为是体外和体内凝固过程中的活性参与者(Nieuwland等人, 1997)。当血小板受到生理激动剂比如凝血酶和胶原的组合物刺激时,它们释



放出大量的微粒(Sims等人, 1988; Tans等人, 1991)。经活化的血小板和微粒表达氨基磷脂, 这就提供了促凝血表面(procoagulant surface)以支持活化凝固酶以内源性、外源性或者通常途径形成(Rosing等人, 1985)。

与经活化的血小板相比, 微粒含有对于活化因子IX(IXa)(Hoffman等人, 1992)和因子Va(Sims等人, 1988)高密度的高亲合性结合位点。它们具有对于因子VIII的高亲合性结合位点的连续表达(Gilbert等人, 1991)并且支持因子Xa活性(Gilbert等人, 1991; Holme等人, 1995)和凝血酶原酶活性(Sims等人, 1989)。

除了血小板微粒是止血响应中重要组分的事实之外, 以血小板凝胶形式的血小板同样已被用于外科伤口愈合应用中以及治疗难以愈合的伤口(Mazzucco等人, 2004)。此外, 以富含血浆的血小板形式的血小板的应用已经扩展到了新的应用中, 比如生物组织工程或者自体 and 同种异体组织移植以及骨质骨骼整合(osseous bone integration)和软组织再生(Oikarinen等人, 2003)。这是因为血小板在它们有助于止血和伤口愈合过程的 $\alpha$ 粒子中含有许多重要的生长因子。研究已经发现在其它因子中生长因子比如血小板源伤口愈合因子(PDWHF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)和胰岛素生长因子(IGF)在伤口愈合级联的不同阶段是尤其重要的, 并且会极大地影响促有丝分裂和细胞分化活性(Pierce等人, 1989; Steed, 1997)。

这些发现引起了生长因子替换策略的发展。例如, 将Regranex®, 在载体凝胶中的重组人类PDGF, 用于治疗糖尿病性创伤, 然而比如TGF的其它因子, 当前正为获得FDA批准进行试验。尽管如此, 用于伤口的单一生长因子还是不如多重生长因子有效。这并不奇怪, 因为伤口愈合是一种复杂的级联整

合，在该过程中的不同阶段，对于不同的刺激和抑制功能需要多种生长因子。

血液的液体部分，通常称为血浆，是含有多种蛋白质和盐的复杂溶液。一般而言，血浆是将红血球、白血球和血小板从血液中除去时的剩余物质。由于多种蛋白质以高浓度存在，因此血浆是一种在室温下不稳定的淡黄色液体(即，必须将血浆在低于室温下良好地贮存，从而防止其中存在的蛋白质丧失活性)。血浆的主要蛋白成分为：白蛋白、血纤蛋白原、抗体以及多种凝固和止血必需的蛋白质。从此血浆蛋白的简明列举中可以看出，从保持满意血压和提供容积到提供对于血液凝固和免疫至关重要的蛋白质，血浆提供多种功能。例如，从血浆中分离的 $\gamma$ 球蛋白可以用于治疗需要抗毒素的患者，并且可以分析某些抗体的存在，从而表明患者是否感染了某些病毒或者细菌。此外，可以从血浆中分离的凝血因子VIII，通常用于治疗典型的先天性血友病。

血液的主要功能是运送氧气和二氧化碳以及使得免疫系统组分能够迅速和有效地到达身体所有部分，从而排斥入侵的微生物。然而，因为血液是流体并且需要不仅保持在体内，而且需要限于身体的特定区域(比如血管或者循环系统的其它部分)，因此血液的重要功能是监控其自身在体内的分布，和修补使得血液漏出身体或者应当保持它的体内特定区域的损伤。所述监控和保持血液分布在其正常界限内的过程是一种生理学过程的平衡，该生理学过程一方面防止血管损伤之后大量出血(通过形成凝块)，同时另一方面，通过使血液保持在非凝聚(即，未凝固)的流体状态来保持正常的血液循环。这些表面上的竞争过程是具有许多控制点和反馈回路的复杂系统的一部分。

保持适当血液流动和封闭的主要过程称为止血，这是形成

和最终降解血块以及修复受伤害组织的过程。止血由四个主要事件组成：血管收缩；在创伤位置聚集血小板、通过血纤蛋白原进行介导和通过凝血酶活化血小板；通过血小板和许多凝固因子的复杂相互作用形成凝块(也称为血栓或者纤维蛋白网络)；和最后降解凝块和修复受伤害组织。

血液凝固是一个复杂的过程：如果凝块的形成未得到抑制，那么血管将被阻断；如果凝块不坚固，那么将产生过度出血。因此，为了进行正常止血，必须保持精确的平衡。在正常止血失衡的情形中，凝块形成可能受到损害。这样的反常可以由于摄取阿斯匹林产生或者由免疫功能障碍引起。该反常还可以是先天性的，比如通过遗传性疾病和凝血因子缺陷引起。例如，已经对导致出血病症的止血过程缺陷进行了鉴定，大多数这样的缺陷都在凝固所需要的活化级联中所涉及的酶中、在血小板活化和功能中或者在接触激活作用中。这样的病症包括vWD和血友病。其它血液凝固系统疾病或者病症是其它疾病或者病症的治疗结果(即，副作用)。此类疾病和病症的治疗一般涉及降低引起副作用的药物的剂量或者中止使用该药物的治疗。

血液凝固依赖于通过多种反馈环和控制点进行密切控制的酶活化的复杂级联。当血小板粘结在受伤害血管的伤口壁上或者其它受伤位置上时，凝固开始。在这种情况下，血小板粘附于在创伤位置处的细胞上存在的胶原上，从而进行通过熟知为von Willebrand因子(vWF)的凝血因子介导的过程。vWF是在巨核细胞和内皮细胞中产生并且贮存在血小板或者某些结缔组织中的复杂蛋白质。通常发现它与因子VIII配合，并且已知它是稳定血浆中因子VIII所必需的。vWF数量和功能上的缺陷在本质上一一般是遗传性的，并且导致熟知为血管性血友病(vWD)的疾病。

血小板对伤害位置的粘附通过vWf结合内皮下膜中胶原介导。作为可溶性蛋白质存在于血浆中的血纤蛋白原可以在称为集结或者粘合的过程中将活化血小板桥接在一起。通过凝血酶(其通过活化因子X得到活化(因子Xa)),血纤蛋白原被转化成不溶性的纤维蛋白束,所述凝血酶还是一种有效的血小板活化剂。自发聚合成丝的纤维蛋白与血小板上的表面蛋白或者磷脂结合,从而将血小板诱捕在网格中。然后,通过因子XIIIa的活性,纤维蛋白丝状体进行交联,所述因子XIIIa由因子XIII通过凝血酶形成。形成的纤维蛋白-血小板网格被称为纤维蛋白网格、血栓或者凝块。

因子X可以通过称为外源性和内源性途径的两种途径中的任何一种途径得到活化。所述内源性途径涉及一系列活化多种蛋白酶的酶促反应。该过程始于将因子XII结合至据推测由内皮下膜的组分提供的带负电荷的表面,以及在通过高分子量激肽原(HMWK)介导的反应中通过激肽释放酶将因子XII活化成因子XIIa。然后,因子XIIa将因子XI转化为因子XIa(血浆凝血激酶前质)。在钙离子存在下,因子XIa将因子IX转化成其活化形式,因子IXa。因子IXa与非酶蛋白因子VIII(抗血友病球蛋白或者AHG)结合,并且在钙离子和细胞来源的磷脂存在下,活化循环因子X,从而形成因子Xa。

在广泛认为是开始凝血的主要生理学途径的外源性途径中,因子VII的活化形式因子VIIa与通常称为组织因子(TF)的因子III(组织促凝血酶原激酶)结合在一起。在钙离子存在下,因子VIIa/TF配合物活化循环因子X,从而形成因子Xa。因子Xa还可以从通过因子IX和XI的因子VII的作用而形成。在此方案中,因子IX和X可以通过联合TF和因子VIIa的活性得到活化。因子VIIa/TF配合物被认为是凝块级联的最有效引发剂。如上所

述，在钙、血小板表面上的磷脂和因子VIIIa存在下，因子IXa将因子X活化为因子Xa，随后该因子将凝血酶原转化为凝血酶。凝血酶将可溶性血纤蛋白原转化为不溶性血纤维蛋白纤维，从而形成网格。

由此，因子X通过内源性或者外源性活化途径得到了活化。因子Xa，与活化因子V并且在钙离子以及存在于血小板表面上的磷脂存在下，将凝血酶原活化成凝血酶，其由血纤蛋白原形成纤维蛋白，导致凝块形成。血液的凝结是涉及许多组分相互作用的复杂过程，包括血纤蛋白原、凝血酶、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI和因子XII。这些组分中的一种组分缺失将必定导致血液病的临床表现，这对于一些患者可能会是致命的。

已经对导致出血病症的止血过程缺陷进行了鉴定，大多数上述缺陷都在于凝固所需要的活化级联中所涉及的酶、在于血小板活化和功能或者在于接触激活作用。这些病症包括vWD和血友病。对于这两种疾病进行的各种治疗都是已知的，其中大多数依赖于提供一种或者多种上述凝血因子。

先天性血友病被分类为三种不同的组：典型性血友病或者血友病A(FVIII缺失)；克里斯马斯病或者血友病B(FIX缺失)；和血友病C(FXI缺失)。血友病被认为是其中流血没有在正常时间内得到终止的病症。即，血友病患者不会出血更多或者更快，而是他们出血更长的一段时间。大约有20,000美国人患有血友病。其中大多数情形为血友病A或者血友病B，其中血友病A占全部血友病案例的约80%。血友病C是稀少的，大约100,000个美国人中发生一例。

血友病A是源于因子VIII缺失的X-相联系病症，定义为不存在凝血因子VIII或者凝血因子VIII低于正常水平。血友病A产生

于关于因子VIII基因的多种突变。当前，血友病A的治疗涉及输注因子VIII浓缩物或者由人血浆或者通过重组DNA技术制备的因子VIII和vWF配合物的浓缩物。与血友病A相比，血友病B源于因子IX的缺失。当前，血友病B的治疗涉及输注源于血浆的或者重组因子IX浓缩物。最后，血友病C源于因子XI的缺失。

由于持续关心公众血液供给的安全性和出现可以通过血液和血液制品传播的疾病，因此因子VIII的选择源已经成为重组形成形式。重组因子IX已经批准用于人类应用(Benefix®，Genetics Institute)，并且其将可能成为选择源。此外，已经建议将基因疗法作为血友病的治疗或者治愈方法。然而，迄今为止，用于治疗血友病患者的转基因方法并没有导致长期稳定的凝血因子表达，已经遭遇到了非预期的致死率问题，并且仍然会导致受体中产生抑制剂(如下所述)。

使用因子VIII浓缩物进行的血友病的治疗分别引起大约15%~约30%的血友病A患者和大约3%的血友病B患者产生了抗引入因子VIII或者IX的抗体。虽然重组因子VIII看起来仅仅在约5%的患有血友病A的患者中引起了上述响应，但是，这仍然是在该病症治疗中的一个显著问题。该过程和产生的病症被称为“具有抑制剂的血友病”，通常将其描述为对通常用于治疗缺乏凝血因子的输注蛋白质的抗体感应。与此相反，获得性血友病是含有正常水平凝血蛋白的人中抑制剂的升高。由此，获得性血友病是一种拟-自身免疫病(pseudo-autoimmune disease)，并且可以发生在用含有涉及凝固的因子的产品治疗的其它正常的非血友病个体中。通常，产生的抗体与给予的因子VIII反应，并且导致因子VIII的活性受到抑制，由此使得在缺少内源性因子VIII的患者中进行治疗无效，并且会不利地使得对原来具有低、但是不充分水平或者活性的内源性因子VIII的患者的治

疗有害。

许多防止获得性血友病和具有抑制剂的血友病的方法已经提出和实现。例如，并不利用外源性因子VIII进行治疗，另一种治疗血友病A的策略是给药外源性因子VIIa，由此除去为止血对因子VIII的需求。同样，用过量因子VIII和用抗-独特型抗-因子VIII抗体进行的治疗已经得到了试验。其它方法包括使用FEIBA分流试剂(bypassing agents)、凝血酶原复合物浓缩物、重组因子VIIa、猪因子VIII、输注高剂量静脉内免疫球蛋白、免疫耐受性疗法(ITT)和利用或者不利用A蛋白吸附血浆除去法从而除去抑制抗体。

此外，用经纯化的重组因子VIIa进行的治疗已经变得普遍。例如，已经发现，因子VIIa $10 \sim 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，并且甚至高达 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量，该剂量范围可以提供因子VIIa的循环水平为约 $0.2 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 血液，在一些具有抑制剂的血友病A患者中是安全和有效的。同因子VIIa的正常测定浓度约 $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 血液相比，这些剂量是非常高的。虽然这些方法看来是成功的，但是当前这些方法没有一个是完全有效的，并且所有方法都相当昂贵。此外，至少5-10%的接受重组FVIIa疗法的患者不能达到止血。

此外，III型或者严重的血管性血友病通常临床上表现为血友病A。因子VIII通常通过vWf运送和保护其免受血浆蛋白酶。在缺少循环vWf时，内源性因子VIII被迅速降解和从循环中清除，从而产生血友病A的症状。对于vWD的治疗根据疾病的本质和严重程度而变化。所述治疗包括或者通过注射或者通过鼻部通道进行的DDAVP疗法。DDAVP疗法通过将内皮细胞vWf释放入流通中而起作用。治疗还包括血浆冷沉淀物，该冷沉淀物提供vWf和其它凝固因子的浓缩物形式。

血友病的常规治疗一般仅仅在出血症状得到确认之后才进

行。最近，治疗方案已经得到了发展，其中不论当时的出血状况如何，都进行定期预防性地输注失去的凝固因子。该方法将因子水平保持在足够高的水平使得出血、连接破坏和危及生命的出血最小化，并且差不多完全避免。虽然卓有成效，但是该治疗方案相当昂贵。

血小板功能是血块中另一至关重要的组分。异常的血小板会引起异常出血，比如出血或者血栓形成。由此，血小板功能测定是血液相关疾病的诊断和监控中不可分割的部分。例如，仅举几个例子，获得性血小板缺陷，比如阿斯匹林注射、心脏病、肾病或者先天性血小板缺陷如伯-苏氏(Bernard-Soulier)综合征、格兰茨曼氏(Glanzmann's)血小板机能不全和血小板颗粒缺乏症(storage pool disease)都会影响血小板的正常止血功能。为了评价血小板功能，在非常少时，利用周围血液涂片进行的全血细胞计数将提供一些基本信息。其它测试，如出血时间，对全血或者富含血小板血浆进行的使用血小板凝集计评价血小板对血小板激动剂的聚集的血小板功能试验将区分出缺陷。然而，上述分析虽然准确，但是其灵敏度不高，并且不能检测在病症早期正常凝固功能的微小波动。同样地，血液凝固级联失败的精确点的测定会需要使用新近抽血进行多种测定。

虽然已知血小板涉及凝固过程并且它们是至少一种凝血因子的来源，但是，迄今为止，对于获得性或者先天性血友病的治疗或者患有出血病症的具有正常血小板数和血小板功能的患者的治疗，并没有公开使用保持、活化、固定、冻结或者冻干血小板或者这些的任意组合。Kirby & Gregoriadis(1984)制备的含有因子VIII的脂质体试图口服治疗血友病。后来，Giles等人(1988)公开了因子Xa和不含因子VIII的卵磷脂-磷脂酰丝氨酸泡的体内联用，Hong & Giles(1992)证明，输注因子Xa和卵磷脂-



磷脂酰丝氨酸泡的组合之后，患有血友病A(因子VIII缺失)的狗的止血阻塞正常化。最近，Yarovoi等人(2003)，使用转基因方法，证明在血小板中异常表达的因子VIII在鼠模型中进行的血友病A治疗中显示出了效果。此外，Hrachovinova等人(2003)表明，P-选择蛋白和PSGL1的相互作用产生了在血友病A鼠模型中矫正止血的源于白细胞的微粒。然而，这些研究人员都没有使用或者提出使用正常的血小板或者血小板衍生物治疗血友病。

血液凝固疾病或者病症的检测一般都涉及分析患者血液，从而得到血小板数、多种涉及血液凝固的标示物和凝固形成能力。将测定活化凝结时间(ACT)、凝血酶原时间(PT)、血浆凝血酶时间(PTT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)的凝血测定用于评价内源性和外源性途径。这些测定通常在实验室中进行，并且所述分析通常需要从患者抽取多个血液样本。此外，这些测定可能是不可靠的，因为它们是其结果基于体外凝固形成时间的终点试验。另一种局限性涉及必须加入外源性试剂如高岭土、凝血酶、钙等等的事实，因此所得结果基于人为系统，并不必然反映患者的血栓形成可能性。

如上所述，血液凝固系统的关键功能是停止受伤害组织如通过伤口、手术或者其它外伤受到损伤的组织的血液损失。然而，有时伤口或者外伤非常大，使得受伤者的血液系统不能迅速和有效地停止全部出血。此外，虽然凝固功能在大部分人中令人满意地提供，但是在一些人中，凝固系统受到了削弱，从而使得充分凝固不能提供和不广泛，由于创伤或者外伤，有时会发生致死性的出血。因此，通常会存在个体需要另外的血小板以提供凝固功能的情形，所述个体失去凝固功能或者凝固功能不充分。

除了它们的如上应用以向需要的个体提供血液凝固功能之

外，在实验室中还对血小板进行广泛的研究，以表征它们的性能和理解它们在血液凝固级联中的准确作用。对血小板的研究提供了关于由血小板提供的凝血因子、与血小板相互作用从而促进凝固和伤口愈合的因子和活化血小板或者否则将血小板引诱并且将它们保持在受伤害位置的必需因子的信息。

血小板的治疗学和研究应用都需要血小板以生物学活性的形式获得。当前，用于治疗学应用(例如，用于伤口愈合的输注)的血小板一般作为新近分离的产品而提供，时间一般短于五天。正如马上所意识到的，为了由需要的患者进行应用，保持新鲜血小板的充分供应源是昂贵的并且由于在使用之前过期，会导致供应源受到大量损失。此外，因为新鲜血小板在治疗学应用中非常重要，因此获得用于研究目的的那些血小板非常困难和昂贵。因此，在本领域中需要用于治疗和研究的新鲜血小板替代物。

Livesey等人的美国专利No. 5,622,867公开了用于存储的低温保护血小板系统。该系统用含有第二信使效应物的抑制剂系统处理新鲜血小板。将一种或者多种以下途径的抑制剂加入：cAMP、钠通道、cGMP、环氧化酶、脂氧合酶、磷脂酶、钙、蛋白酶和蛋白酶以及膜修饰(membrane modification)。还将冷冻保护剂如DMSO、麦芽糖糊精、葡聚糖、羟乙基淀粉和葡萄糖加入，其中将血小板保持在低温下。在使用之前，对血小板进行洗涤，从而除去抑制剂和冷冻保护剂。

Iijima等人的美国专利No. 5,656,498公开了冻干血小板和它们的制备方法。该方法包括用含有糖、生物聚合物、酸或者酸式盐的溶液预处理血浆中的血小板，对经处理的血浆进行粒化，迅速冷却颗粒和冻干颗粒。

Spargo等人的美国专利No. 5,736,313公开了冻干血小板和

制备它们的方法。制备冻干血小板的方法包括，在磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液或者磷酸盐-磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中预培养血小板，所述两种缓冲液中都含有碳水化合物(例如，葡萄糖)。在预培养之后，用碳水化合物负载血小板，然后将其悬浮在含有基质-形成聚合物和碳水化合物的冷冻干燥缓冲液中。然后，将血小板缓慢冷却至约-50℃，同时将压力降低至真空状态。

Goodrish等人的美国专利No. 5,958,670和美国专利No. 5,800,978也都公开了冻干血小板和制备它们的方法。这些专利中公开的发明依赖于使用玻璃化转变温度为约-60℃以上的组合物。所述组合物通常包括可渗透血小板的组分(例如，碳水化合物，如蔗糖)和不能渗透血小板的组分(例如，明胶，PEG)。为了产生冻干血小板，将组合物的温度降低至低于组合物玻璃态转化温度的点，和从组合物中真空蒸发或者升华液体。同样是Goodrish等人的在先专利，美国专利No. 5,213,814公开了稳定化的血小板和制备它们的方法。所述方法和血小板适用于在约4℃下长期贮存血小板。所述方法通常包括将血小板浸入含有碳水化合物和生物学上相容的聚合物或者聚合物混合物的缓冲水溶液中，然后冷冻所述溶液和干燥所得冻结溶液，从而生产含有低于10重量%湿气的冻干血小板。

Braun的美国专利No. 6,127,111和美国专利No. 6,372,423公开了冻干血小板和制备它们的方法。所述制备冻干血小板的方法包括，在室温下，将血小板暴露于凝血抑制剂(例如，EDTA或者柠檬酸盐)和“饼成型剂”(例如，蛋白质如血清白蛋白的或者多糖如甘露醇)约5~60分钟，然后将其冻干，从而将其湿度降低至低于10%。

加州大学的研究者Davis已开发出制备冻干血小板的方法。该方法包括在冻干之前用海藻糖负载血小板。在美国专利No.

6,723,497中公开了制备冻干血小板的方法，其中通过用高达50mM的海藻糖在约25~低于约40℃的温度下培养血小板，用海藻糖负载血小板，将负载的血小板冷却至低于-32℃，和冷冻干燥冷却的血小板。公开的美国专利申请2005/0048460公开了一种制备冻干血小板的方法，其包括将血小板暴露于碳水化合物(例如，海藻糖)和两亲试剂(例如，熊果苷)，和冻干血小板。参见，例如美国专利No. 6,770,478、美国专利No. 6,723,497、5,827,741和美国公开专利申请号2005/0048460、2004/0152964、2004/0147024和2004/0136974。

Stienstra的美国专利No.6,833,236公开了生产稳定的血小板的方法和通过该方法制备的血小板。该方法包括将血小板例如通过将它们暴露于压力下而预活化，从而诱发微泡形成，将预活化的血小板与碳水化合物接触，从而将碳水化合物引入血小板中，和干燥负载的血小板。

虽然血液制品和伤口愈合在前几年已取得许多进展，但是仍然需要用于处理伤口如，通过止血或者伤口凝固的改良组合物。因此，需要制备用于处理伤口的组合物的改良方法。同样地，需要快速、有效并且适用于多种应用的处理伤口以抑制出血的方法。此外，仍然需要改良的用于出血疾病和病症的诊断测定法。

## 发明内容

通过提供血小板、血小板微粒和含有血小板和/或血小板微粒的组合物，本发明满足了本领域需求。所述血小板、微粒和/或组合物可以用于多种目的，包括但不限于用作止血剂、用于在涉及出血的伤口位置形成凝块以及用于促进组织再生和愈合。它们还可以用于治疗血友病，包括血友病A、血友病B、血

友病C和具有抑制剂的获得性血友病。还提供了用于预防性预防或者治疗与抗凝血疗法或者导致抑制凝固级联的其它疗法或环境影响相关的活性大量出血的组合物和方法。本发明还通过提供可以用作检测血液凝固病症的诊断学的组合物和方法，满足了本领域需求。因此，本发明提供了制备诊断用组合物和将它们用于诊断出血病症的方法中的方法。本发明进一步通过提供制备冻干血小板、冻干微粒的方法，重构或者再水化冻干血小板的方法和重构血小板，满足了本领域需求。本发明的这些方法提供了在室温或者更低温度下长期稳定的冻干血小板。它们也提供冻干血小板，通过重构，所述血小板在血液凝固过程中作用良好，并且由此可以将它们成功用于治疗学应用中，如用于伤口愈合和治疗出血疾病和病症。提供含有所述血小板、微粒和/或组合物的试剂盒。

在实施方案中，本发明将血小板和多种血小板和/或微粒制剂用作活性剂，从而如对血友病患者提供常规或者假常规止血性能，和对血友病患者以及其它受到导致出血的外伤的患者提供止血剂性能。本发明进一步提供用于治疗药物诱发凝血病和在冻干血小板衍生物存在下用于促进促凝血药物效果的冻干(冷冻干燥)海藻糖稳定的血小板衍生物。所述血小板、微粒和/或组合物的应用的其它非限制性实例包括在诊断分析中的应用和在对血小板功能和血液凝固研究中的应用。所述血小板、微粒和/或组合物可以按照本文提供的方法生产。因此，本发明提供了制备止血剂的方法和使用所述止血剂，例如用于治疗创伤和出血的方法。

出乎意料地发现，所述血小板或者血小板制剂，如冻干血小板，可以提供常规或者几乎常规的凝固性能，并且由此可以提供止血性能。已经发现，它们适用于向外伤性损伤位置和向

血友病患者的血液提供这些功能。因此，它们可以预防性地用于治疗血友病，不论该血友病是血友病A、血友病B、血友病C或者获得性血友病。它们同样可以对进行抗凝血疗法的血液提供增强的凝固性能。当涉及出血疾病和病症时，上述发现至少部分是意想不到的，因为可以用本发明的血小板组合物治疗的疾病和病症一般不存在低血小板的临床症状。也就是说，例如，血友病患者中的血小板数一般是正常的，并且由此通常期望提供血小板一般提供的所有必需组分。据信，本发明的血小板提供因子VIII或者因子IX、或者一种或者多种在涉及因子VIII或者因子IX的步骤之前发生的凝固级联步骤中涉及的主要组分，并且由此克服血友病中的这些物质的缺失。同样地，通过提供凝血级联中的至少一种这些患者缺少组分的下游组分，本发明组合物克服了在抗凝血疗法患者和其它表现出延迟或者缺乏凝固的对象中观察到的缺失。因为将本发明的血小板可以保持在体内相当长的时期(例如，同小分子药物相比)，因此治疗可以在疗程中获得，并且不必在受伤时进行治疗，不过根据本发明的治疗并不排斥这种“按需”治疗。

在第一方面，本发明提供血小板和含有血小板的组合物。所述血小板和组合物一般含有冻干血小板或者再水化冻干血小板。通常，所述组合物还包括血小板微粒。所述血小板、微粒和组合物可以利用本发明方法进行制备。本发明的冻干血小板是非常稳定的，其贮存期限至少为六个月。所述冻干血小板和由它们得到的再水化血小板保持大多数，即便不是全部，当被引入到需要血小板功能的个体、患者或者目标(在此全部可互换使用)时所需的血小板血液凝固功能的特性。由此，本发明冻干血小板可以用于体内治疗学目的和体外诊断或者研究。不论是冻干还是重构的血小板都可以用于多种目的，包括但不限于，

用作治疗患者出血的可注射或者可注入物质，用作可以从体外进行的直接出血的治疗。它们同样可以用于诊断目的如用于诊断血液凝固系统病症或者用于体外试验如用于血液凝固过程的研究。它们同样可以用于监控患者血液凝固系统在一段时期内的血液凝固能力，如，例如在对血液凝固系统或者患者体内其它系统或者组织的疾病或者病症进行治疗的疗程期间。所述冻干血小板或者由它们制备的再水化血小板可以具有足以提供凝固功能的新鲜获得或者有效期内的血小板的性能，和促进伤口愈合。所述血小板可以存在于任何适宜的组合物内，并且可以以任何浓度存在。在多种实施方案中，它们作为从血液浓缩的血小板或者作为已冻干和任选重构的从血液浓缩的血小板而提供。所述组合物可以含有其它血液组分，并且特别是可以含有其它处于正常或者活化态的凝血因子，如因子VII、因子VIII或者因子IX。

在另一方面，本发明提供制成或者制备(在此可互换使用)冻干血小板、冻干微粒和/或包括冻干血小板和/或微粒的组合物的方法。所述方法通常包括，获得血小板；在足以将糖接合入血小板的条件下使血小板暴露于至少一种糖；加入冷冻保护剂；和冷冻干燥。例如，所述方法可以包括，提供血小板，将血小板悬浮在含有至少一种糖的盐缓冲液中从而制成组合物，在冻结以上温度下将组合物培养至少足以使至少一种糖与血小板进行接触的一段时间，加入冷冻保护剂从而形成第二组合物，和冷冻干燥第二组合物。该方法可以进一步包括将冻干血小板加入到其它血小板或者血浆中，从而形成混合物。根据本发明的冻干血小板，单独或者与其它血小板和血浆联用，尤其可以用于诊断多种血液凝固系统疾病和病症。通过暴露于含水液体如水或者含水缓冲液，可以对所述冻干血小板进行重构或者再

水化(在此可以互换使用)。另外,所述冻干血小板制剂可以直接用于治疗对象或者患者(在此可以互换使用),如遭受流血伤口或者出血病症的对象或者患者。用于制备冻干血小板或者组合物的血小板可以在有效期内(新近分离)或者可以过期(时间长于由USFDA法规允许的血液治疗学应用期限)。

在另一方面,本发明提供由本发明冻干血小板制备再水化或者重构血小板的方法。通常,所述重构方法包括,以足量和足够长的时间将冻干血小板暴露于含水液体,从而再水化所述血小板,使得它们恢复到正常形状和流体含量。在实施方案中,含水液体的量为干燥的血小板体积的两倍。在实施方案中,含水液体的量等于干燥的血小板体积。在实施方案中,含水液体的量等于干燥的血小板体积的一半。在其它实施方案中,含水液体的体积为冷冻干燥之前的组合物的体积的两倍。在其它实施方案中,含水液体的体积等于冷冻干燥之前的组合物的体积。在又一实施方案中,含水液体的体积为冷冻干燥之前的组合物的体积的一半。

在另一方面,本发明提供了再水化的血小板。当被引入到需要血液凝固功能的对象时,本发明的再水化血小板具有正常血液凝固所需要的全部血小板特性。例如,所述再水化血小板含有参与血小板被引入对象(即,给予血小板的对象)中血块形成的必要的所有表面分子。

本发明的另一方面提供了试剂盒。通常,本发明试剂盒含有本发明的冻干血小板。本发明试剂盒一般包括至少一个含有本发明血小板的容器,并且可以进一步包括任选组分如用于再水化血小板的无菌含水液体、用于给予血小板的设备等等。由此,在其基本水平上,本发明的试剂盒为含有根据本发明的血小板、微粒或者组合物的容器。所述容器可以为任何适用于包



含这些物质的材料，如管形瓶或者安瓿。在实施方案中，所述容器含有足量的血小板以进行根据本发明至少一种方法的至少一个实施方案。由此，所述试剂盒尤其可以是诊断试剂盒、用于凝结蛋白质或者血小板的血液凝固监控试剂盒或者药物治疗监控试剂盒。在实施方案中，所述容器作为更大试剂盒的部件提供，所述更大试剂盒包括适宜的包装和任选包括与组合物应用相关的说明书和其它信息。在实施方案中，所述容器或者试剂盒包括其它组分，如纯化的凝固级联组分。可以对所述试剂盒进行构造，从而供应用于体内治疗、用于体外诊断或者用于体外或体内研究的冻干血小板。通常，所述试剂盒将包括一些或者所有进行一种或者多种对照反应的供应源和试剂，从而确保试剂盒适当地进行和提供可以与试验样品进行对比的基线结果。在实施方案中，以足量提供血小板以治疗需要血小板的对象，如进行手术或者具有流血伤口的患者。在其它实施方案中，以足量提供血小板以对血小板或者血小板由来自其的动物物种的血液凝固系统进行研究。

在另一方面，本发明提供治疗需要或者怀疑需要一种或者多种血液凝固系统组分的对象，如需要或者怀疑需要血小板的个体的方法。通常，所述方法包括，获得冻干血小板(纯化的或者为组合物的一部分的)，并将它们给药至需要的对象。给药可以通过任何已知方法进行，但是一般是通过输注、注射或者直接施用至出血位置。在将它们给药至所述对象之前，所述方法可以包括任选的再水化血小板的步骤。所述对象可以是任何需要的对象，如遭受伤口流血的对象或者患有出血疾病或病症的对象。在多种实施方案中，所述个体是血友病患者或者经受抗凝血剂治疗的患者。在其它实施方案中，所述个体是经由一些其它方式如由于肝功能衰竭、透析或者由于暴露于环境剂使其

凝固系统受到损害的患者。通常，本发明此方面的方法包括，以足以将个体的血液止血性能升高至可检测地高于给药之前水平的量将本发明组合物给药至个体。所述方法可以进一步包括给予其它生物活性剂如凝血因子和用于治疗癌症的化学治疗剂。它还可以包括用物理方式如利用辐射进行治疗。可以设想，如果使用新鲜的、在有效期内的血小板，人们可以任选活化血小板，从而对凝固病症的治疗提供更好的止血效果。所述冻干血小板、再水化血小板或者组合物可以与其它止血剂如重组FVIIa联用，从而增强以另外的亚药理学量(sub-pharmacologic amounts)的后者的效果，由此节约成本和简化给药和治疗。

本发明的这方面提供治疗患有先天性或者获得性出血的对象的方法，所述先天性或者获得性出血如具有抑制剂的先天性或者获得性血友病；血小板缺陷疾病，如伯-苏氏综合征和格兰茨曼血小板机能不全；自身免疫血小板减少症、同种免疫的血小板减少症、药物诱发的血小板减少症、血栓性血小板减少性紫癜和其它血小板相关病症。还提供用于预防性预防或者治疗与抗凝血疗法或者导致抑制凝固级联的其它疗法或环境影响相关的活性大量出血的组合物和方法。

在另一方面中，本发明提供了血小板、微粒和组合物作为活性剂的应用，从而对个体，包括但不限于对血友病患者，提供常规或者假常规止血性能，和对个体，包括但不限于受到导致出血的外伤的血友病患者提供止血性能。本发明进一步提供将血小板、微粒和/或组合物用于治疗药物诱发的凝血病和用于促进促凝血药物效果的应用。由此，本发明提供了血小板、微粒和组合物与其它止血剂如重组FVIIa的联用，从而增强以另外的亚药理学量的后者的效果，由此节约成本和简化给药和治疗。

在另一方面，本发明提供用于诊断或者研究目的的冻干血

小板(或者由其得到的重构血小板)、微粒和/或组合物的使用方法。由此,本发明提供了诊断血液凝固系统疾病或者病症的方法。所述方法通常包括,获得冻干血小板、微粒和/或含有它们的组合物(或者再水化血小板、微粒和/或组合物),将它们与从患有或者怀疑患有血液凝固系统疾病或者病症的患者中除去的血小板和/或血浆合并从而形成混合物,和通过测定所述混合物的一种或者多种生物学或者生物化学功能来确定所述个体是否患有血液凝固系统缺陷,其中所述缺陷降低或者消除了患者血液凝固系统实现正常功能或者使得凝块在预定时间段内形成的能力。一般,确定患者的血液凝固系统是否具有缺陷包括测定上述混合物的凝固时间。该诊断方法一般在体外进行,但是如果期望,也可以在试验动物体内进行。通常进行所述诊断方法以确定出血病症和那些病症的原因。研究方法通常涉及发现出血病症的原因,如特定个体不能响应创伤或者其它损伤而正常控制出血的分子依据。所述研究方法还可以涉及药物治疗对个体血液凝固系统的效果研究(例如,消极影响血液凝固的副作用)。

在另一方面,本发明提供了监控血液凝固系统疾病或者病症进展的方法。该方法通常包括,获得冻干血小板或者由冻干血小板得到的再水化血小板,将它们与从患有所述疾病或者病症的患者中除去的血小板和/或血浆合并从而形成混合物,和确定所述混合物的血液凝固能力。一般地,确定混合物的血液凝固能力表明患者血液的血液凝固能力,并且其包括测定混合物的凝固时间。此外,一般随时间流逝进行多个测定,从而得到疾病发展随时间流逝的指征。

在另一方面,本发明提供了监控患者治疗方案对该患者血液凝固系统的影响的方法。该方法通常包括,获得冻干血小板

或者由冻干血小板得到的再水化血小板，将它们与从经受所述治疗方案的患者中除去的血小板和/或血浆合并从而形成混合物，和确定所述混合物的血液凝固能力。一般地，确定混合物的血液凝固能力表明患者血液的血液凝固能力，并且其包括测定混合物的凝固时间。此外，一般随时间流逝进行多个测定，从而得到治疗方案的效果随时间流逝的指征。

## 附图说明

引入说明书并且构成说明书一部分的附图与说明书一起说明本发明的数种实施方案，用于说明本发明某些方面的某些原理。

图1是示出根据本领域已知方法和根据本发明实施方案方法制备冻干血小板中所涉及步骤的流程图。

图2是示出本发明实施方案的冻干血小板以剂量依赖方式促进血浆凝固的效果的图表。

图3是示出本发明实施方案的冻干血小板在促进血液凝缩中的效果的图表。

图4显示了表示根据本发明实施方案制备的重构热处理的冻干血小板的大小和粒度测定结果的荧光激活的细胞分类(FACS)分析。图A示出多种热处理之后的重构冻干血小板和新鲜血小板的尺寸。图B示出多种热处理之后的重构冻干血小板和新鲜血小板的粒度。

图5示出FACS分析，其表明在从75℃(图B)至80℃(图C)至85℃(图D)的多种温度下，冷冻干燥后进行热处理步骤24小时对血小板大小的影响，使用不受热样品作为对照(图A)。

图6显示了FACS分析，其表明在从75℃(图B)至80℃(图C)至85℃(图D)的多种温度下，冷冻干燥后热处理步骤24小时对血

小板粒化的影响，使用不受热样品作为对照(图A)。

图7表示新鲜血小板的FACS分析(图A)、根据本领域已知的先导方案制备的冻干血小板的FACS分析(图B)和本发明方案制备的冻干血小板的FACS分析(图C)。

图8示出了重构冻干血小板的FACS分析和在糖负载缓冲液和冻干缓冲液中乙醇存在的影响。

图9图示出根据本发明其中包括酸处理的实施方案制备时，冻干血小板表面上的HLA标记物的相对量的FACS分析。

图10描绘了图示出显示冻干血小板对成纤维细胞增殖影响的图表(图A)和对人类脐静脉内皮细胞增殖影响的图表(图B)。

图11图示出使用本发明冻干血小板再造的胶原-成纤维细胞基体的胶原收缩测定的结果图。

图12图示出显示三种不同制备冻干血小板的方案对微粒浓度影响的图表。

图13图示出表示更高微粒浓度对局部伤口愈合的有益效果的图表。图A表示微粒浓度对全血凝固时间的影响。图B表示微粒浓度对血浆的影响。

图14示出比较Surgicel<sup>TM</sup>、QuikClot<sup>TM</sup>和本发明组合物之间出血控制的图。图A表示腹部的主动脉刺穿位置；图B表示QuikClot<sup>TM</sup>对主动脉出血的影响；图C表示Surgicel<sup>TM</sup>对出血的影响；和图D表示本发明组合物对出血的影响。

图15示出腹主动脉已经被刺穿、随后用本发明冻干血小板、Surgicel<sup>TM</sup>、QuikClot<sup>TM</sup>处理以及未用止血剂或者未向出血部分施加压力(对照)的啮齿动物血压图。

图16图示出用封闭敷裹、本发明冻干血小板或者VEGF处理的伤口位置创伤层(wound beds)的微观图。

图17图示出图16中所示的血管形成结果的定量分析图。

图18图示出不同伤口愈合治疗方案的对比图。

图19图示出作为冻干血小板源的有效期内和过期血小板在处理伤口效果中的对比图。

图20图示出再水化冻干血小板、本发明组合物和新近分离血小板的尺寸分布。

图21图示出利用正常收集血浆的冻干血小板与凝固时间的标准曲线。

图22图示出利用乏血小板血浆的冻干血小板与凝固时间的标准曲线。

图23图示出血友病血浆中的凝固缺陷的检测。

图24图示出凝血和抑制凝血的一般模式。

图25图示出区分全血中凝血蛋白质缺陷的测定结果。

图26图示出本发明冻干血小板与抗凝血剂的特异性反应。

图27示出利用离子载体(ionophore)活化的冻干血小板, 其为使FITC-膜联蛋白V结合冻干血小板暴露了另外的结合位点。

图28示出与50nM FITC-膜联蛋白V结合的冻干血小板可以与过量100倍的未标记膜联蛋白V竞争。

图29示出25nM的标记FVIIa不能与未活化和离子载体活化的新鲜血小板结合。

图30图示出25nM FVIIa与冻干血小板的直接结合, 并且示出该结合可以竞争过使用2500nM未标记的FVIIa。

图31图示出100nM FXa与冻干血小板的直接结合, 并且示出该结合可以竞争过使用10000nM的未标记FXa。

图32图示出冻干血小板、新鲜血小板和二者的组合物对胶原-介导的聚集的影响。

图33图示出由冻干血小板、新鲜血小板和二者组合物的单细胞数判断的对胶原-介导的聚集的影响。

图34图示出暴露于花生四烯酸、胶原、肾上腺素、凝血酶受体活化肽(TRAP)和瑞斯托菌素介导的冻干血小板聚集体时对冻干血小板的影响。该图还图示出由单细胞数判断的冻干血小板聚集百分比。

图35A示出通过将凝固时间由约300秒提高至差不多500秒,因子XI的单克隆抗体诱发假获得性血友病C。

图35B示出含有再水化血小板衍生物的本发明组合物在获得性血友病C的全血模型中缩短了凝固时间(因子XI抑制剂)。

图36示出因子IX的单克隆抗体诱发假获得性血友病B,以及再水化血小板衍生物在获得性血友病B的全血模型中缩短了凝固时间(因子XI抑制剂)。

图37示出因子VIII的单克隆抗体诱发假获得性血友病A,以及再水化血小板衍生物在获得性血友病A的全血模型中缩短了凝固时间(因子VIII抑制剂)。

图38示出再水化血小板衍生物缩短了由真实血友病血浆得到的重构全血的凝固时间。

图39A示出作为药物诱发凝血病模型的牛胰蛋白酶抑制剂(Aprotinin)抑制作用。

图39B示出牛胰蛋白酶抑制剂抑制作用可以通过再水化血小板衍生物(RHP)而逆转。

图40A示出作为药物诱发凝血病模型的肝素抑制作用。

图40B示出肝素抑制作用可以通过再水化血小板衍生物而逆转。

图41A示出,RHP增强亚药理学量重组人类因子VIIa(NovoSeven®,来源于Novo Nordisk)的活性。

图41B表明了FITC-PPACK因子VII与RHP的特异性相互作用。

图42示出由膜联蛋白V结合判断的RHP促凝血性能。

### 具体实施方式

现在详细参照本发明的多种示例性实施方案进行详述，其实施例图解说明于附图中。

在一方面中，本发明提供冻干血小板、再水化冻干血小板和包含冻干血小板或者再水化冻干血小板的组合物。除了所述血小板之外，所述组合物可以但非必须含有微粒，并且这些微粒可以作为制备冻干血小板的结果来包含，或者可以有意作为组合物组分加入。与所述组合物如何进行制备无关，根据用于制备冻干血小板的方法，所述血小板可以与新近分离的血小板或者已经短期贮存的血小板例如少于六天(有效期内血小板)具有不同程度的类似性。在示例性的实施方案中，所述血小板保持了所有在血液中正常血小板存在下对血小板凝固功能而言不可缺少的特性。在其它示例性实施方案中，血小板缺少或者缺失一种或多种特性。

冻干血小板和源于这些冻干血小板的再水化血小板可以由新近分离的血小板(从供血对象身体分离之后少于几小时)、有效期内血小板(从供血对象身体分离后少于六天)或者过期血小板(从供血对象身体分离后六天或者更多天)制备。现已令人惊讶地发现，可以将过期血小板用作冻干血小板源，并且所述血小板或者由它们得到的再水化血小板不仅可以用于研究目的，而且也可以用于治疗出血和出血病症。

本发明血小板可以具有基本上所有正常的、从血液中新近获得的血小板的总体形态特征。例如，在其中存在重构冻干血小板的某些组合物中，当将所述组合物滤过保持一般血小板大小的颗粒的筛眼尺寸时，组合物中约70%的颗粒得到了保持。



同样地，所述血小板颗粒通常表现出与新鲜、未处理血小板相同的细胞表面蛋白质排列。例如，尺寸、粒度和表面受体如GPIIb和GPIIb/IIIa可以以与新鲜血小板相当的水平保持或者部分保持在冻干血小板的表面。所述血小板还可以包括在新鲜血小板中不常发现的特性，如表达填充脂质和颗粒蛋白质，如P-选择蛋白和因子V。由于上述原因，所述血小板可以给予新鲜血小板不能实现的附加功能，如结合维生素K依赖型蛋白等等。在特定实施方案中，所述血小板保持了大多数，如果不是全部的话，进行充分血液凝固所需要的特性。由此，例如，本发明冻干血小板可以保持正常尺寸(通过再水化)、完整的膜、正常的聚集性能、正确的表面蛋白排列和参与凝固级联的内在因子。也就是说，本发明所述冻干血小板和保持大多数，如果不是全部，当被引入到需要血小板功能的患者或者对象时所需的血小板血液凝固功能的特性。

所述血小板可以从任何来源中得到，包括但不限于哺乳动物，如人类、犬或者其它犬齿动物、猫或者其它猫科动物、小鼠、大鼠或者其它啮齿类动物；猪、马、绵羊、山羊、牛或者其它农畜；和猴子、黑猩猩、猿或者其它灵长类动物。也就是说，所述组合物可以含有得自于包括但不限于人类、灵长类动物、犬齿动物、猫科动物、牛类动物、羊类动物、猪类动物、马类动物和啮齿类动物的任何哺乳动物物种的血小板。此外，相对于在本发明方法中与之混和的血液，所述血小板可以为自源性或者异源性血小板。例如，在实施方案中，本发明方法通常包括将血小板如冻干血小板与从患者中新近获得的血液混合。所述血小板优选，但非必需，得自于与血液相同的患者(即，自源性血小板)。然而，在实施方案中，所述血小板得自于除患者之外的一个或者多个个体(即，异源性血小板)。在某些实施

方案中，所述冻干血小板来自于由两个或者更多个供血者得到的血小板库。在某些涉及含有冻干血小板和新鲜血小板的组合物的实施方案中，所述新鲜血小板来自于由两个或者更多个供血者得到的血小板库。

如上所述，用于本发明中的血小板可以由有效期内或者过期血小板得到。有效期内血液是新近从供血者获得的血液，包括短于六天的血液。与此相比，过期血液是六天或者更多天前从供血者获得的血液，因此一些政府管理机构认为它不再适于用作处理大量出血的治疗剂(例如，用于输血)。在某些实施方案中，将从一个或者多个供血源获得的过期血液(单独使用或者用作从不同来源获得的血液混合物)用作冻干血小板源，从而用作“正常的”或者“标准的”对照。

