(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108366551 A
(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680046548.7
(22)申请日 2016.06.09
(30)优先权数据
62/173,235 2015.06.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/036731 2016.06.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/201121 EN 2016.12.15
(71)申请人 哈佛学院董事会
地址 美国马萨诸塞州
申请人 美国政府退伍军人事务部
(72)发明人 H·塔特 J·施
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 过晓东
(51)Int.Cl.
A01N 1/00(2006.01)
A01N 1/02(2006.01)

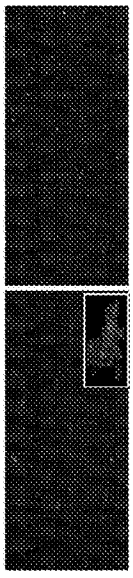
权利要求书8页 说明书27页 附图17页

(54)发明名称

血小板的长期储存和保存

(57)摘要

本文提供一种方法和组合物，重点用于储存血小板使其在长达15天的储存期间内处在无功能损伤的状态下的方法，以及使用此组合物的方法和试剂盒。与目前可用的保存血小板的组合物和技术相比，保存在本文公开的组合物中的血小板的特征在于与“减弱的止血功能”相关的“储存损伤”显著减少。在血小板储存期间，本文所公开的组合物(1)维持和/或恢复血小板能量状态和形态；(2)保持有效地新陈代谢和缓解作用；(3)保存和/或促进一氧化氮的产生；和(4)防止储存期间的微粒形成，聚集和活化。如此，在本文所述的组合物中可以长期保存产生完全功能的和无损伤的血小板。



CN 108366551 A

1.一种用于保存血小板的组合物，其含有：一种生理盐溶液，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷，二氯乙酸，和小于1μM的钙离子。

2.一种用于保存血小板的组合物，其含有：一种生理盐溶液，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷，和小于1μM的钙离子。

3.如权利要求1或2所述的组合物，其中所述的生理盐溶液包含一种或多种的盐选自由氯化钾，磷酸钾，氯化镁，硫酸镁，氯化钠，碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。

4.如权利要求1-3中任一项所述的组合物，其包含约4-5mM氯化钾。

5.如权利要求1-4中任一项所述的组合物，其包含约100-115mM氯化钠。

6.如权利要求1-5中任一项所述的组合物，其包含约10-40mM磷酸钠。

7.如权利要求1-6中任一项所述的组合物，其进一步包含约2.5-5mM肌酸。

8.如权利要求1或3-7中任一项所述的组合物，其包含约0.001-0.5mM二氯乙酸。

9.如权利要求1-8中任一项所述的组合物，其进一步包含约0.5-2mM乳清酸。

10.如权利要求1-9中任一项所述的组合物，其进一步包含约11-25mM的糖。

11.如权利要求10所述的组合物，其中所述的糖是葡萄糖或右旋糖。

12.如权利要求1-11中任一项所述的组合物，其进一步包含约2-10mM精氨酸。

13.如权利要求1-12中任一项所述的组合物，其进一步包含约0.001-10mM苹果酸。

14.如权利要求1-13中任一项所述的组合物，其进一步包含约1-10mM瓜氨酸。

15.如权利要求1-12中任一项所述的组合物，其进一步包含约0.001-10mM瓜氨酸苹果酸。

16.如权利要求1-15中任一项所述的组合物，其进一步包含约5-10mM肌肽。

17.如权利要求1-16中任一项所述的组合物，其进一步包含约5-10mM肉碱。

18.如权利要求1-17中任一项所述的组合物，其中所述的组合物不含有一种或多种钙离子或胰岛素。

19.如权利要求1-18中任一项所述的组合物，其中所述的组合物不含钙离子。

20.如权利要求1-19中任一项所述的组合物，其进一步包含钙螯合剂。

21.如权利要求20所述的组合物，其中所述钙螯合剂是选自由乙二胺四乙酸(EDTA)，乙二醇四乙酸(EGTA)，二乙烯三胺五乙酸(DTPA)，羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA)，二氨基环己烷四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸组成的组。

22.如权利要求21所述的组合物，其包含约0.001至约5mM钙螯合剂。

23.一种保存血小板的方法，其包括使血小板与权利要求1或3-22中任一项所述的组合物接触。

24.一种保存血小板的方法，其包括使血小板与权利要求2-22中任一项所述的组合物接触。

25.如权利要求23或权利要求24所述的方法，其中的血小板与未接触所述组合物的血小板相比，产生更大量强直的一氧化氮。

26.如权利要求23-25中任一项所述的方法，其进一步包括将血小板储存0-15天。

27.如权利要求23-26中任一项所述的方法，其进一步包括将血小板储存0-9天。

28.如权利要求23-27中任一项所述的方法，其中在储存1-9天后，所述血小板不显示聚

集。

29.如权利要求23-28中任一项所述的方法，其中在储存1-8天后，所述血小板与未接触所述组合物的血小板相比，产生更大量的高能磷酸盐。

30.如权利要求23-29中任一项所述的方法，其中在储存1-9天后，所述血小板与未接触所述组合物的血小板相比，表现出更少的细胞凋亡。

31.如权利要求23-30中任一项所述的方法，其中在储存1-9天后，所述血小板与未接触所述组合物的血小板相比，表现出降低的盘状形态学损失。

32.如权利要求23-31中任一项所述的方法，其中所述血小板在环境温度或室温下储存。

33.如权利要求23-32中任一项所述的方法，其中所述血小板在亚环境温度下储存。

34.如权利要求32所述的方法，其中所述血小板在21±2℃下储存。

35.如权利要求33所述的方法，其中所述血小板在4±1℃或者13±3℃下储存。

36.一种生产用于保存血小板的组合物的方法，其包括将一种或多种生理盐，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷，二氯乙酸和小于1μM钙离子与水混合以形成的一种水性生理溶液。

