

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/16

B01D 21/26 C07K 14/75

C12Q 1/56 A61P 7/04



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98810252.8

[45] 授权公告日 2003 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1113656C

[22] 申请日 1998.10.16 [21] 申请号 98810252.8
[30] 优先权
[32] 1997.10.17 [33] US [31] 60/062,264
[86] 国际申请 PCT/US98/21626 1998.10.16
[87] 国际公布 WO99/20288 英 1999.4.29
[85] 进入国家阶段日期 2000.4.17
[71] 专利权人 丰收技术股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 卢·布拉塞蒂
[56] 参考文献
US5030215A 1991.07.09 B65D35/22
审查员 王晓沛

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 从富含血小板的血浆中沉淀富集生长因子的纤维蛋白原浓缩物

[57] 摘要

向具有高浓度血小板的血浆如富含血小板的血浆中添加沉淀剂,可使纤维蛋白原的产量提高。所述的沉淀剂可以是已知几种沉淀剂中的任何一种,如聚乙二醇和硫酸铵。在优选的实施方案中通过使血浆在约 580G 进行“软旋”离心,获得富含血小板的血浆。优选使用全自动多级离心多速离心机,而将抗凝全血分离成富含血小板的血浆和红细胞。将富含血小板的血浆中的蛋白质(优选纤维蛋白原、FXIII 和 FVIII)沉淀出来,然后将这些蛋白质和血小板通过进一步的离心而浓缩。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 分离富含生长因子的纤维蛋白原浓缩物的方法，包括如下步骤：

5 获得富含血小板的血浆，
 向所述富含血小板的血浆中加入纤维蛋白原沉淀剂，和
 从所述富含血小板的血浆中收获富含生长因子的纤维蛋白原浓缩物。

10 2. 根据权利要求1的方法，其中所述的沉淀剂是聚乙二醇。

3. 根据权利要求1的方法，其中所述的沉淀剂是硫酸铵。

15 4. 根据权利要求1的方法，其中所述获得富含血小板的血浆的步骤包括将血液离心的步骤。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述离心步骤包括使所述血液在约 580G 的离心力下离心约 3 分钟的步骤。

20 6. 根据权利要求1的方法，其中所述富含血小板的血浆包括具有 5 万-45 万个血小板/mm³ 的血浆。

7. 根据权利要求1的方法，其中所述收获纤维蛋白原的步骤包括使所述富含血小板的血浆和所述沉淀剂一起离心的步骤。

25 8. 根据权利要求1的方法，其中所述获得富含血小板的血浆的步骤包括将约 50ml 的抗凝全血进行离心并滗析出 23-25ml 的所述富含血小板的血浆的步骤，所述加入沉淀剂的步骤包括向所述富含血小板的血浆中加入约 15ml 30% 分子量为 1000 的聚乙二醇的步骤。

30

9. 根据权利要求 1 的方法，其中所述获得富含血小板的血浆的步骤包括将约 50ml 的抗凝全血进行离心并滗析出 23-25ml 的所述富含血小板的血浆的步骤，所述加入沉淀剂的步骤包括向所述富含血小板的血浆中加入约 7ml 饱和硫酸铵的步骤。

5

10. 根据权利要求 1 的方法，其中所述收获纤维蛋白原的步骤还包括向所述纤维蛋白原中加入缓冲液的步骤。

11. 由权利要求 1-10 中任一项所述方法制得的产物。

10

从富含血小板的血浆中沉淀富集
生长因子的纤维蛋白原浓缩物

5

技术领域

本申请涉及收集和浓缩血组份的改进方法。具体而言，本发明涉及从富含血小板的血浆制备富集生长因子的纤维蛋白原浓缩物。

10

背景技术

人们一直盼望着一种能在封闭的体系中快速地从全血中浓缩并收集到某些血液蛋白质的方法，所述的血液蛋白质也包括血小板和某些生长因子，以便有助于医生用于使伤口闭合、较快地止血、防止空气和液体渗漏和有助于快速愈合和进行药物和生物传递。