此外，在用于治疗对象之前，可以对所述血小板进行多种处理。通常，从全血中浓缩血小板。可以通过包括但不限于离心和过滤的任何适宜的方法对它们进行浓缩，。除了浓缩之外，可以用盐水或者其他适宜的溶液对它们进行一次或者多次洗涤，从而除去一些或者全部其它血液组分。同样地，可以将它们作为在它们周围具有很少或者基本上没有液体介质的填装浓缩物保持，或者可以将它们悬浮在可以含有稳定剂或者其他与血小板相容的物质的适宜含水溶液或者缓冲液中。

在实施方案中，将浓缩血小板冻干或者冷冻干燥。许多冻干血液制品和其它生物学物质的工艺都是已知的，并且任何一种都可以用于制备根据本发明的冻干血小板。示例性的工艺提供于以下和实施例中。在其它实施方案中，用水或者生物学上相容的含水溶液如盐水对冻干血小板进行再水化。所述再水化血小板组合物可以直接应用，或者在用于治疗需要所述血小板的个体之前，可以将其它物质如血液组分或者药物加入。

在实施方案中，本发明由冻干血小板组成。在其它实施方案中，本发明提供包括冻干血小板或者由冻干血小板得到的血小板的组合物，所述由冻干血小板得到的血小板如，例如为冻干然后用水、盐水或者血浆重构的血小板(在此还称为重构或者再水化血小板)。

因此，根据本发明的组合物含有血小板。所述血小板可以为冻干血小板或者再水化冻干血小板。除了血小板之外，所述组合物还可以含有多种物质，包括但不限于血小板微粒。由此，本发明组合物可以为固体或者液体。当为液体形式时，所述组合物可以含有水或者其它含水溶剂，如含水缓冲液、血液或者血液组分或者成分(如血浆)、盐水、缓冲盐水(例如，磷酸盐缓冲盐水)等等。相应地，本发明的再水化冻干血小板可以用任何所述液体，包括但不限于水、含水缓冲液和血液或者血浆进行再水化。所述液体还可以含有一种或者多种有机溶剂，如一种或者多种醇。所述组合物可以适用于体内治疗出血或者出血病症、可以适用于体外或者体内诊断学或者可以适用于体外或者体内研究。

在将血小板冻干之前、期间或者之后，根据本发明的组合物还可以含有一种或者多种与血小板一起存在的物质。由此，所述含有血小板的组合物还可以含有一种或者多种盐，如磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和任何其它可以在血液或者血液制品中发现或者已知可以用于冻干血小板或者真核细胞的盐，或者两种或者更多种这些的任意组合。其它示例性的可以存在于所述组合物中的物质包括但不限于糖，如单糖和二糖(例如，麦芽糖、葡萄糖、甘露糖、海藻糖、蔗糖、蔗糖聚合物、葡萄糖)；聚糖，如Ficoll-70和Ficoll-400；甘油；甘油三酸酯；多糖；脂质；葡聚糖；聚乙烯吡咯烷酮(PVP)；淀粉；和羟乙基淀粉(HES)

等等。其它示例性的物质包括源于人类或者动物源的生物分子，如多肽(例如，白蛋白，如牛血清白蛋白和人血清白蛋白)、酪蛋白、层粘连蛋白和血纤蛋白原等等。当然，因为所述冻干过程会导致若干数目的血小板溶胞，因此，相对于完整血小板外部，本发明组合物还可以含有一些或者全部存在于血小板内部的组分。

可以存在于本发明组合物中的一组具体物质组为起药物作用的化学和生物学化合物。另一组为起食品作用的物质。其它组为起草药补充剂作用的物质。在实施方案中，所述物质为抗凝血剂。本发明的组合物可以，但非必要含有纤维蛋白。例如，当将本发明组合物用于治疗不可压缩的(non-compressible)创伤时，不含有纤维蛋白的根据本发明的组合物可以提供优于本领域已知组合物的优点。

正如以下更为详尽地讨论，本发明的组合物和方法特别适用于检测和监控血液样品中的药物、食品和草药补充剂，和检测和监控这些物质对给予药物等等的患者的血液凝固系统的作用。所述药物包括 Warafin(Coumadin®)、肝素、氯吡格雷(clopidogrel)(Plavix®)、双嘧啶胺醇(Dipyridamole)(Persantine®)、依诺肝素(Lovenox®)、阿地肝素(Normiflo®)、达肝素(Fragmin®)、噻氯匹定(Ticlid®)、达那肝素(Organan®)、亭扎肝素(Innohep®)、阿斯匹林和凝血酶抑制剂等等。所述物质还包括含有潜在抗凝血作用的香豆素的某些食品和草药补充剂，如苜蓿、当归(Don Quai)、山金车(Arnica)、睡菜、辣椒、芹菜、蒲公英、马栗、辣根、绣线菊(Meadowsweet)、荨麻、欧芹、西番莲、花卉(Flower)、红三叶草、草木樨、野生胡萝卜、野生葛苣。此外，所述物质可以为具有抗血小板性能的那些，如龙牙草、芦荟胶质体(Aloe gel)、黑升麻(Black cohosh)、睡菜、丁

香、蒲公英、大蒜、姜、银杏、人参(人参属)、甘草、绣线菊、洋葱、普利醇(Policosanol)、白杨、美远志、罗望子和柳冬青(Willow Wintergreen)等等。

由此,所述组合物可以含有其它血液组分,并且特别是可以含有其它处于正常或者活化态的凝血因子,如因子VII和因子VIII。这些其它组分可以作为浓缩血小板的结果存在或者可以将它们作为分别纯化的组分加入到血小板中。这些其它血液组分可以单独存在(即,仅仅一种存在于组合物中),或者可以将多种其它血液组分与血小板一起包含在组合物中。一般地,将其它血液组分以血小板的选定量给药至个体时,其以提供在至少一种所述治疗个体的生理过程中可检测变化或者提供已知益处的量或者浓度来包含。

例如,在每微升50,000个血小板或者血小板衍生物存在下,可以将重组因子VIIa以对患者提供 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的剂量的量包含在所述组合物中(或者单独给药);该量远远低于用抑制剂治疗血友病患者的标准 $90\mu\text{g}/\text{kg}$ 。关于本发明的该实施方案,发现本发明含有血小板的组合物,当将其与纯化重组因子VIIa一起提供时,将活性所需因子VIIa的量降低5~10倍。即,如下文所述,已发现,当将重组因子VIIa与本发明的浓缩冷冻干燥和再水化血小板一起使用时,在正常时间内实现凝固所需的重组因子VIIa的量比单独使用重组因子VIIa时低5~10倍。

同样地,所述组合物可以含有其它非正常血液组分的组分。所述组分可以为对溶液提供多种有益性能如稳定溶液中的蛋白质、制成生物学上相容的溶液等等的盐、洗涤剂和其它非生物物质。所述组分还可以为具有已知生物活性的物质,如化学治疗剂、抗生素、维生素等等。如同所述血液组分,优选存在于溶液中的非血液组分以提供预期功能的量包含。例如,优选

以稳定组合物中蛋白质或者提供与受体血液相容的量加入盐。此外，将抗生素或者化学治疗剂(等等)以使得当以选定量血小板给药至个体时，提供在被治疗个体的至少一种生理过程中可检测变化或者提供已知益处(例如，以已知适用于对抗细菌感染的量将已知抗生素提供给被治疗个体)的量加入。

在某些实施方案中，本发明组合物含有血小板、微粒或者上述两种物质，但不含有其它形成凝块的生物学上的活性物质。因此，本发明提供这样的组合物，该组合物当只含有血小板时或者当它们含有血小板和其它凝血因子时都促进凝固活性。

在其中所述组合物含有微粒的实施方案中，在所述组合物中，所述血小板一般包括约10%~约70%的颗粒总数，特别是血小板或者源于血小板的颗粒。例如，血小板可以含有约10%~约60%，约10%~约50%的颗粒，约20%~约50%的颗粒，约20%~约40%的颗粒，或者约20%~30%的颗粒。在实施方案中，当将所述组合物滤过保持一般血小板大小的颗粒的筛眼尺寸时，组合物中约70%的颗粒得到了保持。由此，在实施方案中，组合物中高达约70%的颗粒为血小板。因此，本发明组合物可以包含70%血小板和30%微粒、60%血小板和40%微粒、50%血小板和50%微粒、40%血小板和60%微粒、20%血小板和80%微粒或者10%血小板和90%微粒。在示例性的实施方案中，所述组合物含有作为基本上仅仅为血液凝固系统一部分颗粒的血小板和微粒，并且以总颗粒数的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%或者约70%的量含有血小板。当然，本发明组合物可以含有在上述范围内的任何具体百分数或其分数的血小板或者微粒。因为本领域熟练技术人员马上意识到每种众多可能的血小板和微粒的量的组合，因此在此没有必要明确公开各个组合。

此时应当指出，在此公开中所述的各个值，除非另有说明，并不意指准确限于该具体值。相反地，它是指表示设定值和它周围的任何无统计学意义的值。通常，除非另作说明或者从本公开的上下文明显得出，各个值包括高于和低于设定值5%的固有范围。有时，该概念通过使用术语“约”而获得。然而，关于数字不存在术语“约”并不表示该值意味着“精确”或者“准确”。相反地，仅仅当术语“精确”或者“准确”(或者其它清楚表示精确的术语)使用时，才可以将其理解为对该值进行如此限定。在此情况下，该设定值将通过基于所述有效数字的取整的标准规则进行确定。由此，例如，数值“50”的叙述是指45~55之间的任何整数值或者分数值，而数值“准确是50”的叙述是指49.5~50.4。

在此还应当注意，关于本发明组合物，在本文中使用的“血小板”和“血小板衍生物”可以互换使用，并且包括含有全部或者基本上全部的血小板、全部或者基本上全部的血小板衍生物(由血小板得到的颗粒，如血小板碎片、微粒和外翻血小板)或者它们各自任意量的混合物的组合物。

所述血小板可以在任何适宜的组合物或者制剂中并以任何适用于本发明方法的浓度存在。由此，可以使用通过离心正常血液获得的血小板，或者可以使用从血液中获得的血小板的部分或者组分(如，从0.5升、1升或者1品脱人类血液中获得的血小板部分)。因为个体的整个身体将用本发明组合物进行治疗，因此所述组合物不包括全血。也就是说，因为利用全血输液治疗个体是不切实际和不必要的，因此同全血相比，根据本发明的组合物含有浓缩形式的血小板。虽然可以接受大的浓度范围，但是优选提供其中血小板衍生物以比全血浓缩大约10倍或者更多倍的形式提供的组合物，并且其中它们提供从约50,000至约

500,000个血小板/ $\mu\text{l}$ 的基本血小板数的升高。由此，它们可以以是或者约是比正常全血浓缩2倍或者更低、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或者更高的浓度存在。它们还可以以提供患者血液中基础血小板数从或者约从50,000或者更少、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、125,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,00或者更高量升高的量存在。所述血小板衍生物还可以为基于它们的全部磷脂含量的剂量，而不是或者除了通过列举数字度量的量之外。提供于组合物中的量和给药量可以不同，这取决于目标受者(婴儿、儿童、成年人)和进行剂量计算的基础。所述计算在本领域熟练技术人员的能力范围内是熟知的，由此不需要过度的试验即可进行。

由此，所述冻干血小板或者再水化冻干血小板可以以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$ 的量存在于组合物中。在其中新鲜血小板也存在于组合物中的实施方案中，所述新鲜血小板一般以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$ 的量存在。在示例性实施方案中，上述一种或者两种类型的血小板以约 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ ，如约 $1 \times 10^9$ 的量存在于组合物中。在含有新鲜血小板和冻干血小板二者的组合物中，各种血小板的量可以相同或者不同。

如下所详述，本发明某些实施方案的方法通常包括，将冻干血小板和新鲜血液或者可能含有或可能不含有血小板的新鲜血液成分(例如，血浆)混合，从而制备混合物。认为所述混合物为根据本发明的组合物。由此，在实施方案中，本发明组合物包括从供血者获得并且未经受任何冻干工艺的新鲜血小板。同样地，本发明组合物可以含有新鲜血小板和冻干血小板的组合。这些类型的血小板中的每一种可以以任何量或者浓度存在于所述组合物中，与其它血小板的量或者浓度无关。各自的适



宜量可以由专业人员至少部分基于本文关于本发明方法的实践所述的事项进行选择。

所述组合物的pH值可以为任何适用于血小板的稳定和功能的pH值。因此，它可以从弱酸性延伸到弱碱性，如从pH4.0到pH8.5。在多种实施方案中，所述组合物的pH值为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0或者8.5。在其它实施方案中，所述pH值为4.0~8.5范围内的任何其它pH值。在其中血小板处于固体(干燥)状态的实施方案中，所述组合物可以含有一种或者多种当水化时导致所得液体组合物的pH值在适宜范围内的物质。

可以将海藻糖和/或另一种蔗糖包括在组合物中，并且所述海藻糖和/或其它蔗糖可以存在于血小板外、血小板内或者二者中。虽然任何量都可以是适宜的，但是海藻糖或者蔗糖的量一般为50mM~150mM。在多种实施方案中，海藻糖的浓度为50mM、75mM、100mM、125mM或者150mM。在其它实施方案中，海藻糖的浓度为50mM~150mM范围内的任何其它浓度。在其中血小板处于固体(干燥)状态的实施方案中，所述组合物可以含有一种或者多种当水化时导致所得液体组合物的海藻糖浓度在适宜范围内的物质。

适用于将海藻糖和/或另一种蔗糖负载入血小板内的组合物可以含有乙醇。在所述组合物中，乙醇范围可以为0.1%~5.0%(v/v)。在多种实施方案中，乙醇浓度为0.1%、0.5%、1%、2.5%或者5%。在其它实施方案中，乙醇的浓度为0.1%~5%范围内的任何其它浓度。

在其中血小板处于固体(干燥)状态的实施方案中，可以对血小板或者其中存在它们的组合物在如室温、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃或者90℃下进行加热。在

实施方案中，所述温度为室温至约90℃的范围内的任何温度。加热处理可以促进适用于血小板功能测定的血小板的形成。

在其中血小板处于固体(干燥)状态的实施方案中，可以将它们加热少于一分钟至长达24小时或者更长时间。因此，加热时间可以为0、2、4、8、12或者24小时。在其它实施方案中，所述加热时间为少于1分钟~24小时的范围内的任何时间，包括该范围内的任何分钟数或者其时间段。

正如从本发明公开中明显看出的，除根据某些实施方案的组合物中某些药物和抗血小板化合物之外，存在于本发明组合物中的任何和全部物质优选以与正常血小板至少一种功能相容的量存在。也就是说，除了血小板之外，本发明组合物可以含有多种物质，但是各种物质和所述物质的所有组合，优选至少相对于一种血小板功能，以使得血小板正常发挥功能的量存在。在其中一种或者多种物质以抑制正常血小板功能的量存在的实施方案中，为了使得该方法作用良好，优选在将血小板用于本发明的方法之前将上述物质除去或者调节其浓度。当然，这些考虑与有意包含在组合物内从而确定所述物质对血小板或者凝集系统功能影响的药物和其它抗血小板物质无关。

本发明所述冻干血小板、再水化冻干血小板和组合物适用于多种目的，包括但不限于在体外诊断和研究目的以及在体内治疗学目的中使用。例如，可以对所述冻干血小板进行再水化和用于治疗遭受大量出血或者患有出血病症的对象。另外，可以将它们用于研究实验室条件下的血小板功能，或者用于研究血小板或者血小板组分对血液凝固系统的影响。本领域熟练技术人员可以设想到多种可以用血小板治疗的具体疾病和病症，所有这些疾病和病症都可以用本发明冻干血小板进行治疗。

本发明的血小板和组合物是非常稳定的，在室温或者更低

温度下其贮存期限至少为六个月。例如，在室温或者更低温度下，所述冻干血小板可以稳定长达一年、在室温或者更低温度下稳定长达18个月或者更长时间。关于“稳定”，其是指血小板再水化时，在有效期内血小板的正常参数范围内发挥功能，并且当给药至需要的对象时提供充分的血液凝固功能。该稳定性是将血小板制品提供给需要的对象，特别是那些距离血液收集中心一段距离的位置发现的那些是非常有利的。此外，因为所述冻干血小板可以在室温下贮存，因此不再需要复杂、庞大或者昂贵的贮存容器(例如，冷藏器)。此外，因为所述血小板可以在脱水状态下贮存，因此同新鲜、浓缩的血小板相比，可以在体积和重量上获得显著降低。

本发明的冻干血小板，即使在暴露于50kGY高 $\gamma$ 辐射剂量或者在80℃下热处理24小时时也非常稳定。该性能的有利之处在于它使得能够为减少病原体而处理血小板。

此外，根据本发明方法制备的冻干血小板通过再水化，显示出新鲜或者期内血小板的性能。例如，通过再水化，它们显示出新鲜或者有效期内、未活化血小板的涡旋特征。此外，通过再水化，它们显示出了与新鲜或者有效期内血小板类似的大小和粒度。通过再水化，所述冻干血小板的其它特性如上所述。

在实施方案中，所述组合物含有从血液中浓缩的血小板，其中已经将血小板冻干或者冷冻干燥和用水基溶液如盐水对其重构。多种血源都是可利用的，并且可以使用任何一种血源，包括但不限于一般公众血液供给源和自体血液供给源。同样地，多种冻干血小板的方法都是本领域熟练技术人员已知的，并且可以使用任何适合的工艺。下面介绍示例性的冻干工艺。

可以将本发明的血小板用作治疗出血患者的可注射或者可注入物质，或者可以将其用作可以从体外达到的直接出血治疗。

同样可以将它们用于体内或体外诊断目的或者用于体内或体外研究，如用于血液凝固过程研究。所述冻干血小板或者由它们制成的再水化血小板可以具有足以提供凝固功能的新鲜获得或者有效期内的血小板的性能，和促进伤口愈合。

本发明冻干血小板、再水化血小板和组合物实施方案的一个优点在于血小板微粒可以促进凝块形成，可能至少部分通过其自身性能促进tenase和凝血酶原酶的活性，从而增强受伤害位置的凝血酶产生能力和促进凝块快速发展。此外，由于所述组合物可以含有源于血小板的材料并且可以含有多种重要的生长因子的事实，因此它们还可以有助于伤口愈合和组织再生过程。研究已经发现，促有丝分裂脂质和生长因子如血小板源伤口愈合因子(PDWHF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)和胰岛素生长因子(IGF)在伤口愈合级联的不同阶段是尤其重要的，并且会极大地影响促有丝分裂的和细胞分化活性。由此，在实施方案中，将一种或者多种这些因子包括在组合物中或者提供于治疗方法中。

在另一方面，本发明提供制备冻干血小板的方法。通常，所述方法包括，提供血小板，将血小板暴露于至少一种糖，从而形成组合物，在冻结以上温度下将组合物培养至少足够的时间以使至少一种糖与血小板进行接触，加入冷冻保护剂从而形成第二组合物，和冷冻干燥第二组合物。将血小板暴露于至少一种糖可以在缓冲液如盐缓冲液中完成。所述血小板和糖接触时间可以足以将糖吸收入血小板内。通过暴露于含水液体(如水或者含水缓冲液)，可以对所述冻干血小板进行重构或者再水化(在此可以互换使用)。另外地，可以将所述冻干血小板制剂直接用于治疗方法、诊断方法或者研究方法中。制备冻干血小板的具体示例性方法提供如下。

提供血小板的行为可以为任何导致制备的血小板以适用于所述方法的形式应用于所述方法中的行为。由此，所述提供可以包括，从对象中除去血液和从其它血液组分中分离或者纯化(至任何适宜的程度)血小板。可以使用任何从其它血液组分中分离血小板的已知方法。因此，它可以通过利用血浆除去法或者血液的顺序差速离心法获得血小板的工艺。例如，可以将差速离心法用于通过两步法从其它血液组分中分离或者纯化血小板，该两步法中，在 $3000 \times g$ 下将血液离心45分钟；将乏血小板的液体除去；将富含血小板丸粒悬浮在含水缓冲液中，和在 $200 \times g$ 下将所得混合物离心5分钟，从而使血小板成为丸粒。另外地，可以使用单离心步骤，如在 $100 \times g$ 下离心10分钟。在获得血小板的过程中，可以将一种或者多种物质加入到含有血小板的组合物中，如一种或者多种抗凝血剂或者稳定剂。其它方法是本领域熟练技术人员所熟知的，不需要不适当或者过度试验即可使用任何所述方法。

血小板可以来自于任何来源。因此，它们可以得自于动物，如猪、马、狗、母牛、绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠、猴子或者猫。它们还可以来自于人类。在某些情况下，血小板可以作为两种或者更多来源的混合物提供，如从向公众血库的随机献血者得到的两个或者更多个血液单位的混合物。在其它实施方案中，如其中血小板意欲用于日后输注回供血者的实施方案中，所述血小板可以得自于已知来源，由此将其视为用于在此公开的治疗方法目的的自源性血小板。更具体而言，所述血小板可以最初得自于冻干血小板或者重构血小板的最终接受者。通常，所述血小板由新鲜来源(即，在冻干之前少于6天时从供血者得到的血液中的有效期内血小板)提供，不过在某些情形中可以使用过期血小板，特别是用于制备目的是用于体内和体外诊断或

者研究的冻干血小板，如用作止血剂以有助于在具体创伤位置停止出血。

将提供的血小板悬浮在包括至少一种糖的盐缓冲液中，从而形成了含血小板组合物。所述盐缓冲液可以为任何在缓冲液中保持至少大部分血小板处于完整、功能态的缓冲液。优选所述缓冲液在约6.2~约7.8的pH值下保持血小板。由此，所述盐缓冲液可以为含有由血小板天然接触的盐的等渗盐缓冲液，如包括钠盐、钾盐、钙盐等等以及所述盐的组合的那些。另外地，它可以含有一种或者多种与血小板并不天然接触的盐。缓冲液中所述盐的同一性并不是至关重要的，只要它们以对血小板无毒性和在缓冲液中保持至少大多数血小板处于完整、功能态的量存在即可。同样地，所述缓冲组分可以是任何对血小板无毒性和在本发明方法期间暴露组合物的温度下对组合物提供充分缓冲能力的缓冲液。由此，所述缓冲液可以含有任何市售的已知的生物学上相容的缓冲液如HEPES、磷酸盐缓冲盐水(PBS)和Tris-基缓冲液如TBS。同样，它可以包括一种或者多种以下缓冲液：丙烷-1,2,3-三羧酸(丙三羧酸)；苯五羧酸；马来酸；2,2-二甲基丁二酸；EDTA；3,3-二甲基戊二酸；双(2-羟乙基)亚氨基-三(羟甲基)-甲烷(BIS-TRIS)；苯六羧酸(苯六酸)；N-(2-乙酰胺基)亚氨基-二乙酸(ADA)；丁烷-1,2,3,4-四羧酸；焦磷酸；1,1-环戊烷二乙酸(3,3四亚甲基-戊二酸)；1,4哌嗪双-(乙磺酸)(PIPES)；N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES)；1,1-环己烷二乙酸；3,6-内亚甲基-1,2,3,6-四氢化邻苯二甲酸(EMTA；ENDCA)；咪唑；2-(氨基乙基)三甲基氯化铵(CHOLAMINE)；N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)；2-甲基丙烷-1,2,3-三羧酸( $\beta$ -甲基丙三羧酸)；2-(N-吗啉代)丙烷-磺酸(MOPS)；磷酸；N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(TES)；和N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺

酸(HEPES)。此外，所述缓冲系统可以在pH4~pH8的范围内提供缓冲能力。

所述盐缓冲液包括至少一种糖。所述糖可以为任何适宜的糖，包括单糖或者二糖或者多糖。所述糖可以为任何与保持血小板生存能力和功能相容的糖，并且可以以任何对血小板无毒性的量存在。通常，所述糖可以为任何能够穿过细胞膜如血小板膜的糖。适宜的糖的实例为蔗糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、Ficoll-70和分子量截止为小于约100千道尔顿的水凝胶。熟知所述糖可以有利地包括在组合物内以用于冻干或者冷冻干燥血小板，本发明希望使用至少一种糖以用于稳定或者另外促进经过冻干和重构过程的血小板的存活。优选用于制备冻干血小板的方法中的糖为海藻糖。所述糖可以以任何适宜的量存在于缓冲液中。例如，它可以以1mM~1M的量存在。在实施方案中，它以10mM~500mM的量存在。在一些实施方案中，它以20mM~200mM的量存在。在实施方案中，它以40mM~100mM的量存在。在某些特定的实施方案中，所述糖以至少或者约任何以下浓度的量存在于缓冲液中：40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM和100mM。当然，在多种实施方案中，所述糖可以以上述范围内的不同的具体浓度存在，本领域熟练技术人员可以立即理解所述多种浓度，在此不需要对每一种具体描述。当多于一种糖存在于缓冲液中时，各种糖可以以根据以上所述范围和特定浓度的量存在。

所述盐缓冲液可以含有其它组分，只要这些组分以它们存在于缓冲液中的浓度下对血小板无毒性即可。由此，可以将聚合物如蛋白质和多糖包括在缓冲液中。同样地，可以包括醇如乙醇或者多元醇如甘油和糖醇。类似地，可以包括有机溶剂如二甲亚砜。此外，凝血或者血小板抑制剂，如肝素、EGTA、

柠檬酸盐和前列腺素E(PGE)。

在实施方案中，所述缓冲液包括含有50mM海藻糖、pH值为6.8的无阳离子HEPES-Tyrodes缓冲液(95mM HEPES, 1M NaCl, 48mM KCl, 120mM NaHCO<sub>3</sub>)。在其它实施方案中，所述缓冲液包括含有100mM海藻糖和1%(v/v)乙醇、pH值为6.8的无阳离子HEPES-Tyrodes缓冲液。

对含血小板的组合物进行培养，从而至少部分地使糖负载到血小板上。通常，在冻结以上温度下将所述组合物培养足够的时间以使糖与血小板接触。由此，所述培养可以是在1℃、4℃、10℃、20℃、22℃、25℃、37℃、42℃、50℃、55℃或者更高温度下。在实施方案中，所述培养在37℃下进行。此外，所述培养可以进行任何适宜长的时间，只要所述时间，连同所采用的温度，足以使糖与血小板进行接触即可，并且优选至少在某程度上将糖引入到血小板中。在实施方案中，所述培养进行至少或者约10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、60分钟、70分钟、80分钟、90分钟、100分钟、110分钟、120分钟、130分钟、140分钟、150分钟、160分钟、170分钟、180分钟或者更长时间。在某些实施方案中，所述培养在20℃~42℃下进行100分钟~150分钟。例如，在实施方案中，所述培养在35℃~40℃(例如，37℃)下进行110~130(例如，120)分钟。虽然已发现在比约37℃更高的温度下培养是适宜的，但是已经确定所述更高温度是不必要的，并且在实施方案中，不能提供更优良的结果。此外，虽然现已发现大于约2小时的培养时间是适宜的，但是已经确定所述更长时间是不必要的，并且在实施方案中，不能提供更优良的结果。此外，将时间从例如4小时降低至2小时，这降低了生产冻干血小板所需的时间，并且对专业人员提供优于一些本领域可利用的其它方法的优点。在期望得



到活化血小板的实施方案中，在海藻糖存在下，可以应用接近或者超过4小时的培养时间。然而，为了降低活化量和使结构完整性的损失最小化，短于4小时如2小时的培养时间是更为适宜的。

冻干血小板的方法包括：将冷冻保护剂加入到血小板组合物中，从而形成第二组合物，在此之后将其称为冷冻干燥缓冲液。除了上述组分之外，所述冷冻干燥缓冲液还包括冷冻保护剂(在此还称为赋形剂)。所述冷冻保护剂可以为任何在随后冻结和融化过程期间至少在某种程度上保护血小板的适宜物质。多种冷冻保护剂在本领域中都是已知的，并且这些之中的任何物质都可以以有效并且对血小板无毒性的量使用。适宜的冷冻保护剂的实例包括但不限于牛血清白蛋白、人血清白蛋白、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、淀粉、羟乙基淀粉(HES)以及聚糖如 Ficoll-70 和 Ficoll-400。将所述冷冻保护剂以 1% ~ 50%(w/v)，如 5% ~ 40%、5% ~ 30%、5% ~ 20% 和 5% ~ 10% 的量包括在冷冻干燥缓冲液中。在实施方案中，所述冷冻保护剂以最终浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 或者 10% 存在于冷冻干燥缓冲液中。在某些实施方案中，所述冷冻保护剂以 4%-8% 的最终浓度存在于冷冻干燥缓冲液中。在实施方案中，所述赋形剂为血清白蛋白，如牛血清白蛋白或者人血清白蛋白。在其它实施方案中，所述赋形剂不是来自于动物或者人类来源。在这些实施方案中，对赋形剂进行选择，从而降低将杂质如传染性颗粒引入到血小板制剂中的可能性。例如，当使用人血清白蛋白时，白蛋白可能会受一种或者多种传染性颗粒(例如，病毒)的污染。同样地，如果使用牛血清白蛋白，白蛋白就可能含有如果给药至人类患者会产生有害反应的免疫原性颗粒。由此，在某些实施方案中，优选使用不是来自于生

物来源的赋形剂，如Ficoll-400。冷冻保护剂向负载缓冲液中的加入不需要介入离心或者其它分离步骤即可实现。即，将冷冻保护剂(和其它任选组分)直接加入到负载缓冲液中，从而形成适用于直接冷冻干燥的第二缓冲液。这与本领域中的在糖加载和冷冻干燥之间需要分离步骤的现有方案形成对比。

制备冻干血小板的方法包括冷冻干燥或者冻干第二组合物。在本领域中已知多种用于冷冻干燥真核细胞和细胞样颗粒(包括血小板)的方案，可以使用任何适宜的方案。正如在此使用的，冷冻干燥或者冻干是联用低温和真空的干燥物质的过程。一般所述过程使用下述步骤：冻结所述物质，随后通过利用真空升华和/或解吸水和其它液体进行干燥。通常所述冷冻干燥将形成水含量低于10%的血小板。在实施方案中，所述冷冻干燥形成水含量低于5%，如4%、3%、2%、1%或者更低的血小板。在本领域中已知，通常达到的水含量越低，得到的冻干血小板就越稳定(例如，贮存寿命更长)。由此，在实施方案中，优选将水含量降低至尽可能低的量。优选将水含量降低至2%或者更低，其是使冷冻干燥后加热步骤(使用时)的有害作用最小化和促进长期稳定贮存所述冻干血小板的量。

一种适宜的冷冻干燥方案的实例包括，在-45℃下冻结所述冷冻干燥组合物2小时，在约100mTorr的真空下，在-40℃下将所述冻结组合物保持150分钟并且以10℃的增量在六小时时间内将温度缓慢升高至25℃(在大约100mTorr的真空中)。另一种适宜的冷冻干燥方案的实例包括：在-45℃下冻结所述冷冻干燥组合物约4.5小时，在约100mTorr的真空下，在-45℃至-40℃下将所述已冻结组合物保持一小时，并且在100mTorr真空下，以10℃的增量在24小时的时间内将温度缓慢升高至30℃。其它具体方案在下表3中给出。

在一些实施方案中，制备冻干血小板的方法进一步包括加热所述冷冻干燥血小板。现已令人惊讶地发现，冷冻干燥之后的热处理步骤提高了冻干血小板的稳定性，并且提供通过再水化的高度活化的血小板。所述加热可以在25℃以上的任何温度下进行。优选所述热处理在高于40℃的温度下，如在高于50℃的温度下、高于60℃的温度下、高于70℃的温度下或者高于80℃的温度下进行。在具体实施方案中，加热在70℃~85℃，如75℃、80℃、85℃或者75℃~85℃内的任何其它具体温度下进行。结合要进行加热的时间对所述加热温度进行选择。虽然可以使用任何适宜的时间，但是一般将冷冻干燥血小板加热至少1小时，但不超过36小时。由此，在实施方案中，加热进行至少2小时、至少6小时、至少12小时、至少18小时、至少20小时、至少24小时或者至少30小时。例如，可以将冷冻干燥血小板加热18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时或者30小时。非限制性的示例性组合物包括：在高于30℃的温度下将冻干血小板加热至少30分钟；在高于50℃的温度下将冻干血小板加热至少10小时；在高于75℃的温度下将冻干血小板加热至少18小时；和在80℃下将冻干血小板加热24小时。虽然不是必需，但是优选对在密封容器如封盖的管形瓶中的冷冻干燥血小板进行加热。此外，虽然不是必需，但是优选在加热之前使所述密封容器进行真空处理。

已经发现，特别是在冷冻保护剂如白蛋白或者Ficoll-400的存在下的热处理步骤提高了冻干血小板的稳定性和贮存寿命。实际上，同未进行热处理步骤的那些冷冻保护剂相比，利用血清白蛋白或者Ficoll-400和冷冻干燥后热处理步骤的特定组合已经得到了有利的结果。例如，通过应用浓度为大约6%的

Ficoll-400和在约80℃下的冷冻干燥后热处理步骤约24小时的组合，已经得到了有利结果。

在实施方案中，根据本发明制备冻干血小板的方法在盐缓冲液中培养血小板和冷冻干燥之间不需要离心步骤。相反，所述冷冻干燥组合物可以由盐缓冲液组合物直接产生，和冻干血小板可以由冷冻干燥组合物直接产生。这与当前应用的方法形成对比，当前应用的方法中使用两种不同的缓冲液制备冷冻干燥血小板(例如，“负载缓冲液”和“冷冻干燥缓冲液”)，和其中在暴露于第二缓冲液之前将血小板从第一缓冲液中除去(并且一般进行洗涤)。

在制备冻干血小板的方法的实施方案中，所述方法包括减少HLA步骤。该步骤是任选的和可以用于生产低HLA含量的血小板。已经报道，低HLA含量的血小板对于对血小板治疗具有强免疫原性反应的对象的内治疗学应用是有益处的。在其中包括减少HLA的步骤的实施方案中，用于该减少步骤的缓冲液可以为任何适宜的缓冲液，如pH值为4的无阳离子HEPES-Tyrodes缓冲液(95mM HEPES, 1M NaCl, 48mM KCl, 120mM NaHCO<sub>3</sub>)和10mM EGTA。为了实现HLA的减少，可以在缓冲液中将血小板培养适宜的时间，如两小时。虽然所述HLA减少步骤可以在该过程中的任何时间点进行，但是优选其在糖负载步骤之前进行。由此，在实施方案中，HLA-缺失的血小板可以通过以下方法得到：在糖负载之前，在适当的缓冲液中培养，然后洗涤和在负载缓冲液中培养，如包括含有100mM海藻糖和1%(v/v)乙醇的pH值为6.8的无阳离子HEPES-Tyrodes缓冲液的缓冲液。

此外，所述方法可以任选包括再水化所述冻干血小板。当包括所述再水化步骤时，可以将该方法认为是制备血小板的方

法或者认为是制备再水化冻干血小板(或者含有它们的组合物)的单独的和不同的方法部分。更具体而言,因为本发明冻干血小板可以以稳定形式长期贮存,因此所述再水化方法可以在制备冻干血小板的方法数月或者数年后实践,并且由此可以将其认为是不同方法。所述再水化可以通过任何适宜的技术,如本领域通常应用的那些进行。一般地,所述再水化包括,将冻干血小板暴露于足以以部分或者完全再水化血小板的量的水或者含水溶液,从而提供正常的形状和流体含量和/或正常功能。适宜的再水化溶液在本领域中是已知的,包括但不限于磷酸盐缓冲的含水组合物(例如,PBS)。本文中提供某些具体的再水化组合物。在实施方案中,所述再水化缓冲液可以具有与冷冻干燥缓冲液相似的配方,从而可以使得水的任何对冻干血小板的初始有害作用最小化。示例性的再水化缓冲液可以是,但不限于全血、血浆、血清和含牛血清白蛋白、人血清白蛋白、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、淀粉、羟乙基淀粉(HES)和聚糖如Ficoll-70和Ficoll-400的含水溶液。它们可以以1%~50%(w/v),如5%~40%、5%~30%、5%~20%和5%~10%的量加入到所述含水再水化缓冲液中。在实施方案中,它们以1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或者10%的最终浓度存在于再水化缓冲液中。在某些实施方案中,它们以4%-8%的最终浓度存在于所述再水化缓冲液中。

根据再水化方法,使所述冻干血小板暴露于含水溶液。所述含水液体可以为水,或者它可以为含有水和一种或多种其它物质如盐或者缓冲液的液体。一般所述液体可以为含水缓冲液如PBS、含有另一种生物学上相容的缓冲液(例如,HEPES)的含水组合物或者全血、血浆、血清或者任何渗透平衡的生物学缓冲液。在实施方案中,所述再水化缓冲液含有高分子量聚合物,

如聚糖。这些聚合物中包括Ficoll-400。在实施方案中，所述再水化缓冲液还可以含有牛血清白蛋白、人血清白蛋白、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、淀粉和羟乙基淀粉(HES)。优选所述再水化缓冲液含有促使血小板完整性得以保持的组分，如提供适当渗透压的那些。

将血小板暴露于足量的液体足够长的时间，从而再水化所述血小板，例如使得它们恢复正常形状和流体含量。所述液体的量和持续时间将根据期望的血小板的最终浓度、缓冲液和血小板进行再水化的温度而变化。在实施方案中，含水液体的量为干燥血小板体积的两倍。虽然可以应用任何温度，但是通常在周围室温下(例如，20℃~25℃)再水化血小板最为便利。所述再水化时间可以为任何适当的时间。由此，它的范围可以从10秒至超过一小时。例如，它可以为约一分钟或者更短、约五分钟或者更短、约十分钟或者更短、约三十分钟或者更短和约六十分钟或者更短。在实施方案中，所述再水化可以通过以下方式得到完成：物理再悬浮所述血小板(例如，通过涡旋或者移液)10~30秒，然后在室温下将所述血小板静置5分钟。

此外，再水化可以利用任何已知的通用方案进行。由此，所述血小板可以用再水化液体直接再水化或者可以间接或被动地再水化。直接方法可以包括，直接对所述冻干血小板施用一定体积的液体，如通过将液体加入到血小板丸粒中，和使得所述液体接触血小板足够长时间和再水化它们。直接再水化还可以包括在与液体接触的同时将血小板物理分散一次或者多次，如通过温和地涡旋或者移液。在直接再水化的实施方案中，将再水化缓冲液温和地加入到冻干血小板中和使得它们保持静态接触10~60秒，如保持30秒，然后将血小板温和地涡旋几秒，从而将它们分配在液体中，然后在室温下将它们静置1~10分钟。

如果期望，在再水化期间可以通过涡旋或者移液将所述血小板温和地搅拌一次或者多次。在其它实施方案中，通过以下方式对血小板进行再水化：直接加入再水化缓冲液，然后立即进行温和移液直至观察到完全分散为止。然后，可以使上述血小板保持静置1~10分钟以上，可以进行或者不进行一次或者多次短期温和搅拌。在其它实施方案中，可以使用被动再水化。被动再水化的实例包括，通过暴露于再水化缓冲液蒸汽然后将其暴露于再水化缓冲液体进行再水化。专业人员熟知多种再水化冻干血小板的方法，并可以应用任何适宜的方法。

从以上公开内容可以明显看出，本发明包括再水化血小板和制备它们的方法。当被引入到需要血液凝固功能的对象时，本发明的再水化血小板可以具有进行正常血液凝固所需要全部血小板特性。然而它们也可以缺少一种或者多种可能有利于进行诊断测定的特征。由此，所述再水化血小板可以与新鲜血小板具有相同的大小。它们还可以与新鲜血小板具有相同的通常圆盘形状和相同的体积。所述再水化血小板表面上分子的补体可以与新鲜血小板的相同，因为可以具有由这些分子提供的功能。因此，在体外条件下和当再引入到体内环境时，所述再水化血小板通常都可以参与凝固过程。

取决于用于生产它们的方法，本发明的再水化血小板制剂可以含有很少或者许多微粒。通常，本领域已知的冻干工艺形成重构时提供充分血小板功能的冻干血小板。然而，它们一般会导致大量微粒存在，这显然是由于在冻干和/或再水化工艺期间的许多血小板的溶胞作用而产生。与本领域冻干方法不同，确信本发明方法提供具有相对少量微粒的重构血小板制剂。这些实施方案中完整的、适当尺寸的血小板与微粒的高比例对于将血小板制剂用于治疗学方案中是有利的。此外，因为本发明

提供如何控制血小板和微粒的相对量的认识，由此可以产生具有期望量的各种物质的组合物。

在另一方面中，本发明提供制备组合物的方法。通常，本发明该方面的方法包括获得血小板和冻干它们。所述方法可以进一步包括再水化所述血小板和/或在冻干或者再水化之前或者之后，将一种或者多种其它组分加入到所述血小板中。

在某些实施方案中，制备组合物的方法包括，提供含有血小板和/或微粒的材料，全部或者基本上全部除去可能存在于所述材料中的红血球和白血球，将所得无细胞材料的pH值调节至酸性pH值，将血小板、微粒或者二者与存在于所述材料中的所有或者基本上所有的其它组分分离，将血小板、微粒或者二者再悬浮于液体中，和冷冻干燥。在实施方案中，在冷冻干燥之前，将一种或者多种一般包含在冷冻干燥过程中的试剂如糖加入到再悬浮的血小板和/或微粒中。示例性的糖包括但不限于单糖、二糖(例如，蔗糖、乳糖、麦芽糖、异麦芽糖、纤维二糖和海藻糖)或者多糖。在实施方案中，所述方法包括利用任何已知的适用于对冷冻干燥材料进行灭菌的工艺，包括但不限于辐照，对所述冷冻干燥材料进行灭菌。

在制备本发明组合物的基本方法中，将血小板悬浮在含有海藻糖的缓冲液中，从而得到约 $1 \times 10^9/\text{ml}$ 的浓度。在环境温度下(约 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ )将所述组合物培养两小时，在此时间内将5%(最终浓度)牛血清白蛋白或者任何其它膨胀蛋白质(如酪蛋白)或者其它冷冻保护剂加入，并且使用标准冷冻干燥方案对血小板进行冷冻干燥。另外地，在另一基本方法中，将6.0%的可以替换蛋白质作为膨胀试剂的碳水化合物如Ficoll-400或者任何其它膨胀碳水化合物(如水凝胶)加入(最终浓度)，并且利用标准冷冻干燥方案对血小板进行冷冻干燥。



根据上面的讨论,所述血小板可以得自于任何适宜的来源、可以为有效期内的或者过期的并且可以为自体或者异体的血小板(相对于在本发明方法中与它们进行混合的血小板)。因此,它们可以来自于随机供血者单位或者单采血液成分术(apheresis)单位。血小板的量可以为任何适宜的量,如以上所述的那些。在实施方案中,所述血小板得自于一个或者多个献血者并且存在于全血中。然而,优选从一种或者多种其它血液组分中将所述血小板纯化至至少某种程度。对于冻干血小板尤其如此。从其它血液组分中纯化或者分离血小板的方法对于本领域熟练技术人员是熟知的,由此在此不必详述。在示例性实施方案中,通过包括离心的方法从其它血液组分中对血小板进行纯化。

获得步骤可以包括任何导致血小板从供血者身体中除去和将血小板转移至接受容器的行为。用于实现此结果的多种工艺在本领域中都是已知的,本发明包括任何方法或者方法的组合。在某些实施方案中,获得包括从供血者静脉中抽取血液和将抽取的血液置入管中,如由塑料或者玻璃制成的管。该步骤相当于上述的“提供”步骤,它们各自可以与另一种互换使用。

冻干可以通过任何适用于冻干真核细胞的工艺实现。在此详述了示例性的工艺。通常,冻干包括,在施加真空的同时将细胞暴露于低于0℃的温度,并使其升华的过程,从而将原来存在于血小板和它们环境中的水全部或者基本上全部除去。所得血小板为固体(干燥)形式,并且可以直接或者在再水化之后用于以下本发明方法中。

制备组合物的方法可以进一步包括再水化(或者重构)所述冻干血小板。再水化可以包括,以足以恢复血小板的至少一种物理或者生物学性能的量将水或者含水溶液加入到冻干血小板

中。所述再水化可以通过本领域已知的任何适宜方法，包括但不限于，直接将液体水加入到血小板中并缓慢进行蒸汽重构。所述含水溶液可以以它们存在于组合物中的量含有任何与血小板功能相容的物质。

制备本发明组合物的方法可以进一步包括合并冻干血小板和其它血小板，从而形成混合物。所述其它血小板可以为冻干血小板或者可以为存在于液体组合物中的血小板，如血液或者血液组分(例如，血浆)。所述混合物一般，但非永远，在其中可以检测凝结的反应容器中制备。即，虽然可以通过将冻干血小板注射入体内制备混合物，但是一般在体外将所述冻干血小板与其它血小板合并，如在适于检测血块的反应容器中。

该方法可以进一步包括加入一种或者多种具有生物活性的物质。例如，该方法可以包括加入含有冻干血小板可能具有抗血小板活性的一种或者多种药物或者其他物质的组合物。示例性的具有抗血小板活性的药物和物质如上所述。由此，该方法可以进一步包括加入一种或者多种具有酶活性的生物分子。例如，该方法可以包括加入含有冻干血小板、一种或者多种凝血蛋白或者其他可能减弱血小板活性的物质的组合物。

该方法可以进一步包括将一种或者多种荧光分子加入到冻干血小板中。例如，该方法可以包括加入含有冻干血小板、可以增强血小板活性信号的一种或者多种荧光素或者其他荧光物质的组合物。

为了制备冻干和重构的血小板和含有它们的组合物，优选初始血小板来自于有效期内的来源。然而，在有效期内血小板供应受到限制的情形中，可以使用过期血小板，这是因为可以对利用本发明产生的血小板进行不损害血小板功能的减少病原体和减少HLA步骤。为了提供最有利的结果，过期血小板应当

在过期3天内使用(即,截止至从供血者中除去后9天)。也就是说,如果血小板在第五天到期,那么利用本发明的过程可以使用在第六天、第七天或者第八天的过期血小板。

应当理解,本发明包括用于生产血小板、微粒或者二者的单一方法和用于生产组合物的单一方法的实践。可以对各种方法进行调整,从而获得血小板与微粒的期望比例。还应当理解,本发明包括实践生产冻干血小板的两种或者更多种不同方法,各种方法都导致血小板与微粒的不同比例,然后以期望的比例合并两种所得组合物,从而获得血小板与微粒的期望比例。