37.一种生产用于保存血小板的组合物的方法，其包括将一种或多种生理盐，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷和少于1μM钙离子与水混合以形成水性生理溶液。

38.如权利要求36或权利要求37，其中所述生理盐溶液包括一种或多种盐选自由氯化钾，磷酸钾，氯化镁，硫酸镁，氯化钠，碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。

39.如权利要求36-38中任一项所述的方法，其包括约4-5mM的氯化钾。

40.如权利要求36-39中任一项所述的方法，其包括约100-115mM氯化钠。

41.如权利要求36-32中任一项所述的方法，其包括约10-40mM磷酸钠。

42.如权利要求36-33中任一项所述的方法，其进一步包括结合约2.5-5mM肌酸。

43.如权利要求36-34中任一项所述的方法，其进一步包括结合约0.5-2mM乳清酸。

44.如权利要求36-43中任一项所述的方法，其进一步包括结合约11-25mM的糖。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述的糖是葡萄糖或右旋糖。

46.如权利要求36-45中任一项所述的方法，其进一步包括结合约2-10mM精氨酸。

47.如权利要求36-46中任一项所述的方法，其进一步包括结合约0.001-10mM苹果酸。

48.如权利要求36-47中任一项所述的方法，其进一步包括结合约1-10mM瓜氨酸。

49.如权利要求36-46中任一项所述的方法，其进一步包括结合约0.001-10mM瓜氨酸苹果酸。

50.如权利要求36-49中任一项所述的方法，其进一步包括结合约5-10mM肌肽。

51.如权利要求36-50中任一项所述的方法，其进一步包括结合约5-10mM肉碱。

52.如权利要求36-51中任一项所述的方法，其中所述的组合物不包含一种或多种钙离子或胰岛素。

53.如权利要求36-52中任一项所述的方法，其中所述的组合物包含少于1μM钙离子。

54.如权利要求36或38-53中任一项所述的方法，其包括约0.001-0.5mM二氯乙酸。

55.如权利要求36-54中任一项所述的方法，其进一步包括钙螯合剂。

56.如权利要求55所述的方法，其中所述的钙螯合剂选自由乙二胺四乙酸(EDTA)，乙二醇四乙酸(EGTA)，二乙烯三胺五乙酸(DTPA)，羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA)，二氨基环己烷

四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸组成的组。

57.如权利要求56所述的方法,其包括约0.001至约5mM之间钙螯合剂。

58.一种试剂盒,其包括:生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸,腺苷和小于1μM钙离子。

59.如权利要求58所述的试剂盒,其中所述的生理盐溶液包含一种或多种盐选自由氯化钾,磷酸钾,氯化镁,硫酸镁,氯化钠,碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。

60.如权利要求58或权利要求59中所述的试剂盒,其进一步包含肌酸。

61.如权利要求58-60中任一项所述的试剂盒,其进一步包含乳清酸。

62.如权利要求58-61中任一项所述的试剂盒,其进一步包含糖。

63.如权利要求62所述的试剂盒,其中所述的糖是葡萄糖或右旋糖。

64.如权利要求58-63中任一项所述的试剂盒,其进一步包含精氨酸。

65.如权利要求58-64中任一项所述的试剂盒,其进一步包含苹果酸。

66.如权利要求58-65中任一项所述的试剂盒,其进一步包含瓜氨酸。

67.如权利要求58-64中任一项所述的试剂盒,其进一步包含瓜氨酸苹果酸。

68.如权利要求58-67中任一项所述的组合物,其进一步包含肌肽。

69.如权利要求58-68中任一项所述的组合物,其进一步包含肉碱。

70.如权利要求58-69中任一项所述的试剂盒,其中所述试剂盒不包含一种或多种钙离子或胰岛素。

71.如权利要求58-70中任一项所述的试剂盒,其中所述的试剂盒不含钙离子。

72.如权利要求58-71中任一项所述的试剂盒,其中所述的试剂盒进一步包含钙螯合剂。

73.如权利要求72所述的试剂盒,其中所述的钙螯合剂选自由乙二胺四乙酸(EDTA),乙二醇四乙酸(EGTA),二亚乙基三胺五乙酸(DTPA),羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA),二氨基环己烷四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸组成的组。

74.如权利要求58-73中任一项所述的试剂盒,其中所述的试剂盒进一步包含二氯乙酸。

75.一种实时检测血小板中一氧化氮的存在的方法,该方法包括:

a.用一氧化氮特异性荧光染料标记血小板;

b.快速固定血小板;和

c.检测荧光染料的存在。

76.如权利要求75所述的方法,其中所述的血小板已经储存0-9天。

77.如权利要求75或权利要求76所述的方法,其中所述的血小板已经储存在权利要求1-22中任一项所述的组合物中。

78.如权利要求75-77中任一项所述的方法中,其中所述的一氧化氮特异性荧光染料是二氨基荧光素(DAF2)或DAF2的衍生物。

79.如权利要求75-78中任一项所述的方法中,其中所述血小板用戊二醛固定。

80.如权利要求75-79中任一项所述的方法中,其中用共聚焦显微镜或多光子显微镜检测所述荧光染料的存在。

81.一种用于保存血小板的组合物,其包含:4mM氯化钾,0.44mM磷酸钾,0.5mM氯化镁,

0.5mM硫酸镁，100mM氯化钠，5mM碳酸氢钠，30mM磷酸钠，11mM D-葡萄糖，1.5mM谷胱甘肽，1mM抗坏血酸，5mM精氨酸，1mM L-瓜氨酸苹果酸，2mM腺苷，0.5mM乳清酸和2.5mM肌酸一水合物。

82.如权利要求81所述的组合物，其中所述组合物不含有一种或多种钙离子或胰岛素。

83.如权利要求82所述的组合物，其中所述组合物进一步包含少于约1μM钙离子。

84.如权利要求81-83中任一项所述的组合物，其中所述组合物进一步包含钙螯合剂。

85.如权利要求84所述的组合物，其中所述的钙螯合剂选自由乙二胺四乙酸(EDTA)，乙二醇四乙酸(EGTA)，二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)，羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA)，二氨基环己烷四乙酸(CDTA)(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸组成的组。