15

20

本领域的技术人员知道当在手术期间从患者身上收集到富含血小板的血浆后并将之与凝血酶（通常按 7:1 的比例）混合，然后将它们放置在伤口处，在此后的几秒内就会有血小板凝胶形成。该凝胶比其它任何常规的止血剂都能更快地达到止血的效果。由于该凝胶具有粘稠的性质，它还能堵住空气和液体渗漏，由于血小板衍生生长因子（PDGF）的存在，最终导致伤口较快地愈合。这种凝胶仅含有天然水平的纤维蛋白原、FXIII、FVIII 和 PDGF。因此，由该凝胶所形成的粘附力、张力和剪切力通常比所期望的要低。由于所需蛋白的含量低，甚至还会产生止血或封堵失败的事情，导致不能实现所期望的结果。

25

30

在患者手术期间从患者体内收集富含血小板的血浆需要一台“血液处理器”，有一种血液处理器是在“Cell Saver”商标的名义下出售的，其它由各公司制造的此类装置也是已知的。“Cell Saver”需要一名有高度技巧，有时甚至是有资格的操作员，来开启和操作该装置。操作过程（一般持续 30-60 分钟）中需要大口径静脉或动脉接口并需

处理多至几升的血液以获得并收集到足够体积的血小板和血浆。患者的血流状态和心脏状态必须十分稳定，才能允许处理如此大量的血。

5 美国专利 5707331 (Wells.等人)描述了用于获得自体固有的纤维蛋白原的自动化系统，该专利公开的内容引入本文做参考。根据该系统，将相对少量（例如 50ml）的全血放入 2-室可脱式容器的第一室中。将纤维蛋白原沉淀剂放入第二室中。然后将容器置于离心机中，并对全血离心以分离出血浆，产生血小板贫乏的血浆。将如此获得的血小板贫乏的血浆倾入第二室中，在那与沉淀剂（例如 PEG 或硫酸铵）混合。
10 然后再对血浆和沉淀剂离心，以获得用于与凝血酶混合的纤维蛋白沉淀，制备出纤维蛋白密封剂。

优选实施方案的描述

15 收集纤维蛋白原的方法的一个重要因素，如描述于上述美国专利 5707331 中的那些，是收集在沉淀中的纤维蛋白原占全血的百分比。本申请人发现，当从其中沉淀出纤维蛋白原的血浆含有较高水平的血小板时，上述重要的因素，即“纤维蛋白原的产率”就意想不到地较高。因此，根据本发明的方法，将已知的纤维蛋白原沉淀剂加入到富含血小板的血浆中，能获得高产率的纤维蛋白原。

20

现有方法获得的纤维蛋白原的产率通常为约 50%，而本发明方法所获纤维蛋白原的产率却为 72%，表明所收获的纤维蛋白原有 44% 的增加。

25 在优选的实施方案中，从其中沉淀出纤维蛋白原的富含血小板的血浆含有至少 5 万个血小板/ mm^3 ，优选含有约 20 万个/ mm^3 。

30 本发明能在相对较短的时间（约 20 分钟）内，从相对较小量（20cc-150cc）的抗凝全血中生产 FVIII 和浓缩蛋白（高至 10 多倍），优选纤维蛋白原、FXIII 和血小板（结果是人生长因子增多）。在凝集

蛋白浓度方面本发明较现有“Cell Saver”方法的提高使得其可在临床上产生更有效（张力更大并剪切力更大）的凝块。相对于“Cell Saver”方法所用的几升血液，本发明可通过本领域已知的简单的静脉切开放血术所获得的少量(20cc-150cc)的患者血液来生产临床有效的剂量。

5

优选方法采用描述于美国专利 5707331 中的专用离心机和可脱式容器来处理从患者（或指定的血液供体）身上采集的抗凝全血。根据本发明，将上述专利所描述的方法加以改进，通过适当地控制离心速度和对血液离心的时间长短来提供富含血小板的血浆。