基于在此公开的参数,可以进行所述基本方法的多种改进,从而提高与微粒相比的血小板的相对量或者提高与血小板相比的微粒的相对量。已发现,因为组合物的活化水平相对较低,因此升高量的完整血小板提高了组合物对于体内输注和注射应用的适用性,所述组合物显示了更多的正常、新鲜或者有效期内血小板的特性。与此相比,在期望凝固增强物质的体内特定位点给药时,含有升高量微粒的组合物愈加地更为理想。据信,与通过完整血小板提供这些物质可能需要花费长时间来释放它们相比,提高组合物中微粒的相对数目加快了凝固时间,这是因为它立即递送增加量的凝固促进物质。根据诊断测定或者研究测定的目的,本领域熟练技术人员可以选择适当的制备冻干血小板的方法,从而增加或者限制微粒在含有冻干血小板的组合物中或者在含有再水化冻干血小板的组合物中的相对量。

本发明方法提供优于制备冻干血小板和含有它们的组合物的现有方法的优点。一个优点是省去血小板活化抑制剂的能力。因为同现有技术方法中应用的时间相比,培养可以进行较短的时间,因此没有必要对血小板进行活化,或者如果进行活化,仅仅将其活化至相对较低的水平。由此,在本发明方法的实施

方案中，在用糖负载它们的同时，不必加入血小板活化抑制剂抑制血小板的活化。这不仅降低了该方法的成本和复杂性，而且消除了使用前的后一段时间如在冷冻干燥之前或者再水化之后除去抑制剂的需要。

根据本发明实施方案制备冻干血小板的方法提供具有涉及多种血小板功能如粘附在皮下基体上从而引发和参与凝固过程完整的表面受体的血小板，如糖蛋白IIb-IIIa和糖蛋白Ib。根据本发明实施方案的制备冻干血小板的方法还提供具有完整胞内细胞器的血小板，如涉及多种血小板功能如胞内信号、促进血管收缩和释放进一步促进血小板活化和聚集在创伤位置的分子的密集和 $\alpha$ 颗粒。因此，该方法可以对其它无核真核细胞或者细胞片断(包括但不限于红细胞)实施。在此使用的术语“血小板”是指所述其它无核的真核细胞和细胞片断。同样地，该方法可以用于制备稳定的大分子或者大分子配合物，如但不限于蛋白质、核酸和病毒等等。事实上，因为本发明方法提供可以在室温和不需要冷冻或者冻结的条件下以稳定形式长期得到贮存的稳定产品，因此可以对多种生物学或者化学物质，包括明确记载在本文中的那些和其它类似物质实践该方法。

例如，在实施方案中，该方法可以包括制备含有微粒的组合物。该方法可以包括：用血小板激动剂(如TRAP、胶原、凝血酶或者离子载体)预活化血小板，然后在37℃下将血小板培养约30分钟。在负载和冷冻干燥之前如此活化血小板，这提高了微粒在冻干组合物中的相对百分比。一种用于产生具有高相对比例微粒(在此情形中，约60~90%的微粒)的组合物的具体例证方案包括：将PRP收集入管中；在1000×g下离心15分钟；倾析出上清液；将丸粒悬浮在10ml含有10mM EDTA的pH6.5的PBS中，在pH6.5的PBSE中洗涤；将丸粒再悬浮于PMP缓冲液

(137mM NaCl, 4mM KCl, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5mM葡萄糖, 10mM HEPES, 2mM CaCl<sub>2</sub>)中, 从而获得 $2.5 \times 10^9$ 个血小板/毫升的血小板浓缩物; 加入15 $\mu$ m SFLLRN并且在37 $^{\circ}$ C下培养10分钟; 在750 $\times$ g下离心剩余丸粒20分钟; 除去上清液和在4 $^{\circ}$ C下在10,000 $\times$ g下将其离心30分钟; 除去上清液和将PMP再悬浮于等体积的150mM海藻糖缓冲液(0.0095M HEPES, 0.05M NaCl, 0.0048M KCl, 0.012M NaHCO<sub>3</sub>, 0.15M海藻糖, 0.005M葡萄糖, pH值6.8)中; 加入1/4体积的30%ficoll, 将液体等分为0.5ml部分; 和进行冷冻干燥。

另一方面, 根据本发明实施方案制备冻干血小板的方法可提供含血小板组合物, 同微粒和其它由血小板溶胞得到的物质相比, 所述组合物具有高含量的完整血小板。由此, 类似于当前依赖于使用DMSO或者甲醛从而生产冷冻干燥的或者另外干燥的血小板制剂的工艺, 本发明可以提供具有高含量完整血小板的组合物。然而, 与使用DMSO或者甲醛的方案不同, 在使用之前不必洗涤本发明的重构血小板。

在通过单一细胞计数的聚集百分比进行测定的聚集功能测定中, 发现由本发明实施方案(参见以下实施例1和2)制备的重构血小板具有有利的性能, 如表1所示。

表1: 重构血小板的聚集特性

激动剂	通过单细胞计数的聚集%
花生四烯酸	77
胶原	83
肾上腺素	86
TRAP肽	93
瑞斯托菌素	97
没有激动剂	10

当对新近制备的冻干血小板和已经在室温下贮存6个月的冻干血小板进行重构和测定某些特定时,发现它们均具有以下特性:粘附在内皮下膜基体蛋白质上;响应于多种激动剂的聚集;保持主要受体;与自体血小板功能一致;促凝血活性;保持总体尺寸和粒度;在全血和血浆模型中促进体外凝结;对加热和 $\gamma$ 照射处理保持功能活性;和稳定性大于90%(即时重构)。由此,可以预期已经在室温下贮存6个月的冻干血小板以与新近制备的冻干血小板相同的方式发挥作用。

至于表面标志(surface marker),已经发现本发明的重构冻干血小板具有表2所示的表面标志水平。如果将HLA降低步骤并入制备血小板的方法中,可以将HLA的水平降低至5%(100%)。同利用通过本领域其它已知方法制备的重构冻干血小板获得的值相比,这些数值是有利的。表2中示出的结果是基于通过本发明的方法(参见以下实施例1和2)制备的重构冻干血小板和新鲜血小板。

表2:选择的表面标志在由多个随机供血者单位制备的冻干血小板上的表达

表面标志	新鲜血小板	实施例2方案	实施例1方案
GP Ib	100%	65-75%	5-10%
GP IIb/IIIa	100%	100%	100%
HLA	100%	5%(w/酸减少) 100%(w/o 酸减少)	100%
保持的P-选择蛋白	5-10%	80%	100%
P-选择活性	100-140%	100%	100%

在不同的实施方案中,所述重构血小板可以具有不同的活

化水平。取决于多种因素，包括温度和糖负载的持续时间、冻干后的血小板含湿量和是否包括冷冻干燥后加热步骤，已经证实本发明的血小板表现出了低活化水平至高活化水平。通过实施本发明某些实施方案的步骤，可以获得通过重构未得到完全活化的冻干血小板。这是一种不同于其它通过本领域已知冻干工艺提供的血小板制剂的性能。由此，在实施方案中，通过视觉观察，本发明的重构血小板显示了涡旋血小板。通过暴露于激动剂，如花生四烯酸、胶原、肾上腺素、TRAP肽和瑞斯托菌素，上述涡旋特性消失。此外，已经发现，通过暴露于激动剂重构血小板聚集成可以目测检测到的凝块。另外，保持高的表面标志GP Ib水平(~60-100%)。

活化血小板停止涡旋并且与蛋白膜联蛋白V结合。活化血小板的表面表达其它蛋白质(如P-选择蛋白)，并且将表面蛋白GP Ib的水平降低至初始水平的约10%。在本发明的冻干血小板上，仅仅检测到P-选择蛋白的表达和与膜联蛋白V的结合。由此，基于这些简要说明，表2中试验的重构冻干血小板保持了大多数未活化特性和一些通常在正常血小板中发现的活化特性。

由此，重要的是认可本发明提供以干燥形式长期保存和存储血小板的方法，其中所述血小板易于贮存和运输并且便于使用。同样重要的是认可本发明提供稳定血小板和通过用适宜的缓冲液重构提供功能化血小板的方案。应当理解，在此公开的方法还给予具有与新鲜血小板类似的生物学能力的无核真核细胞。应当理解，本发明方法构成了保持无核真核细胞和细胞片断处于干燥状态同时通过重构保持它们的生物学功能的新方法。同样地，本发明方法可以用于冻干低复杂性的生物材料，如脂质、脂囊泡、病毒颗粒、病毒衣壳、蛋白质和核酸。

本发明的冻干血小板和再水化冻干血小板适用于多种应

用。事实上，因为它们可以具有新鲜或者有效期内血小板的特性，因此它们可以用于新鲜或者有效期内血小板可以用于的任何治疗学目的。例如，可以将本发明的再水化血小板用作治疗大量出血如在受伤对象或者进行手术的对象中出现的大量出血的血液替代品或者补充品。此外，可以将所述冻干血小板作为伤口愈合绷带的一部分(例如，约 $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$ 个血小板/ $\text{cm}^3$ )来包含，从而对伤口位置提供血小板功能。它们同样可以用于治疗与血小板功能降低或者消失相关的病症。此外，因为所述血小板可以具有新鲜或者有效期内血小板的特性，因此可以将它们用于诊断测定，从而确定对象血液凝固系统的多种功能。此外，可以将它们用于研究设置中，从而阐明血小板的特性、研究凝固级联和鉴定涉及血液止血和其它生物学功能的细胞组分。

在另一方面，本发明提供试剂盒。通常，本发明试剂盒包含本发明的冻干血小板和/或重构血小板。鉴于本发明冻干血小板的储存稳定性，优选试剂盒含有冻干血小板。试剂盒一般含有足量的血小板以根据本发明的方法实施至少一种实施方案。

以其最简单形式，根据本发明的试剂盒是含有根据本发明的冻干血小板、重构冻干血小板或者至少一种组合物的容器。由此，在实施方案中，本发明试剂盒包括含有冻干血小板的容器。在实施方案中，所述试剂盒包括含有重构冻干血小板的容器。在实施方案中，所述试剂盒包括含有本发明组合物的容器，所述组合物中含有冻干血小板或者重构冻干血小板。在实施方案中，所述试剂盒含有人类冻干血小板。

在试剂盒的某些构造中，所述试剂盒包括多个容器，其各个容器可以含有冻干血小板、重构冻干血小板、含有冻干血小板或者重构冻干血小板的组合物、或者可以用于进行本发明方



法的一种或者多种实施方案的其它物质。在其中试剂盒包括其它组分或者物质的实施方案中，它们可以与血小板和/或组合物包含在相同容器中或者一种或多种不同容器中。在含有多个容器或者一个容器和其它组分的试剂盒中，所述容器和组分据称是位于试剂盒中的包装组合中。在存在多个容器的情形中，各个容器可以含有足以用于本发明单个方法实施的血小板，如含有用于治疗的一个剂量。另外，各个容器可以含有足以用于实施所述方法两次或者更多次的血小板，如含有两个或者更多个剂量。不同容器可以含有不同量的本发明血小板和/或组合物。

在实施方案中，所述试剂盒包括其它组分，如纯化的凝结级联组分等等。所述试剂盒可以进一步含有一些或者全部制备和给药本发明组合物所需的供应品和材料，如大孔针和注射器、泵、无菌布和用于对注射位置进行灭菌的溶液等等。在实施方案中，所述试剂盒包括一种或者多种液体，从而对试剂盒组合物进行水化。所述液体可以为任何适宜的液体，但是一般为水基液体，如水、盐水或者二者的混合物。优选所述液体是无菌的。由此，所述试剂盒可以是诊断试剂盒、用于凝结蛋白质或者血小板的血液凝固监控试剂盒或者药物治疗监控试剂盒。

因此，可以对试剂盒进行构造，从而提供用于体内治疗、用于体外诊断或者用于体外或体内研究的冻干血小板或者重构冻干血小板(或者包含它们的组合物)。由此，与所述血小板的水合状态无关，在实施方案中，所述试剂盒包括多个容器，其各个容器可以含有用于进行一种或者多种诊断方案、一种或者多种治疗方案、或者一种或者多种研究试验的血小板或者其它物质。在其它实施方案中，所述试剂盒包括可以包含在相同容器中或者包含在一个或多个不同的容器中的另外的组分。通常，所述试剂盒将包括一些或者所有进行一种或者多种对照反应的

供应品和试剂，从而确保试剂盒运行正确和从而提供可以与试验样品进行对比的基线结果。

同其容纳的组合物一样，以其多种形式，本发明试剂盒可以含有用于血小板研究的物质，如体外研究以检测和/或研究多种血小板的特性和功能；校准仪器；分离和纯化血小板细胞浆分子(cytolasmic molecules)或者血小板颗粒( $\alpha$ 和致密颗粒)；研究血小板和微粒自身之间以及与血液凝固系统的其它组分之间的相互作用；研究抗血小板药物和血小板或者凝结抑制剂；校准血小板大小；校准不同梯度的分离工艺；作为研究工具以测定血小板受体和它们的配体的相互作用；研究表面介导的酶促反应，包括但不限于tenase复合物、凝血酶原酶复合物等等；研究血小板凝聚，不论是机械诱发还是生物化学诱发；研究血小板生物学和存储；分离血小板相关的表面分子；确定适用于个体的血小板抑制剂；研究神经心里药理学；研究炎症、凝结、细胞修复和再生；研究血小板治疗中的新抗原性；表征促进对血细胞产生免疫响应的非MHC抗原；研究血液携带病原体(blood-borne pathogens)的影响；映象正常和受损伤的血管；和研究血管形成、动脉粥样硬化症、血栓形成和心血管疾病。

所述容器可以为任何适用于容纳本发明血小板或者组合物的材料，如管形瓶或者安瓿。它可以由任何适宜的材料制造，如玻璃、塑料、金属或者纸张或者纸制品。在实施方案中，它为可以例如通过塞子、塞子和卷边封盖(crimp seal)或者塑料帽或者金属帽如螺帽来密封的玻璃或者塑料安瓿或者管形瓶。通常，所述容器和密封由可以通过加热(干式加热或者湿式加热)、辐照(紫外线、 $\gamma$ 射线等等)或者暴露于化学品进行灭菌的材料制成。优选地，在将本发明血小板或者组合物引入到容器之前对容器进行灭菌。一般地，所述容器将具有足以容纳本发明血小

板或者组合物的大小，另外具有允许加入另外的可以用于再水化容器中血小板或者组合物的物质如为无菌水或者盐水或者二者混合物的顶部空间。在实施方案中，所述容器含有足量的血小板以进行根据本发明方法的至少一个实施方案。由此，在实施方案中，所述容器含有足量的血小板以用于治疗遭受出血或者出血病症的个体的一个剂量、两个剂量或者更多个剂量，或者足量的血小板以用于至少一次诊断测定。包含于所述容器中的血小板的量可以由本领域熟练技术人员基于多种参数在不过度试验的情况下进行选择，所述参数包括但不限于，患者体重、治疗的出血或者出血病症的类型、在给定时间内将要给药的剂量(例如，在组合物水化后24小时时间内)和诊断设备的敏感性。

在实施方案中，所述容器作为试剂盒的组件进行提供，其包括适宜的包装和任选的与试剂盒内容物相关的说明书和/或其它信息。一般地，所述试剂盒由坚固材料如纸板或者塑料制造而成并且可以含有直接印刷在其上的说明书或者其它信息。在实施方案中，所述容器或者试剂盒包含其它组分，如一种或者多种凝固级联的纯化组分、影响凝固级联的药物、一个或者多个涂药器、一个或者多个用于血小板给药位置的覆盖物(covering)或者包衣等等。所述试剂盒可以包括含有本发明血小板和/或组合物的多个容器。在这种试剂盒中，各个容器可以大小相同，并且含有与其它各个容器相同量的血小板或者组合物。另外，不同容器可以大小不同和/或含有不同量的血小板、组合物或者具有不同组分的组合物。本领域熟练技术人员应当可以马上意识到，可以根据本发明设想许多不同构型的容器尺寸和容量，由此不需要在此对所有变化进行明确说明。

虽然为了其中将血小板直接给药至出血位置的体内治疗学目的，可以将任何适宜量的血小板提供在试剂盒的各个特定容

器中或以总量在试剂盒中，但所述试剂盒一般将含有至少一个含有至少或者约 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 个血小板的容器。在实施方案中，至少一个容器含有至少或者约 $1 \times 10^8$ 个血小板、 $1 \times 10^9$ 个血小板、 $1 \times 10^{10}$ 个血小板或者 $1 \times 10^{11}$ 个血小板。对于其中将血小板作为可注入或者可注射止血剂给药的体内治疗学目的，一般至少一个容器将含有至少约 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个血小板。同样地，对于体外诊断或者研究目的，一般至少一个容器将含有至少约 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个血小板。应当注意，上述量一般为各个容器的一般含量，还可以预期其它更高或者更低的量。由此，在实施方案中，所述试剂盒将提供足量的血小板从而治疗需要血小板的对象，如进行手术或者具有流血伤口的患者。例如，所述试剂盒可以包括一个或者多个各自含有 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个用于伤口治疗的血小板的管形瓶。应用所述试剂盒的治疗方案可以包括给药10个剂量的血小板(在再水化之后)。在其它实施方案中，血小板以足量提供在试剂盒中以对血小板或者血小板来自其的动物物种的血液凝固系统进行研究。在其它实施方案中，血小板以足量提供在试剂盒中以对血液凝固系统的至少一个功能如血小板功能进行至少一种诊断测定。例如，用于诊断目的的试剂盒可以包含多个管形瓶，所述管形瓶各自含有200,000 ~ 1,000,000个血小板。在某些实施方案中，所述试剂盒仅仅是含有与一升或者一品脱血液的血小板量等量的冻干血小板的容器。

在另一方面，本发明提供治疗需要血小板或者一种或多种血小板功能的对象的方法。通常，所述方法包括获得血小板、源于血小板的微粒或者二者；和将它们给药至需要血小板或者一种或多种血小板功能的对象。本发明此方面的有利特征在于它提供具有不同应用的不同实施方案。总体而言，可以将所述

方法理解为包括，以足以将个体血液的止血性能升高至可检测地高于给药之前水平的量将本发明血小板或者组合物给药至个体。由此，本发明方法通常包括将本发明组合物给药至个体，从而将足以克服折磨所述个体的疾病或者病症、或者创伤或者外伤的缺陷的血小板量递送至所述个体。例如，在实施方案中，提供使用血小板、微粒和/或组合物治疗涉及出血的创伤或者伤口的的方法，其中所述血小板、微粒和组合物能够通过直接施加(如通过局部给药)而不是本领域典型的输注新鲜或者有效期内血小板，给药至需要的患者。另一方面，本发明提供使用血小板、微粒和/或组合物治疗涉及出血的创伤或者伤口的的方法，其中所述组合物、微粒和/或组合物能够通过输注或者注射冻干血小板、微粒或者组合物给药至需要的患者，而不是通过本领域典型的输注新鲜或者有效期内血小板。

基于发明人的知识，本发明首次提供冻干血小板用于体内治疗学目的的应用。它还提供再水化冻干血小板用于体内治疗学目的的应用。同样地，本发明提供冻干微粒和再水化冻干微粒用于体内治疗学目的的应用。现已出乎意料地发现，当给药表现多种形式血友病或者药物诱发凝血病的临床特征的个体时，所述再水化冻干血小板倒转了临床作用并且由此降低了在这些个体中凝固所需的时间。这是令人惊讶地，因为所述个体一般不会表现出低血小板数或者异常血小板功能。

根据治疗方法，给药可以通过直接将血小板或者一种或多种组合物应用至出血位置而得到实现。同样地，所述给药可以通过直接将血小板或者一种或多种组合物应用至紧接出血位置的位置而得到实现。由此，它可以通过将血小板、微粒或者组合物提供在绷带或者其它载体中得到实现，所述绷带或者其它载体可以与出血位置相接触而放置。它还可以通过将血小板或

者一种或多种组合物输注入进行治疗的对象血液系统中而得到实现。另外地，它还可以通过将血小板或者一种或多种组合物注射入进行治疗的对象血液系统中而得到实现。

本发明的方法可以用于治疗涉及出血的创伤或者伤害。它们还可以用于多种其它如本文所述的治疗中。所述出血可以是由于何种原因出血，但是一般是由于创伤或者其它外伤(包括手术)或者出血疾病或病症出血。所述方法可以用于通过例如在出血位置形成凝块完全止血，或者它们可以通过降低所述位置的出血量促进伤口愈合，在某些情形中，通过充当患者血液系统提供的凝固形成过程中的添加剂或者助剂促进伤口愈合。

所述对象可以为任何需要血小板或者一种或多种血小板功能的对象。例如，所述对象可以是遭受流血伤口的对象或者患有出血疾病或病症的对象。所述对象或者患者可以为动物，如陪伴宠物(例如，狗、猫、啮齿动物、鸟)或者家畜(例如奶牛、绵羊、马、山羊、鸡)。它还可以是实验室动物，如啮齿动物(例如，大鼠、小鼠)、兔或者猴子。它可以是人类。通常，它可以是任何动物，包括但不限于哺乳动物。

本发明包括冻干处理的血小板和血小板微粒的混合物、或者再水化血小板和由它们获得或者得到的微粒的混合物的二元应用。由此，在一方面，可以将本发明的血小板和组合物用作非注入止血剂，所述止血剂不仅可以在脉管系统的低压区域用于迅速止血，而且也可以在高压区域如腹主动脉、股动脉、颈动脉和其它不服从当前止血控制方法如人工挤压和/或应用止血器的血管，用于迅速止血。

在多种实施方案中，本发明提供体现以下思想的组合物和治疗方法：含有冻干血小板、冻干微粒或者冻干血小板和冻干微粒的组合物，和包括其任何形式，包括冻干粉末、气雾剂系

统、蒸气合剂、绷带等等形式的衍生品和变型的所述组合物的用途，通过将所述组合物施用至伤口或者创伤用于治疗涉及出血的伤口或者创伤；组合物和其作为止血剂阻止出血的用途，包括低压和/或高压血管的严重出血，所述血管例如但不限于腹主动脉、冠动脉、股动脉、颈动脉、肝动脉、腹动脉、肾动脉、髂(iiliac)动脉和其它主要血管，其中将止血剂制剂直接给药至出血位置或者其附近，而不是给药至较远位置如输注和系统递送组合物的情形；和在治疗方法中意欲用作非注入止血剂的本发明组合物、其衍生物和任何变型，以应用至外科手术/外伤位置，从而降低出血总量和降低对输血的需要。本发明还提供体现以下思想的组合物和治疗方法：意欲用作非注入止血剂的组合物、其衍生物和任何变型，以用于控制先天性或者获得性凝血病出血；意欲用作非注入止血剂的组合物、其衍生物和任何变型，以用于控制进行抗血栓性药物治疗的患者出血；意欲应用在侵入性手术如但不限于脾手术、肝切除术、胰十二指肠切除术和胆囊切除中用作封闭剂的组合物、其衍生物和任何变型，从而控制出血和促进组织再生；意欲用作病理学条件如但不限于糖尿病性溃疡、皮肤溃疡和其它非愈合性伤口的局部/伤口愈合应用的组合物、其衍生物和任何变型。本发明进一步提供体现以下思想的组合物和治疗方法：意欲用作促进局部伤口愈合试剂的组合物、其衍生物和任何变型；意欲用作减少瘢痕形成的试剂的组合物、其衍生物和任何变型；意欲用作吻合适应症试剂(anastomosis indications)的组合物、其衍生物和任何变型；和用于治疗与削弱的或者不适当的血管形成相关的条件和涉及脉管系统或者内皮细胞的疾病的组合物、其衍生物和任何变型。这些可以为，但不限于与老化相关的黄斑变性、冠状动脉病、末梢血管病、小岛细胞移植、骨折和肌腱恢复、再造手术、组

织工程、再狭窄、癌、糖尿病性视网膜病、风湿性关节炎、牛皮癣、血管瘤/AIDS-相关的卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)和动脉粥样硬化血小板破裂等等。由此，在多种应用中，本发明组合物可以用作止血剂和用于加速伤口愈合过程。

因此，本发明提供使用血小板、微粒和组合物用于在此所讨论的体内和体外目的的使用方法，如治疗需要至少一种血液凝固组分的对象的方法。

在实施方案中，本发明提供治疗需要或者怀疑需要一种或者多种正常血液凝固系统组分的对象的方法。因为本发明血小板提供至少一种足以克服血友病和治疗诱发的凝血病形式的缺失的因子，因此本发明组合物可以用于治疗患有血友病或者凝血病形式的个体。通常，所述方法包括，以足以将个体的血液止血性能升高至可检测地高于给药之前水平的量将本发明组合物给药至个体。由此，本发明的方法通常包括将本发明组合物给药至个体，从而将足以克服折磨所述个体的疾病或者病症的缺失的量的血小板递送至所述个体。

在实施方案中，所述方法治疗患有血友病的个体。所述血友病患者可以患有血友病A、血友病B、血友病C或者具有抑制剂的获得性血友病。同样地，任何水平的血友病(完全、严重或者中等)都可以根据本发明的方法得到治疗。

在其它实施方案中，所述方法治疗正在用抗凝血剂或者其它试剂进行治疗或者导致凝固系统受到损害的疗法的患者。由此，在实施方案中，所述方法为治疗化学疗法诱发的血液凝固病症、与血小板减少症不同的辐射诱发的血液凝固病症、或者由于暴露于一种或者多种有害环境剂而产生的血液凝结凝固病症的方法。优选以产生的血小板数不超过剩余血小板数两倍的量给药本发明组合物。换言之，如果受者的基准数为200,000



个血小板/ $\mu\text{l}$ ，那么应当以约 $10^{11}$ 个血小板的剂量给药所述产品，设计的该剂量将基准数增加至约每剂量50,000个血小板/ $\mu\text{l}$ 。取决于出血的本性、位置和严重程度，为了实现止血可能需要两个或者更多个剂量。

由此，本发明预期本发明血小板用于治疗出血病症，特别是其中患者血小板数正常或者不认为临床异常的那些出血的应用。由此，本发明预期本发明血小板用于治疗所有形式的先天性血友病、具有抑制剂的血友病、获得性血友病和药物诱发凝血病的应用。它进一步预期所述血小板用于在例如介入心脏病学过程期间中和肝素的应用，和作为低分子量肝素的解毒剂和直接或者间接因子Xa抑制剂的应用。本发明可以进一步将所述血小板用于增强重组因子VIIa效果的辅助疗法中。同样发现了例如在轻链淀粉样变性期间，其在获得性因子X缺失治疗中的应用。还发现了它在治疗凝血因子缺失而不是治疗因子II(凝血酶原)或者因子I(血纤蛋白原)缺失中的用途。本发明和公开的血小板还可以在作为肝功能失常的结果存在的瞬时凝血病如与肝功能衰竭或者肝移植相关的瞬时凝血病和作为可以导致尿毒症的肾衰竭的结果存在的瞬时凝血病的治疗中具有用途。本发明血小板的其它应用包括在GPIIb/IIIa拮抗剂治疗(例如，作为解毒剂)和vWD治疗中的用途。

由此，本发明所述方法可以进一步包括二次或者更多次给药本发明组合物。因此，本发明方法包括其中重复给药一次或者多次的治疗方案。连续给药可以包括相同量或者不同量的血小板衍生物，并且可以含有或者不含有另外的组分。其量和组合物组分的选择可以由本领域熟练技术人员基于多种参数如对象年龄、重量、病史、临床报告和辅助临床报告等等进行选择。对治疗方案进行的适当变化和调整在本领域熟练技术人员的能

力范围之内，不需要进行过度试验。由此，本发明方法可以包括多次给药本发明组合物，各次给药通过预定时间进行间隔。例如，对于血友病的预防性治疗，本发明组合物可以每周给药一次或者每两周给药一次。基于治疗的疾病或者病症，其它适宜的方案将是明显的。

所述方法可以进一步包括给药其它生物活性剂如凝固因子和用于治疗癌症的化学治疗剂。它还可以包括用物理方式如利用辐射进行治疗。存在多种和不同的对于本领域熟练技术人员显而易见的附加治疗，可以将任何所述治疗包括在本发明方法中。

在将它们给药至所述对象之前，所述方法可以包括任选的再水化冻干血小板和/或微粒的步骤。

本发明的一方面是将非自体性血液制品用作本发明组合物的来源。更具体而言，当前可利用的用于治疗出血的基于血小板的止血产品使用从需要治疗的患者中抽取的血液(即，自体性献血)。本发明不需要本发明组合物来源的自体性供血。事实上，本发明甚至不必依赖新鲜或者有效期内血小板。也就是说，现已令人惊讶地发现，当作为冻干血小板、冻干血小板组合物(可以或者不必含有大量微粒)或者含有再水化冻干血小板的组合物提供时，如供血后六天到九天之间的那些过期血小板可以提供适宜的血小板功能。

鉴于本发明所述方法，本发明提供本发明组合物在制备治疗有效的组合物或者制剂中的用途。这些组合物或者制剂可以用于治疗出血以及用于治疗血友病或者其它导致缺少正常凝固、或者涉及低水平或者不存在一种或者多种凝固因子的疾病或者病症。因此，本发明提供本发明组合物或者制剂在治疗血友病或者其它特征为低水平或者不存在一种或多种凝固因子的

疾病或者病症中的用途。其它非限制性例证实施方案包括血小板衍生物用于治疗与肝损伤、肝功能衰竭或者肝移植以及肾衰竭(尿毒症)相关的出血素质的用途。

用于治疗遗传性或者获得性出血病症的生效和有效止血剂必须提供迅速控制出血,从而防止由于创伤或者手术所造成的无法接受的出血,和最小化由于微生物侵入或者消极影响其它身体组织(包括关节)的血液蛋白活化而对身体其它位置的伴发性损伤。在此方面,通过提供用于治疗需要一种或者多种涉及凝固过程的因子的个体的组合物和方法,本发明满足了本领域需求。可以根据本发明进行治疗的疾病或者病症包括所有形式的血友病,包括血友病A、血友病B、血友病C和具有抑制剂的获得性血友病和由于用抗凝血疗法治疗而产生的不充分凝固。本发明至少部分基于以下发现,血小板衍生物可以用于治疗具有完全正常的血小板数和血小板功能的人中的凝固病症。本发明将多种形式的血小板用作活性剂,从而对血友病患者和其它需要的对象提供正常或者假正常止血性能,和对血友病患者以及其它受到导致出血的外伤的需要对象提供止血性能。由此,在优选的实施方案中,本发明提供用于治疗药物诱发的凝血病和用于促进促凝血药物效果的冻干(冷冻干燥)的海藻糖稳定的血小板。根据本发明,凝固至少部分得到了促进,因为所述血小板含有促进与内源性因子如维生素K-依赖型凝固因子(即,因子II、VII、IX和X))结合的天然带负电荷的磷脂表面。

在优选的实施方案中,本发明利用冷冻干燥促凝血血小板和血小板衍生物以产生或者促使凝块形成,推定其通过将凝血因子结合到血小板衍生物表面,从而促进凝血酶产生和凝块形成。在不受任何具体理论限制的同时,当前获取的数据与一种或多种凝结蛋白或者由血小板贮存颗粒内部产生,即,源于血

小板，或者外部结合血浆(即源于冻干之前的血浆)的理论一致。

本发明进一步包括使用血小板和再水化血小板逆转药物诱发的凝血病，特别是通过心肺直视手术(cardiopulmonary bypass surgery)期间通常应用的牛胰蛋白酶抑制剂(Trasylo1®， Bayer)或者肝素诱发的那些。因此，本发明包括治疗正在进行抗凝血疗法或者最近进行了抗凝血疗法的患者。

推定该系统通过以下方式产生作用：提供失去的凝固因子或者直接在血小板表面上的凝固因子，其中它可以克服缺少的凝固因子或者直接绕过抗体抑制剂或者有缺陷的凝结蛋白的作用，从而促进止血。

在本发明提供多种优点中，一个优点是成本节约和可用性。熟知用于血友病患者的的大多数疗法的每个有效剂量的成本约\$10,000。由此，对于该病症的治疗，血友病患者一般每年花费超过\$100,000。

在另一方面，本发明提供将冻干血小板或者由此得到的重构血小板用于诊断或者研究目的的方法。所述诊断方法一般在体外进行，但是如果期望，也可以在试验动物体内进行。通常进行所述诊断方法以诊断出血病症和引起那些病症的原因。研究方法通常涉及发现出血病症的原因，如特定个体不能响应于创伤或者其它损伤正常控制出血的分子依据。所述研究方法还可以涉及药物治疗对于个体血液凝固系统的影响(例如，不利地影响血液凝固的副作用)的研究或者对血液凝固一般过程或者明确关于该过程中一个或者多个特定步骤的影响的研究。

在诊断方法中，所述方法可以为诊断血液凝固系统疾病或者病症的方法。这些方法通常包括，获得冻干血小板，将所述冻干血小板与从患有或者怀疑患有血液凝固系统疾病或者病症的患者中除去的小板和/或血浆合并从而形成混合物，和通过

测定所述混合物的一种或者多种生物学或者生物化学功能来确定所述个体是否患有血液凝固系统缺陷，其中所述缺陷降低或者消除了患者血液凝固系统实现正常功能或者使得凝块在预定时间段内形成的能力。一般，确定患者的血液凝固系统是否具有缺陷包括测定所述混合物的凝固时间。可以在使用之前对所述冻干血小板进行再水化。

所述冻干血小板可以得自于凝固系统状态已知(例如，具有完全功能的凝固系统或者在一种或者多种凝固因子中存在缺陷)的一个或者多个供血者。当所述冻干血小板得自于公众血库中的血小板混合物时，关于血小板功能，可以假定它们是“正常”或者“功能完全的”。另外，所述冻干血小板可以得自于正在进行或者将要进行可能影响血小板功能的治疗方案的患者。同样地，所述冻干血小板可以得自于已经完成了影响或者可能影响血小板功能的治疗方案的患者(无论是完成了全部治疗方案还是由于不利的副作用而早期放弃了该治疗方案的患者)。

类似于所述冻干血小板，所述新鲜血小板或者血浆可以得自于凝固系统状态已知(例如，具有完全功能的凝固系统或者在一种或者多种凝固因子中存在缺陷)的一个或者多个供血者。当所述新鲜血小板或者血浆得自于公众血库中的血小板混合物时，关于血小板功能或者血浆补体，可以假定它们具有“正常的”或者“功能完全的”。另外，所述新鲜血小板或者血浆可以得自于正在进行或者将要进行可能影响血小板功能的治疗方案的患者。同样地，所述新鲜血小板或者血浆可以得自于已经完成了影响或者可能影响血小板功能的治疗方案的患者(无论是完成了全部治疗方案还是由于不利的副作用而早期放弃了该治疗方案的患者)。

不论冻干血小板和新鲜血小板或者血浆源如何，所述方法

都包括合并二者从而形成混合物。然后对混合物进行测定，从而获得所述混合物的一种或者多种生物学或者生物化学功能。优选对凝固系统的一种或者多种功能如聚集能力进行测定。所选择的功能或者活性与“正常”水平的功能或者活性水平的对比使人们确定这些水平是否存在差异。水平上存在差异说明存在血液凝固系统疾病或者病症。

在示例性的实施方案中，所述方法包括将由公众血库得到的冻干血小板与从患有或者怀疑患有血液凝固系统疾病或者病症的患者中分离的新鲜血小板合并，从而形成混合物，和通过测定所得混合物的一种或者多种生物学或者生物化学功能确定该个体是否具有血液凝固系统缺陷。根据本发明的该方面，如果存在缺陷，那么该缺陷降低或者消除了患者血液凝固系统正常发挥作用或者使得凝块在预定时间内形成的能力。

在其它示例性实施方案中，所述方法包括，将从开始治疗方案之前的患者得到的冻干血小板与从治疗方案期间或者治疗方案完成之后的患者中一次或者多次得到的新鲜血小板或者血浆合并，从而形成混合物。该方法进一步包括确定上述混合物的凝固能力，该能力表明所述治疗方案是否诱发凝固系统疾病或病症，或者是否恶化潜在的但从未意识到的患者凝固系统的疾病或者病症。

根据以上的讨论，所述来自于患者的冻干血小板和血小板可以由任何来源提供。可以通过任何适宜的方法如本领域熟知的合并两种真核细胞的那些合并二者。此外，确定患者是否患有一种或者多种血液凝固系统缺陷可以通过任何适宜的技术完成，如上所述。

在实施方案中，所述确定包括检测混合物中血小板的存在或者聚集量。通常，低水平的聚集表明血液凝固活性中的缺陷

或者缺失，而高水平的聚集表明正常或者可接受水平的活性。一般，确定患者的血液凝固系统是否具有缺陷包括测定所述混合物的凝固时间。

除了上述公开的基本步骤之外，所述方法还可以包括其它步骤。例如，在将它们与血液合并之前，所述方法可以包括获得冻干血小板的步骤。在实施方案中，所述冻干血小板得自于正在进行测定的患者，和所述冻干血小板为早些时候如在开始药物方案之前获得的血小板。所述方法还可以包括将一种或者多种对血小板或者凝固系统的其它参与细胞或者分子具有已知影响的药物或者其它物质加入到血小板中，和确定所述加入对凝固功能的影响。通过选择具有已知活性的具体药物，有可能确定导致疾病或者病症的准确原因。利用上述知识，可以实现适当的治疗方案。

在某些应用中，所述方法可以为监控血液凝固系统疾病或者病症发展的方法。这些方法通常包括，获得冻干血小板，将所述冻干血小板与从患有所述疾病或者病症的患者中除去的小板和/或血浆合并从而形成混合物，和确定所述混合物的血液凝固能力。一般地，确定混合物的血液凝固能力表明患者血液的血液凝固能力，并且其包括测定混合物的凝固时间。此外，一般随时间流逝进行多个测定，从而得到疾病发展随时间流逝的指征。通过比较两个时间点，可以确定在两个时间点之间是否存在疾病或者病症(如果存在的话)状态变化。该信息尤其可以帮助医生或者患者确定是否继续进行特定的治疗方案。可以在使用之前对所述冻干血小板进行再水化。

所述方法还可以为监控患者治疗方案对该患者血液凝固系统的影响的方法。通常，这些方法包括，获得冻干血小板，将所述冻干血小板与从进行所述治疗方案的患者中除去的小板

和/或血浆合并从而形成混合物，和确定所述混合物的血液凝固能力。一般地，确定混合物的血液凝固能力表明患者血液的血液凝固能力，并且其包括测定混合物的凝固时间。此外，一般随时间流逝进行多个测定，从而得到治疗方案的效果随时间流逝的指征。可以在使用之前对所述冻干血小板进行再水化。

由此，在实施方案中，本发明提供监控患者治疗方案对该患者血液凝固系统的影响的方法。通常，所述方法包括，合并冻干血小板和新鲜血小板两次或者更多次(对于冻干血小板、新鲜血小板和/或血浆中的一者或者二者)，和确定血液凝固系统疾病或者病症是否存在于获得冻干血小板或者新鲜血小板或者血浆的个体中。通过两个时间点的比较，可以监控治疗方案对所述个体血液凝固系统的影响。在该方法中，冻干血小板、新鲜血小板或者血浆中、或者其二者可以得自于相同个体(即，患者)。通过比较两个或者更多个时间点获得的信息，尤其可以帮助医生或患者确定是否继续特定的治疗方案。

在另一实施方案中，本发明提供监控血小板一种或者多种功能的方法。通常，所述方法包括，获得冻干血小板，将它们暴露于一种或者多种可以对血小板功能产生影响的物质，和确定所述物质是否影响一种或者多种血小板功能。该方法可以在将冻干血小板暴露于上述物质之前、期间或者之后，进一步包括重构冻干血小板。获得冻干血小板和对它们重构可以通过任何上述方法或者本领域已知适用于所述目的的方法实现。

确定所述物质对血小板功能的影响可以通过本领域熟练技术人员熟知的任何宽范围的工艺。所述工艺对于本领域熟练技术人员是熟知的，由此在此不必详叙。确定所述物质对血小板的影响的示例性工艺包括但不限于，测定血小板参与凝块形成(在此还指体外测定时的聚集)能力的技术。聚集可以通过组合



物的光散射量进行确定，并且可以使用简单光电电池或者专门的凝集计进行确定。可以用于检测聚集的分子包括但不限于肾上腺素、ADP、凝血酶、凝血酶受体活化肽(TRAP)、胶原和凝血噁烷(thromboxane)。

确定所述物质对血小板功能的影响可以包括，检测含有冻干血小板和新鲜血小板的含血小板组合物的聚集量。如下详述，本发明冻干血小板具有多种，如果不是全部的话，新鲜血小板的功能特性。然而，其中多种功能以不足以促进凝固的水平存在。有趣地，虽然所述功能可能在不足以促进正常水平凝固的水平上，但是如果其它可以提供不充分功能的血小板存在，那么冻干血小板可以参与正常或者接近正常的凝固。由此，在实施方案中，新鲜血小板提供一种或者多种在冻干血小板中不足的或者缺少的功能，并且可以检测到凝固。

在本发明实施方案中，本发明冻干血小板在没有其它血小板如新鲜血小板辅助时具有降低的凝固能力的事实，提供了新鲜血小板不能单独提供的优点。实际上，该特性使得冻干血小板和冻干血小板与新鲜血小板的组合物对凝固系统抑制剂更为敏感和对凝固系统缺陷敏感。由此，通过利用冻干血小板，可以检测凝固系统中的缺陷。所述系统，并且特别是冻干血小板的测定，使得用户可以调节试验样品的凝固系统和形成对在凝结能力中小变化高度敏感的系统。

此外，合并取自于影响血小板功能的治疗之前的供血者的预定量的冻干血小板，与取自于开始治疗后(例如，在治疗期间或者停止治疗之后)的供血者的预定量的新鲜血小板将产生具有等于或者大于单独新鲜血小板的凝固性能的组合物。实际上，这使得冻干血小板和新鲜血小板的组合物对凝固系统抑制剂敏感，并且使得组合物对凝固系统缺陷更为敏感。由此，通过利

用含有冻干血小板和新鲜血小板的组合物，可以比单独使用新鲜血小板更高的敏感性测定凝固系统缺陷。

在本发明实施方案中，所述冻干血小板保持了新鲜血小板的表面标志。实际上，这使得血小板尤其对糖蛋白IIb/IIIa、糖蛋白Ib、血管性血友病因子和血纤蛋白原中的缺陷以及其它缺陷敏感。这还使得所述血小板对无纤维蛋白原血症、Thrombasthenia、vWF病、巨大血小板综合症、分泌/信号转导的受体缺陷病症、贮藏池病(Storage Pool Deficiency)、减少的凝血噁烷合成、信号转导/基本分泌缺陷(Primary Secretion Defects)和血小板凝血活性缺失更为敏感。由此，通过利用冻干血小板，可以检测血小板缺陷和凝结系统中的缺陷。

所述监控方法可以包括，从一个供血者获得多个样品和将样品彼此和/或与标准曲线对照，从而确定一种或者多种血小板功能的存在和/或功能水平。可以随时间流逝获得样品和进行对比，从而确定一种或者多种治疗方案对一般血小板功能或者凝结固统的影响。还可以对它们进行分析，从而确定在供血者血液中存在支持手术或者其它可能出血液过程的足够数目的血小板。可以将获得的样品作为新鲜样品短期贮存起来，或者可以对所述样品进行处理，从而产生后来进行重构和测定的冻干血小板样品。

此外，所述监控可以包括，从一个供血者获得多个样品和将样品彼此和/或与标准曲线对照，从而确定一种或者多种血小板功能的存在和/或功能水平。例如，可以测定无纤维蛋白原血症、Thrombasthenia、vWF病、巨大血小板综合症、分泌/信号转导的受体缺陷病症、存储库缺失、减少的凝血噁烷合成、信号转导/基本分泌缺陷或者血小板凝血活性缺失。

正如本发明的其它方法一样，可以将多种药物或者其它物

质加入到测定混合物中,从而确定疾病或者病症中的具体缺陷。对具体缺陷源的认识可以使得治疗方案得到发展。

在实施方案中,所述方法包括,从公众血源或者开始治疗方案之前的患者中获得冻干血小板,从开始治疗方案之前的患者或者公众血源中获得新鲜血小板或血浆,和进行治疗方案期间的患者中一次或者多次获得新鲜血小板或者血浆。所述方法进一步包括确定冻干和新鲜组分的组合物的血液凝固能力。一般地,确定混合物的血液凝固能力表明患者血液的血液凝固能力,并且其包括测定混合物的凝固时间。此外,一般随时间流逝进行多个测定,从而得到治疗方案的效果随时间流逝的指征。

公众可以采用用于各种疾病和病症的多种治疗方法。这些治疗中的一些,在有效治疗特定疾病或者病症的同时,产生降低或者消除血液凝固系统一种或者多种功能的不期望的作用(即,副作用)。其它治疗明确设计为促进或者抑制患者血液凝固系统的活性。在任何情况下,通常理想的是监控患者血液中药物的存在和/或浓度,并且特别是监控那些药物对患者血液凝固活性的影响。本发明方法使得人们可以简单和迅速地监控这样的影响。

应当注意,所有监控和诊断方法都可以包括一个或者多个对照反应。对照反应的概念是本领域熟练技术人员所熟知的,可以将多种对照反应类型包括在本发明的方法中,从而监控所述方法中一步或者多步的有效性和成功性。在可以进行的更普遍的对照反应中,所述反应为涉及冻干血小板作为血小板唯一来源的反应、涉及新鲜血小板作为血小板唯一来源的反应、其中将一种或者多种已知物质(对血小板功能或者凝固系统功能具有已知影响)暴露于新鲜血小板(例如,阳性对照)的反应和其中除了血小板之外没有物质加入的反应(例如,阴性对照)。所

述对照反应包括形成标准曲线的反应。因为本发明方法当利用精确测定量的正常冻干血小板和正常血清或者血液进行时，提供可重复的聚集特性，因此可以产生标准曲线并且可以将这些标准曲线用作比较试验样品多种特性，包括但不限于，血小板数/浓度、血小板参与凝固的能力和在血小板上存在或者不存在功能表面蛋白的基础。

还应当注意，虽然在此公开的方法适于使用冻干血小板和新鲜血小板或者血浆，但是冻干血小板可以根据本发明的方法与全血、血小板、血浆、纯化的凝结蛋白和血液系统其它组分合并。使用的术语“新鲜血小板”和/或“新鲜血浆”应当理解为包括所有其它类型的新鲜血液制品。此外，术语“新鲜”并不必须要求严格的时间相关性。相反地，它仅仅用于区分冻干血小板和非冻干物质。

本发明方法还可以包括，在相同条件下对相同样品实施该方法超过一次。如本领域所知，对多个等同样品进行所述方法提供了所述方法可靠性和可重复性的指征。根据本发明，可以根据本发明的此实施方案对所述方法的每一步骤或者仅仅是该方法中的某些步骤进行重复。