86.如权利要求85所述的组合物，其包含约0.001至约5mM之间的钙螯合剂。

87.如权利要求81-86中任一项所述的组合物，其进一步包含0.5mM二氯乙酸。

88.如权利要求1-17，20-22，或者81-87中任一项所述的组合物，其中所述的组合物包含少于50μM，少于10μM，少于1μM，少于0.1μM，少于0.01μM，或者少于0.001μM钙离子。

89.如权利要求81-89中任一项所述的组合物，其进一步包含一种或多种肌肽或肉碱。

90.如权利要求81-89中任一项所述的组合物，其进一步包含约0.001-0.5mM二氯乙酸。

91.一种血小板储存组合物，其包含：

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	≤ 1μM
氯化钾	4-5 mM
磷酸钾	0.44-10 mM
氯化镁	0.5-2.5 mM
硫酸镁	0.5-2.5 mM
氯化钠	100-115 mM
碳酸氢钠	5-15 mM
磷酸钠	10-40 mM
二氯乙酸	0-2.5 mM
谷胱甘肽	1.5-5.0 mM
抗坏血酸	1.0-5 mM
腺苷	2-5 mM

92.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	≤1μM
氯化钾	4-5mM
磷酸钾	0.44-10mM
氯化镁	0.5-2.5mM
硫酸镁	0.5-2.5mM
氯化钠	100-115mM
碳酸氢钠	5-15mM
磷酸钠	10-40mM
谷胱甘肽	1.5-5.0mM
抗坏血酸	1.0-5mM
腺苷	2-5mM

93.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	mM
钙离子	<1μM
氯化钾	4.0
磷酸钾	0.44
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
二氯乙酸	0.50(任选的)
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
腺苷	2.00
钙螯合剂	2.5(任选的)

94.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	< 1μM
氯化钾	4-5 mM
磷酸钾	0.44-10 mM
氯化镁	0.5-2.5 mM

硫酸镁	0.5-2.5 mM
氯化钠	100-115 mM
碳酸氢钠	5-15 mM
磷酸钠	10-40 mM
D-葡萄糖	11-25 mM
二氯乙酸	0-0.5 mM (任选的)
谷胱甘肽	1.5-5.0 mM
抗坏血酸	1.0-5 mM
精氨酸	2-10 mM
瓜氨酸	1-10 mM
苹果酸	0-7 mM (任选的)
腺苷	2-5 mM
乳清酸	0.5-2 mM
肌酸	2-5 mM
肌肽	5-10 mM (2.26 gm/中含 10 mM)
肉碱	5-10 mM (2.00 gm/L中含 10 mM)
EGTA	0-5 mM (任选的)

95.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	mM
钙离子	<1μM
氯化钾	4.0
磷酸钾	0.44
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.5

氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
葡萄糖或右旋糖	11.00
二氯乙酸	0.50(任选的)
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
精氨酸	5.00
苹果酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10
肉碱	10
EGTA	2.5(任选的)

96.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	<2μM
氯化钾	4-5mM
磷酸钾	0.44-10mM
氯化镁	0.5-2.5mM
硫酸镁	0.5-2.5mM
氯化钠	100-115mM
碳酸氢钠	5-15mM
磷酸钠	10-40mM
D-葡萄糖	11-25mM
谷胱甘肽	1.5-5.0mM
抗坏血酸	1.0-5mM
精氨酸	2-10mM
瓜氨酸苹果酸	2-10mM
腺苷	2-5mM
乳清酸	0.5-2mM
肌酸	2-5mM
肌肽	5-10mM
肉碱	5-10mM
钙螯合剂	0.001-5mM

97.一种血小板储存组合物,其包含:

成分	mM

氯化钾	4.0
磷酸钾	0.44
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
D-葡萄糖	11.00
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
L-精氨酸	5.00
L-瓜氨酸苹果酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
一水合肌酸	2.50
L-肌肽	10mM
L-肉碱	10mM
钙螯合剂	2.5mM

血小板的长期储存和保存

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有申请日为2015年6月9日提交的美国临时申请序列号62/173,235的优先权,上述申请完整的在此引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及的,除其它以外,用于保存血小板使处于功能上无损伤的状态及延长人血小板的储存寿命的方法和组合物。

背景技术

[0004] 血小板输注常用于治疗大量失血或正在接受化疗以及患有血小板减少症的病人。例如,化疗通常会减少血小板的数量,并且也会导致存在的血小板功能有缺陷。长时间储存的血小板会导致损伤修饰血小板的产生。虽然大量的血小板可以在储存后恢复,但是由于这些储存介导的损伤,绝大多数的血小板会迅速被脾脏和肝脏循环排出。现有技术已经尝试了多种增加储存后恢复活性的血小板数量的方法,例如,降低储存温度,冷藏技术,添加剂以及人造储存介质。

[0005] 尽管近期在血小板储存技术方面有所进步,但是用这些方法恢复的血小板的功能性和循环持久性部分仍然受到限制,这归因于储存中损伤的持续存在。因此,仍然迫切需要寻找人血小板的无损伤储存的其他方法和组合物。

发明内容

[0006] 本文提供,重点用于减少血小板中储存介导的损伤以及在不减弱其止血功能的情况下延长血小板储存时间的方法,组合物和试剂盒。本文还提供了用于在环境温度(25℃)以及亚环境温度(>4到<25℃)条件下储存血小板的组合物,方法和试剂盒。