10

将采用静脉切开放血术而从哺乳动物身上采集的抗凝血分散到 2-室可脱式容器的第一室中，并将适量的沉淀剂如 PEG 或饱和硫酸铵放入第二室中。上述硫酸铵可以是 25-100%的硫酸铵，并优选约 95%的硫酸铵。将上述可脱式容器放入如美国专利 5707331 中所述的专利离心机中，并开始该专利所描述的方法。对该离心进行编程以自动完成如下步骤：

15

1. 在能产生富含血小板的血浆（PRP）的旋转速率下从全血中分离出红细胞。该旋转速率被称为“软旋”，并优选产生约 580G 的那一转速。然后停止离心，并将 PRP 从第一室倾入第二室中，在第二室中与沉淀剂混合。已经发现该“软旋”能产生具有约 $50\text{K}/\text{mm}^3$ - $450\text{K}/\text{mm}^3$ 血小板浓度的血浆。

20

2. 在上述混合完成之后，重新开始离心，通过“硬旋”而将沉淀蛋白质与血小板一起浓缩，所述“硬旋”优选产生约 3500G 的那一转速。

25

3. 上述第 2 步之后，将血小板贫乏的和纤维蛋白原贫乏的血浆以及残留的沉淀剂从第二室倒回到第一室中，留下相对干燥并富含生长因子的蛋白质/血小板沉淀。已经发现将沉淀剂如 PEG 或硫酸铵与 PRP 一起使用比将沉淀剂和血小板贫乏的血浆（PPP）一起使用的技术能收获更多的蛋白质(特别是纤维蛋白原)。

30

4. 将适量的稀释剂(优选柠檬酸盐缓冲液)加入，以将沉淀再次溶

解，并收获蛋白质/血小板沉淀，以便例如用注射器进行输送。

5 5. 当将收获的含高含量人生长因子的浓缩蛋白质与凝血酶混合并将所得产生置于伤口部位时，在放置后数秒内就会形成血小板凝胶。该凝胶比使用其它常规止血剂能获得更快的止血效果。由于其具有粘性，它还能封堵住空气和液体渗漏，并且由于有大量的血小板衍生长因子（PDGF）的存在，结果导致愈合更快。该凝胶的性能包括 FVIII 和纤维蛋白原 FXIII 含量的增高，以及人生长因子比固有水平的提高。这些物质含量的提高使得所产生的凝块具有更理想的粘附力、张力和剪切力。由于所需蛋白的含量较高，减少了凝块在成熟前失败的危险，并增大了获得所需结果的可能性。

10

实施例 1

将 50ml 全血放入用于全自动离心的容器的第一室中，并将 15ml 30%聚乙二醇(MW1000)放入第二室中。然后将容器在约 580G “软旋”约 3 分钟。由此获得 23-25ml 富含血小板的血浆，然后将该血浆倒入第二室中并使之与 PEG 混合。接着，将容器进行硬离心，并将上清液倒回到第一室中。结果得到了纤维蛋白原沉淀，其纤维蛋白原产率为约 70%，TGF-B-1 增加了 4-10 倍，PDGF-AB 增加了 30 倍。

15

20 实施例 2

将 50ml 全血放入用于全自动离心的容器的第一室中，并将 7ml 饱和硫酸铵放入第二室中。然后将容器在约 580G “软旋”约 3 分钟，并将 23-25ml 富含血小板的血浆倒入第二室中，在富含血小板的血浆与硫酸铵混合之后，再将容器进行“硬旋”以得到纤维蛋白原沉淀，并将上清液倒回到第一室中，所得沉淀中的纤维蛋白原的产率为约 72%，TGF-B-1 增加了 4-10 倍，PDGF-AB 增加了 30 倍。

25

在所附权利要求范围内的修改对于本领域的技术人员而言，是显而易见的。