从以上说明书可以明显看出，所有检测和监控方法都可以包含通过测定凝固时间确定血小板数和功能水平的一般概念。由此，在实施方案中，可以将本发明方法认为是确定含有血小板的样品的血小板数的方法。同样地，在实施方案中，可以将本发明的方法认为是确定含有血小板的样品的血小板功能的方法。一般，血小板功能通过参与凝固过程的能力进行测定。

本发明冻干血小板可以表现出新鲜血小板的多种特性。这些特性之一为大小。本发明实施方案的冻干血小板与新鲜血小板具有大致相等的大小。由此，所述冻干血小板可以用于校准

用于检测和研究血小板的仪器。在冻干后，本发明血小板被有利地用于校准仪器，因为此时校准可以在任何适宜的时间进行，而不是在由新鲜血小板提供的小机会窗口时间内进行。

本发明首次认识到了冻干血小板在检测和监控影响血液凝固系统的疾病和病症中的有效性。本发明还首次认识到了冻干血小板在监控药物和药物治疗方案对给予所述药物的个体的血液凝固系统影响的有效性。实质上，本发明认识到冻干血小板适用于由新鲜血小板提供的全部诊断能力，包括监控任何和全部血小板功能。由此，本发明认识到了冻干血小板在监控个体血液的血液凝固能力中的有效性。冻干血小板可以在多种测定中用作新鲜血小板的替代物的发现，使得所述方法能够监控血液样品的血液凝固能力，并且提供对个体健康和寿命重要和关键性的信息。

### 实施例

本发明将通过以下实施例进行进一步说明，这些实施例意欲为纯粹的本发明的示例性说明，不应当认为其以任何方式限制本发明。

除非另作说明，以下试验使用的血小板是：购自于BRT Labs(Baltimore, MD)，在抽取4~24小时内使用或者在抽取后6~7天时使用；收集入酸性柠檬酸盐葡萄糖溶液(ACD)抗凝血缓冲液(1.5体积血小板+8.5体积血液)的新鲜血小板；或者过期不超过5天的过期血小板(George Washington University血库，Washington DC)。

### 实施例1：冻干血小板的制备

开发制备冻干血小板的方法，从而提供具有长期贮存期限和通过再水化的适宜特性的血小板。发现该方法提供具有有利于体外研究和体内治疗学应用的性能的冻干血小板和由所述冻

干血小板重构的血小板。

制备冻干血小板的方法包括以下步骤：

初始糖负载方法，包括：

对所有溶液、缓冲液、设备等等进行检查，从而确保每一种均处于或者接近室温，从而最小化低温对血小板的不利影响；

获得富血小板血浆(PRP)；

通过检查涡旋对血小板的适用性进行检验，如果没有观察到涡旋，那么血小板被舍弃；

对血小板组合物的pH值进行检查，pH值低于6.2的样品受到排斥；

当可应用时，将不同的血小板样品(例如，PRP)收集入塑料烧杯中；

对所述血小板组合物进行搅拌和测量pH值，如果必要，用ACD缓冲液(85mM柠檬酸钠；65mM柠檬酸；111mM葡萄糖；在去离子超滤水中；过滤)将其pH值调节至6.6~6.8；

在ACT-10仪器上对血小板数进行确定，并且对其进行稀释，从而使血小板位于ACT-10的线性范围内(约10~1000)；

将血小板相等地分入不同的离心瓶中；

必要时，通过在固定角离心机中，在 $500 \times g$ 下离心5分钟将红血球(RBC)除去，然后将富血小板血浆组分转移到新的干净烧瓶中并得到新的血小板数；

需要时，得到PRP样品以用于后续分析(5~10ml)；

通过在 $1500 \times g$ 下离心15分钟将血小板制成丸粒；

如果需要，通过抽吸将乏血小板血浆除去并且存储以用于以后应用；

将所得丸粒化的血小板再悬浮于少量体积(等于先前步骤中除去的乏血小板血浆体积的约5%)的负载缓冲液(9.5mM

HEPES; 100mM NaCl; 4.8mM KCl; 5.0mM 葡萄糖; 12mM NaHCO<sub>3</sub>; 50mM 海藻糖; pH值6.8)中;

测量再悬浮血小板的血小板数, 并且将其浓度调节至大约 1250( $1.25 \times 10^9$ /ml, 通过ACT-10设备进行测定);

对其体积进行记录;

在水浴中, 在37°C下将血小板培养2小时;

在培养期间, 对血块凝缩进行测定, 从而比较PRP和乏血小板血浆, 如果同乏血小板血浆相比, 血小板不能凝缩凝块, 那么血小板制剂被舍弃;

在培养之后, 将人血清白蛋白加入至最终浓度5%(w/v);

在ACT-10设备上对最终血小板浓度进行测量; 和

将所述血小板组合物如下冷冻干燥:

表3: 冷冻干燥方案

周期	时间(h)	贮存温度(°C)		真空(mTorr)
		开始	结束	
1	0.63	30	-45	环境压力
2	4	-45	-45	环境压力
3	1	-45	-40	100
4	12	-40	-30	100
5	12	30	30	100

#### 实施例2: 冻干血小板的制备

开发制备冻干血小板的第二方法, 从而提供具有长的贮存期限和通过再水化的适宜特性的血小板。发现该方法提供具有对体外研究和体内治疗学应用非常有利的性能的冻干血小板和由所述冻干血小板重构的血小板。

制备冻干血小板的方法包括以下步骤:

初始糖负载方法，包括：

对所有溶液、缓冲液、设备等等进行检查，从而确保每一种均处于或者接近室温，从而最小化低温对血小板的不利影响；

获得富血小板血浆(PRP)；

通过检查涡旋对血小板的适用性进行检验，如果没有观察到涡旋，那么血小板被舍弃；

对血小板组合物的pH值进行检查，pH值低于6.2的样品受到排斥；

当可应用时，将不同的血小板样品(例如，PRP)收集入塑料烧杯中；

对所述血小板组合物进行搅拌和测量pH值，如果必要，用ACD缓冲液(85mM柠檬酸钠；65mM柠檬酸；111mM葡萄糖；在去离子超滤水中；过滤)将其pH值调节至6.6~6.8；

在ACT-10仪器上对血小板数进行确定，并且对其进行稀释，从而使血小板位于ACT-10的线性范围内(约10~1000)；

必要时，通过在固定角离心机上，在 $500 \times g$ 下离心5分钟将红血球(RBC)除去，然后将富血小板血浆组分转移到新的干净烧瓶中和得到新的血小板数；

需要时，得到PRP样品以用于后续分析(5~10ml)；

通过在 $1500 \times g$ 下离心15分钟将血小板制成丸粒；

如果需要，通过抽吸将乏血小板血浆除去并且将其存储以用于以后应用；

将所得丸粒化的血小板再悬浮于少量体积(等于先前步骤中除去的乏血小板血浆体积的约10%)的负载缓冲液(9.5mM HEPES；100mM NaCl；4.8mM KCl；5.0mM葡萄糖；12mM NaHCO<sub>3</sub>；50mM海藻糖；pH值6.8)中；

测量再悬浮血小板的血小板数，并且将其浓度调节至大约



1250( $1.25 \times 10^9$ /ml, 通过ACT-10设备进行测量);

对其体积进行记录;

在水浴中, 在37°C下将血小板培养2小时;

在培养期间, 对血块凝缩进行测定, 从而比较PRP和乏血小板血浆, 如果同乏血小板血浆相比, 血小板不能收缩凝块, 那么血小板制剂被舍弃;

在培养之后, 将Ficoll 400加入到血小板中, 从而得到最终浓度6%(w/v);

在ACT-10设备上对最终血小板数进行测量(该数量一般是大约 $1000(1 \times 10^9)$ /ml);

对上述血小板进行等分, 并且利用与表3中所述的相同的冷冻干燥方案将其冷冻干燥;

在冷冻干燥之后, 在真空下将在其中冷冻干燥血小板的管形瓶塞住、立即封盖并且在烘箱中在多种温度和时间下对其进行烘烤。

需要时, 用与冷冻干燥前的体积等体积的再水化缓冲液加入到干燥血小板中对血小板进行再水化。例如, 如果对1ml组合物进行冷冻干燥, 那么为了再水化, 将加入1ml重构缓冲液。

所述再水化过程通常涉及以下物质加入: 蒸馏水; 蒸馏水溶液中的6%Ficoll-400; 蒸馏水溶液中的6%Ficoll-400、2mM氯化钙; 或者蒸馏水溶液中的6%Ficoll-400、2mM氯化钙、1mM氯化镁。

在使用之前, 使再水化血小板在室温下平衡30秒~300秒。

### 实施例3: 本发明组合物的制备

非自体性血小板购自于BRT Labs(Baltimore, MD)并且在抽取4~24小时内使用。通过低速离心( $135 \times g$ )15分钟除去红血球, 获得富血小板血浆(PRP)。通过加入1/14体积的ACD(酸性

柠檬酸盐葡萄糖溶液)将离心的PRP(没有红血球)酸化至pH6.5, 然后通过 $1000 \times g$ 下离心10分钟将其制成丸粒。将乏血小板血浆倾倒入, 并且将沉积的细胞在纸巾上弄干, 从而除去血浆蛋白质。可选择地, 通过用塑料移液吸管抽吸将剩余液体除去。将血小板再悬浮于pH值为6.8的含有50mM海藻糖的1ml无阳离子Tyrodes缓冲液中, 将血小板浓度调节至 $\sim 1.0 \times 10^9$ /ml。在37℃下将混合物培养2小时, 每半个小时将其混合一次。最后, 将白蛋白(BSA)浓度调节至用于冷冻干燥的血小板制剂的5%(w/v)。根据表3进行冷冻干燥。

在0、5、30和50kGy下对所得冷冻干燥组合物进行辐照、包装并且将其密封, 以用于多种应用。

#### 实施例4: 制造冻干血小板的备选方法

开发制备冻干血小板的方法, 从而提供具有长的贮存期限和通过再水化的适宜特性的血小板。发现该方法提供具有有利于体外研究和体内治疗学应用的性能的冻干血小板和由所述冻干血小板重构的血小板。

制备冻干血小板的方法包括以下步骤:

初始糖负载方法, 包括:

对所有溶液、缓冲液、设备等等进行检查, 从而确保每一种均处于或者接近室温, 从而最小化低温对血小板的不利影响;

获得富血小板血浆(PRP);

通过检查涡旋对血小板的适用性进行检验, 如果没有观察到涡旋, 那么血小板被舍弃;

对血小板组合物的pH值进行检查, pH值低于6.2的样品被舍弃;

当可应用时, 将不同的血小板样品(例如, PRP)收集入塑料烧杯中;

对所述血小板组合物进行搅拌和测量其pH值，如果必要，用ACD缓冲液(85mM柠檬酸钠；65mM柠檬酸；111mM葡萄糖；在去离子超滤水中；过滤)将其pH值调节至6.6~6.8；

在ACT-10仪器上对血小板数进行测定，并且对其进行稀释，从而使血小板位于ACT-10的线性范围内(约10~1000)；

将血小板相等地分入不同的离心瓶中；

必要时，通过在固定角离心机上，在 $500 \times g$ 下离心5分钟将红血球(RBC)除去，然后将富血小板血浆组分转移到新的干净烧瓶中和得到新的血小板数；

需要时，得到PRP样品以用于后续分析(5~10ml)；

通过在 $1500 \times g$ 下离心15分钟将血小板制成丸粒；

如果需要，通过抽吸将乏血小板血浆除去并且将其存储以用于以后应用；

将所得丸粒化的血小板再悬浮于少量体积(等于先前步骤中除去的乏血小板血浆体积的约5%)的负载缓冲液(9.5mM HEPES；100mM NaCl；4.8mM KCl；5.0mM葡萄糖；12mM  $\text{NaHCO}_3$ ；50mM海藻糖；pH值6.8)中；

测量再悬浮血小板的血小板数，并且将其浓度调节至大约 $1250(1.25 \times 10^9/\text{ml})$ ，通过ACT-10设备进行测量)；

对其体积进行记录；

在水浴中，在 $37^\circ\text{C}$ 下将血小板培养2小时；

在培养期间，对血块凝缩进行测定，从而比较PRP和乏血小板血浆，如果同乏血小板血浆相比，血小板不能凝缩凝块，那么血小板制剂被舍弃；

在培养之后，将人血清白蛋白加入至最终浓度5%(w/v)；

在ACT-10设备上对最终血小板浓度进行测量；和

如上表3所示将血小板组合物冷冻干燥；

## 实施例5:制造具有升高百分比微粒的冻干血小板的备选方法

开发制备冻干血小板的方法,从而提供具有长的贮存期限和通过再水化的适宜特性的血小板。发现该方法提供具有对体外研究和体内治疗学应用有利的性能并且具有高百分比微粒的冻干血小板和由所述冻干血小板重构的血小板。

制备冻干血小板的方法包括以下步骤:

初始糖负载方法,包括:

对所有溶液、缓冲液、设备等等进行检查,从而确保每一种均处于或者接近室温,从而最小化低温对血小板的不利影响;

获得富血小板血浆(PRP);

通过检查涡旋对血小板的适用性进行检验,如果没有观察到涡旋,那么血小板被舍弃;

对血小板组合物的pH值进行检查,pH值低于6.2的样品被舍弃;

当可应用时,将不同的血小板样品(例如,PRP)收集入塑料烧杯中;

对所述血小板组合物进行搅拌和测量其pH值,如果必要,用ACD缓冲液(85mM柠檬酸钠;65mM柠檬酸;111mM葡萄糖;在去离子超滤水中;过滤)将其pH值调节至6.6~6.8;

在ACT-10仪器上对血小板数进行确定,并且对其进行稀释,从而使血小板位于ACT-10的线性范围内(约10~1000);

将血小板相等地分入不同的离心瓶中;

必要时,通过在固定角离心机上,在 $500 \times g$ 下离心5分钟将红血球(RBC)除去,然后将富血小板血浆组分转移到新的干净烧瓶中和得到新的血小板数;

需要时,得到PRP样品以用于后续分析(5~10ml);

通过在 $1500 \times g$ 下离心15分钟将血小板制成丸粒；

如果需要，通过抽吸将乏血小板血浆除去并且将其存储以用于以后应用；

将所得丸粒化的血小板再悬浮于少量体积(等于先前步骤中除去的乏血小板血浆体积的约5%)的负载缓冲液(9.5mM HEPES； 100mM NaCl； 4.8mM KCl； 5.0mM葡萄糖； 12mM NaHCO<sub>3</sub>； 50mM海藻糖； pH值6.8)中；

测量再悬浮血小板的血小板数，并且将其浓度调节至大约 $1250(1.25 \times 10^9/\text{ml})$ ，通过ACT-10设备进行测定)；

对其体积进行记录；

在水浴中，在 $37^\circ\text{C}$ 下将血小板培养2小时；

在培养期间，对血块凝缩进行测定，比较PRP和乏血小板血浆，如果同乏血小板血浆相比，血小板不能收缩凝块，那么血小板制剂被舍弃；

在培养之后，将人血清白蛋白加入至最终浓度5%(w/v)；

在ACT-10仪器上对最终血小板浓度进行测量；

通过浸入液氮( $-190^\circ\text{C}$ )中60秒，对血小板浓缩物进行快速冻结；和

如上表3所示将血小板组合物冷冻干燥。

#### 实施例6：本领域用于产生冻干血小板的方法的比较例

为了产生用于与根据本发明实施方案制备的冻干血小板进行比较的冻干血小板，使用本领域已知的方案制备冻干血小板。该方法包括：

通过使用吊桶式转头(swinging bucket rotor)和非离心破碎，在 $320 \times g$ 下将血液(在CPD或者CPDA抗凝血溶液中)离心14分钟，获得PRP；

将PRP除去和转入新鲜试管中，注意避免RBC污染；

从100X原液中加入PGE1的乙醇溶液至10 $\mu$ g/ml, 并且对血小板进行计数;

在480  $\times$  g下将血小板离心25分钟;

通过抽吸将乏血小板上清液除去;

以1 $\times$ 10<sup>9</sup>/ml将血小板再悬浮于pH值为6.8的含有5mM葡萄糖和40mM海藻糖与2mM Mg<sup>2+</sup>加上10 $\mu$ g/mL PGE1(从1mg/ml原液以1:100加入)的Tyrodes磷酸盐缓冲液中(即, 4.63mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.37mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120mM NaCl, 2.67mM KCl, 2mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM葡萄糖, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM海藻糖, pH值6.8(从在乙醇中的1mg/ml的原液加入PGE1至10 $\mu$ g/ml));

如果需要, 保存少量以用于进一步测定;

在37 $^{\circ}$ C下将样品培养4小时, 通过每半小时的温和倒置将其混合;

如果需要, 将样品除去, 从而进行功能测试(例如, 凝集计和FACS);

在480  $\times$  g下将所述组合物离心15分钟;

通过抽取将上清液除去;

将所得丸粒以1 ~ 2 $\times$ 10<sup>9</sup>/ml再悬浮于含有5%人血清白蛋白、100mM海藻糖和1mM MgCl<sub>2</sub>的pH值为6.8的等渗HEPES盐水中(即, 9.5mM HEPES, 75mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.00mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM海藻糖, 5%人血清白蛋白, pH6.8);

在ACT-10设备上对血小板进行计数, 并且记录血小板数和体积;

需要时, 将样品移走并且将其存储, 以用于后期试验中(例如, 功能试验);

将血小板转入到具有阻塞封盖的冷冻干燥管形瓶中, 并且对各个管形瓶中的内容物进行称重;

利用与实施例1中相同的冷冻干燥周期将血小板冷冻干燥；  
在真空下将冷冻干燥血小板密封在冷冻干燥管形瓶中；  
在缺少干燥剂下，将冷冻干燥血小板贮存在室温或者2~8℃下；和

需要时，用无菌水对所述冻干血小板进行再水化如下：加入的水的体积=冷冻干燥之前的管形瓶重量减去冷冻干燥之后的管形瓶重量，假定1ml水=1.0g。

为了确定根据本发明实施方案制备的冻干血小板的特性，将根据以上实施例2制备的冻干血小板再水化于蒸馏水中，并且测试其多种物理和功能性能。

存在于实施例1和2中的方案、以及任选的HLA减少步骤(以下进行详述)和实施例6的对比方案的图解流程图对照示于图1中。

#### 实施例7: 根据实施例2制备的冻干血小板的表征

为了确定根据本发明实施方案制备的冻干血小板的特性，如上所述对根据以上实施例2制备的冻干血小板进行再水化，并且测试多种物理和功能性能。

在一组试验中，以剂量依赖型的方式对重构血小板促进血浆凝固时间的能力进行测定。对于这些试验，将100μl APCT(活化血浆凝固时间，Analytical Control Systems, Inc., Fishers, IN)试剂与25μl多种浓度的水-重构冻干血小板和25μl得自于商业供应商的血浆进行混合。在水浴中，在37℃下将上述混合物培养3分钟，然后将100μl 0.02M的CaCl<sub>2</sub>(37℃)加入并且对凝固时间进行确定。

从图2中可以看出，根据实施例2制备的重构冻干血小板以类似于新鲜血小板的形式，以剂量依赖方式促进血浆凝固时间。更具体而言，图2显示了多种制剂的凝固时间，包括富血小板血

浆(PRP; 栏1)、乏血小板血浆(PPP)和本发明多种浓度的冻干血小板(FDP)。可以看出, FDP表现出至少与PRP一样好的凝固能力, 但是当血小板数目降低时凝固有效性下降。

在另一组试验中, 对通过实施例2的方案制备的重构FDP促进血块凝缩的能力进行试验。简要而言, 所述过程涉及: 将约 $4.5 \times 10^7$ 个重构血小板/ml加入到1ml乏血小板血浆中。向此溶液中加入0.02M的 $\text{CaCl}_2$ , 并且在 $37^\circ\text{C}$ 下对其进行培养。对初始形成的凝块进行测量, 并且在30分钟时, 对此凝块的长度再次测量。基于零时和30分钟时的凝块长度对血块凝缩量进行计算。

从图3中可以看出, 本发明的重构冻干血小板可以与新鲜血小板相同的方式促进血块凝缩。更具体而言, 在重构FDP中的相对血块凝缩量高于PPP, 并稍低于类似量的PRP。

#### 实施例8: 冷冻干燥后加热步骤对冻干血小板尺寸和粒度的影响

为了确定实施例2中所述方案的冷冻干燥后处理步骤的作用, 对通过该方案制备的重构血小板的尺寸和粒度进行测定, 并且将其与以相同方式处理的新鲜血小板的尺寸和粒度进行比较。使用log-log设定, 在Becton Dickenson FACS caliber仪器上进行试验。血小板的特征在于它们代表性的向前和侧向散射光线图(使用凝胶过滤的血小板进行)和与FITC抗人CD41的结合。在分离的试管中, 在HMBT中将血小板稀释至 $\sim 50,000/\mu\text{l}$ , 并且在环境温度下, 以饱和剂量加入荧光-标记抗体30分钟。用2ml HMBT稀释样品并且收集10,000个个体事件。对荧光柱形图和阳性细胞百分比进行记录, 这表示与荧光标记的抗体结合的血小板数目。所得结果示于图4~6中。

图4示出了表示测定根据实施例2制备的重构冻干血小板的尺寸和粒度的试验结果的图表, 该制备使用和未使用冷冻干燥



后热处理步骤。热处理的重构FDP(在80℃下加热24小时)的尺寸分布(图4A)和粒度(图4B)事实上与新鲜血小板相同,然而未热处理的重构FDP尺寸较小并且脱颗粒化。

图5示出在从75℃至80℃至85℃的多种温度下,冷冻干燥后热处理步骤对血小板尺寸的影响,使用未加热样品作为对照。更具体而言,根据实施例2中所述过程制备的冻干血小板彼此等同地形成,直至热处理点。在热处理步骤中,在75℃、80℃或者85℃下将样品加热24小时,或者在室温下将其保持24小时。正好在进行对比分析之前制备在血浆中的新鲜血小板。将各个温度下各个时间点的样品合并,并且使用FACS分析对血小板尺寸进行测定。示于图5中的结果表明,在高达80℃的温度下加热冻干血小板18~24小时增大了血小板尺寸(即,同新鲜血小板相比,促进了尺寸保持),但是在85℃或者更高温度下加热会降低有益效果。处理18小时得到了类似的结果(数据未显示)。

图6是示出在从75℃至80℃至85℃的多个温度下,24小时的冷冻干燥后热处理步骤对血小板粒度的影响的图表,使用未加热样品作为对照。更具体而言,根据实施例2中所述过程制备的冻干血小板彼此等同地产生,直至热处理点。在热处理步骤中,在75℃、80℃或者85℃下将样品加热24小时,或者在室温下将其保持24小时。在进行分析之前制备在血浆中的新鲜血小板。将各个温度下各个时间点的样品合并,并且使用FACS分析对血小板制剂的粒度进行测定。示于图6中的结果表明,在高达80℃的温度下,特别是在约80℃下加热冻干血小板18~24小时增大了血小板粒度(即,类似于新鲜血小板的粒度),但是在85℃或者更高温度下加热会降低有益效果。培养18小时得到了类似的结果(数据未显示)。

实施例9: 同其它方法相比,冷冻干燥后热处理对冻干血小

## 板尺寸的影响

为了确定本发明冻干血小板的适用性，并且特别是利用实施例2中公开的热处理步骤产生的那些冻干血小板的适用性，测定三个样品的尺寸。第一个样品包含在血浆中的新鲜血小板。第二个样品包括根据实施例6的对比方法制备的重构血小板，其中所述冻干血小板用蒸馏水进行重构。第三个样品包括根据实施例2制备的重构冻干血小板，在80℃下应用冷冻干燥后热处理24小时并且用蒸馏水进行重构。对各个样品进行如上所述的FACS分析，所得结果示于图7中。

图7中的结果示出了各个样品的平均尺寸和粒度。对含有新鲜血小板的样品进行分析(图7A)，位于FACS图上的门或者窗口表示定位基本上所有血小板的区域。对含有根据实施例6的对比例制备的重构冻干血小板的样品进行类似地分析，位于FACS图上的门或者窗口定位于与图7A中相同的位置。最后，对含有根据实施例2中公开的方案制备的重构冻干血小板的样品进行类似地分析，位于FACS图上的门或者窗口定位于与图7A中相同的位置。从图7A、7B和7C对比中可以看出，同新鲜血小板相比，含有根据本发明重构冻干血小板的样品表现出几乎相同的尺寸和粒度分布，然而通过由对比例制备的重构血小板显著移出了新鲜血小板定位的区域。该实施例表明，根据本发明方法制备的重构冻干血小板比通过本领域已知方案制备的重构冻干血小板更类似于新鲜血小板。

## 实施例10:根据实施例2制备的冻干血小板的生物学活性表征

为了证明重构冻干血小板可以响应激动剂的加入进行聚集，将多种激动剂(0.5mg/ml的花生四烯酸、10μg/ml的胶原、300μM肾上腺素、10mM凝血酶受体活化肽(TRAP: SFLLRN)

和1mg/ml瑞斯托菌素加上20%柠檬酸化血浆和盐水加入到在400 $\mu$ l的250,000个血小板/ $\mu$ l的HEPES-Tyrodes缓冲液中的重构冻干血小板中至最终体积为500 $\mu$ l,所述缓冲液含有0.3%牛血清白蛋白(BSA)。5分钟之后,在室温下对血小板的聚集进行确定。使用标准全血细胞计数设备(得自于Beckman coulter的ACT 10)对血小板进行计数。结果表明,响应花生四烯酸、胶原、肾上腺素、凝血酶受体活化肽(TRAP)和瑞斯托菌素聚集的冻干血小板的聚集百分比经测定分别为77、83、86、93、97和10(参见以上表1)。

#### 实施例11: 通过重构的血小板表面标志的表征

在另一系列试验中,对根据实施例2制备的重构冻干血小板,在80 $^{\circ}$ C下进行热处理步骤24小时,测定通用的血小板表面标志。试验使用如上所述的FACS分析利用以下荧光抗体进行:

同种型 BD Pharminagen鼠IgG kappa

HLA BD Pharminagen抗人HLA-A-B-C

GPIb DakoCytomation鼠抗人CD42b克隆AN51

IIbIIIa DakoCytomation鼠抗人CD41克隆5b12

P-选择蛋白 BD Pharminagen抗人CD62P(cat# 555523)。

为了确定本发明冻干血小板保持与血小板功能相关的表面受体的能力,对刚好在试验前制备的新鲜血小板、利用实施例2中公开的热处理步骤生产的血小板和根据实施例6的对比方法生产的血小板进行FACS分析。所有冻干血小板都用蒸馏水进行重构。

如上所指出,对于新鲜血小板的基线计算,将以下数值进行再调节并标准化成百分比。对于新鲜血小板,将组成表达的受体GP1b、GPIIb/IIIa和HLA的百分比设定为100%。对于P-选择蛋白,当血小板休眠(resting)时该蛋白不表达(一般来说5~

10%表达), 当血小板活跃时完全表达(100%)。

相对于新鲜血小板, 利用实施例2中公开的热处理步骤生产的冻干血小板显示, 结构表达受体GP1b和GPIIb/IIIa的百分比分别为65~75%和100%。对于HLA, 相对于新鲜血小板, 当进行酸处理时, HLA表达的水平被降低至5%, 当未进行酸处理时它们保持在100%。对于P-选择蛋白, 该蛋白结构表达了冻干血小板是否活跃或者休眠。所得结果以表格形式示于以上表2中。

由此, 在实施例2中所示的热处理步骤可以有助于保持GPIb表达, 这是用于止血的重要蛋白质。

#### 实施例12: 乙醇在糖-负载缓冲液和冷冻干燥缓冲液中的作用

根据本发明一种实施方案的方案将乙醇包含在糖-负载缓冲液和冷冻干燥缓冲液中。为了确定这些缓冲液中乙醇存在的影响, 根据实施例2的方法制备冻干血小板, 在多个温度下热处理24小时, 重构和测定其大小和粒度。更具体而言, 对新鲜血小板(对照)、在负载缓冲液或者冷冻干燥缓冲液中没有乙醇的情况下用海藻糖负载的重构冻干血小板, 和在1%乙醇存在下用海藻糖负载和0.8%乙醇存在下冷冻干燥的重构冻干血小板进行FACS分析。结果示于图8中。

从图8中可以看出, 同乙醇不存在下进行的类似方案相比, 在负载缓冲液和冷冻干燥缓冲液两者中乙醇的存在改善了重构冻干血小板的尺寸分布。与此相比, 它对重构血小板的粒度没有显著影响。本发明首次提供证据表明在负载缓冲液特别是冷冻干燥缓冲液中包含乙醇有助于稳定血小板和促进负载步骤中血小板的糖吸收。

#### 实施例13: HLA降低

制备本发明冻干血小板的方法的一个实施方案包括任选的

HLA降低步骤。为了确定该任选步骤连同实施例1和2所述方法的有效性，在这些实施例中的每一个刚好在初始丸粒化血小板之后进行该任选步骤。各个实施例的HLA降低细节提供如下。

将实施例1和2的丸粒化血小板再悬浮于很少体积的还原缓冲液(9.5mM HEPES; 100mM NaCl; 4.8mM KCl; 5.0mM葡萄糖; 12mM NaHCO<sub>3</sub>; 100mM EGTA; pH4.0)中，其中该步骤中定义的很少体积的还原缓冲液等于从先前步骤中除去的乏血小板血浆的体积的约10%。在室温下培养2小时之后，将血小板用与还原缓冲液相同体积的洗涤缓冲液(9.5mM HEPES; 100mM NaCl; 4.8mM KCl; 5.0mM葡萄糖; 12mM NaHCO<sub>3</sub>; pH6.8)洗涤三次，并且如前所述对其进行丸粒化。

可以将任选步骤加入方案中，从而提供降低组合物免疫原性的灵活性。在蒸馏水中对根据以上实施例2制备的冻干血小板进行再水化，并且测定HLA在血小板表面上的量。为了分析HLA在冻干血小板表面上的含量，在Becton Dickenson FACS caliber仪器上利用log-log设置进行上述试验。血小板的特征在于它们代表性的向前和侧向散射光线图(使用凝胶过滤的血小板进行)和与FITC抗人HLA-A-B-C的结合。在分离的试管中，在HMBT中将血小板稀释至~50,000/ $\mu$ l，并且在环境温度下，以饱和剂量加入荧光-标记抗体30分钟。用2ml HMBT稀释样品并且收集10,000个个体事件(event)。对荧光柱形图和阳性细胞百分比进行记录，这表示与荧光标记的抗体结合的血小板数目。

从图9中可以看出，在不经过酸处理下，对照血小板表达了强荧光信号，然而，对于如实施例2中所述的用酸性缓冲液处理的血小板，荧光信号降低差不多95%。

#### 实施例14: 基于细胞的增殖测定

使用根据实施例4制备的组合物进行成纤维细胞和内皮细

胞增殖测定。简要而言，所述冻干血小板制备如下：将血小板收集入酸性柠檬酸盐葡萄糖溶液(ACD)抗凝血缓冲液(1.5体积+8.5体积血液)中。通过低速离心( $135 \times g$ 下15分钟)除去红血球，获得富血小板血浆(PRP)。通过加入1/14体积的ACD将PRP酸化至pH6.5，然后通过 $1000 \times g$ 下离心10分钟将其制成丸粒。将血小板丸粒再悬浮于pH值为6.8的含有50mM海藻糖的1ml无阳离子Tyrodes缓冲液中，将其调节至 $\sim 1.0 \times 10^9$ 个血小板/ml。在 $37^\circ\text{C}$ 下将混合物培养2小时，每半个小时将其混合一次。最后将白蛋白加入，至最终浓度为占全部血小板制剂体积的5%，并且对血小板制剂进行冷冻干燥。

在没有胎牛血清补充物的情况下使用介质，将分别在通道3和7的成纤维细胞和人类脐静脉内皮细胞(HUVECs)饥饿24小时。24小时之后，使细胞传代并且以10,000个细胞/孔播种在96孔平底培养皿中，使其连接2~3小时。一旦细胞得到连接，加入样品并在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的润湿培养器中培养48小时。48小时时，通过MTT测定(ATCC)对细胞增殖进行测量，其中细胞还原的MTT染料可以由590~650nm下的吸光率测定。简要而言，以1:10的比例将MTT染料加入到孔中，并且将该培养皿在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的润湿培养器中培养2~3小时。培养之后，将100 $\mu\text{l}$ 去垢剂加入并且在590~650nm下测定其光强度。将从A590-650中读取的数值用作参比增殖指数。

增殖测定结果示于图10中，这表明本发明冻干血小板对成纤维细胞和内皮细胞增殖具有基本上与新鲜血小板相同的影响。

#### 实施例15：胶原-成纤维细胞收缩测定

为了更进一步表征实施例3生产的血小板，使用这些血小板进行胶原收缩测定。对于胶原收缩测定，通过用0.05%胰蛋白

酶/0.02%EDTA处理对80%融合的成纤维细胞培养物进行收集。通过在含有0.2%BSA的PBS中加入大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶进行灭活。用DMEM+10%FBS将上述细胞洗涤两次并且以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml的浓度再悬浮。将成纤维细胞与10%FBS混合，中和胶原和浓缩DMEM，从而使得DMEM和碳酸氢钠的最后浓度为1X。在一些试验中，将FBS由30ng/ml PDGF-BB和2%BSA或者本发明重构组合物与2%BSA的稀释物替代。将所述细胞混合物的样品(0.6ml)加入到24孔组织培养皿上的孔中，所述孔预涂有2%BSA，并且在37℃下使胶原进行聚合。胶原的最终浓度为约1.8mg/ml，并且各种凝胶含有 $6 \times 10^4$ 个细胞。在进行两个小时的培养之后，将凝胶温和地从塑料表面上分离从而使其进行收缩，向各个孔中加入0.5ml DMEM+10%FBS，并且在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中将凝胶培养过夜。如果通过加入PDGF-BB使胶原凝胶进行收缩，那么向加入的介质中补充30ng/ml PDGF-BB+2%BSA而不是FBS。

胶原收缩测定的结果示于图11中。更具体而言，图11示出用本发明冻干血小板改造的胶原-成纤维细胞基体图。当将鼠尾I型胶原(rat tail type I collagen)和成纤维细胞的混合物仅仅培养在介质(对照)中、富血小板血浆(新鲜血小板)和根据本发明使用实施例4制备的组合物(FDP)中时，含有本发明组合物的样品、FDP和新鲜血小板都表现了胶原重建和收缩，然而对照样品没有显示收缩。

显示在图11中的试验用于评价本发明组合物对伤口愈合和重建的影响。虽然难于表现组织体外重建，但是已经将在三维天然I型胶原凝胶中的成纤维细胞培养用于示范伤口愈合中的伤疤形成和组织重建。多项先前研究表明，PDGF和新鲜血小板可以促进胶原凝胶的体外收缩。如图11所示，本发明组合物在

24小时培养中促进胶原收缩。由此，本发明组合物促进胶原基体再组织(reorganization)和成纤维细胞增殖，并且可以实现、促进或者帮助伤口愈合。

#### 实施例16: 组合物的物理特性评价

使用Beckman Multisizer 3 COULTER COUNTER(Fullerton, CA)对根据实施例3制备的组合物的结构组成进行测定，特别是分析其粒径。所述multisizer提供尺寸和体积分布，范围高达10 $\mu$ m内。在此使用的血小板的体积为2~4 $\mu$ m，其中小于1 $\mu$ m的任何物质都认为是血小板微粒。

图12显示了血小板制剂的multisizer分析图。该图表明该组合物由使用实施例4和5的血小板制剂内的血小板微粒的百分比组成。从图12中可以看出，通过实施例4所述方法产生的颗粒总数的约10~50%为微粒(标记为FDP-2和FDP-3的样品)，然而，通过实施例5所述方法产生的颗粒总数超过70%为微粒(FDP-1)。由此，该实施例表明，根据本发明的组合物在冷冻干燥之前暴露于极度低温或用水重构都表现为血小板微粒和完整血小板的混合物。

另外，在根据实施例4和5制备的样品中，GPIIb/IIIa和其它血小板表面标志的表达可以在血小板和微粒表面上得到检测(数据未显示)，其介导组合物组分以可逆和明确方式对涂有血纤蛋白原的固体表面的结合(数据未显示)。

#### 实施例17: 冻干血小板的凝固功能

为了进一步表征本发明组合物，对通过实施例4和5制备的冻干血小板进行试验，从而测定它们提供凝固功能的能力。

图13A表明了如图12中所示的含有不同量的微粒的冻干血小板对全血样品凝固能力的影响。图13A中所示数据如下获得：对含有400 $\mu$ l ACD全血、25 $\mu$ l 0.2M的CaCl<sub>2</sub>、25 $\mu$ l盐水和50 $\mu$ l多



种浓度的重构(再水化)冻干血小板的混合物,使用样品FDP-1、FDP-2和FDP-3确定其凝固时间。

从图13A中可以看出,全血测定结果表明,同含有较低百分比微粒的样品FDP-2和FDP-3相比,含有最高量微粒的FDP-3样品提供最短的凝固时间。

图13B表明如图12中所示的含有不同量的微粒的冻干血小板对正常库血浆样品凝结能力的影响。为了测定凝结时间,将100 $\mu$ l APCT(活化血浆凝结时间, Analytical Control Systems, Inc., Fishers, IN)试剂与25 $\mu$ l来自不同制剂FDP-1、FDP-2或者FDP-3中的多种浓度的水-重构冻干血小板和25 $\mu$ l得自于商业供应商的因子-缺失血浆进行混合。在水浴中,在37 $^{\circ}$ C下将上述混合物培养3分钟,然后将100 $\mu$ l 0.02M的CaCl<sub>2</sub>(37 $^{\circ}$ C)加入并且对凝结时间进行确定。

从图13B中可以看出,基于血浆的测定结果表明,同含有较低百分比微粒的样品FDP-2和FDP-3相比,含有最高量微粒的FDP-3样品提供最短的凝结时间。

#### 实施例18: 利用本发明组合物的体内研究

进行该试验以研究本发明组合物的止血能力和将其与广泛应用的Quikclot<sup>TM</sup>和Surgicel<sup>TM</sup>产品进行比较。该试验在Qual Tech Labs, NJ进行。用于研究的Sprague Dawley大鼠得自于Hilltop Lab Animals。试验动物为雄性、成熟、等年龄和重量为350g左右。到货后,将所述动物隔离48小时,在此之后,将所述动物成对罩在具有满足NIH需求的线罩(lid)的聚丙烯笼中。对动物室的温度进行每日记录。保持12小时的明/暗周期。自由进食Purina啮齿动物食物和自来水,但是在研究之前停止食品供应过夜。对用氯胺酮/甲苯噻嗪7:1混合物进行麻醉的大鼠进行研究,所述混合物以0.05ml/100克体重的剂量进行肌肉注射

给药。将各个试验动物置于手术板上并且将其固定。将颈部和腹部的毛发除去，并且用betadine对手术位置进行清洗。然后，暴露颈动脉并且将其分离。利用缝合丝线，将所述动脉进行动脉扎紧并且在实际可远离扎紧处夹持。在扎紧和具有20计量导管放置单元的夹钳之间，向动脉内插入导管。对导管进行固定并且将其连接至WECO血压监控器。将夹钳除去，使得血压得到稳定。在腹壁上实施约20mm长的中线切割。将腹部动脉分离，使缝合丝线在动脉下穿过，以在研究期间有助于进行定位。在此之后，用23计量针刺穿腹主动脉。将多种止血剂，包括本发明组合物，应用到出血位置上。将此与对照组进行比较。对存活进行评价，并且监控生命特征如收缩血压、心率和氧饱和30分钟时间。在研究结束时，对该啮齿类动物实施安乐死。

图14显示了比较Surgicel™、QuikClot®和本发明组合物之间出血控制的图。图14A提供表明动脉创伤位置的参照照片。如图14B所示，当用针刺穿动脉和然后将QuikClot™(2克)立即施加到创伤位置时，即使进行该方法2分钟之后，由此时在伤口的血液渗出证实，该止血剂不能阻止出血。如图14C所示，作为止血剂的Surgicel™的应用显示了相同的图案，在应用该止血剂之后仍然持续出血超过两分钟。与此相反，当使用根据实施例5的方法生产的本发明组合物时，出血迅速减少，并且在应用至伤口位置两分钟之内，出血被完全停止(图14D)。基于该数据，可以推断出本发明止血剂优于本领域已知的其它试剂，并且能够止血，甚至是严重的动脉出血，然而其它止血剂不能实现。

为了进一步评价本发明组合物的体内作用，通过在30分钟时间内监控收缩血压、平均血压和心率，对用于上述试验中的大鼠的生命特征进行监控。图15表示腹主动脉已经被刺穿、随后用本发明冻干血小板、Surgicel™和QuikClot™与对照(未向出

血位置施压)处理的啮齿动物平均血压图。使用WECO监控器测量血压30分钟。在该过程之后,将所述动物杀死。

如图15所示,在刺穿过程之后,在Surgicel™组和对照组(未向出血位置施压)中的动物的平均血压一直没有恢复。QuikClot™组中的动物的确重新获得了一些压力,但是不能恢复至正常。与此相反,当用本发明组合物处理时,在刺穿过程之后1200~1400秒内恢复了正常压力,并且该压力在研究期间都保持稳定。

对啮齿类动物的心率进行监控,仅仅发现用本发明组合物处理的组的心率迅速恢复了正常(对照组、Surgicel™和QuikClot™不能恢复)。

在整个过程中,对动物进行持续视觉监控。尽管所有动物都存活超过了30分钟,但是Surgicel™、QuikClot™和对照组的动物尽力呼吸,并且其心率非常微弱。与此相反,用本发明组合物处理的动物呼吸正常并且具有几乎正常的心率。基于该数据可以推断出,本发明组合物可以为有效体内止血剂。

由该数据可以看出,本发明组合物保持了其物理表面结构的大部分及完整性。此外,本组合物可以参与胶原重建和成纤维细胞增殖(参见先前实施例)。不受任何具体理论的限制,天然生长因子库可能已经包括在本发明组合物内,并且会有助于伤口处理以及细胞和组织再生。

所有这些迹象可以表明,本发明组合物含有限定比例的血小板和血小板微粒的独特混合物。此外,这些数据还表明,本发明组合物当应用它时能够迅速和有效封闭高压出血的主动脉。此外,该止血剂活性优于QuikClot™或者Surgicel™,并且被证实其作为能够在高压、不可压缩出血位置停止出血的止血剂是有用和有效的。

### 实施例19: 体内特性的进一步分析

为了进一步测定根据实施例4制备的组合物的性能,进一步进行体内伤口愈合研究,和进行来自这些研究中的细胞的分析。对于体内伤口愈合研究,使用糖尿病性小鼠(雄性Lepr db+/+)。将三十只动物排序,并且保持每笼五只,直至切开伤口位置为止。以60mg/kg的剂量对麻醉剂(戊巴比妥钠/戊巴比妥)进行腹膜内给药。通过掐动物脚趾和评价其屈肌退缩对麻醉深度进行评价。使用电动剃刀对麻醉小鼠的背部进行修剪。通过将除毛洗剂(基于氢氧化钙)短暂应用到皮肤和然后用温盐水冲洗除去任何残余的毛发。在手术之前,用betadine对修剪皮肤进行清洁,然后用70%EtOH对其进行擦拭。从小鼠的无发背部切开 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 的完全厚度伤口,如下所述。用钳子将皮肤夹起,用剪刀将其剪开。将皮肤提起从而确保剪切通过肉膜移动。在第一次剪切之后,用钳子将部分除去的表皮区域固定,通过进行二次或者三次另外剪切完成切割。在切割伤口完成之后,将动物分成多个试验组(每组十只动物),将相应的试验物质施用到伤口层。十只动物仅仅接受封闭敷裹;十只动物在手术当天接受 $5 \times 10^8$ FDP的单次用药;十只动物在手术当天和手术后第2、5、9和12天接受 $5 \times 10^8$ FDP的用药。将安息香酐化合物放置在伤口边缘周围和放置Tegaderm覆盖伤口。在手术之后,以 $0.05 \text{mg/Kg}^2/12$ 小时对小鼠给药丁丙诺啡24小时,从而使其在术后丧失痛觉,然后根据需要进行每日给药。在从麻醉中恢复过来之后,将小鼠转入Animal Core Facility中,在此将它们单独地关入笼中,然后每天监控两次。对小鼠的不活动性和食欲降低进行监控,并且对其伤口进行检查。在研究期间,每隔一天进行一次伤口测定。这些天中,通过气体 $\text{CO}_2$ 吸入将各组中的一只动物杀死。从这些动物中采集血液、肾和肝样品进行免疫

原性研究，并且将伤口位置除去进行免疫组织分析。从所述研究中除去任何产生伤口感染的动物。

伤口层的免疫组织分析示于图16中。数据通过以下方式得到：每三天将伤口层的组织从各组中一只动物中除去，进行着色。以小功率对着色部分进行扫描，从而鉴定具有最密集的新血管形成的区域。为了测定新血管形成，在40x放大率下系统地获得每个滑片的3个区域，一个在损伤中央，两个在伤口边缘。

在显微镜下进行的伤口层组织的细致测试显示，接受FDP、新鲜血小板和VEGF的组产生强烈的新血管形成。新近形成的血管可以在伤口边缘以及中间部分发现。当对血管的绝对数目进行计数时，接受FDP、新鲜血小板和VEGF的样品中的血管数目几乎相等。从图16中可以看出，封闭敷裹、单剂量和多剂量处理组的伤口层在第1、9和15天时的微观观察显示了升高的血管形成作用。

图17图示了图16的数据。更具体而言，图17显示了量化伤口层组织中血管数目的柱状图。因为伤口组织需要血管进行愈合，因此冻干血小板施于伤口层不仅提供用于组织再生的生长因子，而且刺激了新血管的生长。该数据表明，通过本发明组合物产生的血管数目类似于新鲜血小板和VEGF对照。由此，所述冻干血小板为有效的伤口愈合剂。

#### 实施例20：伤口闭合速率和多剂量的评价

对于此实施例，进行研究以确定与仅仅在手术当天接受1次剂量的动物和仅仅接受封闭敷裹的动物相比，多次施用冻干血小板对伤口愈合的影响。对于多剂量FDP组，动物在手术当天和手术后第2、5、9和12天接受5次 $5 \times 10^8$ 的血小板。对于单剂量FDP组，动物在手术当天接受1次 $5 \times 10^8$ 血小板的给药。封闭敷裹组中的动物不接受任何血小板。