[0007] 因此,在一些方面,本文中提供的储存血小板的组合物,其包含:一种生理盐溶液,葡萄糖,谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸苹果酸,腺苷,肌酸和小于100μM(例如1μM或更小)的钙离子。在其他方面,本文所提供的储存血小板的组合物,其包含:一种生理盐溶液,谷胱甘肽,抗坏血酸,腺苷和小于100μM(例如1μM或更小)的钙离子。在一些实施方案中,生理盐溶液包含一种或多种盐选自由氯化钾,磷酸钾,氯化镁,硫酸镁,氯化钠,碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其包含4-5mM氯化钾。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其包含100-115mM氯化钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其包含10-40mM磷酸钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其包含2.5-5mM肌酸。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其包含0.001-5mM的钙螯合剂(例如EGTA)。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中的组合物,还包含0.5-2mM乳清酸。在此公开的所有实施方案方案中的一些实施方案中的组合物,其不含有一种或多种钙离子或胰岛素。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物,其含有可忽

略计量的或不含钙离子。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中提供的组合物，其含有小于50μM，小于10μM，小于1μM，小于0.1μM，小于0.01μM或者小于0.001μM钙离子。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中的组合物，其还包含一种或多种二氯乙酸，肌肽，瓜氨酸，苹果酸，瓜氨酸苹果酸，精氨酸，肌酸，糖(例如但不限于核糖，葡萄糖或右旋糖)，或肉碱。

[0008] 在其他方面，本文还提供了用于保存血小板的方法，包含使血小板与本文公开的任何组合物相接触。在一些实施方案中，所述血小板与未接触本文公开的组合物的血小板相比，产生更大量强直性的一氧化氮(NO)。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述的方法还包括将血小板储存0-15天。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述的方法还包括将血小板储存0-9天(例如0,1,2,3,4,5,6,7,8或者9天中的任一个)。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，经过1-9天储存，血小板不显现聚集。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，经过1-8天储存，与未接触组合物的血小板相比，所述血小板产生更大量的高能量磷酸盐。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，经过1-9天的储存，与未接触组合物的血小板相比，所述血小板显现出更少的凋亡。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，经过1-9天的储存，与未接触组合物的血小板相比，所述血小板显现出更少的活化(P-选择蛋白表达)。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，经过1-9天的储存，与未接触组合物的血小板相比，所述血小板显现出降低的盘状形态丢失。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板在环境温度或室温下储存。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板储存在21±2℃。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板储存在4±1℃或在13±3℃.在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板储存在约3℃至约18℃。

[0009] 另一方面，本文提供用于生产一种储存血小板的组合物的方法，包括将一种或多种生理盐，葡萄糖，谷胱甘肽，抗坏血酸，精氨酸，瓜氨酸苹果酸，腺苷，肌酸和少于2μM钙离子与水混合而形成的生理水溶液。在其他方面，用于生产一种储存血小板的组合物的方法，包括将一种或多种生理盐，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷和小于100μM(例如1μM或更少)的钙离子与水混合而形成的生理水溶液。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，生理盐溶液包含一种或多种的盐选自由氯化钾，磷酸钾，氯化镁，硫酸镁，氯化钠，碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含4-5mM的氯化钾。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含100-115mM的氯化钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含10-40mM磷酸钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含2.5-5mM肌酸。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物还包含0.5-2mM乳清酸。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物不含一种或多种钙离子或胰岛素。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含小于100μM钙离子，例如小于约90μM,80μM,70μM,60μM,50μM,40μM,30μM,20μM,10μM,5μM,4μM,3μM,2μM,1μM或更少。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述方法还包括将二氯乙酸，肌肽，瓜氨酸，苹果酸，瓜氨酸苹果酸，精氨酸，肌酸，糖(例如但不限于核糖，葡萄糖或右旋糖)或肉碱。

[0010] 在其他方面，本文提供的试剂盒，包含一种生理盐溶液，葡萄糖，谷胱甘肽，抗坏血酸，精氨酸，瓜氨酸苹果酸，腺苷，肌酸和小于100μM(例如1μM或更小)钙离子。在其他方面，

本文提供的试剂盒，包含一种或多种生理盐，谷胱甘肽，抗坏血酸，腺苷和小于100μM(例如1μM或更小)钙离子。在一些实施方案中，生理盐包含一种或多种的盐选自由氯化钾，磷酸钾，氯化镁，硫酸镁，氯化钠，碳酸氢钠和磷酸钠组成的组。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒包含4-5mM的氯化钾。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒包含100-115mM氯化钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒包含10-40mM磷酸钠。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒包含2.5-5mM肌酸。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒还包含0.5-2mM乳清酸。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒不含有一种或多种钙离子或胰岛素。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒不含钙离子。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒还包含一种钙螯合剂。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，试剂盒还包含一种或多种二氯乙酸，肌肽，瓜氨酸，苹果酸，瓜氨酸苹果酸，精氨酸，肌酸，糖(例如但不限于核糖，葡萄糖或右旋糖)或肉碱。

[0011] 在其它方面，本文提供了用于实时检测血小板中一氧化氮存在的方法，所述方法包括：(a)用一氧化氮特异性荧光染料标记血小板；(b)快速固定血小板；和(c)检测荧光染料的存在。在一些实施方案中，血小板已经储存0-9天。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板已经储存在本文公开的任何组合物中。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，一氧化氮特异性荧光染料是二氨基荧光素乙酸脂(DAF2-DA)或二氨基荧光素(DAF-2)的衍生物(例如，二氨基荧光素脂；二氨基荧光素-FM(DAF-FM)或二氨基荧光素-FM二乙酸盐(DAF-FM二乙酸盐))。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，血小板用戊二醛固定。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，用共聚焦显微镜，多光子显微镜和荧光激活细胞分选(FACS)扫描、分析来检测荧光染料的存在。