研究结果示于图18中。该图表明，多剂量FDP组动物显示了更快的伤口闭合速率，对于完全闭合仅仅需要16天。单剂量和封闭敷裹组的伤口闭合速率较慢，对于完全闭合需要17天和21天。更具体而言，每隔一天(或者每隔两天)进行伤口测定。到第16天，多剂量组几乎实现了完全伤口闭合，然而单剂量和封闭敷裹组分别需要至少17天和21天。同样重要的是，贯穿研究持续期间，多剂量组显示了比单剂量和封闭敷裹组更小的平均伤口面积。

#### 实施例21: 伤口闭合速率和使用有效期内和过期血小板的单剂量给药的评价

为了确定多种类型的血小板和血小板制剂对于体内治疗学应用的适宜性，以单剂量测定血小板闭合伤口的能力。首先，根据实施例4制备过期一天的血小板。简要而言，将血小板收集入酸性柠檬酸盐葡萄糖溶液(ACD)抗凝血缓冲液(1.5体积+8.5体积血液)中。通过 $135\times g$ 低速离心15分钟除去红血球，获得富血小板血浆(PRP)。通过加入1/14体积的ACD将PRP酸化至pH6.5，然后通过 $1000\times g$ 下离心10分钟将其制成丸粒。将血小板丸粒再悬浮于pH值为6.8的含有50mM海藻糖的1ml无阳离子Tyrodes缓冲液中，将其调节至 $\sim 1\times 10^9$ 个血小板/ml。在 $37^\circ C$ 下将混合物培养2小时，每半个小时将其混合一次。最后，将白蛋白浓度调节至用于冷冻干燥的血小板制剂的5%。

对于该研究，将向动物单剂量应用有效期内或者过期FDP对伤口愈合的影响与仅仅应用封闭敷裹的影响进行对比。对于FDP组，动物在手术当天接受 $5\times 10^8$ 血小板的一次施用。封闭敷裹组中的动物不接受任何血小板。每隔一天(或者每隔两天)进行伤口测定。从图19中可以看出，单剂量的本发明有效期内或者过期冻干血小板需要17天以完全愈合伤口。与此相反，与以

上存在的结果一致，封闭敷裹组需要21天才能完全愈合伤口。由此，有效期内和过期血小板之间的伤口愈合能力不存在差异，它们都优于封闭敷裹方法。

#### 实施例22: 本发明组合物的递送系统

对根据本发明的组合物进行配制，从而将其悬浮于压缩空气以用于气雾剂系统中。在此系统中，压缩空气充当推进剂以将血小板组合物推动到出血位置。在此系统中，该空气向下推动组合物，迫使组合物穿过气雾剂系统的封液管和当阀门开放时穿过阀门。所述喷雾器含有插入到穿过伤口位置的腹腔中的喷嘴。所得含有本发明组合物的喷雾剂在出血位置发挥作用，从而止血。

#### 实施例23: 组合物的物理特性评价

使用Beckman Multisizer 3 COULTER COUNTER(Fullerton, CA)对根据实施例2制备的组合物的结构组成进行进一步研究，特别是分析其粒径。所述multisizer提供尺寸和体积分布，范围在高达 $10\mu\text{m}$ 。在此使用的血小板的体积为 $2\sim 4\mu\text{m}$ ，其中小于 $1\mu\text{m}$ 的任何物质都认为是血小板微粒。

从图20中示出的数据可以清楚看出，其印证了图4中的数据，本发明组合物，通过用水进行重构，保持与新鲜血小板类似的大小。此外，从图20中可以看出，制备冻干血小板的方案可以形成主要含有血小板和在一定程度上含有一些微粒的组合物。更具体而言，图20图示了根据实施例2中公开的方法制备的组合物的尺寸范围分析结果。通过再水化，再水化颗粒表现为血小板和血小板微粒的混合物，通过定径数据可以证实(图20)。据估计，微粒的百分比为在组合物中全部颗粒总数的约 $1\sim 20\%$ 之间的值。

#### 实施例24: 冻干血小板作为正常收集的血浆的校准试剂的

## 用途

如上所述，已经发现冻干血小板可以用于监控血小板的功能。在此血管中，对冻干血小板参与血液凝固的能力进行确定。为了进行上述试验，将多种量的冻干血小板与从多个正常供血者收集的血浆混合，并且对产生凝块所需的时间进行确定。

为了确定凝固时间，将100 $\mu$ l APCT(活化血浆凝固时间，Analytical Control Systems, Inc., Fishers, IN)试剂与25 $\mu$ l多种浓度的水-重构冻干血小板和25 $\mu$ l得自于商业供应商的正常收集血浆进行混合。在水浴中，在37 $^{\circ}$ C下将该混合物培养3分钟，然后将100 $\mu$ l 0.02M的CaCl<sub>2</sub>(37 $^{\circ}$ C)加入并且对凝固时间进行确定。

从图21中可以看出，加入到给定量正常血浆中的冻干血小板的量形成了标准曲线，其中凝固时间与冻干血小板的量成正比。由此，冻干血小板不仅可以参与凝块形成，而且可以用于鉴定血浆的正常凝固时间。通过比较对于给定量冻干血小板和血浆的凝固的正常时间，可以确定个体样品血液凝固能力的异常，所述样品如为得自于患有或者怀疑患有血液凝固系统疾病或者病症的患者的那些样品。

标准凝固测定依赖于血小板因子3(磷脂)以活化内源性凝血机制。其它测定法使用新鲜血小板提供磷脂组分。在本发明中，磷脂由冻干血小板而不是新鲜血小板提供。由此，所述试验表明冻干血小板不仅具有与新鲜血小板相似的物理性能，而且它们也具有类似的功能性。

## 实施例25: 冻干血小板作为乏血小板血浆的校准试剂的用途

对冻干血小板与正常血浆混合时获得标准凝固时间反应的能力的概念进行延伸，从而确定冻干血小板是否可以充当乏血



小板血浆的校准试剂。也就是说，先前试验证明，冻干血小板可以以可重现和可预期的方式参与含正常血浆的混合物的血液凝固。进行试验，从而确定冻干血小板是否同样能够与缺少血小板的异常血浆一起参与凝固反应。有意将血小板从血浆中除去，并将冻干血小板加入其中以替换新鲜血小板。样品中的新鲜血小板数可忽略(约5000血小板/ $\mu\text{l}$ )。

从图22中可以看出，加入到给定量乏血小板血浆中的冻干血小板的量产生标准曲线，其中凝固时间与冻干血小板的量成正比。由此，冻干血小板不仅可以参与乏血小板血浆中的凝块形成，而且可以用于鉴定所述血浆的凝固时间。通过比较凝固给定量冻干血小板和正常血浆的正常时间，不仅可以确定个体样品如得自于患有或者怀疑患有血液凝固系统疾病或者病症的患者的那些的血液凝固能力的异常，而且还可以对乏血小板样品中的血小板数进行量化。事实上，可以由该试验得出的一个结论是，在没有任何血小板的血浆(或者具有极低血小板数的血浆)中，冻干血小板可以用作校准试剂以校准其它血液组分(即，凝血因子抑制剂或者凝结过程中的任何其它缺陷)。在正常血浆中，冻干血小板也可以因为相同目的用作校准试剂。在此公开的系统使用冻干血小板作为在与血小板无关的任何给定血浆样品中的试剂，以检测凝结蛋白缺陷或者检测某些凝结抑制剂。例如，在血友病血浆中，冻干血小板在具有多种缺陷的冻结血浆上应用，并且其能够鉴定和矫正因子IX、X和XI缺陷，而不是因子VIII和II缺陷。其价值之一是实验室可以接受冻结血浆和使用该冻干血小板试剂以迅速确定凝结蛋白缺陷。

该实施例表明，在没有任何血小板的血浆(或者具有极低血小板数的血浆)中，冻干血小板可以用作校准试剂校准其它血液组分(即，凝血因子抑制剂或者凝结路径中的任何其它缺陷)。

那么，很显然在正常血浆中，冻干血小板也可以基于相同目的用作校准试剂。该系统可以使用冻干血小板作为在与血小板是否存在无关的任何给定血浆样品中的试剂，以检测凝结蛋白缺陷或者检测某些凝结抑制剂。例如，在血友病血浆中，冻干血小板与具有多种缺陷的冻结血浆一起使用。该组合能够确定和纠正因子IX、X和XI缺陷。然而，因子VIII和II的缺陷纠正没有得到表明。该系统的一个优点在于，实验室可以接受冻结血浆并使用该冻干血小板和本发明系统迅速确定凝血蛋白缺陷。

#### 实施例26: 冻干血小板作为凝血因子缺陷诊断剂的用途

根据冻干血小板可以用于鉴定血浆凝固能力的缺陷的知识，设计试验以确定冻干血小板是否可以用于鉴定血液凝固途径中的具体缺陷。为了确定凝固时间，将100 $\mu$ l APCT(活化血浆凝固时间，Analytical Control Systems, Inc., Fishers, IN)试剂与25 $\mu$ l多种浓度的水-重构冻干血小板和25 $\mu$ l得自于商业供应商的因子缺失血浆进行混合。在37 $^{\circ}$ C的水浴中将该混合物培养3分钟，然后将100 $\mu$ l 0.02M的CaCl<sub>2</sub>(37 $^{\circ}$ C)加入并且对凝固时间进行确定。

从图23中可以看出，冻干血小板可以克服凝血因子XI、X和IX而不是VIII中缺陷的凝固缺失。由此，可以进行测定以与因子XI、X和IX相比较，以在基于因子VIII的凝固缺陷之间加以区别，并且可以鉴定凝块形成固有途径中的缺陷。因为冻干血小板可以克服因子XI、X和IX缺陷，因此可以设定校准曲线，从而准确确定这些因子在血液中的存在量或者不存在。同理，对于进行其中维生素-K依赖因子受到损伤的华法林(coumadin 苜丙酮香豆素钠)治疗的患者，冻干血小板可以用于监控该缺失。

#### 实施例27: 冻干血小板作为诊断工具确定具体凝血因子缺

## 陷的用途

根据冻干血小板可以用于鉴定基于血浆的系统中的固有凝血因子缺陷的认识,对冻干血小板用作精确定位全血系统中相同类型缺陷的诊断工具的能力进行测试。进行上述试验的能力可以区别基于冻干血小板的诊断学和其它市售测定法(例如, aPTT、PT、ELISA、PCR等等),其中必须对全血进行处理,从而提取血浆、血清或者个体血液组分以定量确定具体缺陷。为了便于参比,图24示出凝血系统和血液凝结抑制剂的综述。

图25示出冻干血小板对在血液凝固组分中具有已知缺陷的血样的凝固能力的影响。该图中所示数据如下获得:确定含有400 $\mu$ l ACD全血(或者用目标为抗特定凝血因子的多种抗体或者用当前用于卫生保健设施中的抗凝血药物进行培养)、25 $\mu$ l 0.2M的CaCl<sub>2</sub>、25 $\mu$ l盐水和50 $\mu$ l多种浓度的重构(再水化)冻干血小板的混合物的凝固时间。

从该图中可以看出,全血测定结果与基于血浆的测定结果一致。冻干血小板对于在因子IX、X和XI而非因子VIII中的缺陷能够降低凝固时间。该结果表明,所述冻干血小板可以与血浆和全血一起用于鉴定因子IX、X和XI中的缺陷,并且区别因子VIII的那些缺陷。其一个优点在于所述冻干血小板可以与全血充分作用,由此避免加工血浆的并发症。

该实施例证明,当将特定抗体加入到全血中时,冻干血小板的反应形式与基于血浆的系统几乎相同。此外,当用多种抗凝血药物处理全血时,发现冻干血小板还以不同的动力学和反应模式(profiles)对这些抗凝血剂敏感(参见下文)。

由此,发现所述冻干血小板的应用具有数个独特的优点,包括:

可以将冻干血小板用作鉴定涉及固有途径的因子中的缺陷

的完备试剂(stand alone reagent);

冻干血小板可以与任何已知适于与新鲜血小板一起应用的现有临床设备一起使用;

冻干血小板可以与离去诊断试剂盒一起用作校准试剂; 和

冻干血小板可以与全血或者血浆一起使用, 从而鉴定固有途径中涉及的因子缺陷。

#### 实施例28: 冻干血小板显示出与全血的特异反应模式

根据冻干血小板可以用于鉴定血液凝固系统中具体缺陷的知识, 对所述血小板鉴定多种抗凝血剂存在或者影响的能力进行试验。用指定量的抑制剂对ACD中新近抽出的血液进行培养。将多种浓度的冻干血小板加入, 并且在室温下将其培养30秒。然后, 用10mM CaCl<sub>2</sub>对所述血液进行再钙化, 并且对其凝固时间进行确定。

从图26中可以看出, 冻干血小板可以用于鉴定抗凝血剂在全血中的存在和/或影响。因为冻干血小板会以特异模式与具体抗凝血剂反应, 因此它们不仅可以用于检测抗凝血剂的存在, 而且可以用于确定血液中存在多少抗凝血剂。照此方式, 可以对血液中的抗凝血剂进行监控, 从而例如, 确保施用的适当剂量。这特别有益于进行肝素治疗的心肺支管(CBP)患者。可以在床边对这些患者的血液进行监控, 从而确定血液中的肝素水平和手术的安全时机。

#### 实施例29: 冻干血小板用于监控维生素-K依赖型凝固因子的用途

在凝固级联中的很多凝固因子都是维生素-K依赖型的, 并且它们结合细胞膜上的带负电荷的磷脂。此外, 膜联蛋白-V标记物为血小板前凝血活性的标记物, 这是因为它以类似于维生素-K依赖型蛋白的Ca<sup>2+</sup>-依赖型方式与带负电荷磷脂结合。为了

分析这些蛋白质与冻干血小板的结合，在Becton Dickenson FACS caliber仪器上利用log-log设置进行以下试验。血小板的特征在于它们代表性的向前和侧向散射光线图(使用凝胶过滤的血小板进行)和/或与荧光-标记蛋白质的结合。在分离的试管中，在HMBT中将血小板稀释至 $\sim 50,000/\mu\text{l}$ ，并且在环境温度下，以饱和剂量加入荧光-标记蛋白质30分钟。用2ml HMBT稀释样品并且收集10,000个个体事件。对荧光柱形图和阳性细胞百分比进行记录，这表示与荧光标记蛋白结合的血小板数目。

从图27中可以看出，冻干血小板结合至25mM的FITC-标记膜联蛋白-V(表示膜联蛋白V休眠(resting))。通过加入 $20\mu\text{m}$  TRAP肽(SFLLRN)，冻干血小板暴露于另外的带负电荷的磷脂，从而导致与另外的膜联蛋白V结合(表示膜联蛋白V活性)。为了确定将FITC-膜联蛋白V与休眠冻干血小板的结合是特异的，将100倍过量的未标记膜联蛋白V加入。从图28中可以看出，FITC-膜联蛋白V的结合会受到未标记膜联蛋白V的竞争，这表明冻干血小板的带负电荷的表面使用特定结合点构造。

更具体而言，可以将维生素K依赖型蛋白质用于结合测定中。当对FITC-标记的PPACK-FVIIa(活性部位抑制的FVIIa)测定结合时，发现，在25nM的浓度下，FVIIa不能与新鲜未激活血小板以及新鲜的活化血小板结合(图29)。然而，当使用冻干血小板时，在25nM下FITC-FVIIa表现出特异结合，并且该结合可以与未标记FVIIa竞争(图30)。

还对FITC-标记的EGR-FXa(活性部位抑制的FXa)与冻干血小板的结合进行研究。从图31可以看出，FXa与冻干血小板的结合是特异性的，因为它会受到超过100倍的未标记FXa的竞争。

由此，根据这些试验可知，使用冻干血小板监控全血或者

血浆中的维生素K依赖型凝血因子功能性或者浓度的优点是显然的。这些凝血因子以特异的方式结合至冻干血小板的表面。此外，可以对与冻干血小板的表面的所述特异结合进行修饰。例如，可以将冻干血小板的表面连接在对每一种维生素K依赖型因子具有特异性的试剂(荧光或者其它)上。其信号(荧光或者其它)可以解释缺失因子或在抗凝血作用药物的影响下的因子的精确鉴定。

### 实施例30: 冻干血小板作为鉴定血小板缺陷的诊断剂的用途

其它试验表明，本发明冻干血小板具有与新鲜血小板相似的物理和功能特性。为了更好地表征其物理性能，对冻干血小板试验它们对多种已知对新鲜血小板凝结具有抑制作用的激动剂的响应。

该实施例如下进行：在含有0.3%牛血清白蛋白(BSA)的HEPES-Tyrodes缓冲液中，将新鲜血小板和/或冻干血小板稀释至最终浓度为250,000个血小板/ $\mu$ l。将多种激动剂加入到各个组合物中，如下所述。将400 $\mu$ l组合物置于聚集计量池(aggregometry cuvettes)中，血小板随时间流逝聚集。

$\alpha$ -FIIa: 0.05-1U/ml;

$\gamma$ -FII: 0.03 $\mu$ g/ml;

A23187: 10mM;

凝血酶受体活化肽(TRAP): SFLLRN: 10mM;

Risto+: 1mg/ml(20%自体柠檬酸盐(citrated)血浆);

Risto-: 1mg/ml;

胶原(Chronolog): 10 $\mu$ g/ml;

肾上腺素: 300 $\mu$ M;

花生四烯酸: 0.5mg/ml;

ADP: 20 $\mu$ m;

对照: 无激动剂。

利用胶原的测定的结果示于图32中。栏A表示使用100%冻干血小板时的聚集百分比。该栏显示了低量聚集(约10%),这表示所述冻干血小板仅仅部分对胶原敏感。与此相反,栏D示出胶原对新鲜洗涤的血小板的影响。在栏D中,在导致冻干血小板稍高于10%的聚集的相同时间周期中观察到几乎90%的聚集。从栏C和D中可以看出,不同量冻干血小板和新鲜血小板的混合物产生了中等水平的聚集,所述量取决于加入的冻干血小板和新鲜血小板的相对量。

在第二组设计用于确定冻干血小板对新鲜血小板聚集功能的影响的试验中,使不同量的冻干血小板(再水化血小板或者RH)与不同量的新鲜血小板合并。将重构血小板以所示浓度与新鲜血小板混合。向这些中的每一种中,分别将10 $\mu$ g/ml(400 $\mu$ l血小板+4 $\mu$ l 200mM的MgCl(2mM)+4 $\mu$ l 1mg/ml的胶原(10 $\mu$ g/ml))加入到混合物中。在室温下5分钟之后,使用标准全血细胞计数设备(得自于Beckman coulter的ACT 10)对血小板进行计数。

从图33中可以看出,多种冻干血小板和新鲜血小板的混合物都具有中等聚集特性,这取决于各自存在于混合物中的相对量。

此外,还可以看出,冻干血小板响应花生四烯酸、胶原、肾上腺素、凝血酶受体活化肽(TRAP)和瑞斯托菌素进行聚集,聚集百分比经测定分别为77、83、86、93和97(图34)。

图32、33和34的结果表明,冻干血小板含有响应上述所有激动剂的至少部分官能化的受体,并且具有低的但是可检测水平的自聚集作用。在其中将冻干血小板与新鲜血小板混合的反应中,我们证实所述混合物能够以剂量依赖方式协同进行聚集。

由此，在多种实施方案中，作为血小板具体诊断工具的冻干血小板的应用提供以下数个优点：

进行这样测定的独特工艺：与甲醛粘合固定的血小板不聚集，而根据本发明的冻干血小板聚集；

冻干血小板保持了可以用于监控血小板功能缺陷的相关表面标志，所述血小板功能缺陷如格兰茨曼血小板机能不全、伯-苏氏综合征、灰色(Gray)血小板综合症、魁北克(Quebec)血小板病症、赫曼斯基-普德拉克综合症(Hermansky-Pudlak Syndrome)、切-希二氏综合征(Chediak-Higashi syndrome)、威-奥二氏综合症(Wiskott-Aldrich syndrome)、释放缺陷、vWF病症、无纤维蛋白原血症(Afibrinogenemia)、斯科特综合症(Scott syndrome)和其它先天性病症；

可以将患者自身的血小板冻干，和在治疗期间用作监控患者自身血小板功能的控制剂；

可以将收集的血小板冻干和用作用于相同目的的通用血小板试剂；和

本发明组合物可以为独立产品，它可以在任何适用于血小板分析的现有设备中使用。

#### 实施例31：假血友病C的诱导和用血小板进行的治疗

开发用于血友病C治疗的模型，从而确定本发明血小板是否可以治疗该病症。为了实现上述目的，将血液收集入1/10体积的3.8%柠檬酸钠中，将其合并并且分成1ml的等分。将因子XI的单克隆抗体(Hematologic Technologies, Inc, Essex Junction VT)或者盐水对照加入至0~30 $\mu$ g/ml，并且在环境温度下将其培养~15分钟。将400 $\mu$ l血液转入到含有25 $\mu$ l 0.2M氯化钙(最终10mM)和75 $\mu$ l缓冲对照或者再水化血小板的试管中，从而引发凝固。将试管立即放入Actalyke-活化凝固时间设备(Helena



Labs, Beaumont, TX)中, 并且自动记录其凝固时间。示于图35A和35B中的数据表明, 在血友病C诱发的模型中, 本发明血小板可以克服因子XI的抑制或者损失, 并且可以将凝固时间恢复到正常范围。

#### 实施例32: 假血友病B的诱导和用血小板的治疗

开发用于血友病B治疗的模型, 从而确定本发明血小板是否可以治疗该病症。除了使用因子IX的绵羊多克隆抗体或者非免疫性绵羊抗体对照之外, 如实施例31所述进行试验。示于图36中的数据表明, 在血友病B诱发的模型中, 本发明血小板可以克服因子IX的抑制, 并且将凝结时间恢复到正常范围。

#### 实施例33: 具有抑制剂的获得性血友病的诱导和用血小板的治疗

开发用于具有抑制剂的获得性血友病治疗的模型, 从而确定本发明血小板是否可以治疗该病症。如实施例31所述进行试验, 除了使用因子VIII的绵羊多克隆抗体或者非免疫性绵羊抗体对照。示于图37中的数据表明, 在具有抑制剂的获得性血友病诱发的模型中, 本发明血小板可以克服因子VIII的抑制, 并且将凝固时间恢复到正常范围。

#### 实施例34: 用血小板对血友病患者血液的治疗

为了试验本发明血小板对真实血友病血液的影响, 对已知受到多种血友病形式影响的个体血液样品以及正常血液和血浆进行试验。患有先天性血友病A、血友病B、血友病C或者低滴度(1 Bethesda Unit)和高滴度(140 Bethesda Units)的患者的血浆和对照收集的正常血浆都来自于 George King Biomedical(Overland Park, Kansas)。从正常O型供血者新鲜获得柠檬酸盐血, 将其分为2ml等分, 并且在 $2000 \times g$ 下将其离心15分钟, 从而将细胞制成丸粒。将血浆除去, 用等体积的上述

获得的自体血浆将自旋细胞重构至血细胞比容为45%。将该重构血液(400 $\mu$ l)置于凝固试管中,如上所述,在再水化血小板衍生物存在或者不存在下通过再钙化启动凝固。示于图38中的数据表明,本发明血小板可以克服血友病患者血液中因子XI、IX和VIII的损失和因子VIII通过体内抑制剂产生的抑制作用,并且将凝固时间恢复到正常范围。由此,该数据确定在实施例31~33中存在的模型系统中获得的结果和证实用于这些实施例中的模型。

#### 实施例35: 用牛胰蛋白酶抑制剂进行的凝固缺失诱导和用血小板的治疗

开发用于治疗由于抗凝固剂治疗而产生的延迟凝固的模型,从而确定本发明血小板是否可以处理该影响。将正常的柠檬酸盐血与0~2000U/ml牛胰蛋白酶抑制剂(Calbiochem)或者盐水对照一起培养,然后取400 $\mu$ l置入凝固试管中,如上所述在再水化血小板存在或者不存在下,通过再钙化启动凝固。示于图39A和39B中的数据表明,在由于抗凝血剂治疗而诱发的延迟血液凝固模型中,本发明血小板可以克服抗凝血因子的作用,并且可以将凝固时间恢复到正常范围。

#### 实施例36: 用肝素诱导的凝固缺失(药物诱发的凝血病)和用血小板的治疗

开发用于治疗由于抗凝固剂治疗而产生的延迟凝固的第二模型,从而确定本发明血小板是否可以处理该影响。在此模型中,用肝素处理全血,从而延迟或者抑制凝固。除了使用未分级锂肝素代替牛胰蛋白酶抑制剂之外,如例如实施例35所述进行试验。示于图40A和40B中的数据表明,在由于抗凝血剂治疗而诱发的延迟血液凝固模型中,本发明血小板可以克服抗凝血因子的作用,并且将凝固时间恢复到正常范围。

### 实施例37: 血小板对重组因子VIIa活性的影响

为了确定本发明血小板对用于治疗血友病的已知凝固剂活性的影响, 单独使用或者在本发明血小板存在下, 用亚药理学浓度(5nM)的重组因子VIIa对再钙化全血进行处理。试验结果示于图41中。使用的试验系统是, 在缺少任何外源性凝固促进剂如高岭土、硅藻土或者玻璃下, 使用定制测定试管在标准Activated Clotting Time(ACT)设备上进行再钙化全血凝固时间测定。

示于图41A中的数据如下产生。从正常供血者新鲜获得柠檬酸盐血, 将其分为2ml等分, 并且在 $2000 \times g$ 下将其离心15分钟, 从而将细胞制成丸粒。将血浆除去, 用等体积的自体血浆(PPP, 无plts)、自体PRP(PRP)或者两个独立批次的含有再水化血小板制剂的PPP(RH批1, RH批2)对自旋细胞进行重构。所有样品中的最终血小板数为 $150,000/\mu\text{l}$ 和45%血细胞比容。如上所述, 将重构血液( $400\mu\text{l}$ )置于凝固试管中, 在再水化血小板衍生物存在或者不存在下通过再钙化启动凝固。

示于图41B和41C中的数据如下产生。在含有0.35%牛白蛋白和不补充任何物质以及补充 $1\text{mM MgCl}_2$ 、 $2\text{mM CaCl}_2$ 或者二者的无二价阳离子HEPES Tyrodes缓冲液中, 将再水化血小板稀释至 $50,000 \sim 100,000/\mu\text{l}$ 。在环境温度下, 将 $50\mu\text{l}$ 稀释血小板单独培养或者与 $5\text{nM}$ (亚药理学剂量)或者 $25\text{nM}$ (药理学剂量)FITC-PPACK-FVIIa一起培养30分钟, 然后用 $2\text{ml}$ 相同缓冲液对其进行洗涤, 通过log-log设置的流式细胞计进行分析, 和仅仅在栅极(gate)上获得血小板数据。

从图41A、41B和41C中可以看出, 本发明再水化血小板将重组因子VIIa的活性升高至亚药理学量重组人因子VIIa可以将凝固时间有效降低至它们正常范围的程度。此外, 该图表明,

在通过Ca<sup>2+</sup>增强的反应中，因子FVII变体直接连接到再水化血小板表面上。鉴于重组因子VIIa和其它凝血因子的成本，这是意义重大的发现，无疑将显著降低治疗血友病的成本。

#### 实施例38：膜联蛋白-V与本发明血小板的结合

为了进一步表征本发明血小板的性能，对膜联蛋白-V与本发明血小板的结合进行测定。膜联蛋白-V是血小板促凝血活性的标记物，因为类似于维生素K依赖型凝血因子，它以钙-依赖方式结合带负电荷的磷脂。图42示出了表明膜联蛋白-V结合本发明再水化血小板的流式细胞计剖面数据。

对于本领域熟练的技术人员而言，在实践本发明时很显然可以进行多种改变和变化，而不背离本发明的范围或者精神。通过考虑说明书和实践本发明，本发明的其它实施方案对于本领域熟练技术人员而言是显而易见的。应当将说明书和实施例仅仅视为示例性的，本发明的真正范围和精神由以下权利要求表明。

## 引用的参考文献

Christenson, JT, A Kalangos, 2004, Autologous fibrin glue reinforced by platelets in surgery of ascending aorta\*: Thorac.Cardiovasc.Surg., v. 52, p. 225-229.

Gilbert, GE, P J Sims, T Wiedmer, B Furie, B C Furie, S J Shattil, 1991, Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII: J.Biol.Chem., v. 266, p. 17261-17268.

Giles AR, Mann KG, Nesheim ME, "A combination of factor Xa and phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles bypasses factor VIII in vivo", Br. J. Haematol. 69(4):4917, Aug. 1988.

Hoffman, M, D M Monroe, H R Roberts, 1992, Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study: Thromb.Haemost., v. 68, p. 74-78.

Holme, PA, F Brosstad, N O Solum, 1995, Platelet-derived microvesicles and activated platelets express factor Xa activity: Blood Coagul.Fibrinolysis, v. 6, p. 302-310.

Hrachovinova I, Cambien B, HafeziMoghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH Jr, Schaub RG, McEver RP, Wagner DD, "Interaction of P-selectin and PSGL1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A", Nat Med. 9(8):10205, Aug. 2003.

Kirby CJ, Gregoriadis G., "Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia", J. Microencapsul. 1(1):3345, Jan.-Mar. 1984.

Mazzucco,L, D Medici, M Serra, R Panizza, G Rivara, S Orecchia, R Libener, E Cattana, A Levis, P G Betta, P Borzini, 2004, The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study: *Transfusion*, v. 44, p. 1013-1018.

Nieuwland,R, R J Berckmans, R C Rotteveel-Eijkman, K N Maquelin, K J Roozendaal, P G Jansen, K ten Have, L Eijnsman, C E Hack, A Sturk, 1997, Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant: *Circulation*, v. 96, p. 3534-3541.

Oikarinen,KS, G K Sandor, V T Kainulainen, M Salonen-Kemppi, 2003, Augmentation of the narrow traumatized anterior alveolar ridge to facilitate dental implant placement: *Dent.Traumatol.*, v. 19, p. 19-29.

Pierce,GF, T A Mustoe, J Lingelbach, V R Masakowski, G L Griffin, R M Senior, T F Deuel, 1989, Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms: *J.Cell Biol.*, v. 109, p. 429-440.

Prior,JJ, D G Wallace, A Harner, N Powers, 1999, A sprayable hemostat containing fibrillar collagen, bovine thrombin, and autologous plasma: *Ann.Thorac.Surg.*, v. 68, p. 479-485.

Rosing,J, E M Bevers, P Comfurius, H C Hemker, G van Dieijen, H J Weiss, R F Zwaal, 1985, Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder: *Blood*, v. 65, p. 1557-1561.

Serebruany,VL, J V Ordonez, V V Yurovsky, P A Gurbel, 1998, Crossreactivity of Human versus Swine Platelet Surface

Antigens Is Similar for Glycoproteins Ib and IIIa, but Not for the Glycoprotein IIb/IIIa Complex: *J.Thromb.Thrombolysis.*, v. 5, p. 37-41.

Sims,PJ, E M Faioni, T Wiedmer, S J Shattil, 1988, Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity: *J.Biol.Chem.*, v. 263, p. 18205-18212.

Sims,PJ, S A Rollins, T Wiedmer, 1989, Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex: *J.Biol.Chem.*, v. 264, p. 19228-19235.

Steed,DL, 1997, The role of growth factors in wound healing: *Surg.Clin.North Am.*, v. 77, p. 575-586.

Tans,G, J Rosing, M C Thomassen, M J Heeb, R F Zwaal, J H Griffin, 1991, Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles: *Blood*, v. 77, p. 2641-2648.

Wajon,P, J Gibson, R Calcroft, C Hughes, B Thrift, 2001, Intraoperative plateletpheresis and autologous platelet gel do not reduce chest tube drainage or allogeneic blood transfusion after reoperative coronary artery bypass graft: *Anesth.Analg.*, v. 93, p. 536-542.

Yarovoi HV, Kufrin D, Eslin DE, Thornton MA, Haberichter SL, Shi Q, Zhu H, Camire R, Fakharzadeh SS, Kowalska MA, Wilcox DA, Sachais BS, Montgomery RR, Poncz M, "Factor VIII ectopically expressed in platelets: efficacy in hemophilia A

treatment", Blood 102(12):400613, Dec. 1, 2003.

所有在此引用的参考文献都在此引入作为参考。



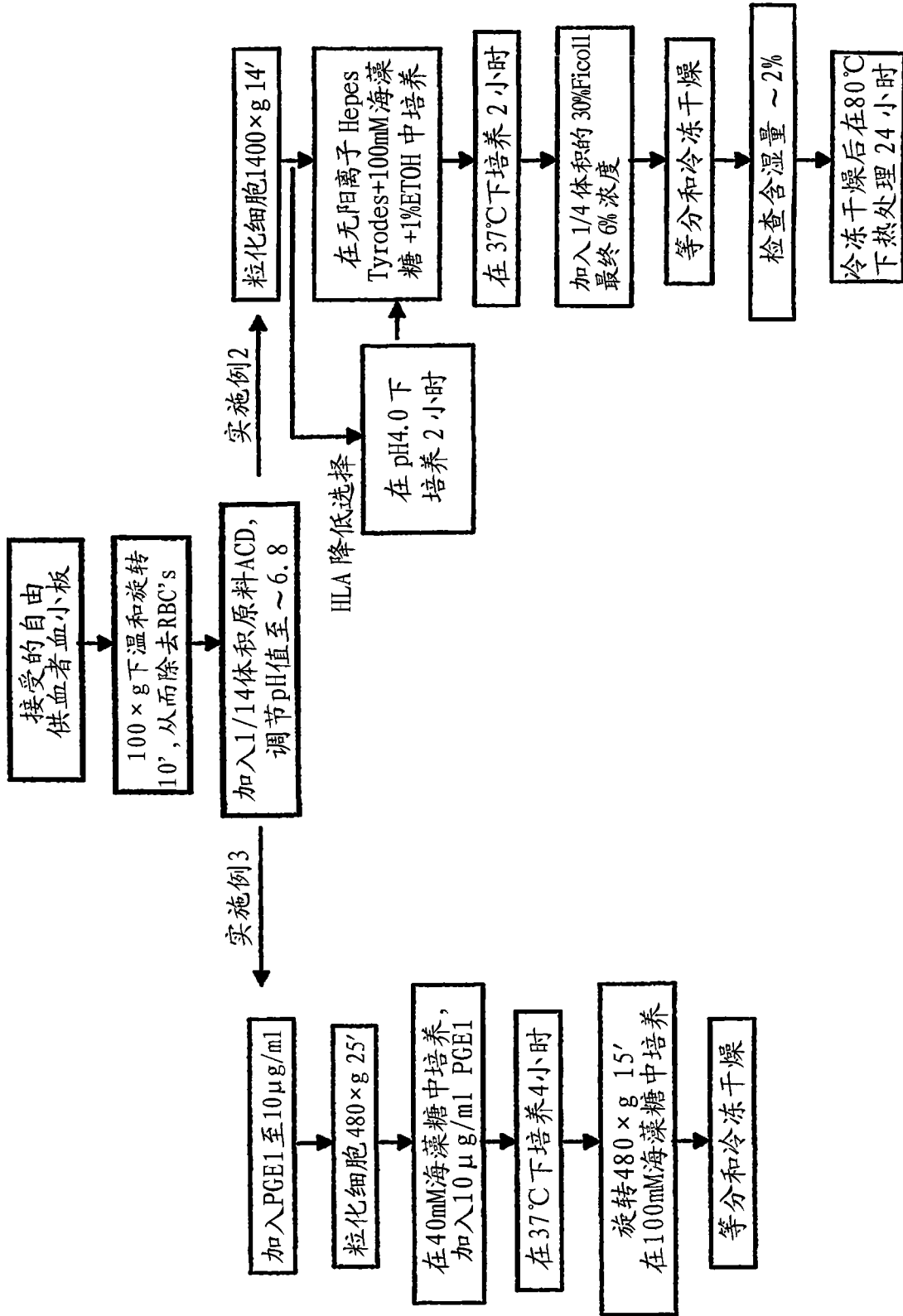


图 1

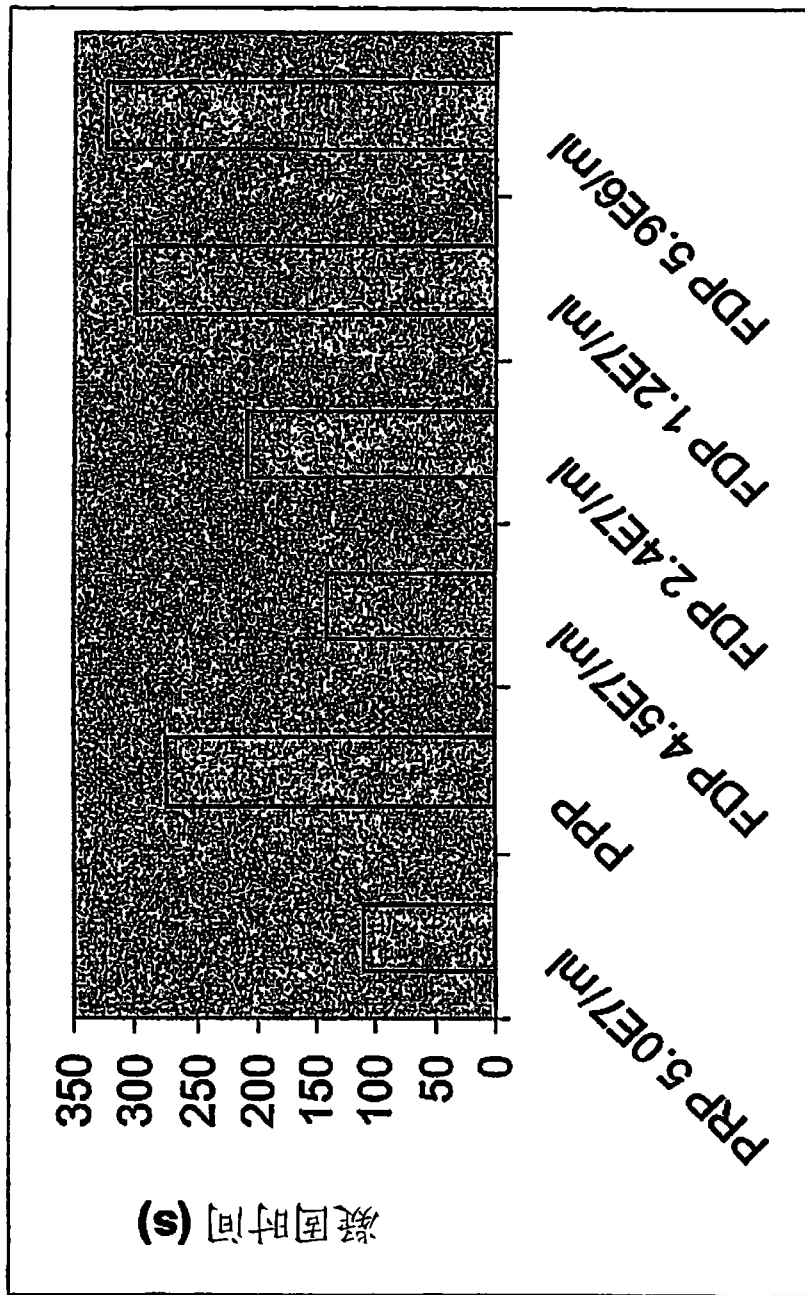


图 2

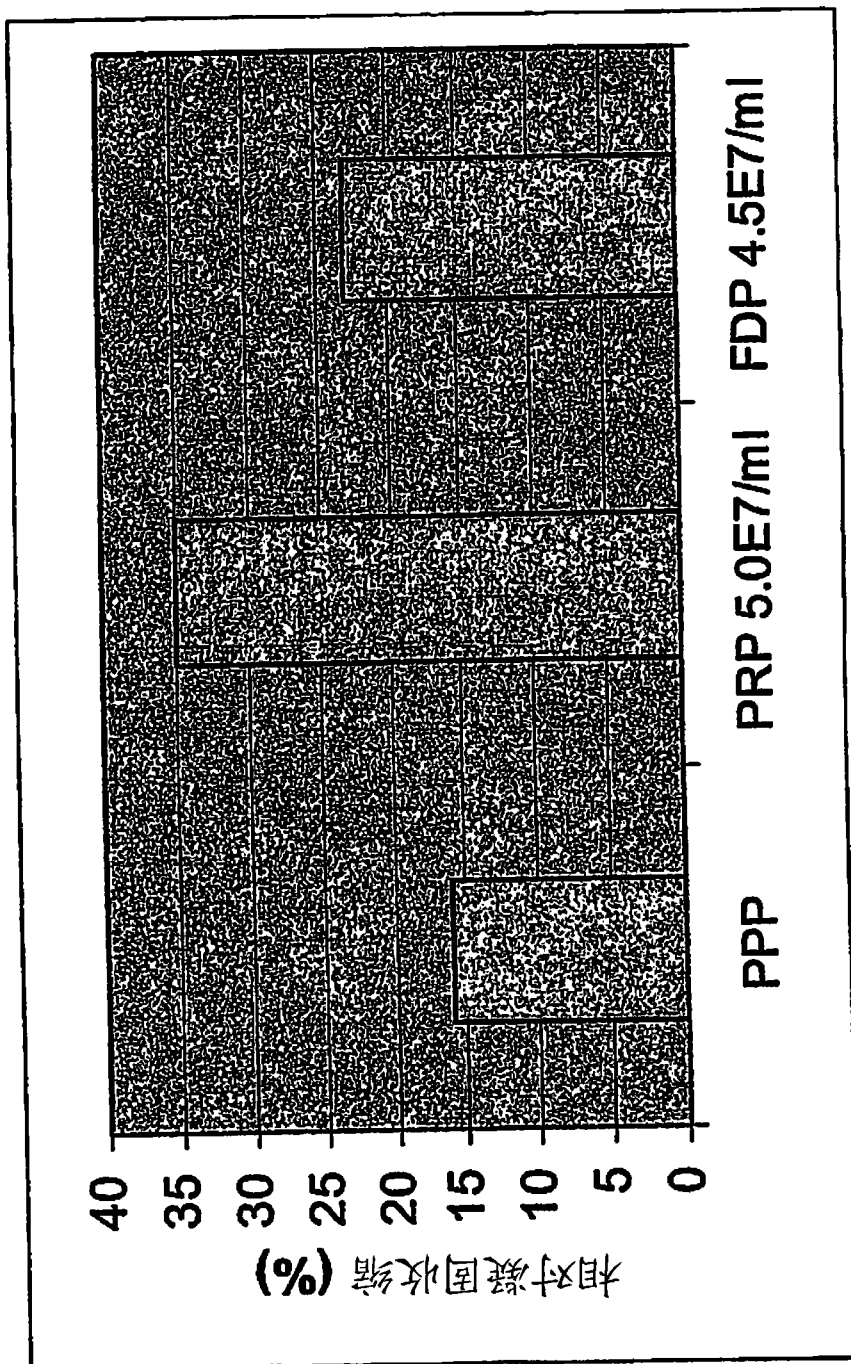


图 3

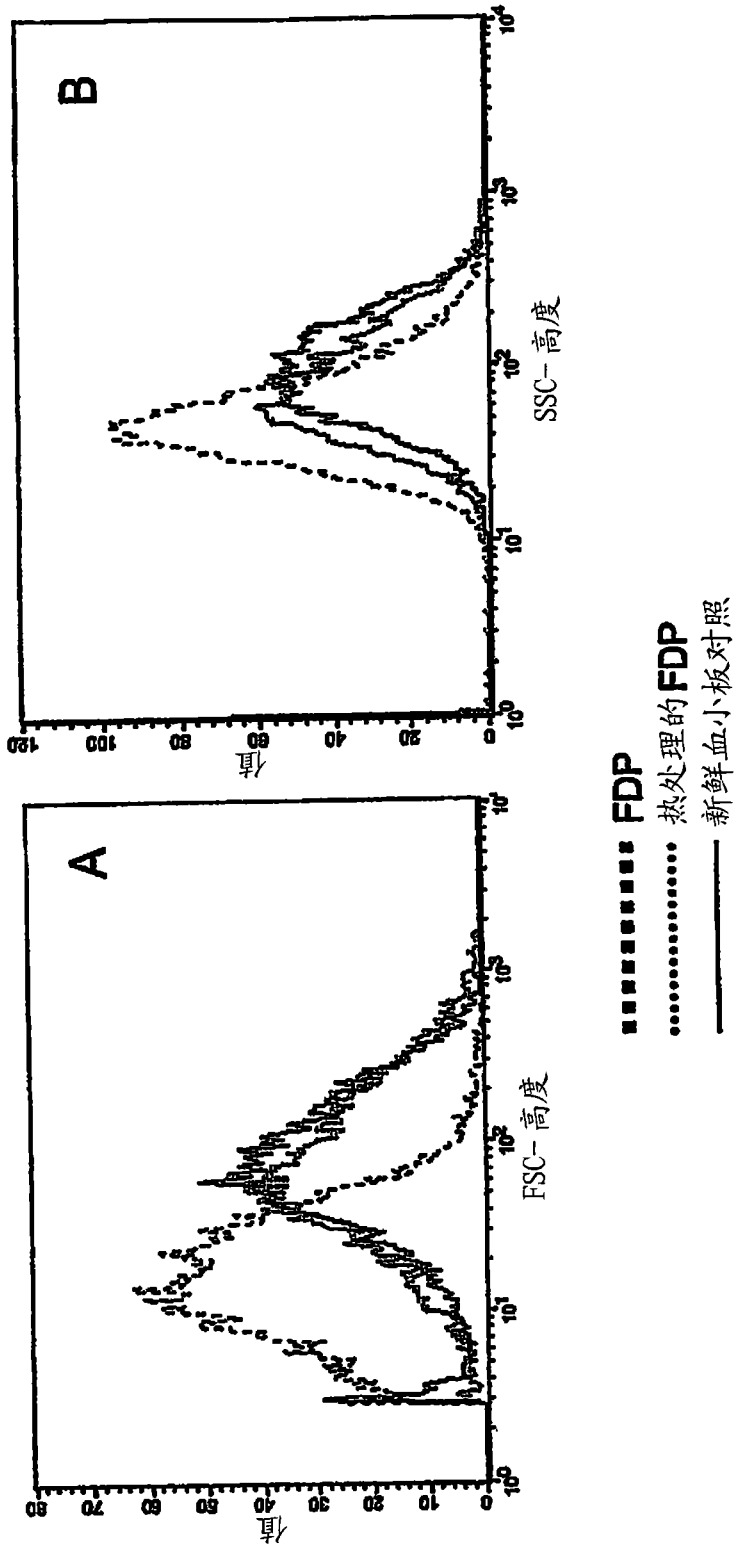


图 4

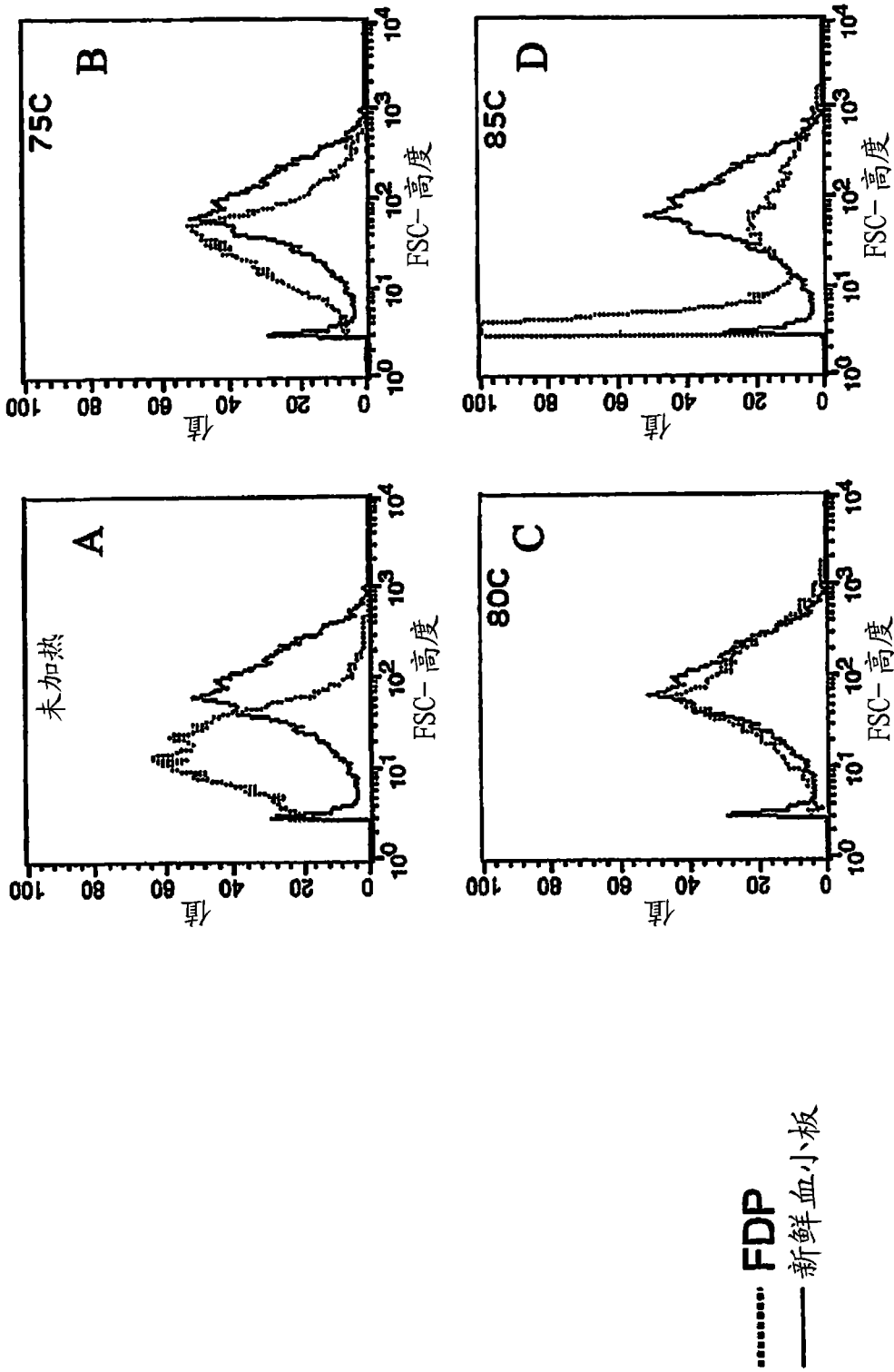


图 5

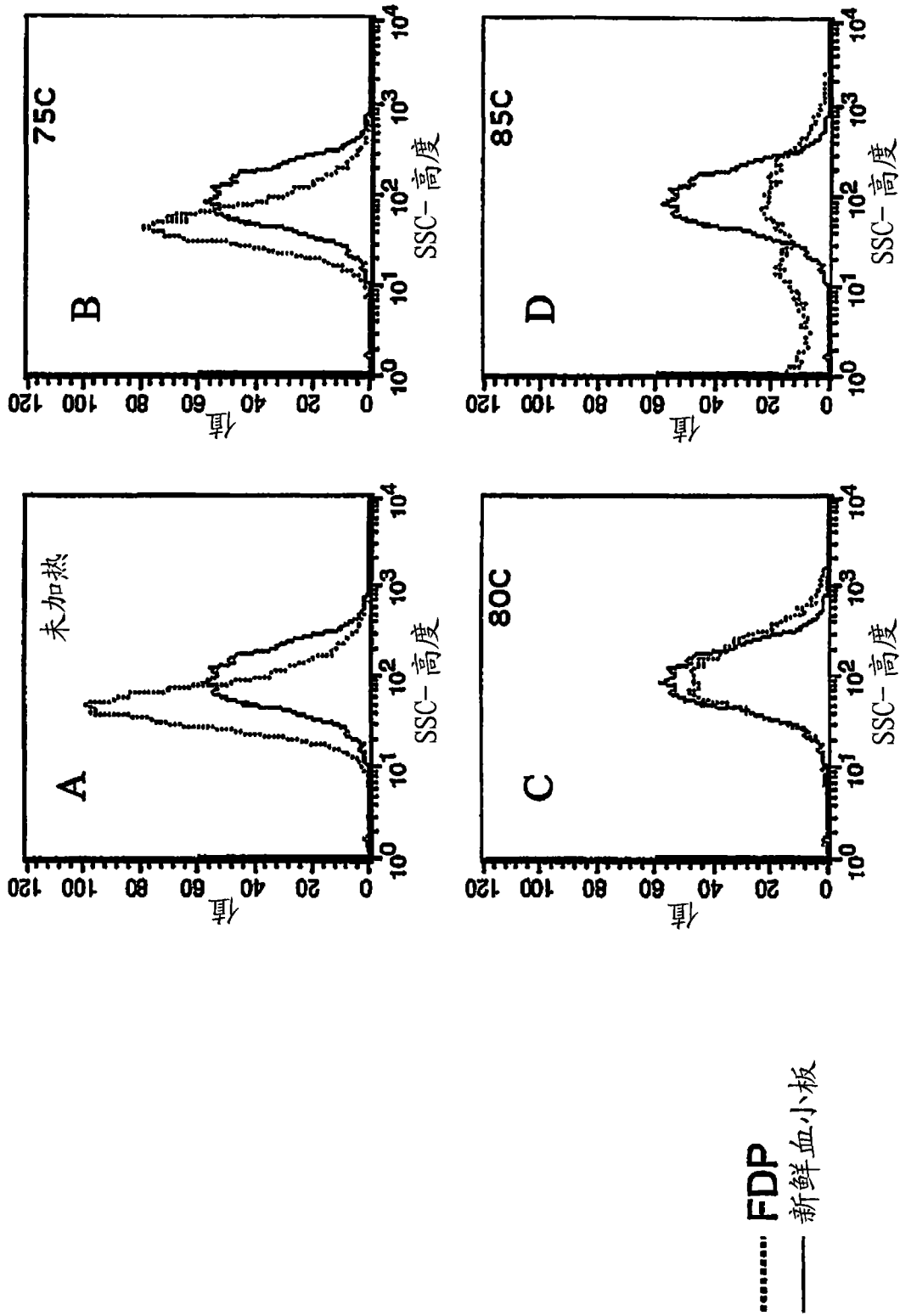


图 6

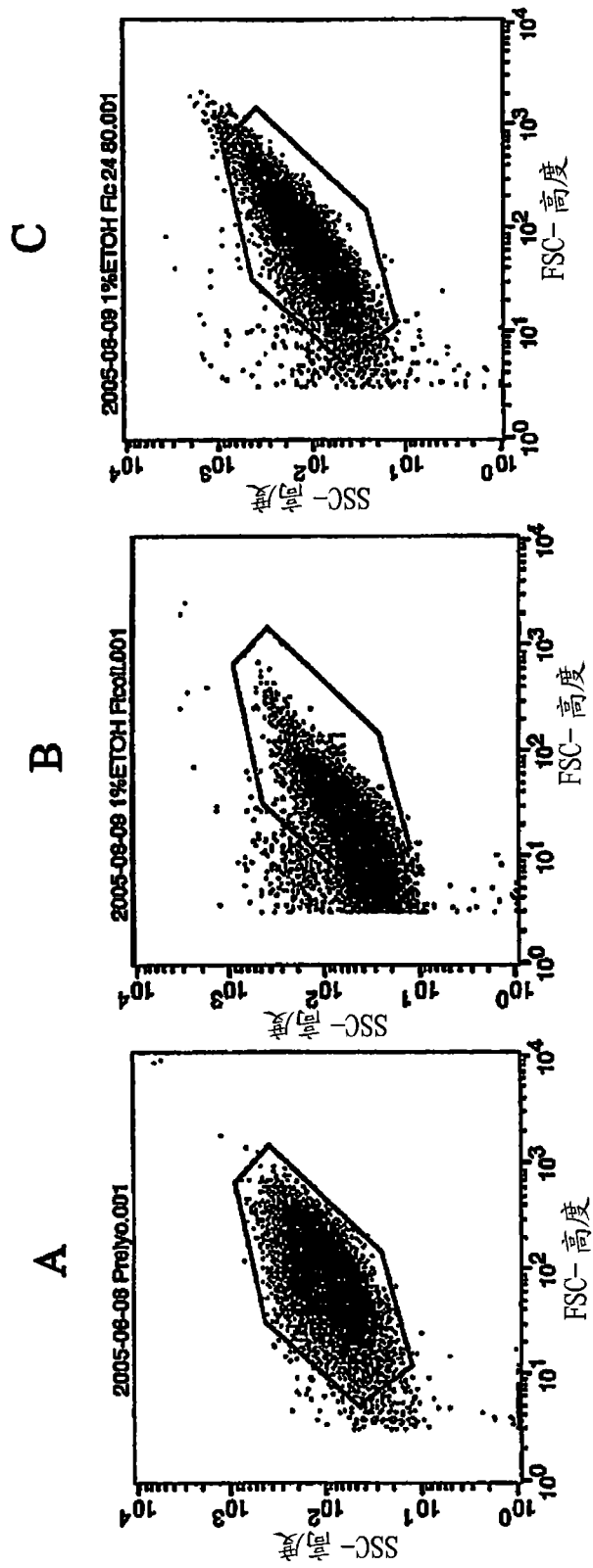


图 7

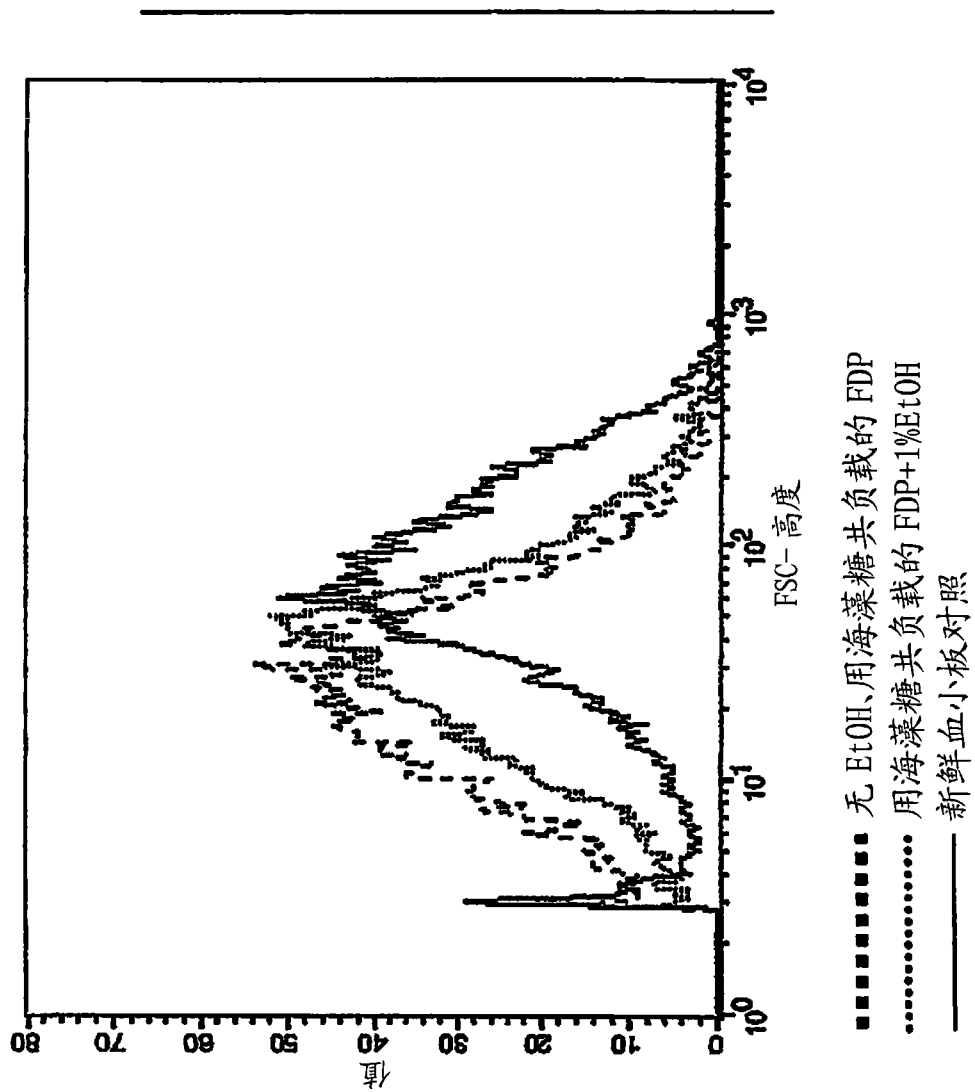


图 8



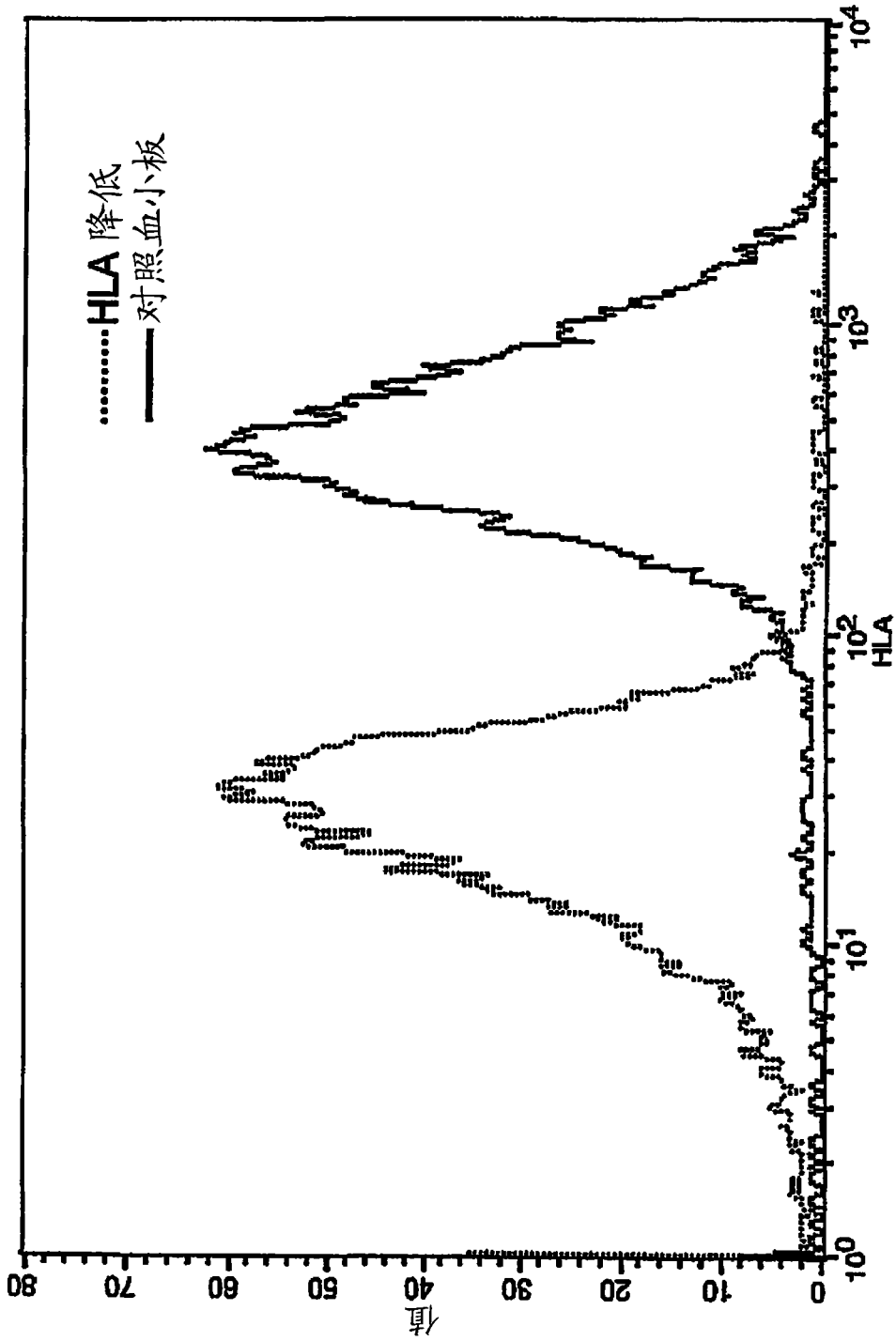


图 9

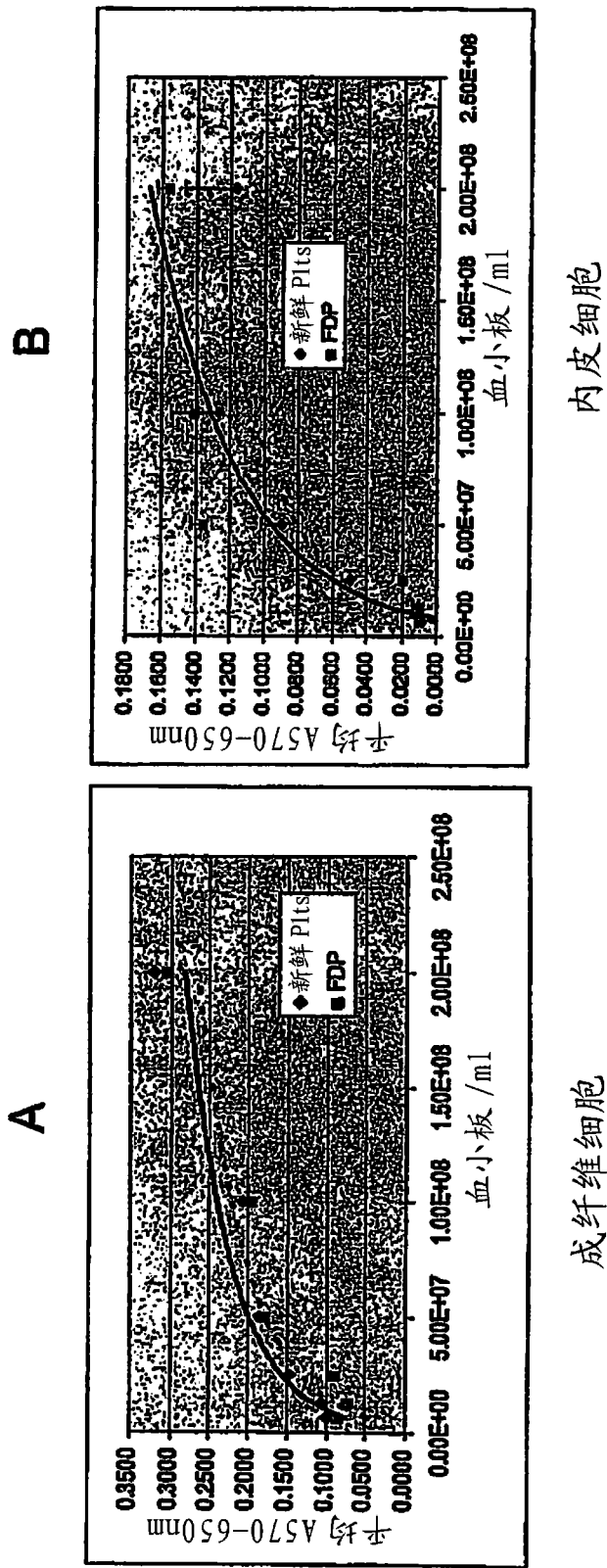


图 10

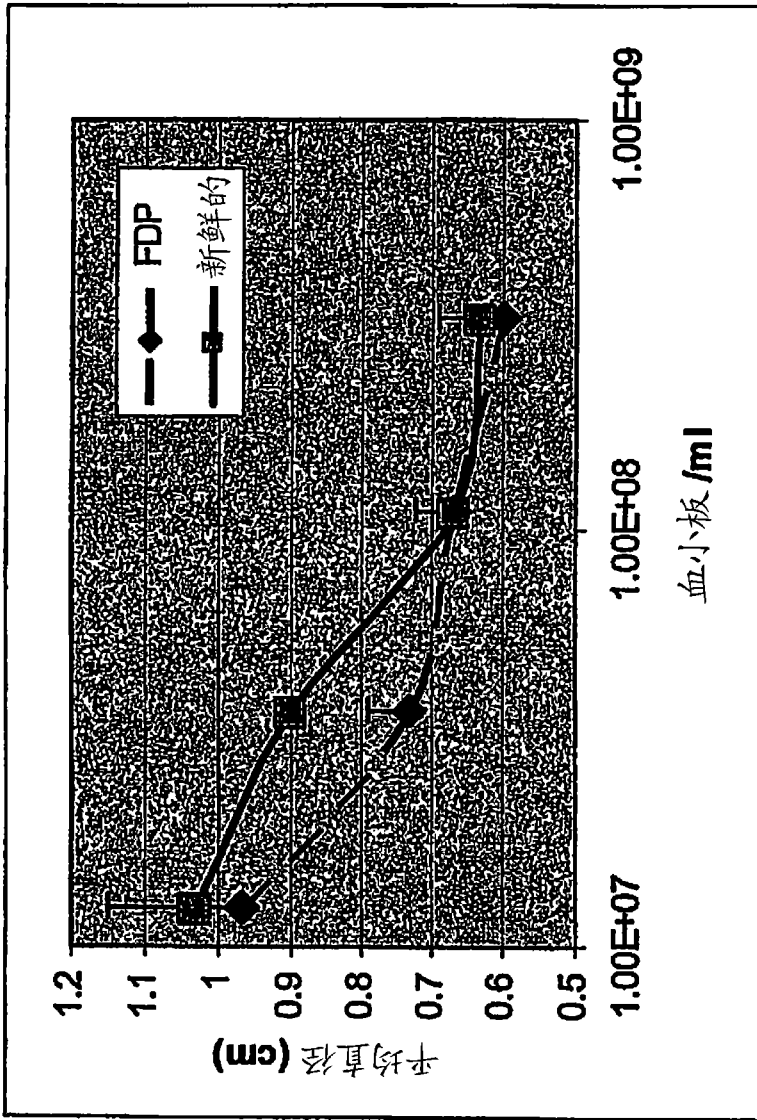


图 11

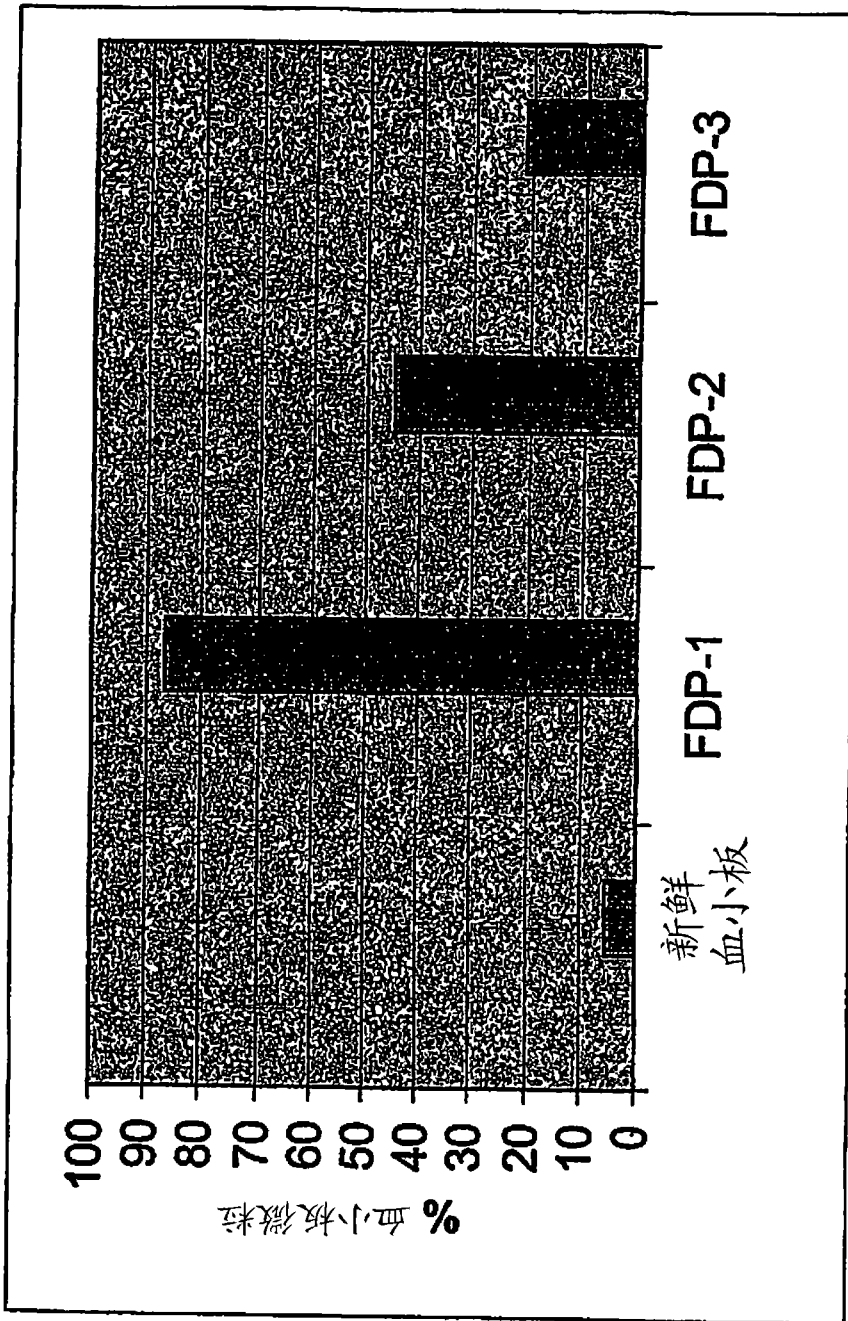


图 12

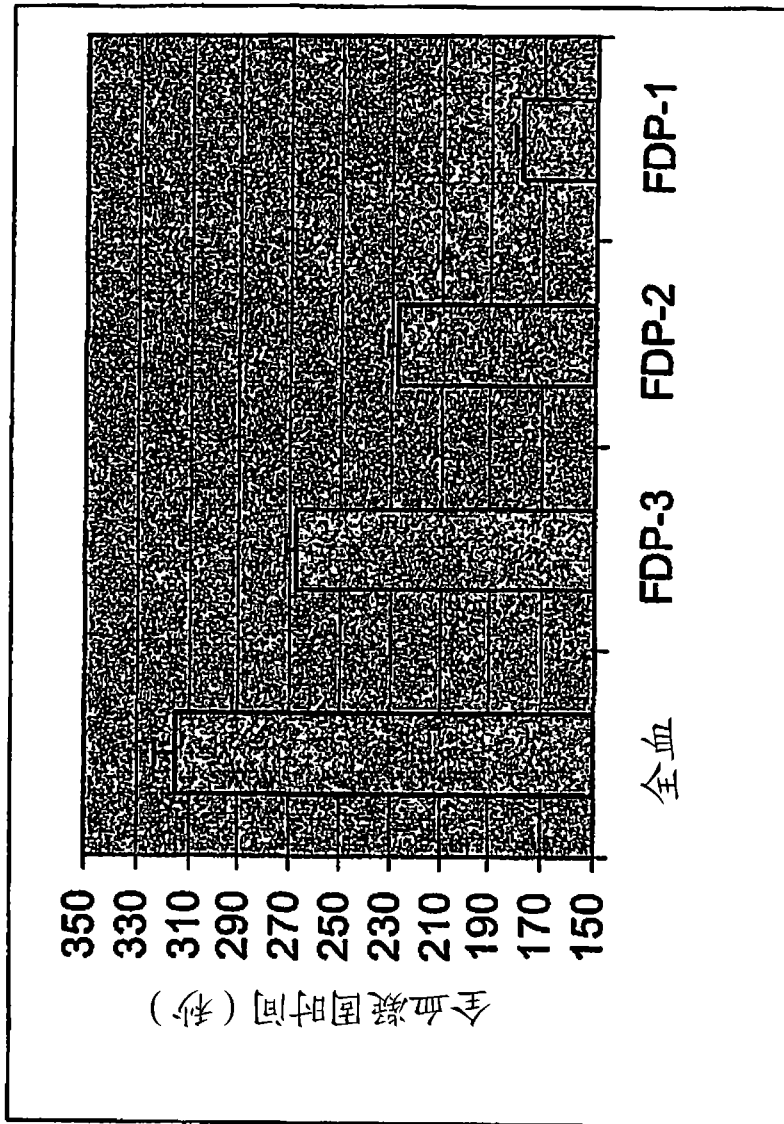


图 13A

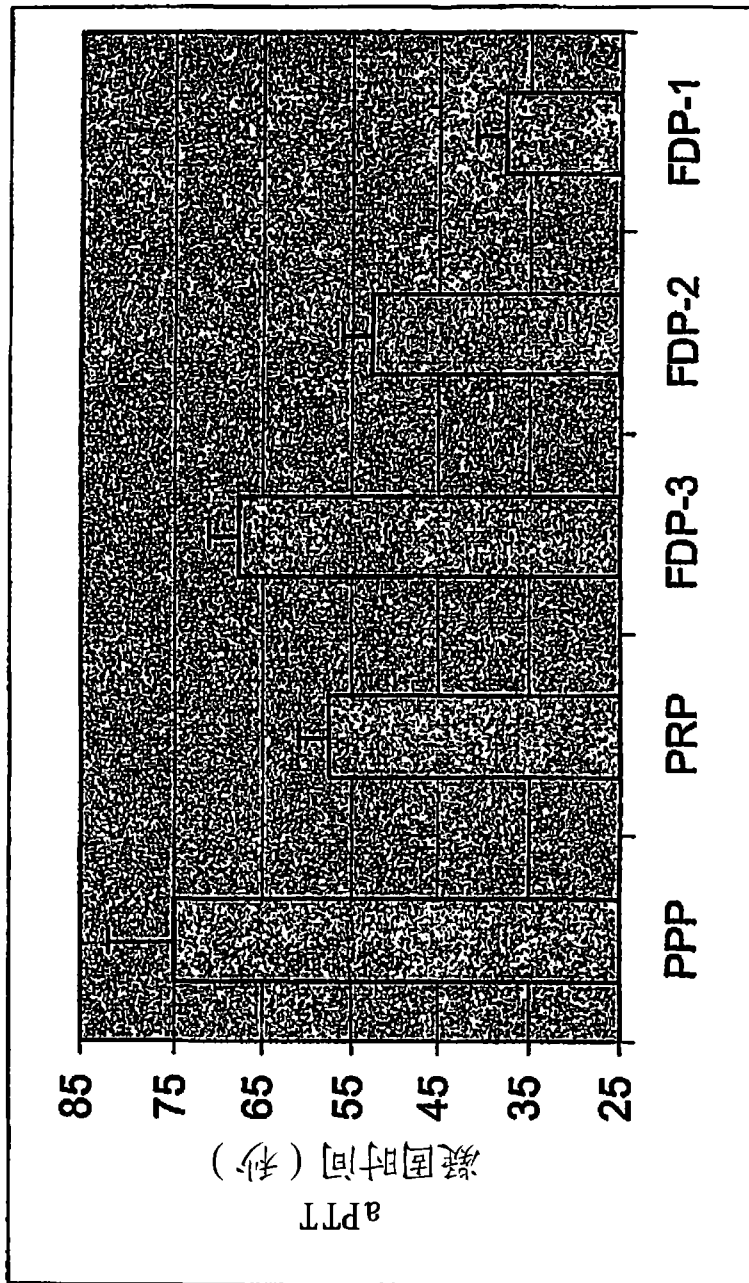


图 13B

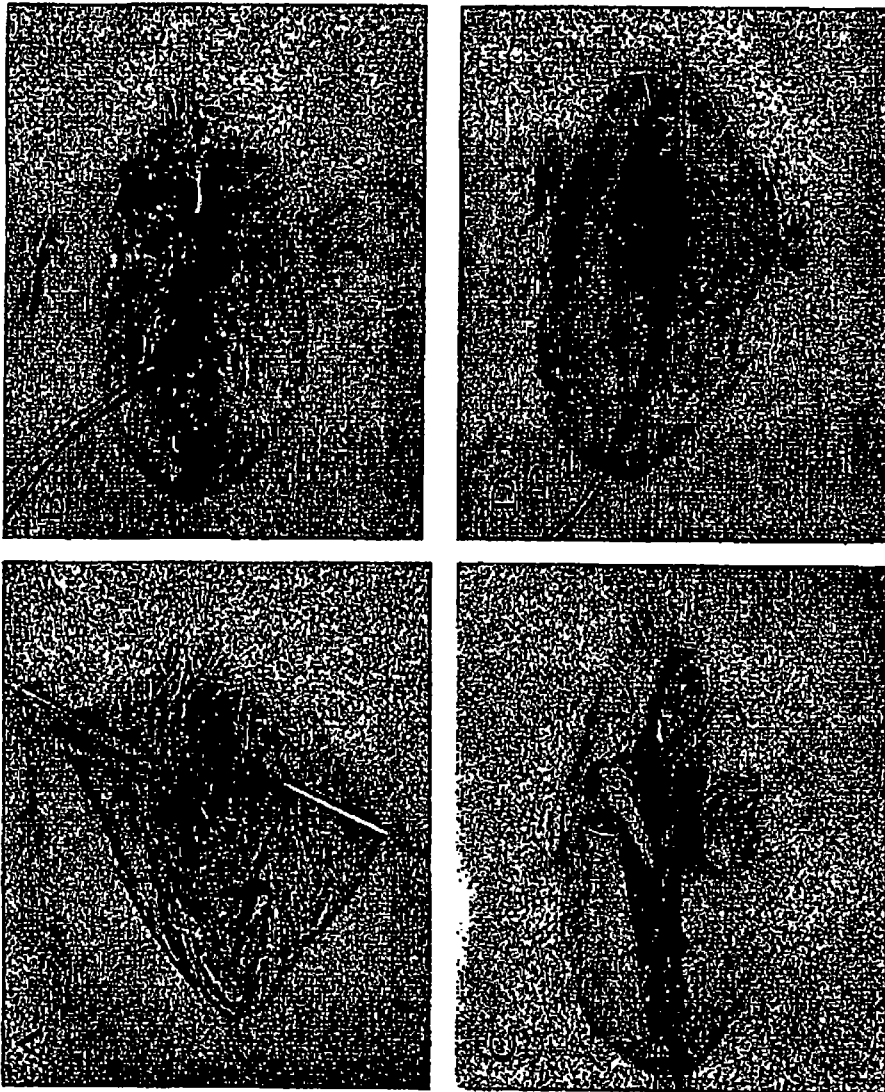


图 14

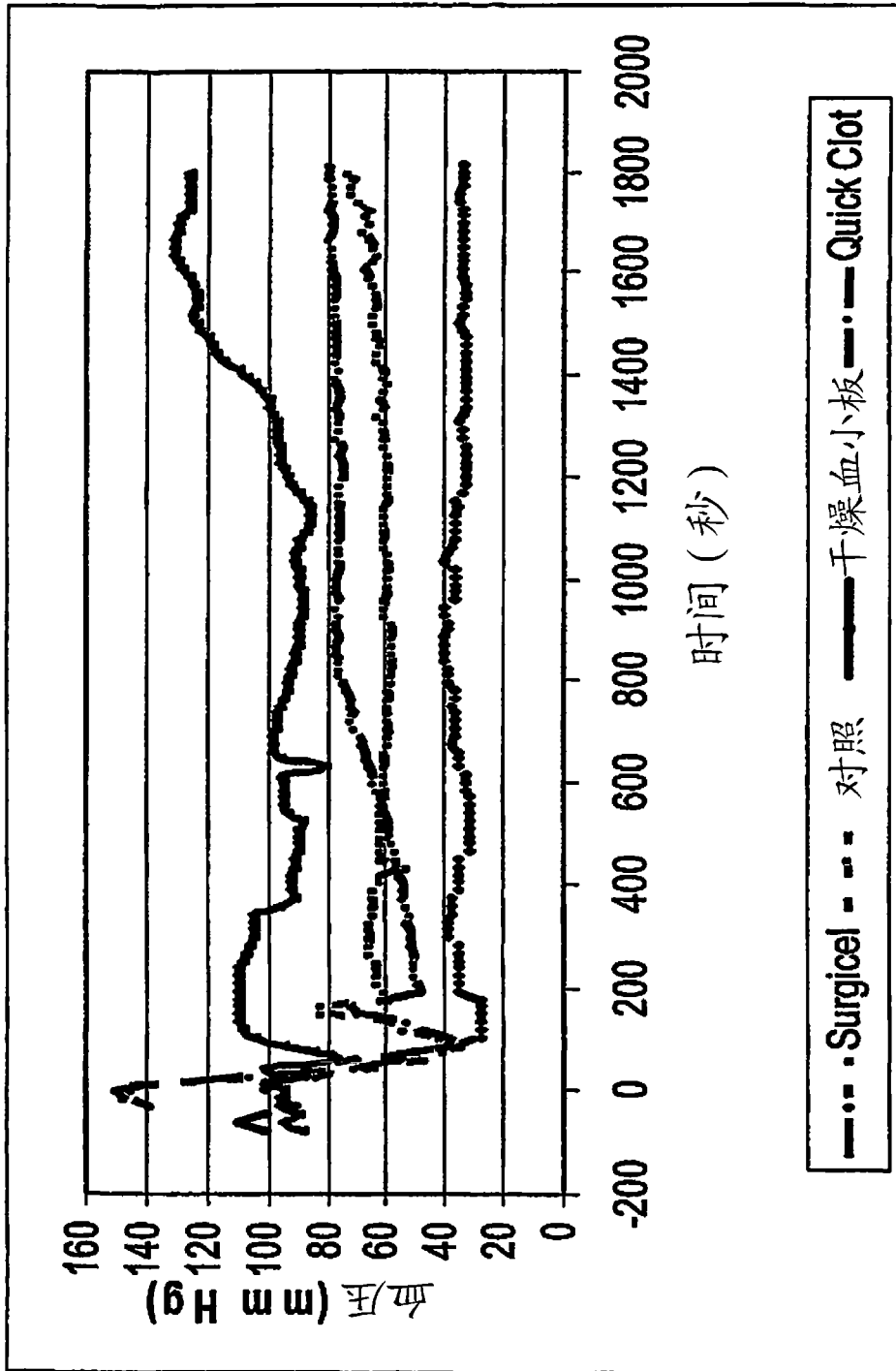


图 15