[0012] 在其它方面，本文提供了保存血小板的组合物，其包含：4mM氯化钾，0.44mM磷酸钾(一元)，0.5氯化镁(六水合物)，0.5mM硫酸镁(七水合物)，100mM氯化钠，5mM碳酸氢钠，30mM磷酸钠(二元；七水合物)，11mM D-葡萄糖，1.5mM谷胱甘肽(还原型)，1mM抗坏血酸，5mM精氨酸，1mM L-瓜氨酸苹果酸，2mM腺苷，0.5mM乳清酸，和2.5mM肌酸一水合物。在一些实施方案中，所述组合物不含有一种或多种钙离子或胰岛素。在一些实施方案中，所述组合物还包含小于100μM(例如1μM或更小)钙离子。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物还包含一种钙螯合剂。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物包含小于50μM，小于10μM，小于1μM，小于0.1μM，小于0.01μM或小于0.001μM钙离子。在此公开的所有实施方案中的一些实施方案中，所述组合物还包含一种或多种二氯乙酸，肌肽或肉碱。

[0013] 除非明确地或清楚地从实施方案或各方面的上下文中排除，否则本文所表述的每一个方面和实施方案都能一起使用。

[0014] 通过各种标准代谢，功能和形态学的体外检测的共同测量下，储存血小板过程中质量的逐渐丧失被称为血小板储存损伤。血库条件下，血小板储存期间发生的生化，结构和功能变化影响血小板的活力和止血功能。血小板储存损伤(PLS)与形态学变化和血小板活化相关，随后出现微囊泡和功能丧失，导致输血失败。这种结构和功能的有害变化将血小板的保存期限限制在5天以内。

[0015] 在整个说明书中，引用了各种专利，专利申请和其他类型的出版物(例如期刊论

文,电子数据库条目等)。出于所有目的,本文引用的所有专利,专利申请,以及其他出版物的公开内容均完整的在此引用作为参考。

[0016] 附图的简要说明

[0017] 图1A是一张照片,图1B是描绘用DAF2-DA定期标记的血小板的条形图,DAF2-DA是一氧化氮特异性荧光染料,并使用共聚焦显微镜成像。n=3实验为代表性图像;放大200倍。图像显示,在储存的第5天(x轴)Aayusol中的血小板与绿色荧光的亮度(y轴)与PASIII-M中的相比产生更大量的强直的一氧化氮。

[0018] 图2描绘了长期储存期间血小板中的高能磷酸盐浓度。将血小板浓缩液在环境温度(21±2℃)温和振荡下储存在Aayusol或PASIII-M(20:80)中15天。使用PRP(高血小板血浆)作为对照。定期评估血小板的ATP浓度(n=3).CP=磷酸肌酸。

[0019] 图3A和图3B是照片描绘的是流式细胞仪分析的在储存血小板时暴露的磷酯酰丝氨酸(PS)。将血小板在环境温度(21±2℃)下储存在Aayusol(顶行)或PASIIIM(底行)中0,3,6和9天,室温条件下,与FITC-乳粘素一起在黑暗中培养10分钟后,进行流式细胞术分析。样品分将别使用488nm(激发)和530nm(发射)的波长进行分析。三个独立实验的代表图像。

[0020] 图4是描绘储存期间血小板上的P-选择蛋白表达的流式细胞术分析结果的条形图。环境温度(21±2℃)下,将血小板储存在Aayusol中0,3,5和9天,室温条件下,与FITC-抗P-选择蛋白(CD62)抗体在黑暗中培养10分钟后,进行流式细胞术分析。样品分别使用488nm(激发)和530nm(发射)的波长进行分析。显示血小板活化程度的三个独立实验的代表图像。储存在Aayusol中的血小板中的P-选择蛋白表达数显著低于储存在PASIII-M中,这表明血小板储存期间的活性减弱。

[0021] 图5是描绘储存血小板的共聚焦显微镜的照片。将血小板储存在PASIII-M和Aayusol中0-9天,并定期用FITC-乳粘附素标记以识别PS暴露(诱导系统凋亡)并评估形态。使用Zeiss LSM710共聚焦显微镜搭配63X油浸物镜使细胞成像。在PS暴露中血小板显示出逐渐增加。

[0022] 图6是描绘在亚环境温度下储存的血小板的形态的显微照片。在4±1℃和13±3℃温度下储存在Aayusol中的血小板使用共焦显微镜在0,5,9和15天所成像的照片。

[0023] 图7是描绘储存的血小板中的血小板聚集体和微粒(MPs)的定性和定量分析的点状图。代表性的一组点图显示在4℃(图7第一排)和13℃(图7第二排)储存的血小板,聚集体和微粒。在储存过程中微粒(P;绿色)和聚集体(P7;蓝色)的形成有一个渐进但不显著的增加的趋势(在4℃是更显著),然而两个温度下的血小板种群在储存期间保持一致。

[0024] 图8是描述形态的显微照片(图8第一排)和在亚环境温度下,储存在Aayusol中的血小板上的血小板标记物(图8第二排)的定量分析的图。在0,3,5,7,9,12和15天定期采集血小板并用荧光标记的抗CD41a,CD42b,CD62p(p-选择蛋白)抗体标记。PS用PITC-乳粘素标记。样品用荧光共焦显微镜(图8第一排)和定量流式细胞术(图8第二排)成像;n=5。

[0025] 图9是描述储存血小板过程中一氧化氮的产生的显微照片(第一排图片)和一氧化氮产生的定量分析的图(第二排图片)。用共聚焦显微镜(第一排图片)在0,5,9和15天用可渗透细胞的荧光前体4-氨基-5-甲基氨基-2',7'-二氟荧光素(DAF-FM)二乙酸盐观察一氧化氮的合成。另外,储存在血小板中的一氧化氮合成还通过流式细胞仪从载有DAF-FM的血小板的荧光分布图(第二排图片)中定量。代表性数据来自五个实验。

[0026] 图10描绘了亚环境温度条件下在Aayusol中储存的血小板的高能磷酸盐(HEP)水平的图。每条代表每组n＝5的平均值±SEM。

[0027] 图11描绘了显示在亚环境温度条件下，在Aayusol中储存的血小板在激动剂刺激后保持功能活性的图。在0,1,3,5,7,9,12和15天，用50μM ADP和/或2μM A23187/刺激所储存的血小板，用FITC-乳粘素(PS探针)和Alexa 647抗-CN62p Ab着色，然后用流式细胞术进行分析。结果来自两个独立的实验。