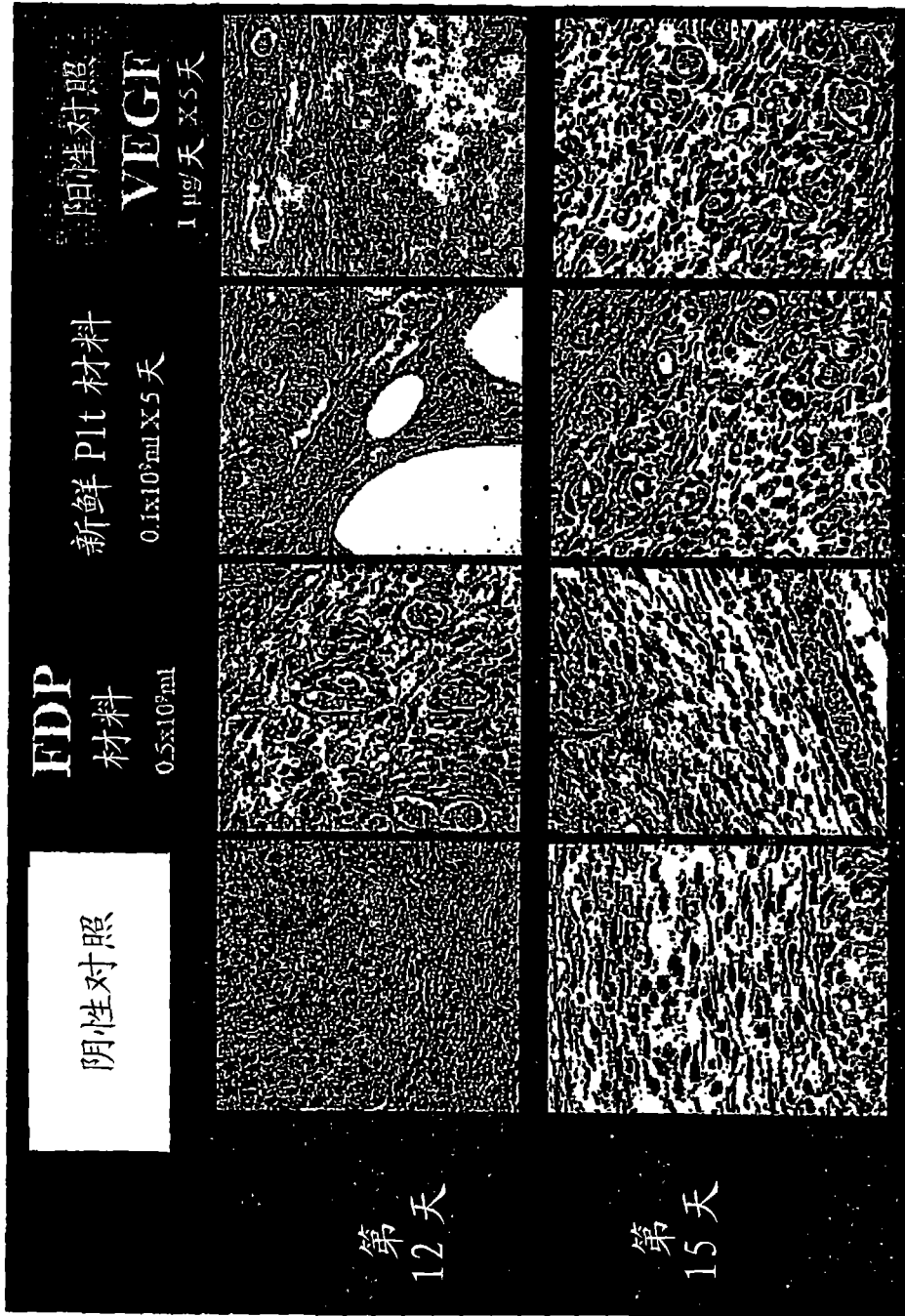


图 16

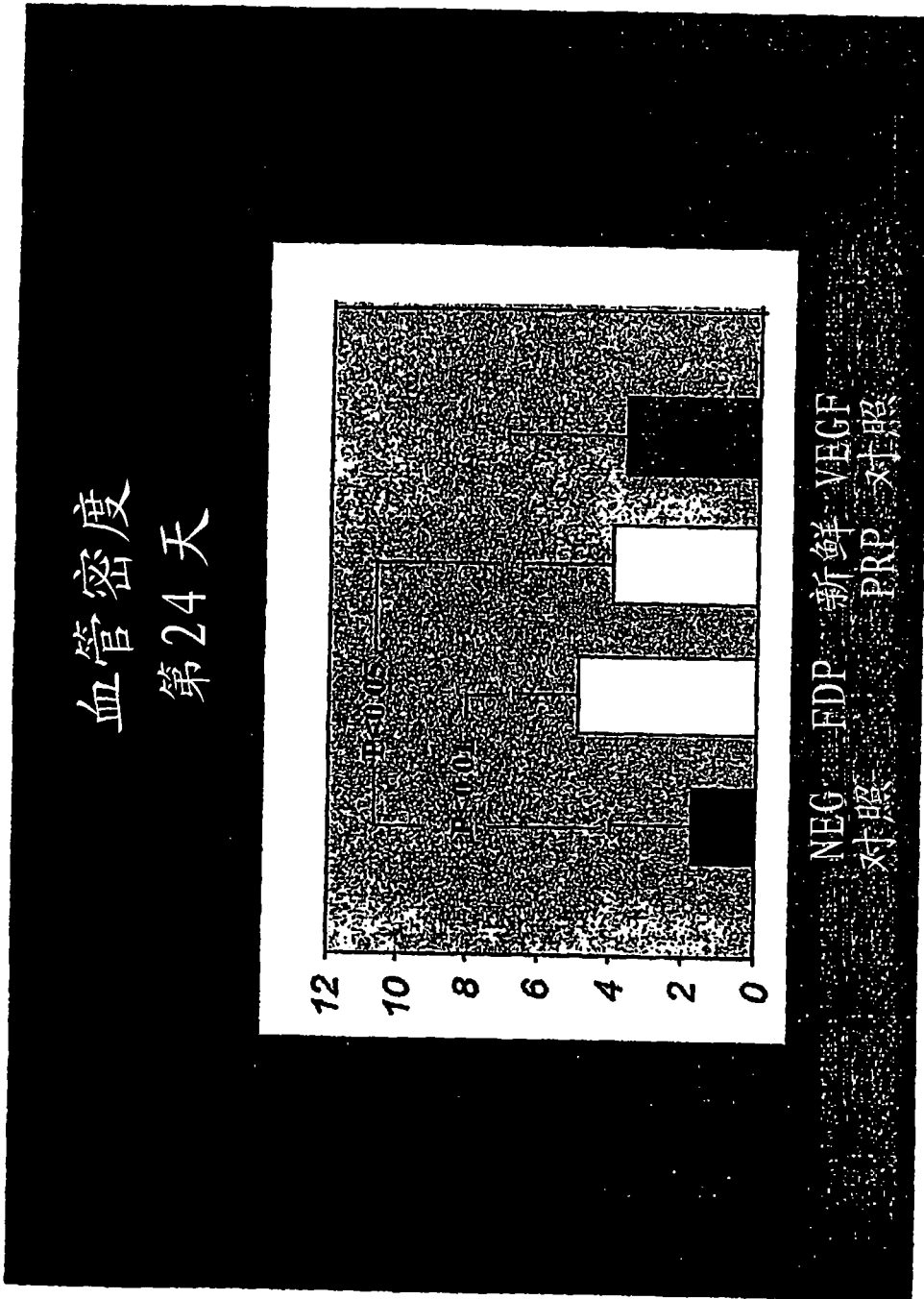


图 17

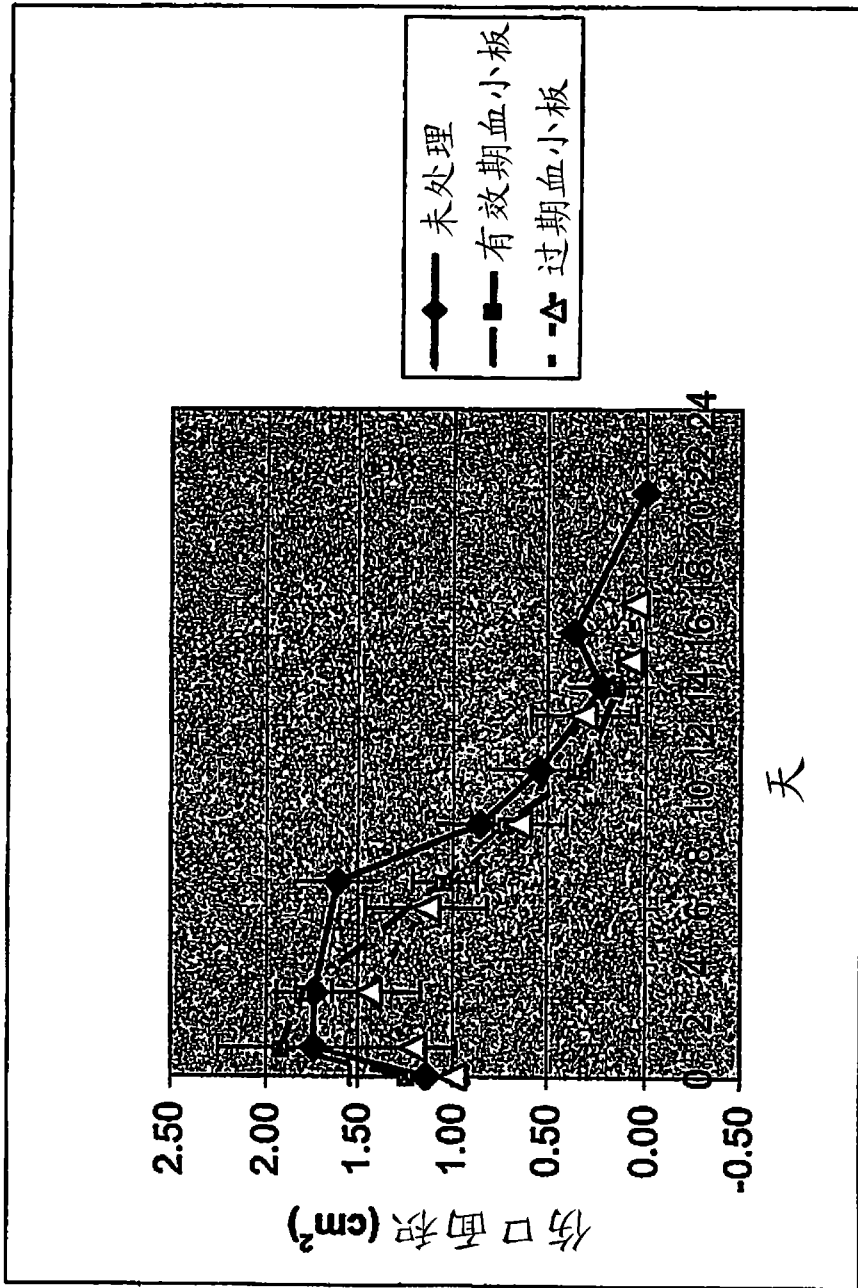


图 18

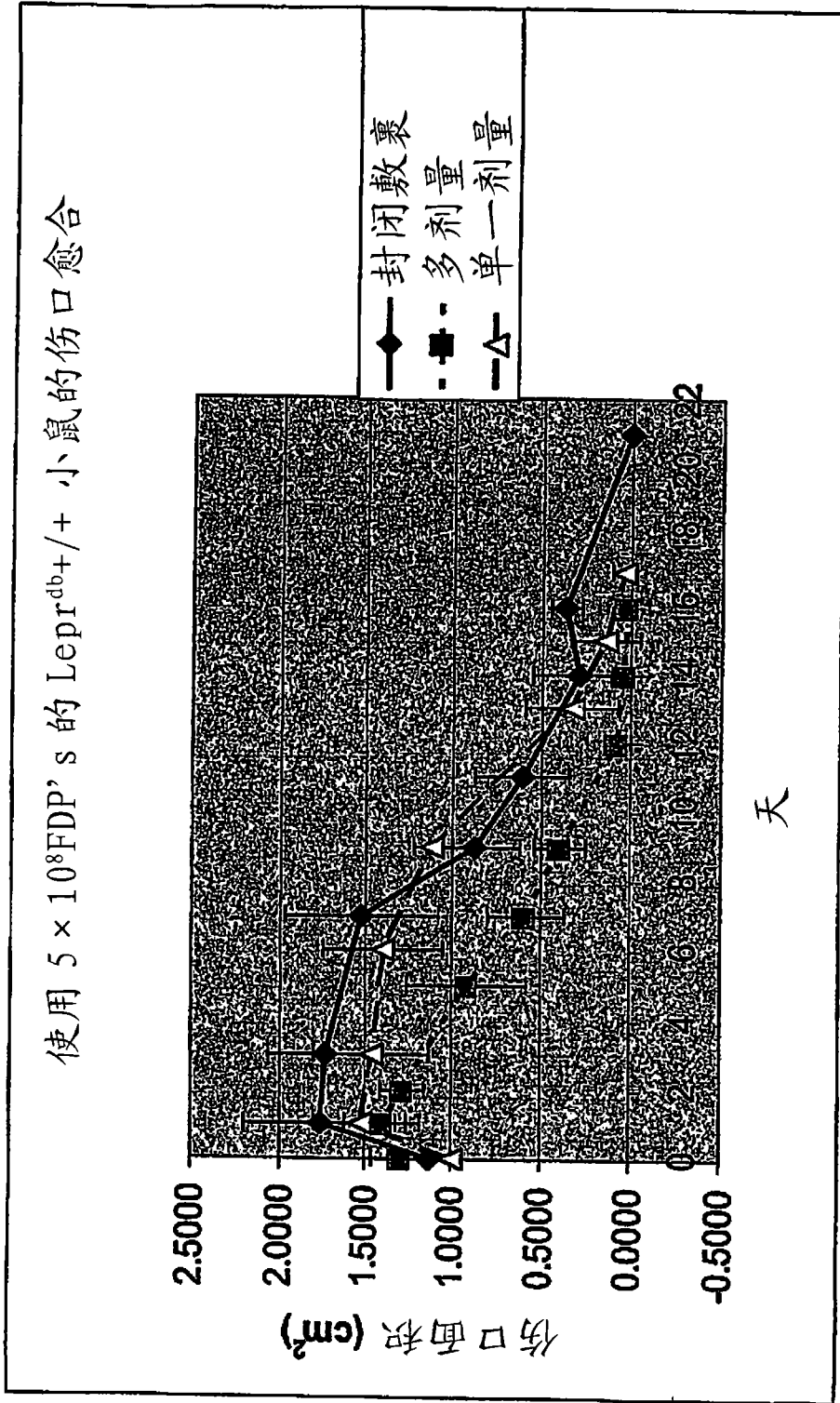


图 19

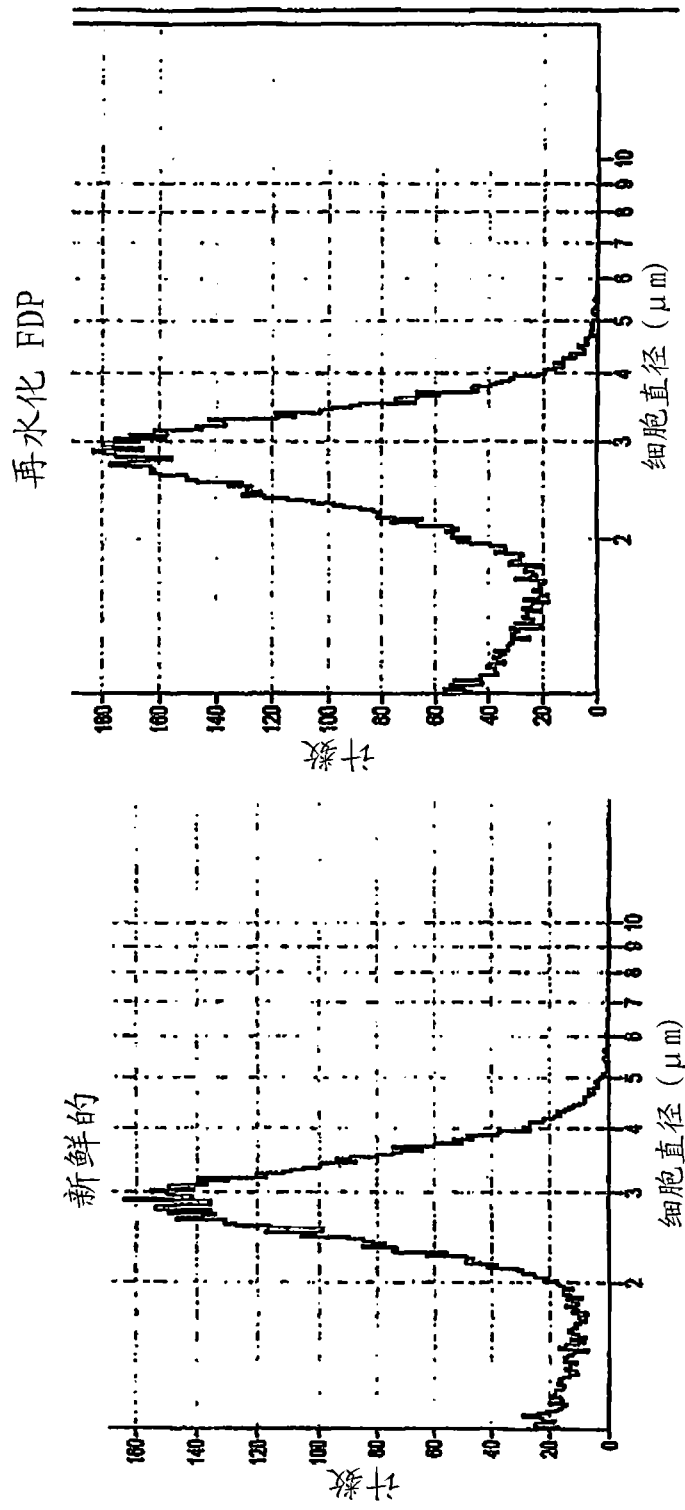


图 20

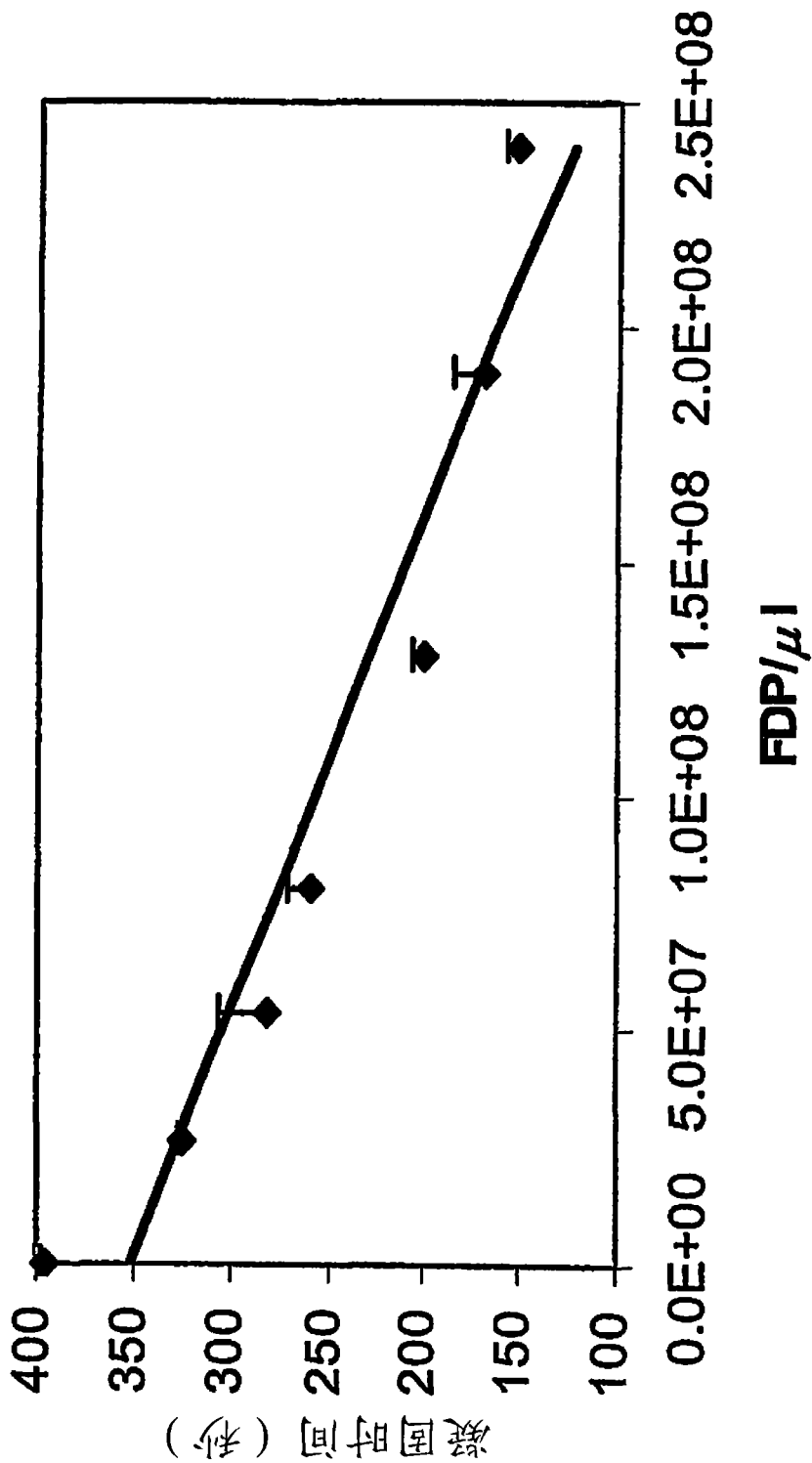


图 21

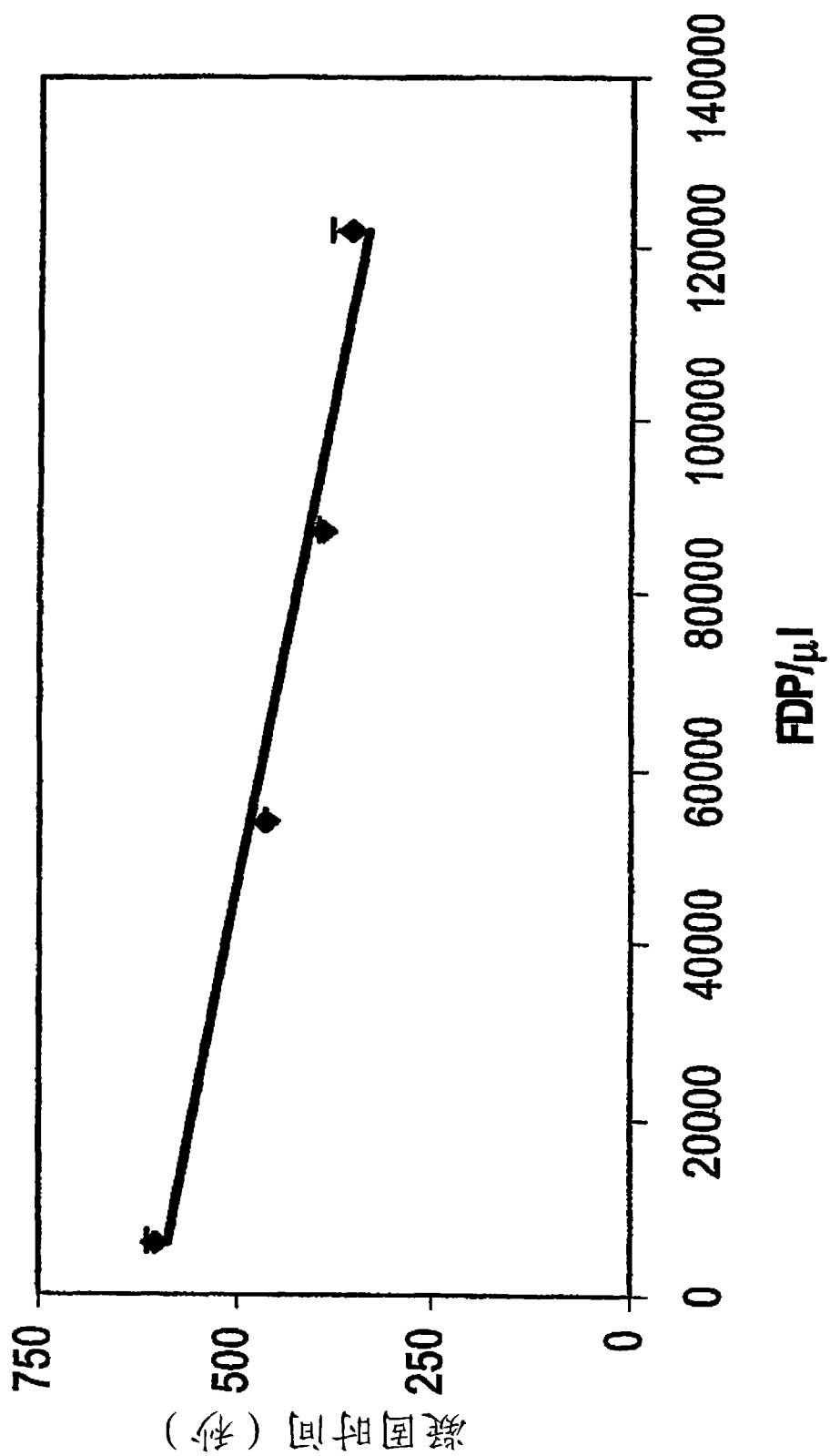


图 22

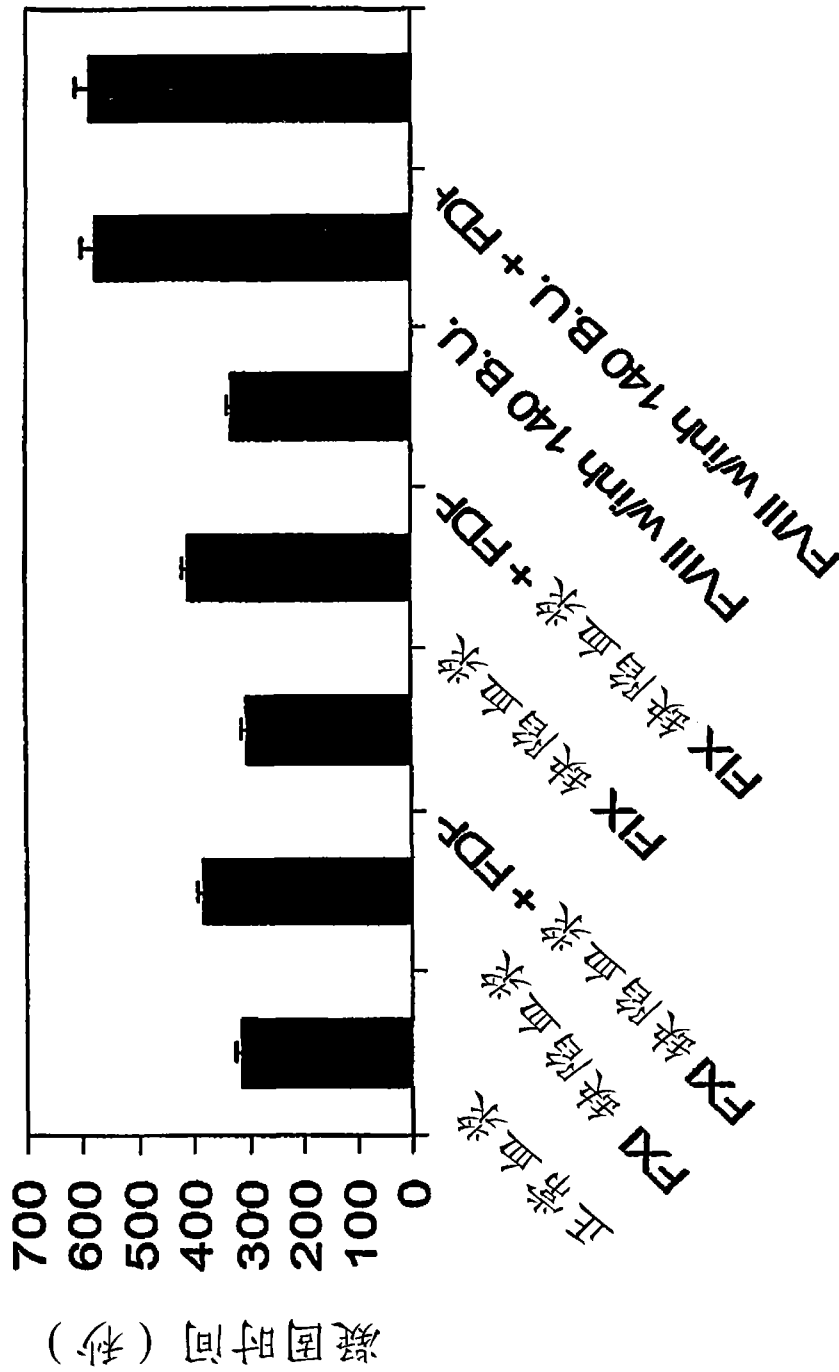


图 23



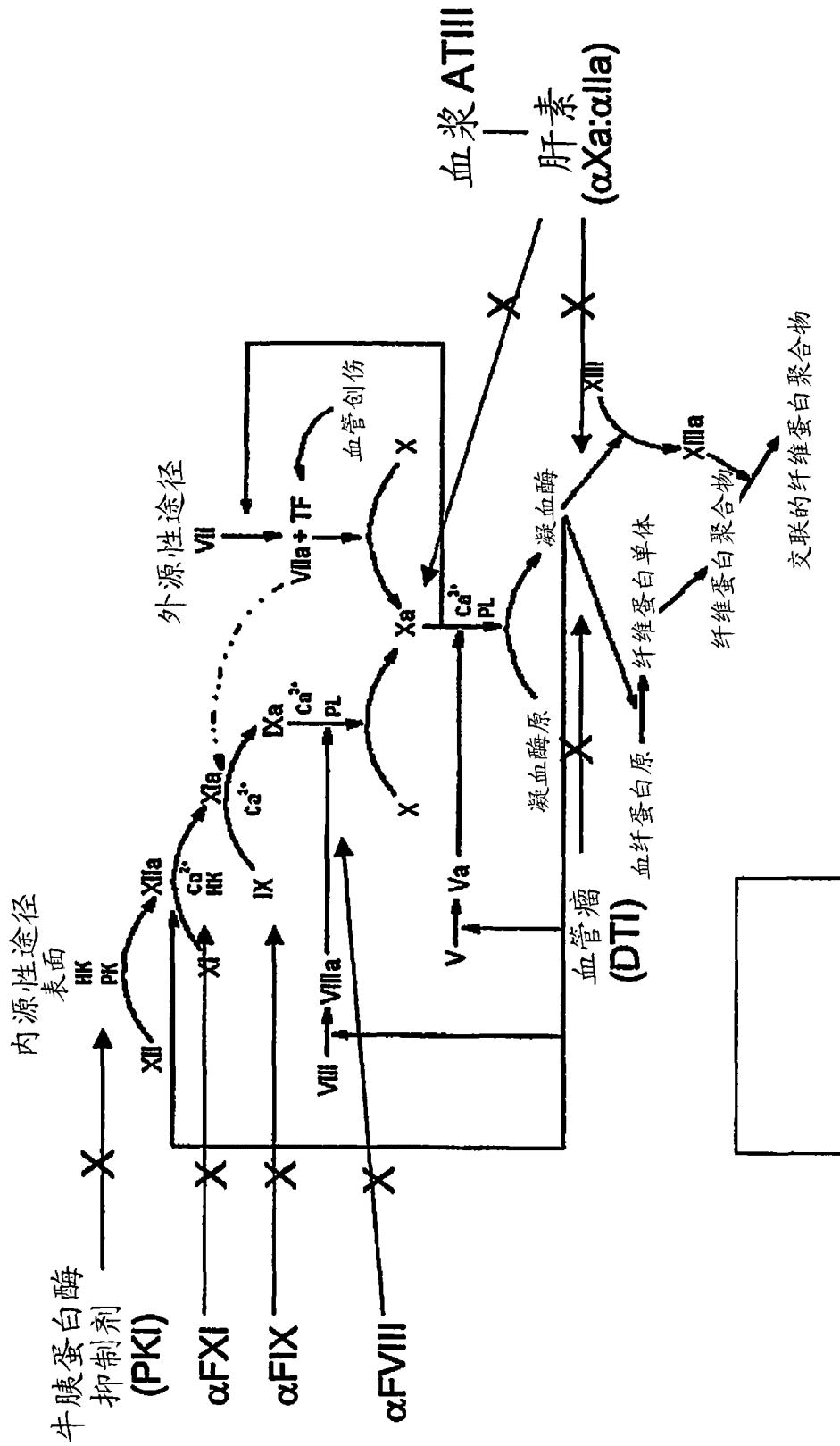


图 24

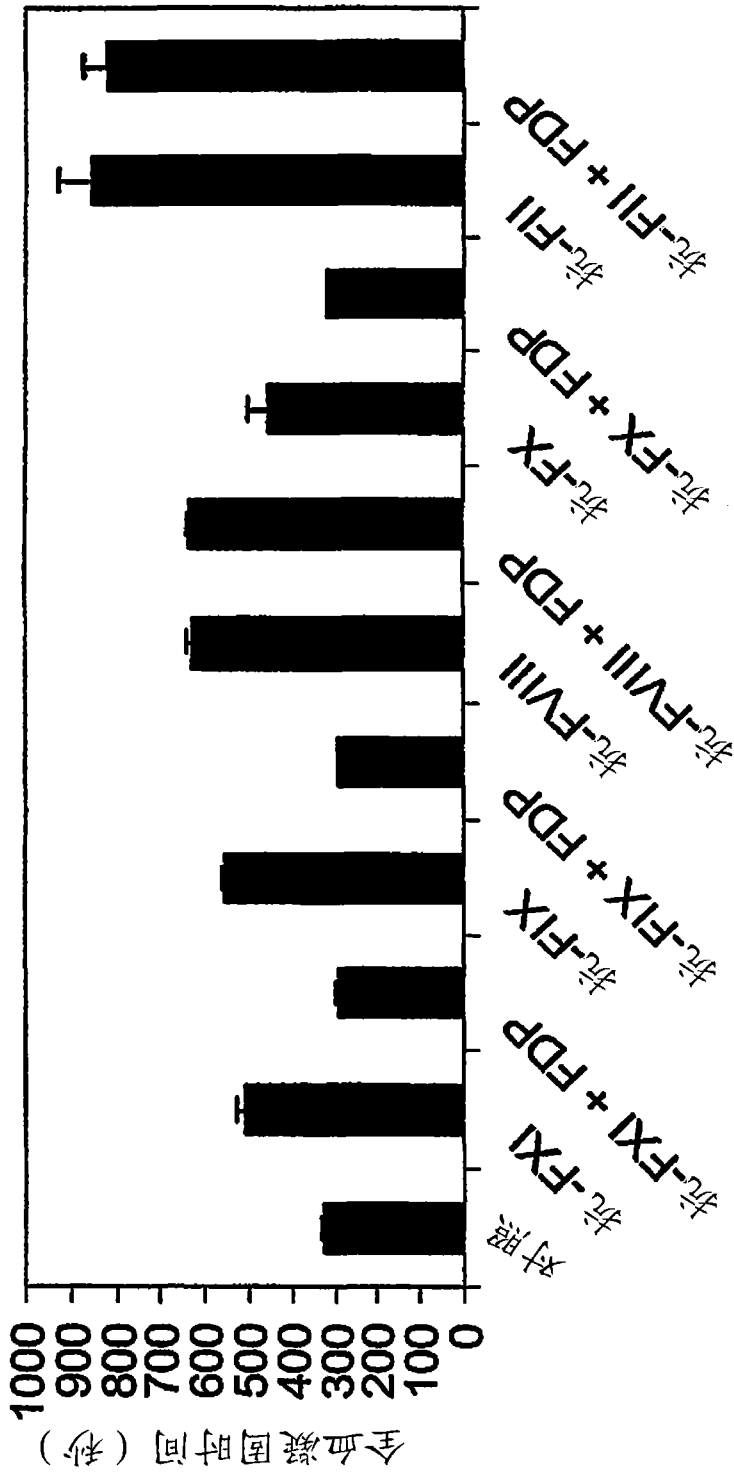


图 25

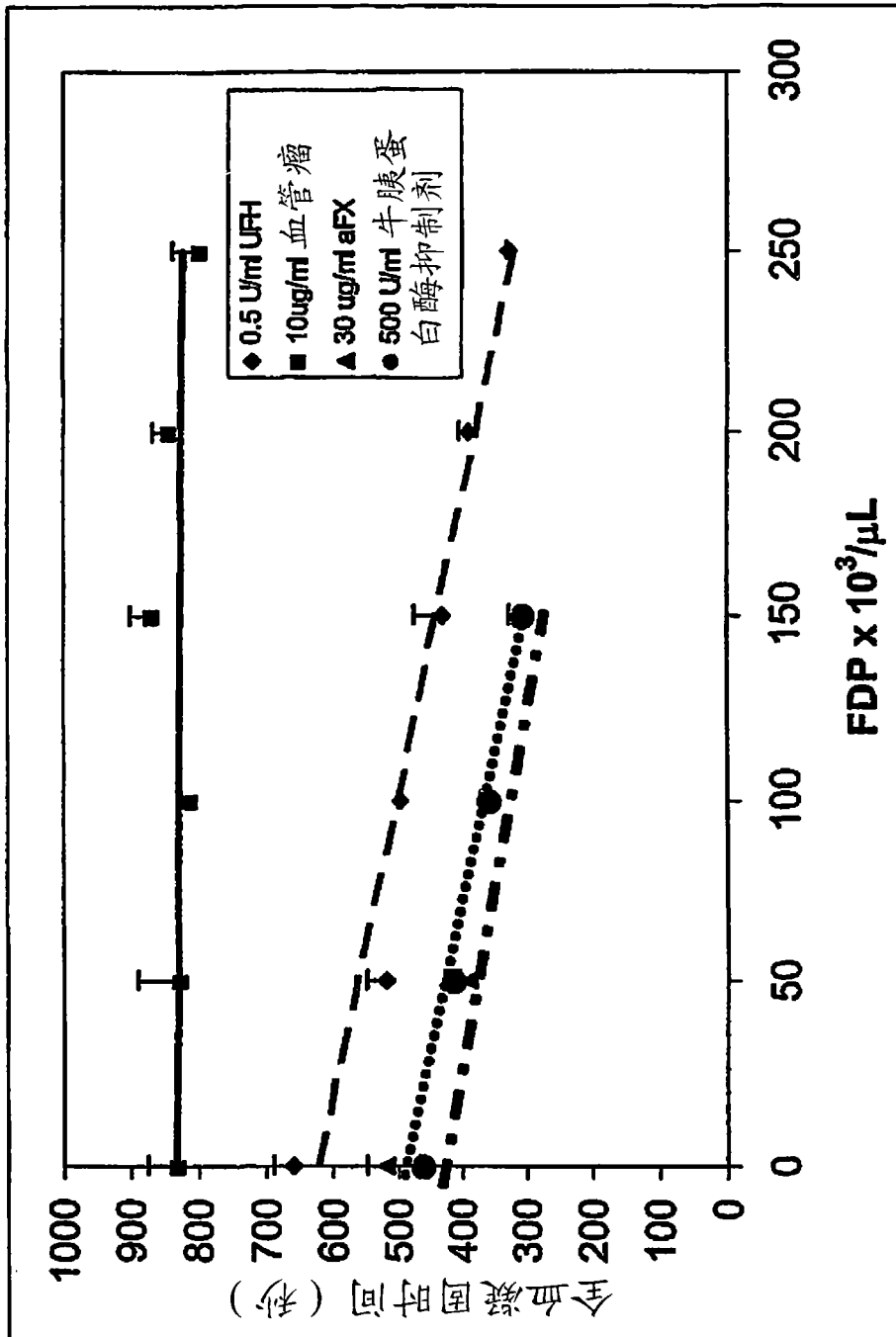
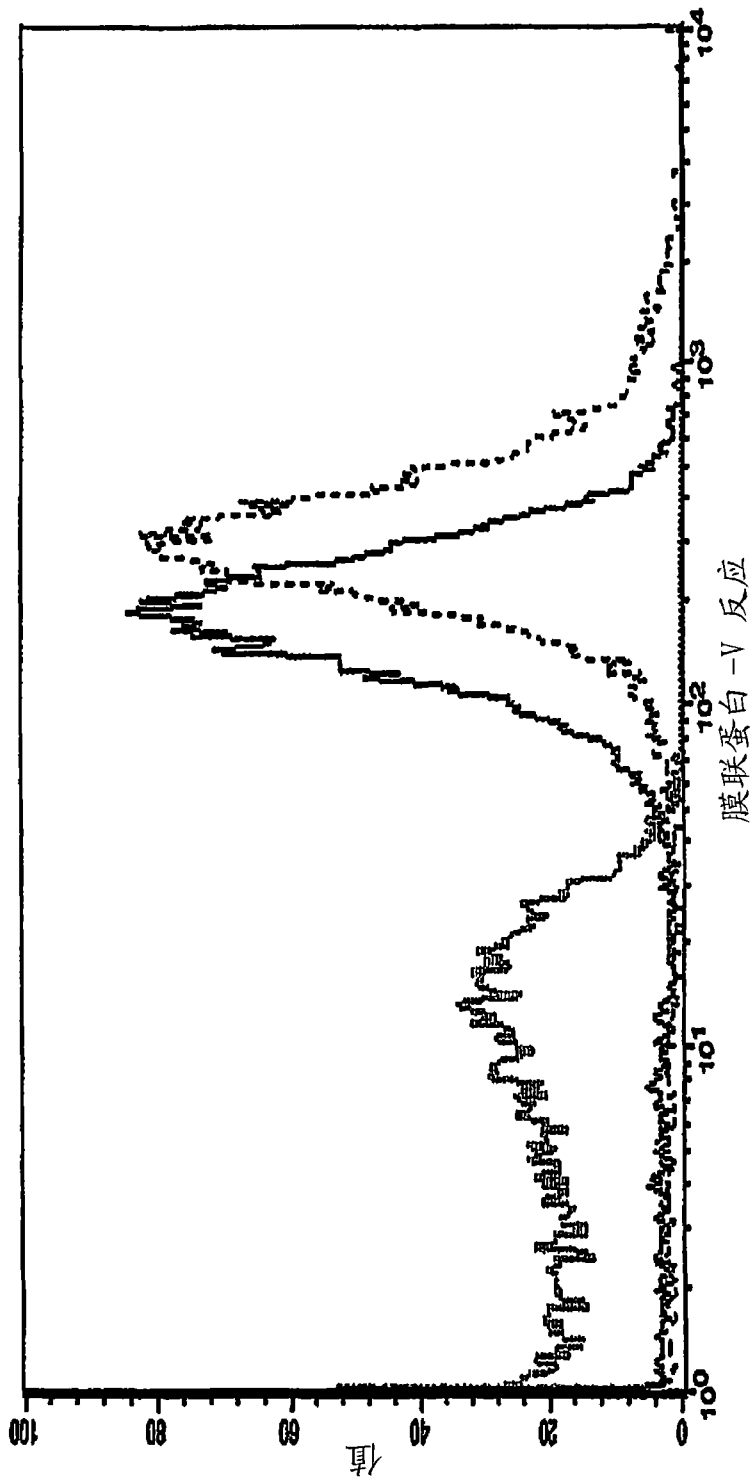


图 26



冷冻干燥后膜联蛋白 V 活化

点——同种型

实线——膜联蛋白 V 休眠

虚线——膜联蛋白 V 活化 (20 μM SFLLRN)

图 27

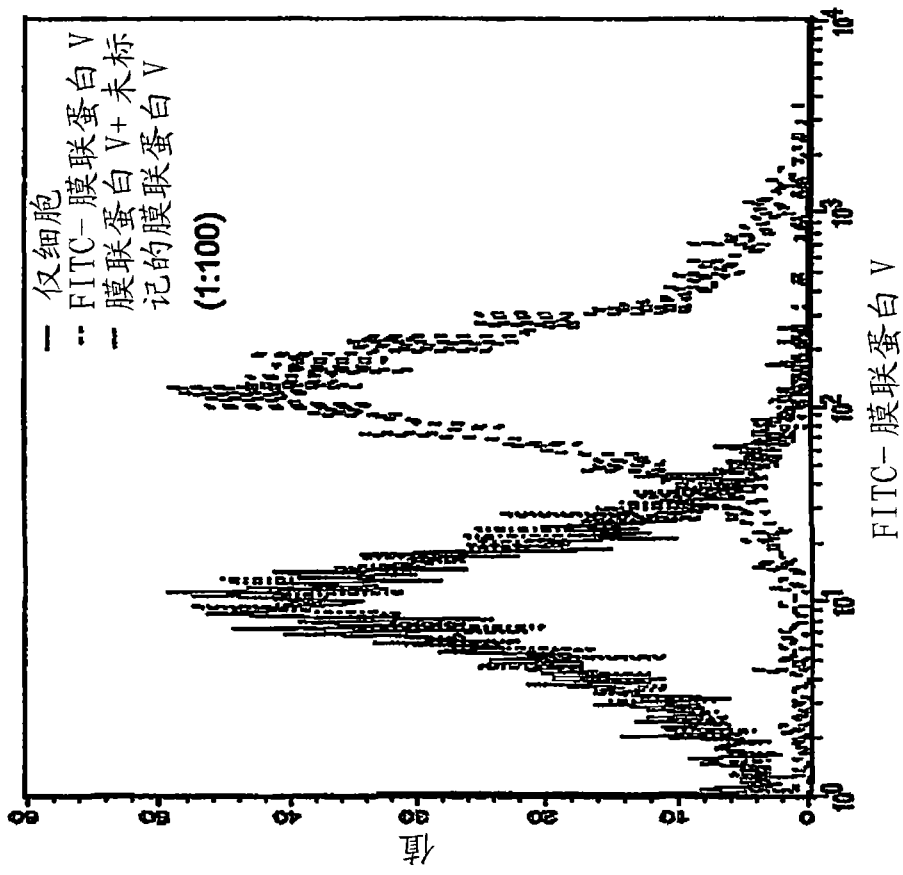
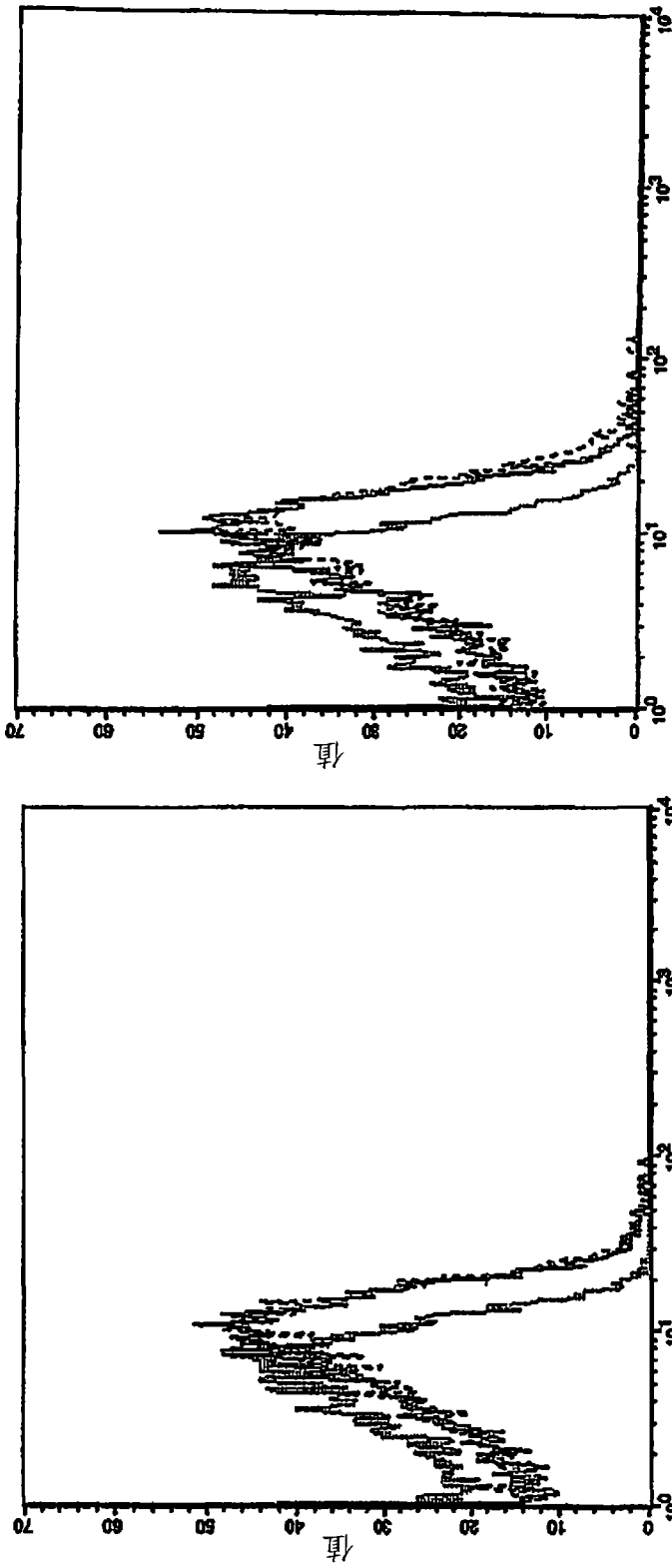


图 28



图例	名称
——	2004-10-14 仅细胞 .002
——	2004-10-14 25 nM FITC Vlla.002
- - -	2004-10-14 100-1 未标记的 .002