具体实施方式

[0028] 通过各种标准代谢，功能和形态学的体外检测的共同测量下，储存血小板过程中质量的逐渐丧失被称为血小板储存损伤。血库条件下，血小板储存期间发生的生物化学，结构和功能变化影响血小板的活力和止血功能。血小板储存损伤(PLS)与形态学变化和血小板活化相关，随后出现微囊泡和功能丧失，导致输血失败。这种结构和功能的有害变化将血小板的保存期限限制在5天以内。

[0029] 本文所述的发明，在此提供一种组合物，重点用于储存血小板使其在长达15天的储存期间内处在无功能损伤的状态下的组合物，以及使用此组合物的方法和试剂盒。与目前可用的保存血小板的组合物和技术相比，保存在本文公开的组合物中的血小板的特征在于与“减弱的止血功能”相关的“储存损伤”显著减少。在血小板储存期间，本文所公开的组合物(1)维持和/或恢复血小板能量状态和结构；(2)保持有效地新陈代谢和缓解作用；(3)保存和/或促进一氧化氮的产生；和(4)防止储存期间的微粒形成，聚集和活化。如此，在本文所述的组合物中可以长期保存产生完全功能的无损伤的血小板。因此，本文公开的组合物和方法使得血小板能够有比以前在环境温度下可能储存更长时间的潜力。因此，本文所述发明将有助于缓解持续的血小板短缺，特别是在人口较少的偏远地区，还可以通过减少患者发病率来帮助降低医疗成本。此外，本文所述的储存血小板的组合物通过降低血浆浓度来减少个体接受存储于这些溶液中的血小板而产生的过敏性输血反应(ATR)。此外，本文公开的组合物可以用作血容量扩张剂/置换剂或作为遭受大量失血或正在接受化疗的受试者的复苏液。该解决方案还将提供能量来源以及基质血管舒张。

[0030] 与储存在缺少肌肽和肉碱的溶液相比，在此二种材料的组合协同作用下，储存在本文公开的任何溶液中的血小板产生了更高量的高能磷酸盐。在另一个实施方案中，在肌肽、肉碱、葡萄糖和肌酸的组合协同作用下，储存在本文公开的任何溶液中的血小板比储存在缺少上述材料的溶液中的血小板产生更高量的高能磷酸盐。在其它实施方案中，在瓜氨酸和精氨酸的组合协同作用下，储存在本文公开的任何溶液中的血小板比储存在缺少上述材料的溶液中的血小板产生更高量的一氧化氮(NO)。通过这些成分的组合表现出的协同作用是既出乎意料又令人惊讶的。

[0031] 另外，本文所描述的发明提供的组合物和方法，用于在环境(即室温)温度以及亚环境(即在约3℃至约18℃)温度下长期储存血小板，并使其处于无损伤和功能状态下。以前使用的组合物和保存血小板的方法，只能使血小板在环境温度下储存，以防止损坏。这导致一旦给患者施用，就在体内被快速清除。因此，本文提供的组合物和方法不仅使储存血小板的时间比以往可以达到的还要极大地延长，而且还允许血小板可以储存在比以往可行的更大的温度范围下。

[0032] I定义

[0033] 如本文所用，术语“生理盐”是指任何盐，当在给定浓度的水溶液中，为细胞或生理功能提供所需的任何盐。。生理盐的实施例包括，但不限于，碱和碱土金属氯化物，磷酸盐和硫酸盐，例如，KCI，NaCI，$MgCl_2$，$MgSO_4$，以及它们的混合物。

[0034] 本文中的短语“血小板储存损伤”或所使用的相同的变体包括所有的生理的，生化，或伴随血小板储存的形态变化。这些包括，但不限于，一种或多种血小板细胞骨架的重新排列，微囊泡，磷酯酰丝氨酸易位到质膜的外叶，聚集，活化，以及各种粘附血小板糖蛋白的表面表达的改变，包括CD62P(P-选择蛋白)和CD42b(GPIbc)。在一些实施方案中，血小板储存损伤发生在处理和/或储存血小板的过程中的任何机械性损伤，低氧环境和/或低温环境中。

[0035] “受试者”可以是脊椎动物，哺乳动物，或人类。哺乳动物包括，但不限于，家禽，走兽，宠物，灵长类，小鼠和大鼠。在一方面，受试者是人。

[0036] 如本文所用，“环境温度”或“室温”是在大约21℃±2℃范围内的任何温度，例如任何约19℃，20℃，21℃，22℃，或23℃。如本文所用的“亚环境温度”是指温度从约0℃至约18℃，例如任何约0℃，1℃，2℃，3℃，4℃，5℃，6℃，7℃，8℃，9℃，10℃，11℃，12℃，13℃，14℃，15℃，16℃，17℃，或18℃。

[0037] 除非本文另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的相同含义。

[0038] 本文所使用的，除非上下文另有明确指示，否则单数术语“一”(“a”)，“一个”(“an”)和“该”(“the”)包括复数指代。

[0039] 与“包括”，“包含”或“特征在于”等同的过渡性术语“包含”是包含性的或开放性的，并且不排除额外的，未陈述的要素或方法步骤。相比之下，过渡性短语“由.....组成”排除了权利要求中未指定的任何要素，步骤或成分。过渡性短语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤以及不会实质上影响本发明公开的基础和新颖性。

[0040] II发明的组合物

[0041] 血小板是无核的骨髓源性血细胞，通过附着于血管损伤部位并通过促进血浆纤维蛋白凝块的形成防止受伤的哺乳动物失血。人类耗尽循环血小板，例如，骨髓造血功能衰竭的人遭受有生命危险的自发性出血和血小板不太严重的不足会导致在外伤或手术后的出血并发症。

[0042] 循环血小板的数量减少到低于～70,000每μL导致标准化皮肤出血时间测试时间的延长，随着血小板数量降到零(血小板减少症)测试时间外推到近于无限。血小板数量小于20,000每μL的主体，被看做是粘膜表面自发性出血的高度易感人，特别是在由骨髓衰竭，化疗，或者外伤引起的血小板减少症时，导致大量失血。与骨髓失调例如再生障碍性贫血，急性和慢性白血病，转移性癌症但特别是从癌症治疗引起的电离辐射和化疗相关的血小板缺乏，是主要的公共健康问题。与大手术、损伤和败血症有关的血小板减少症最终导致显著数量的血小板输注的管理。

[0043] 医疗保健半个世纪前的主要进展是血小板输注的发展，以纠正这种血小板缺乏，美国仅仅在1999年就发生了超过9百万的血小板输注(Jacobs，J Am Geriatr Soc.2001

Jan;49(1):91-4.)。然而,血小板与所有其它移植组织不同,它不能容忍冷藏,因为即使受到非常短期的低温,它也会快速的从接受者的血液循环中消失,并且这种缩短血小板存活的低温影响是不可逆的(Berger et al.,Blood.1998 Dec 1;92(11):4446-52.)。

[0044] 这样在输血之前需要保持这些细胞在室温下,给储存血小板强加了一组独特的昂贵花费和复杂的后勤需求。因为血小板在室温下积极地代谢,它们需要在多孔容器中恒定搅拌以允许释放进化的二氧化碳来防止代谢性酸中毒的毒性后果。室温储存条件下导致大分子降解和血小板的止血功能降低,一组被称为"储存损伤"的缺陷。带有储存损伤的血小板会被接受者的脾在主循环中快速的清除,因此不适合用于极需补充这些细胞的接受者中。

[0045] 目前储存血小板的可用技术和组合物只允许血小板在发生显著地储存损伤之前储存3-5天。

[0046] 本发明的组合物是可用于在环境和亚环境温度下,长期储存过程中保存血小板使处于无损伤和具有功能性状态的血小板添加剂溶液。血小板可储存在本文所述组合物中长达15天,例如任何的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,或15天中,没有储存损伤的显著积累,没有一氧化氮合成的显著减少,没有高能磷酸盐浓度的显著降低,没有细胞凋亡状态的显著指示(例如,磷酯酰丝氨酸(PS)易位到外细胞膜)和显著减少的聚集以及形态缺陷水平。

[0047] A.生理盐溶液

[0048] 本发明的组合物可以是水性的(即水基)溶液,包含生理盐溶液,葡萄糖,谷胱甘肽,抗坏血酸,精氨酸,瓜氨酸苹果酸,腺苷,肌酸,和小于100μM(如1μM或更小)的钙离子源(例如,氯化钙)。生理盐溶液可以包含任何盐,其中,在给定浓度的水溶液中,帮助或成为被需要的生理功能例如维持储存血小板内部和外部的离子浓度(例如,钾,镁,钠,氯,硫酸根,磷酸根,和碳酸氢盐离子浓度)以及控制能够穿过血小板细胞膜的水量。生理盐溶液的成分还可以帮助缓冲和维持储存血小板溶液的适当的pH值。能够在本发明中使用的特定的盐包括,但不限于,氯化钾,磷酸钾,氯化镁,硫酸镁,氯化钠,碳酸氢钠和磷酸钠。

[0049] 在本文所公开的一些实施方案中的组合物中,生理盐溶液含有钾离子源,例如,氯化钾。在储存血小板的组合物中的氯化钾的浓度可以是大约4-5mM之间,例如约4mM或约5mM。在另一个实施方案中,储存血小板的组合物可以包含约0.030g/L氯化钾。

[0050] 任何本文公开的组合物的生理盐溶液可含有钠离子源。钠离子可以钠盐形式的被添加到生理盐溶液中,例如一种或多种钠盐选自由$NaAlO_2$,$NaBO_2$,NaCl,NaClO,$NaClO_2$,$NaClO_3$,$NaClO_4$,NaF,Na_2FeO_4,$NaHCO_3$,NaH_2PO_4,$NaHSO_3$,$NaHSO_4$,NaI,$NaMnO_4$,$NaNH_2$,$NaNO_2$,$NaNO_3$,NaOH,$NaPO_2H_2$,NaSH,Na_2MnO_4,Na_3MnO_4,$Na_2N_2O_2$,Na_2O_2,Na_2SO_3,Na_2SO_4,$Na_2S_2O_4$,Na_2SeO_3,Na_2SeO_4,Na_2SiO_3,$Na_2Si_2O_5$,Na_4SiO_4,$Na_2Ti_3O_7$,$Na_2Zn(OH)_4$,$NaH_2C_6H_5O_7$,和Na_3PO_4组成的组。在一些实施方案中,储存血小板组合物中的钠离子的浓度为约100-140mM,例如约100mM,约101mM,约102mM,约103mM,约104mM,约105mM,约106mM,约107mM,约108mM,约109mM,约110mM,约111mM,约112mM,约113mM,约114mM,约115mM,约116mM,约117mM,约118mM,约119mM,约120mM,约121mM,约122mM,约123mM,约124mM,约125mM,约126mM,约127mM,约128mM,约129mM,约130mM,约131mM,约132mM,约133mM,约134mM,约135mM,约136mM,约137mM,约138mM,约139mM,或约140mM包括落入这些数值内的所有范围和数字。

[0051] 在本文公开的组合物的其它实施方案中，生理盐溶液包含氯化钠。储存血小板组合物中氯化钠的浓度可以在约100-115mM，例如约100mM，约101mM，约102mM，约103mM，约104mM，约105mM，约106mM，约107mM，约108mM，约109mM，约110mM，约111mM，约112mM，约113mM，约114mM，或约115mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，储存血小板的组合物可以含有约5.84g/L氯化钠。