图 29

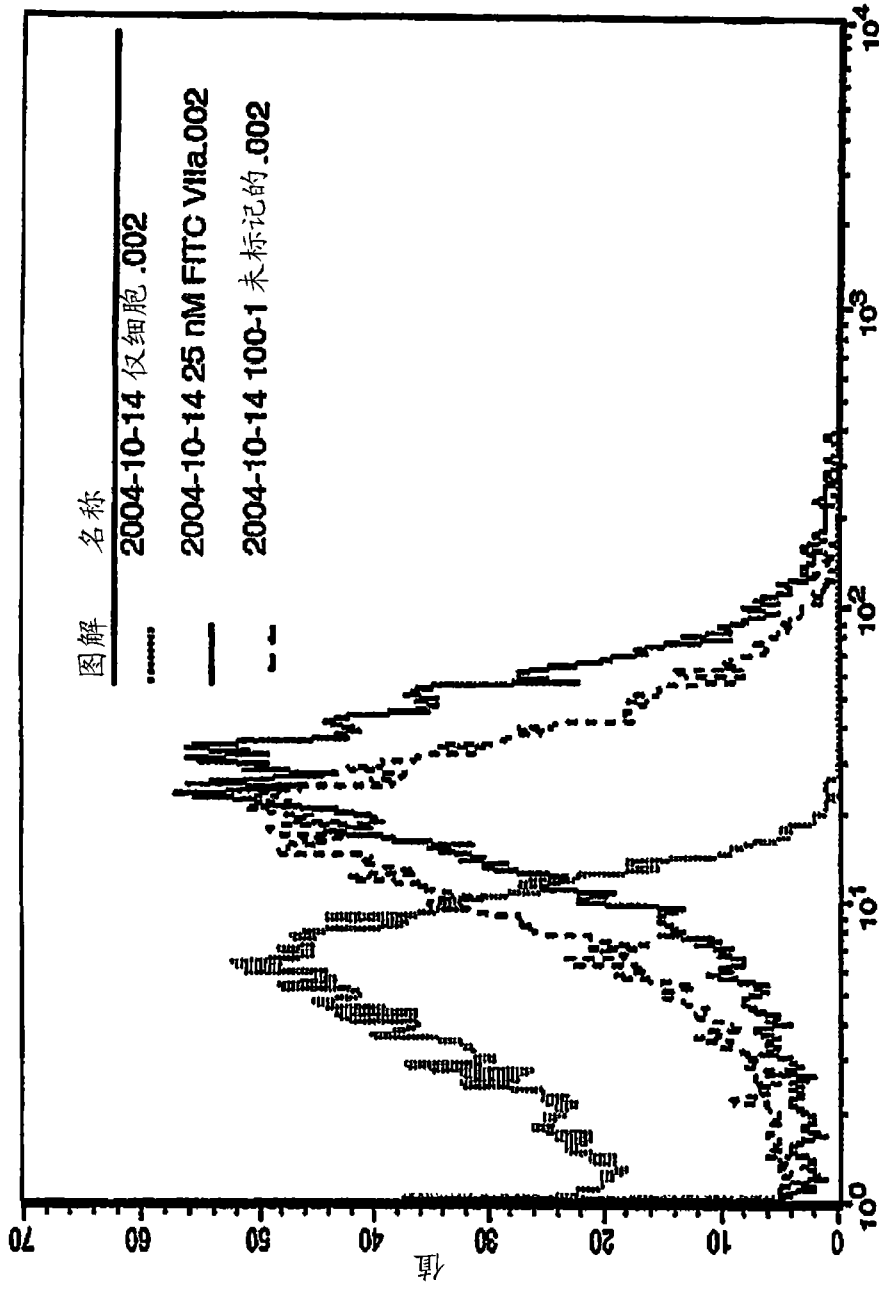


图 30

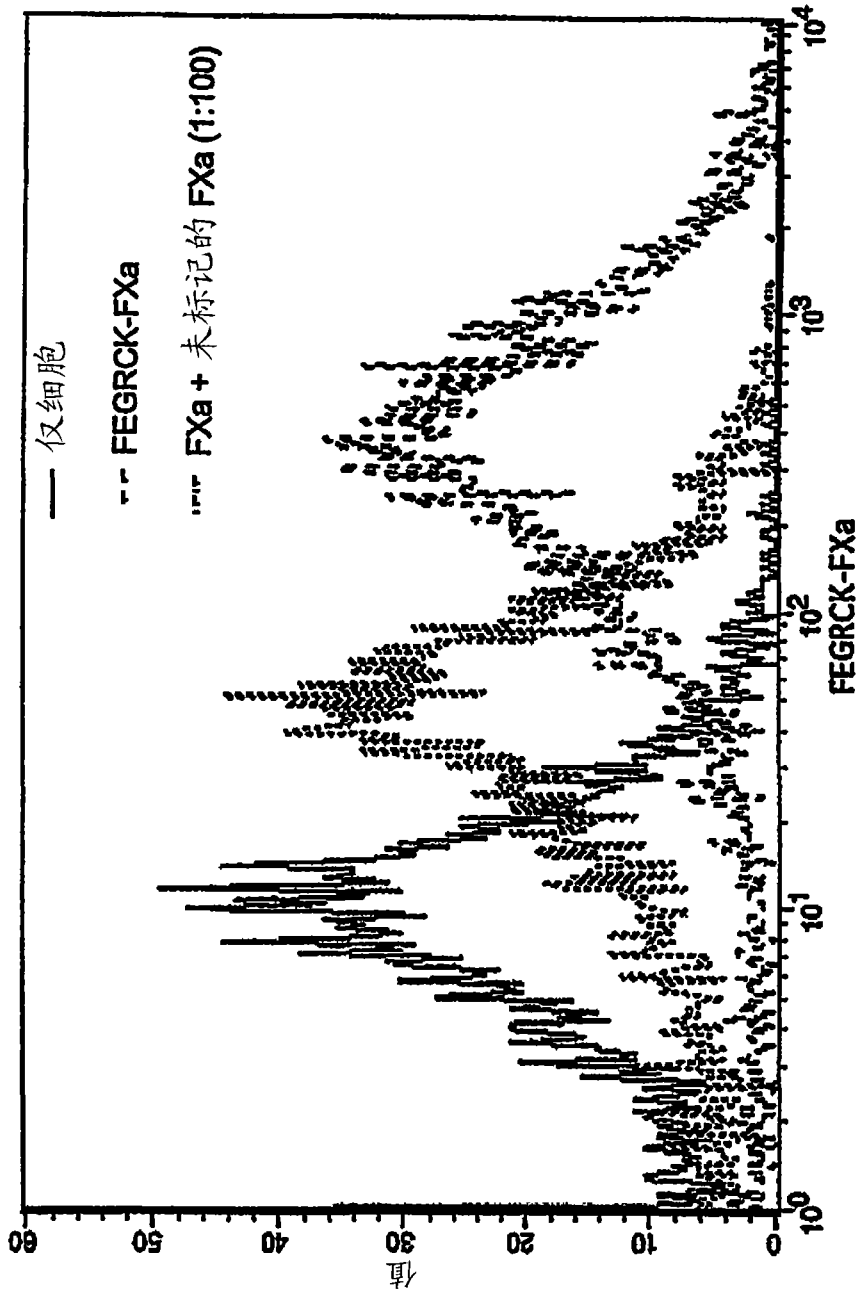


图 31



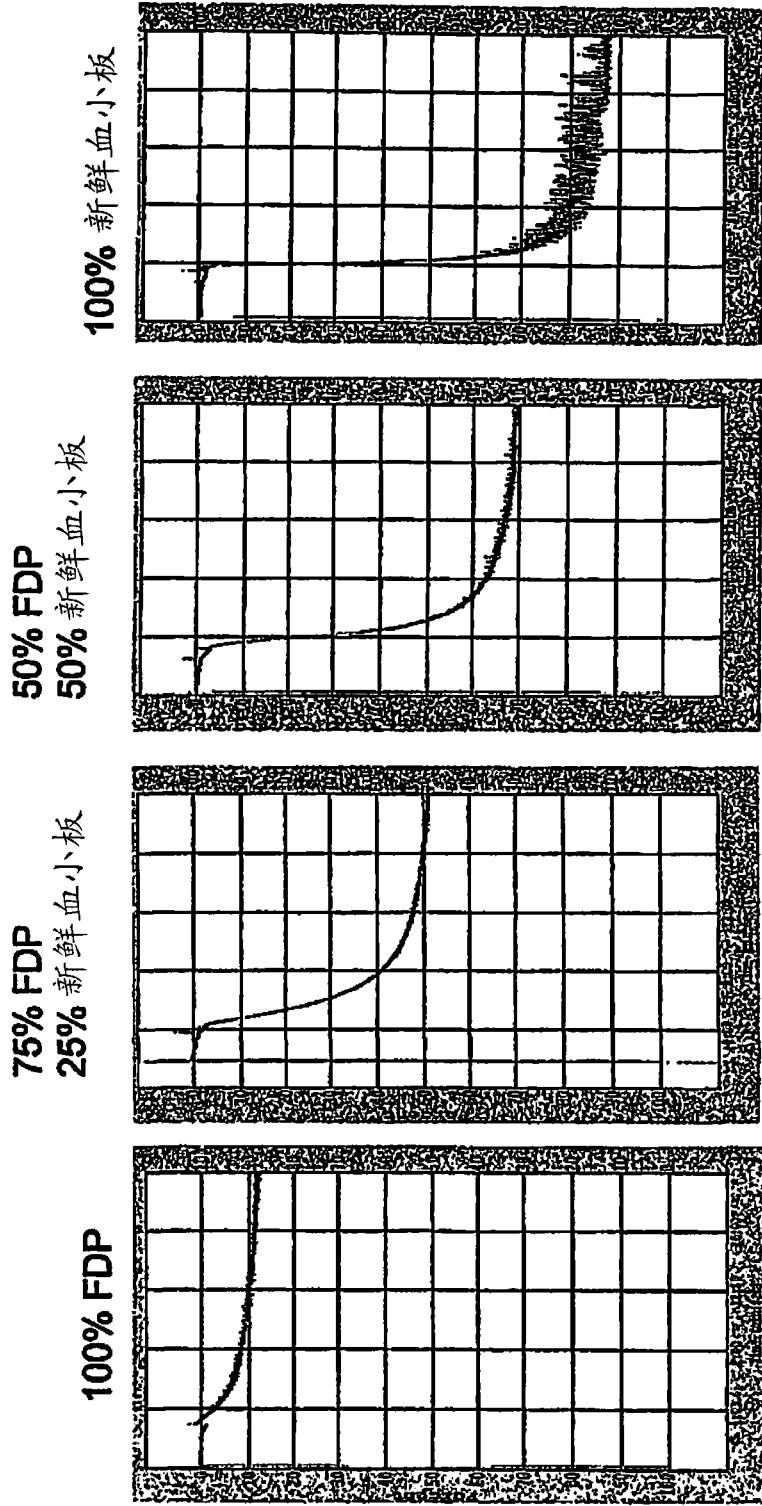


图 32

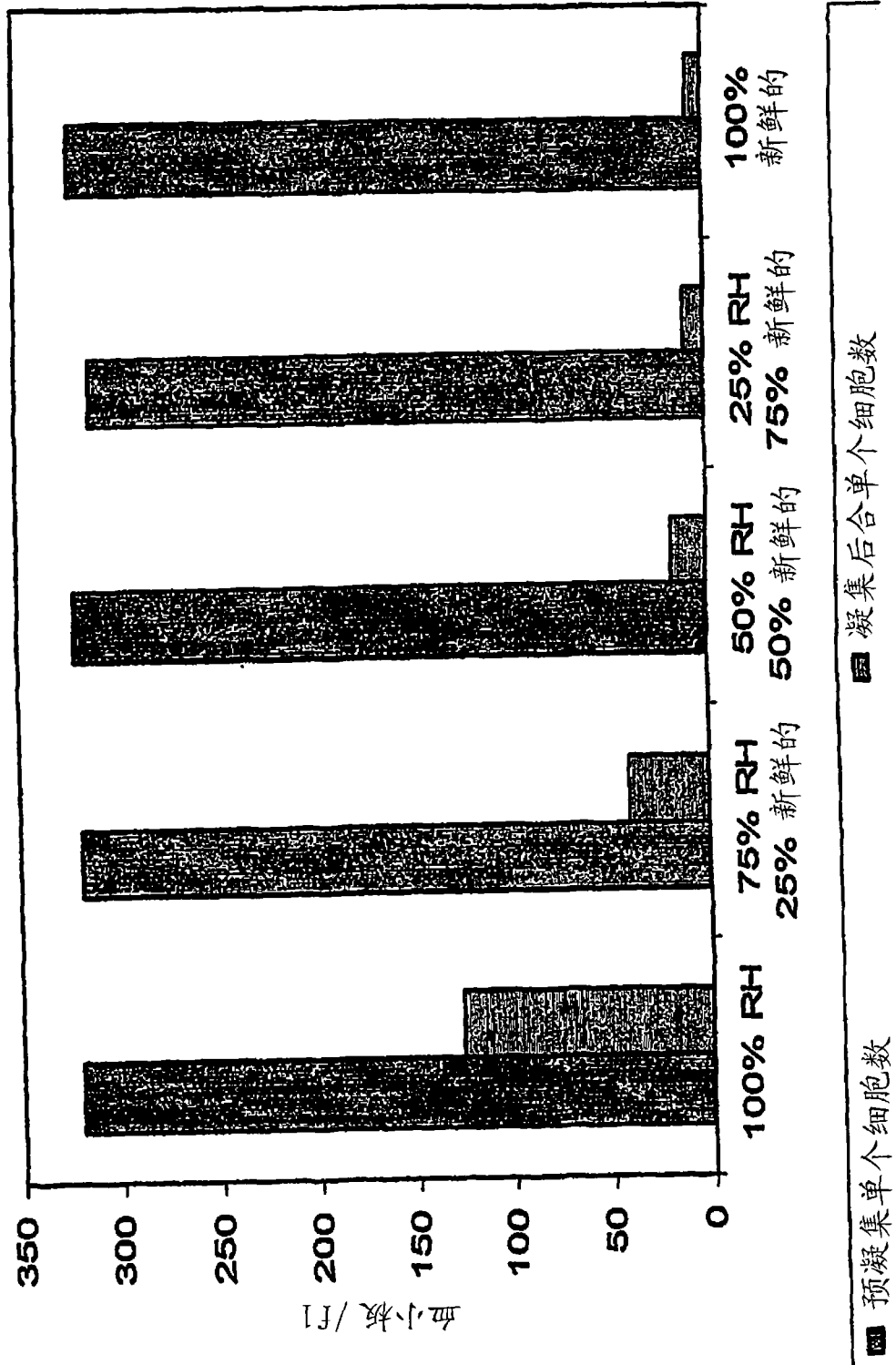


图 33

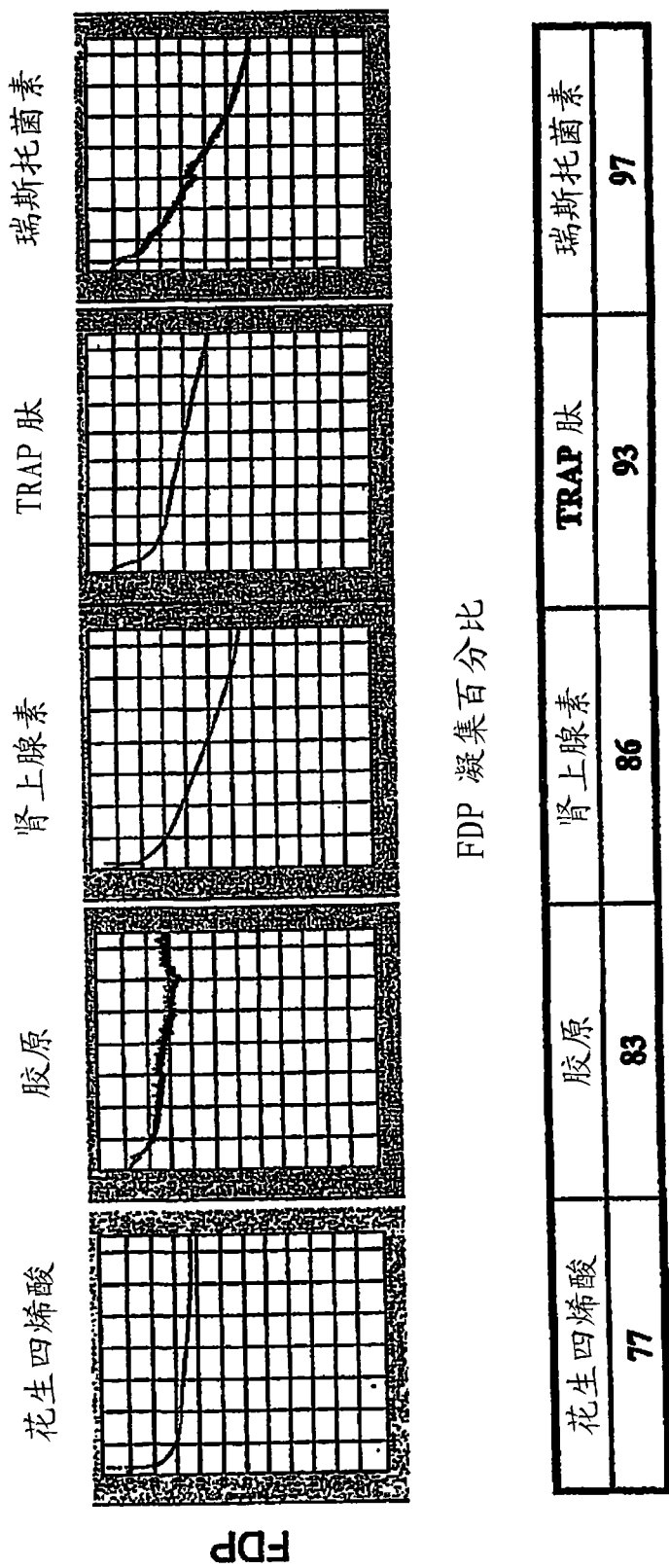


图 34

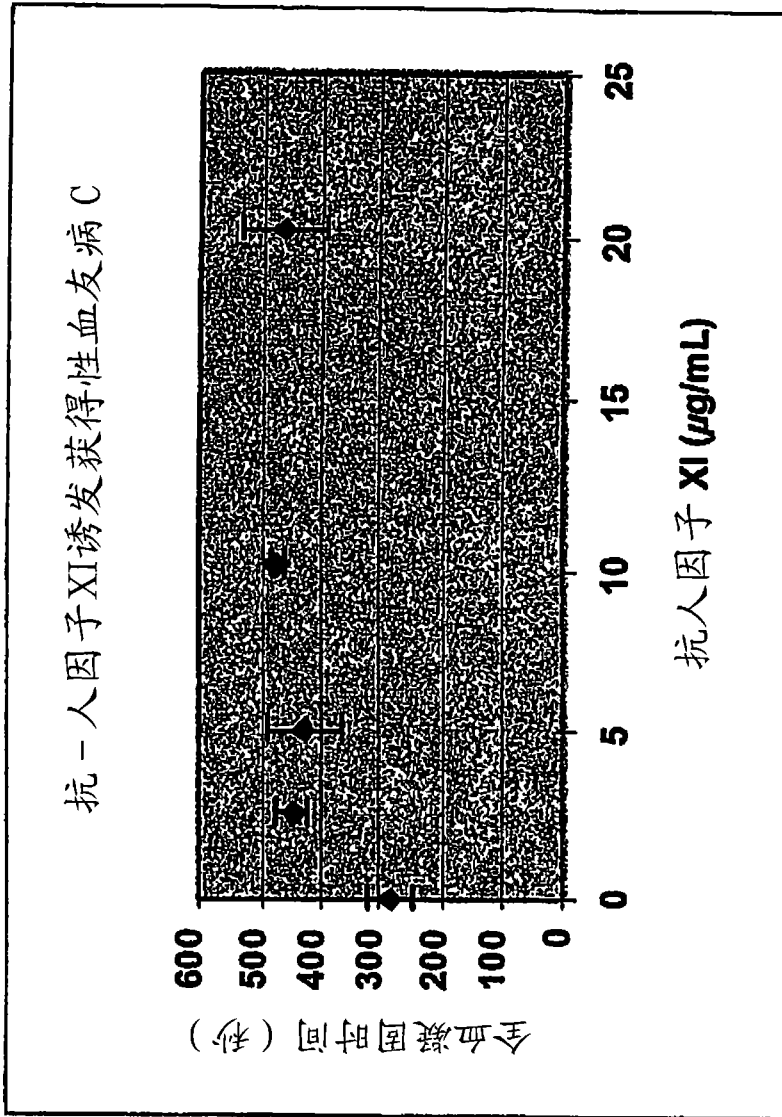


图 35A

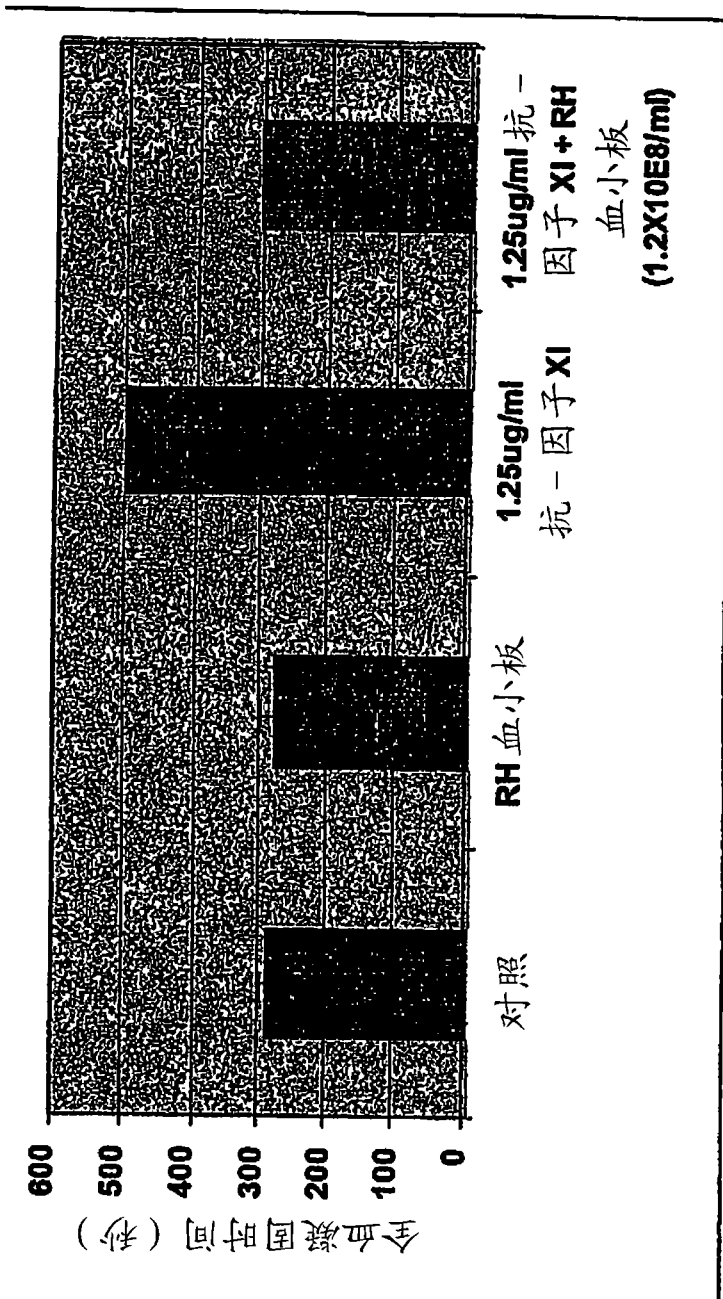


图 35B

RH 血小板对由抗-因子IX抑制的血液凝固时间的影响

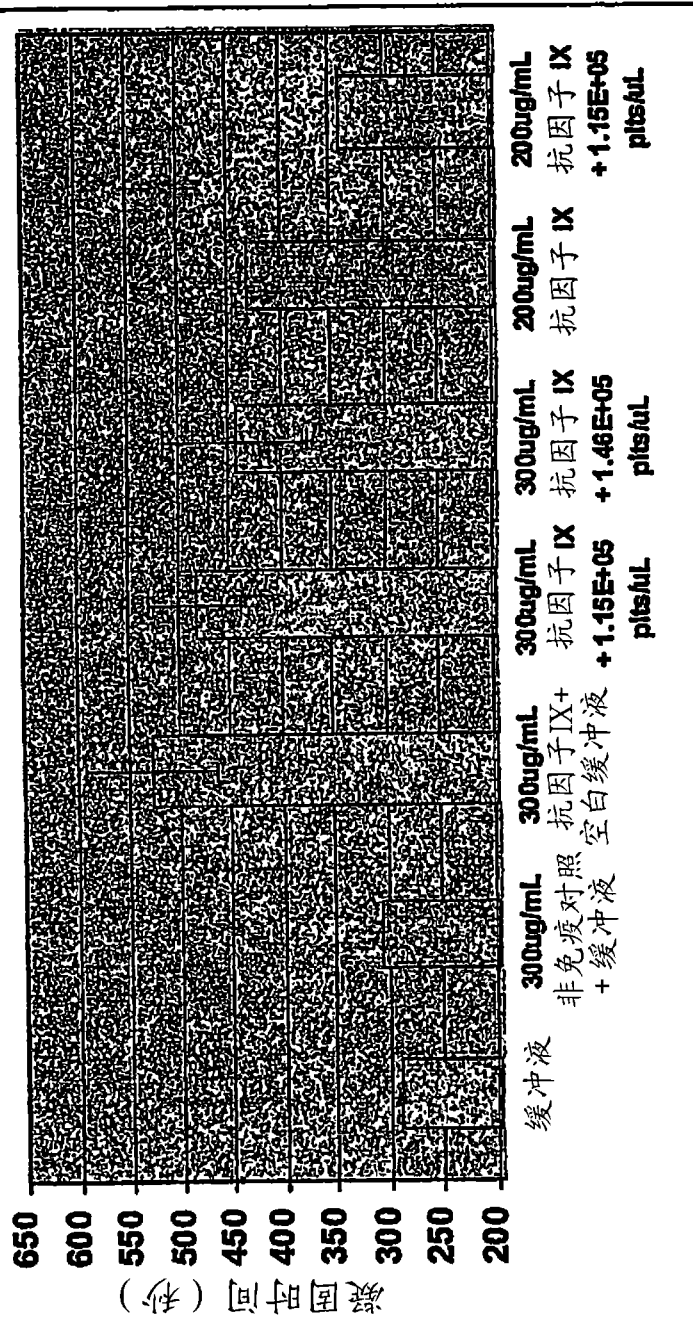


图 36

再水化血小板由抗-人因子VIII抑制的血液的影响

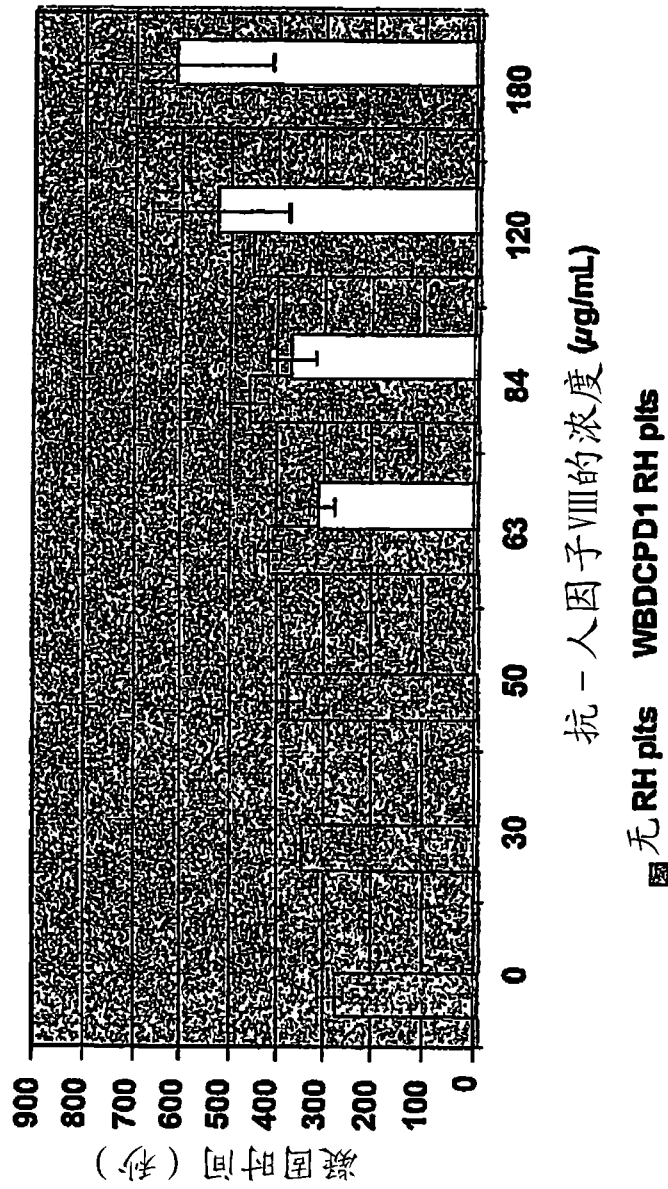


图 37

RH血小板对具有多种缺失  
和抑制剂的血液的影响

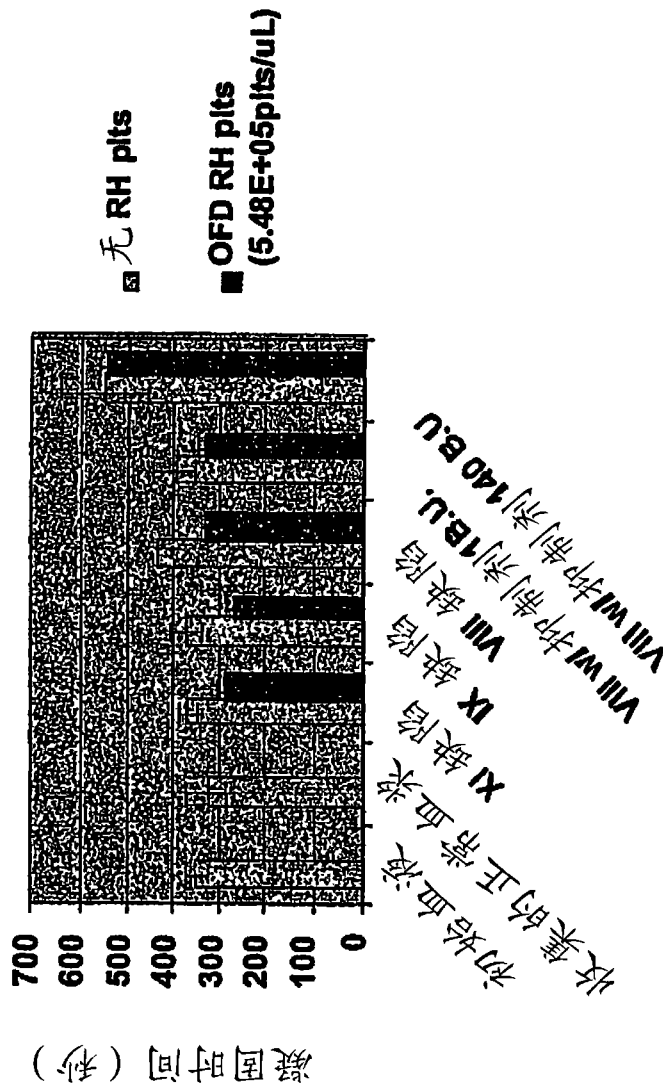


图 38



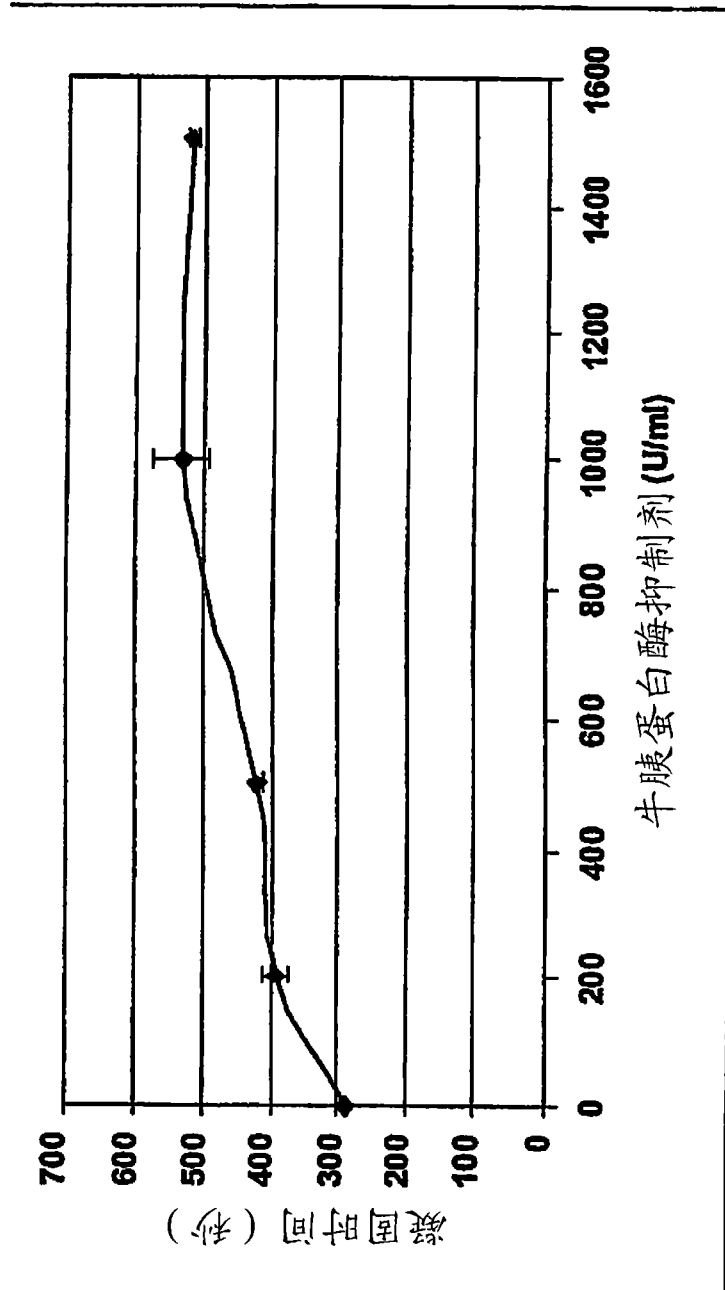


图 39A

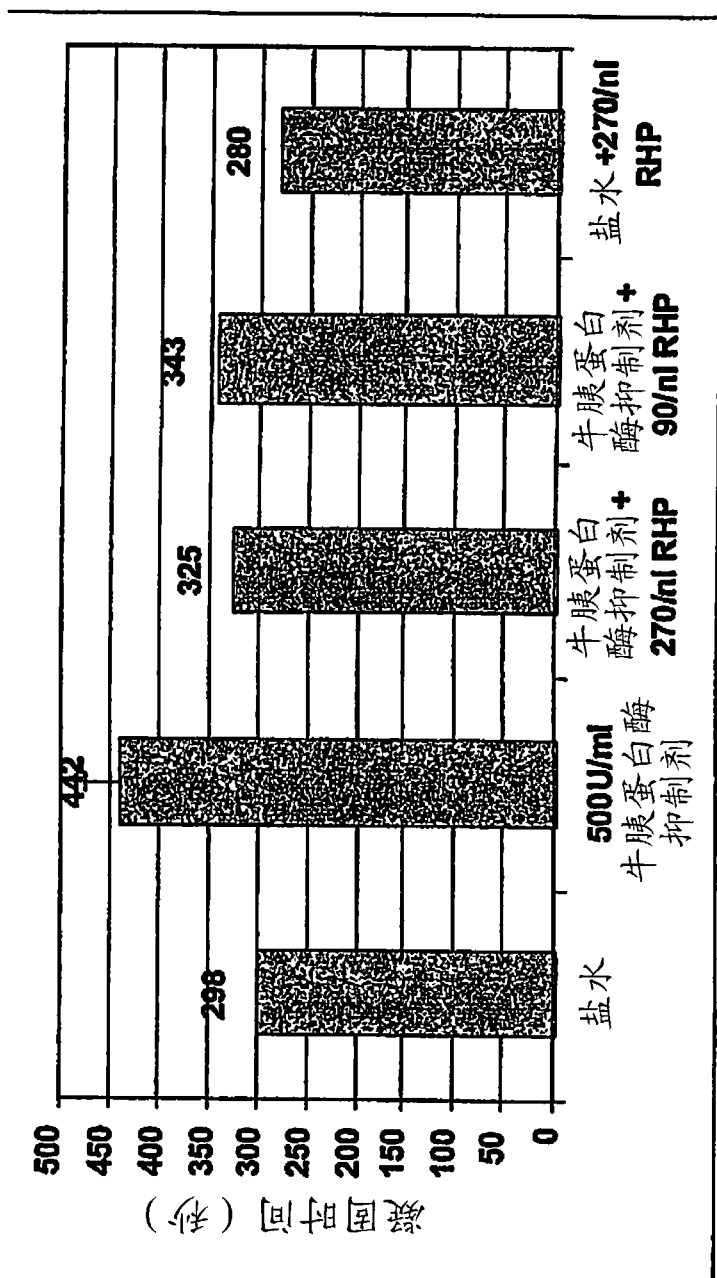


图 39B

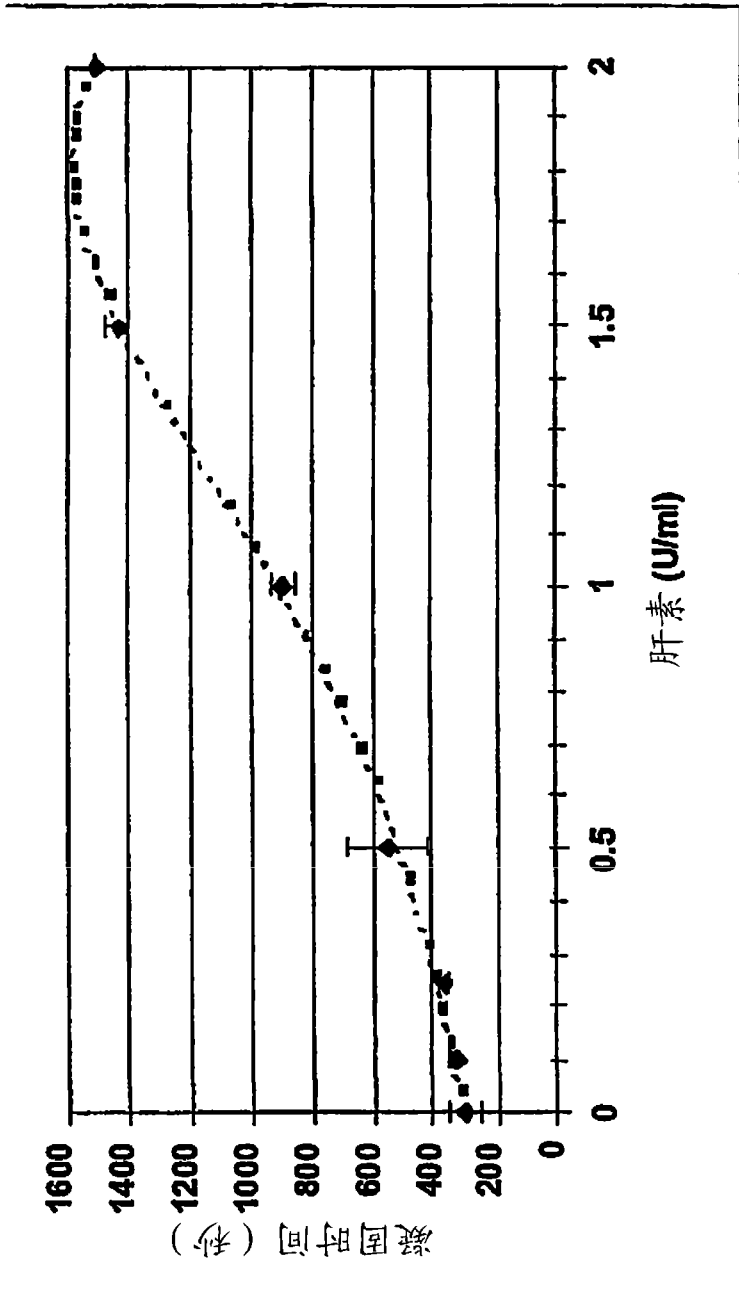


图 40A

通过 RHP 反转肝素诱发的凝血症  
(41% Hct; 198 plts/ml)

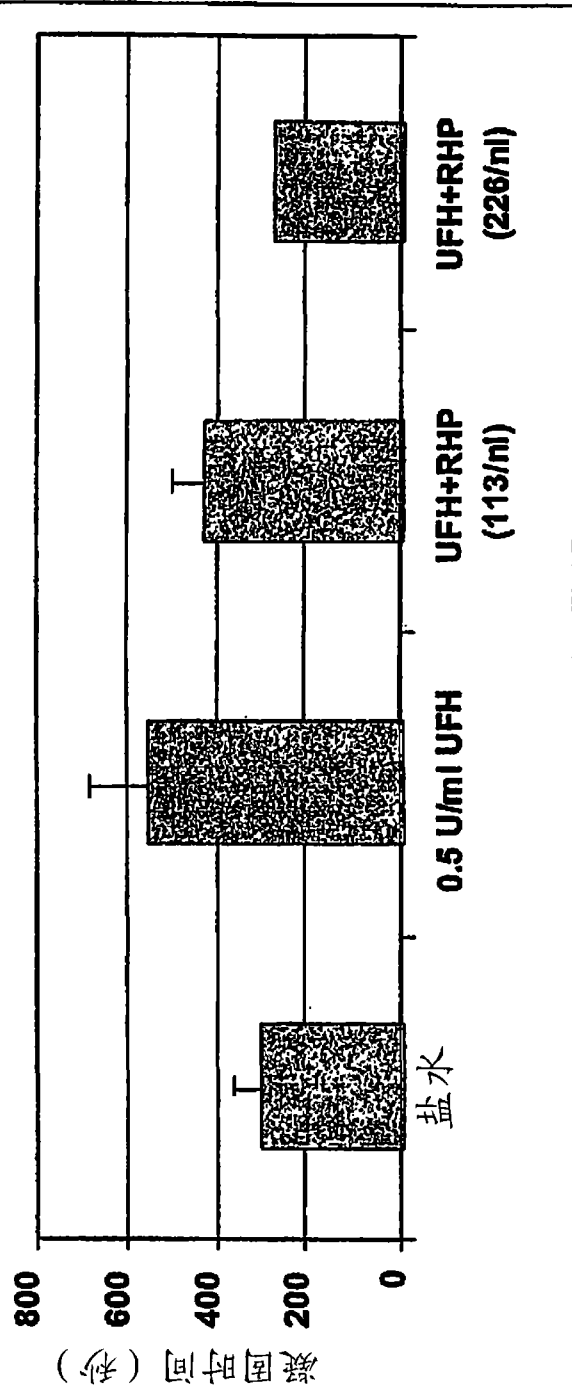


图 40B

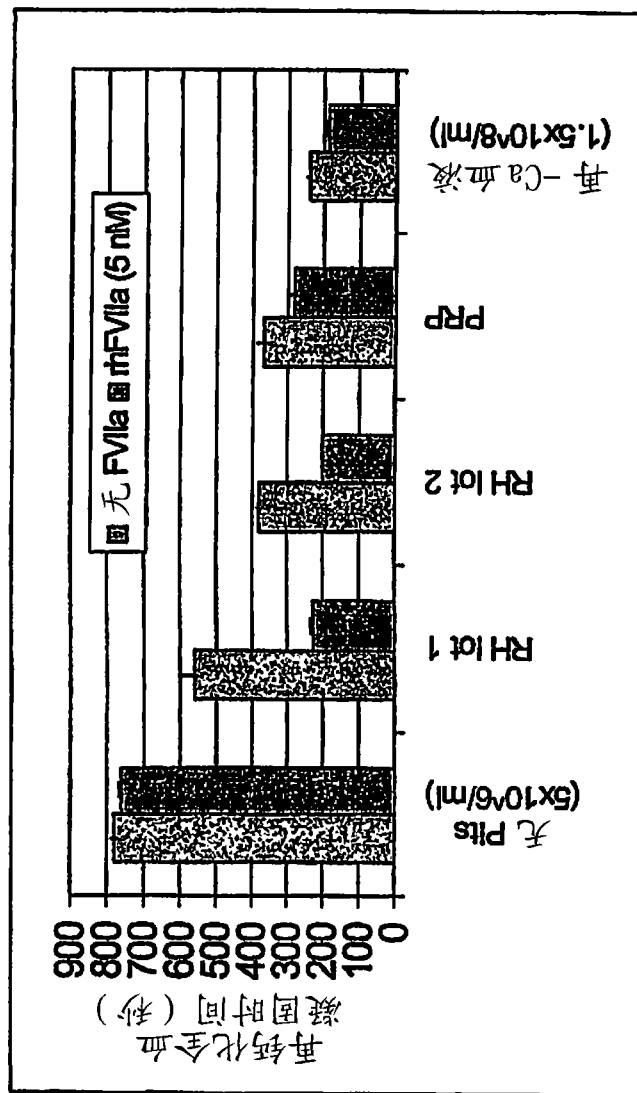


图 41A

用 120 nM FITC-PPACK VIIa 培养

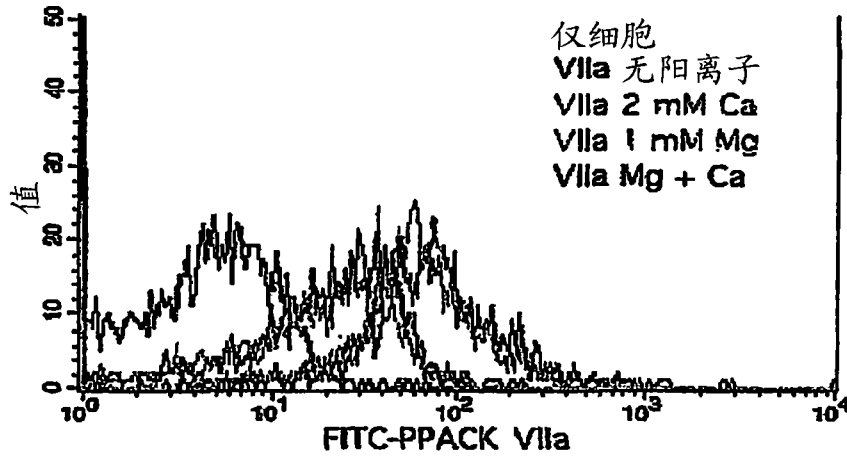


图 41B

用 2mM Ca<sup>++</sup> 培养

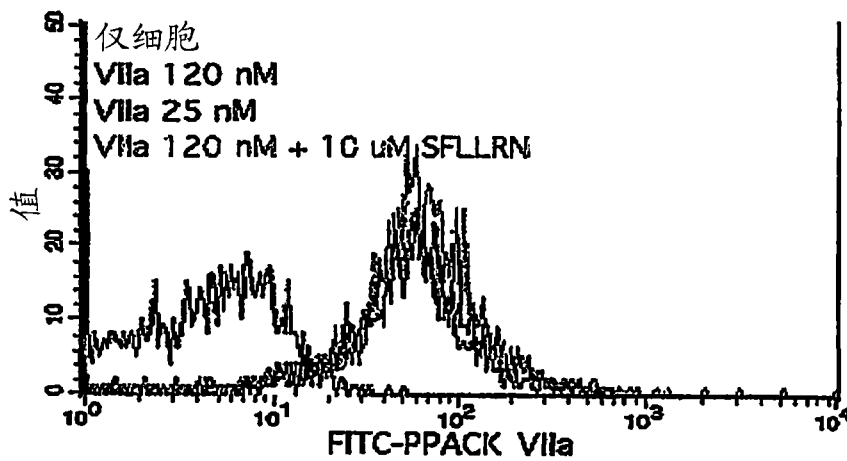


图 41C

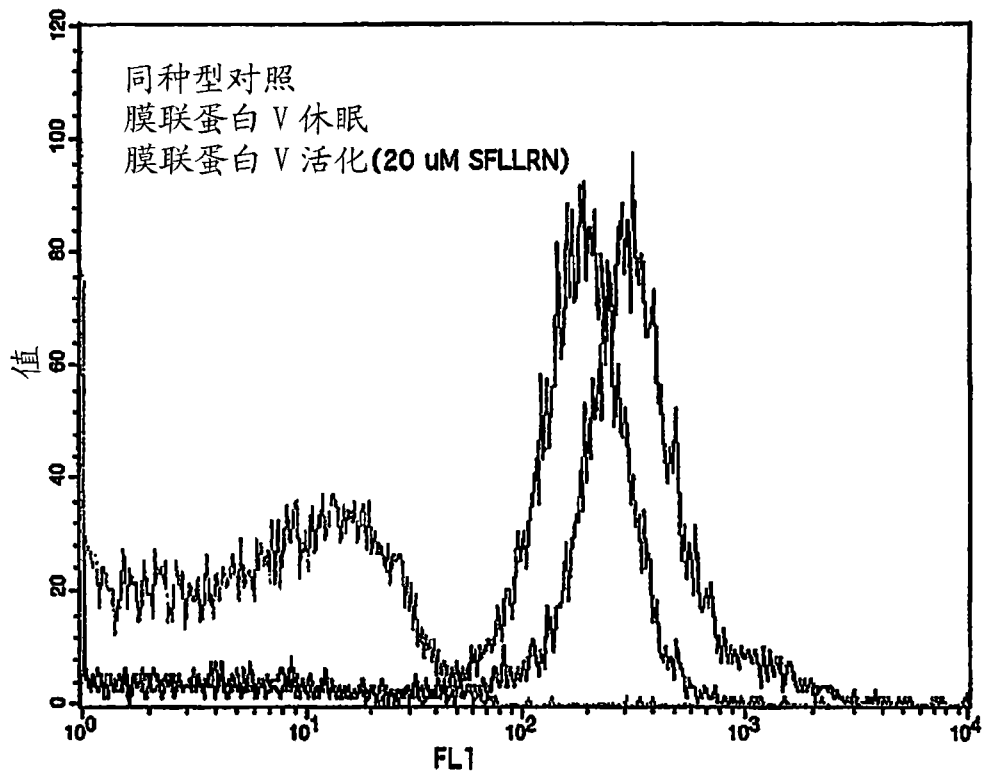


图 42