[0052] 本文公开的组合物的进一步实施方案中，所述生理盐溶液含有磷酸钠。储存血小板组合物中磷酸钠的浓度可以在约10-40mM之间，例如约10mM，约11mM，约12mM，约13mM，约14mM，约15mM，约16mM，约17mM，约18mM，约19mM，约20mM，约21mM，约22mM，约23mM，约24mM，约25mM，约26mM，约27mM，约28mM，约29mM，约30mM，约31mM，约32mM，约33mM，约34mM，约35mM，约36mM，约37mM，约38mM，约39mM，或约40mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，储存血小板组合物可以包含约7.9g/L磷酸钠。任何形式的磷酸钠均可用于本发明，包括但不限于二元七水混合物形式。

[0053] 本文公开的组合物的进一步实施方案中，所述生理盐溶液含有柠檬酸钠。柠檬酸钠在储存血小板组合物中的浓度可为约5-15mM之间，例如约5mM，约6mM，约7mM，约8mM，约9mM，约10mM，约11mM，约12mM，约13mM，约14mM，或约15mM包括落入这些数值内的所有范围和数字。

[0054] 在本文公开的组合物的另一个实施方案中，所述生理盐溶液含有碳酸氢钠。碳酸氢钠在储存血小板组合物中的浓度可以是约4-6mM之间，例如约4.5mM，5mM，5.5mM，或6mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，硫酸镁的浓度为约5mM。在另一个实施方案中，储存血小板组合物可包含约0.42g/L碳酸氢钠。

[0055] 在本文所公开的另一个实施方案中的组合物中，所述生理盐溶液不含有钙离子(例如，通过钙盐如氯化钙供给钙离子)或者，任选地，含有小于约100μM(例如1μM或更少)钙离子，如小于约95μM，约90μM，约85μM，约80μM，约75μM，约70μM，约65μM，约60μM，约55μM，约50μM，约45μM，约40μM，约35μM，约30μM，约25μM，约20μM，约15μM，约14μM，约13μM，约12μM，约11μM，约10μM，约9μM，约8μM，约7μM，约6μM，约5μM，约4μM，约3μM，约2μM，约1μM，约0.1μM，约0.01μM，约0.001μM，或约0.0001μM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在本文所公开的另一个实施方案中的组合物中，所述生理盐溶液不含有钙离子(例如，通过钙盐如氯化钙供给钙离子)或者，任选地，含有小于约100nM(1nM或更小)钙离子，如小于约95nM，约90nM，约85nM，约80nM，约75nM，约70nM，约65nM，约60nM，约55nM，约50nM，约45nM，约40nM，约35nM，约30nM，约25nM，约20nM，约15nM，约14nM，约13nM，约12nM，约11nM，约10nM，约9nM，约8nM，约7nM，约6nM，约5nM，约4nM，约3nM，约2nM，约1nM，约0.1nM，约0.01nM，约0.001nM，或约0.0001nM，包括在这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，本文公开的组合物的生理盐溶液含有从一种或多种钙盐供给小于100μM(如1μM或更少)钙离子，如那些选自由乙酸钙，铝酸钙，铁铝酸钙，硅铝酸钙，硝酸钙铵，砷酸钙，抗坏血酸钙，叠氮化钙，苯甲酸钙，钙的β-羟基-β-甲基丁酸盐，碳酸氢钙，亚硫酸氢钙，硼酸钙，酸钙，溴钙，溴化钙，碳化钙，钙碳酸酯，氯酸钙，铬酸钙，柠檬酸钙，柠檬酸苹果酸钙，钛酸铜，氰氨化钙，钙二谷氨酸，钙异抗坏血酸，氟化钙，甲酸钙，富马酸该，葡乳醛酸钙，钙葡庚糖酸盐，葡萄糖酸钙，钙磷酸丙三，钙鸟苷酸，六硼化钙，氢化钙，氢氧化钙，次氯酸钙，钙肌苷，碘酸钙，碘化钙，乳酸钙，乳酸葡萄糖酸钙，乙酸镁，苹果酸钙，氢化钙，磷化钙，吗啡钙，硝酸钙，氮化钙，亚硝酸钙，草酸

钙，氧化钙，泛酸钙，高氯酸钙，高锰酸钙，过氧化钙，磷酸钙，磷化钙，丙酸钙，焦磷酸钙，硅酸钙，硅酸钙水合物，硅化钙，山梨酸钙，硬脂酸钙，硫酸钙，硫化钙，亚硫酸钙，酒石酸钙，钛酸钙，氯化钙，和氰化钙组成的组。

[0056] 任何本文公开的组合物的生理盐溶液(例如在室温/环境温度(21±2℃)或亚环境温度(4±1℃和13±3℃)下储存血小板的组合物中的生理盐溶液可以进一步包含一种或多种钙螯合剂的化合物。本发明中所用的非限制性的可用钙螯合剂的实例包含一种或多种的乙二胺四乙酸(EDTA)，乙二醇四乙酸(EGTA)，二乙烯三胺五乙酸(DTPA)，羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA)，二氨基环己烷四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸，以及它们在药学上可接受的盐。在一个实施方案中，本文公开的任何组合物的生理盐溶液含有0.001-5mM的钙螯合剂(例如EGTA)，如任何0.001mM,0.01mM,0.1mM,0.2mM,0.3mM,0.4mM,0.5mM,0.6mM,0.7mM,0.8mM,0.9mM,1mM,1.1mM,1.2mM,1.3mM,1.4mM,1.5mM,1.6mM,1.7mM,1.8mM,1.9mM,2mM,2.1mM,2.2mM,2.3mM,2.4mM,2.5mM,2.6mM,2.7mM,2.8mM,2.9mM,3mM,3.1mM,3.2mM,3.3mM,3.4mM,3.5mM,3.6mM,3.7mM,3.8mM,3.9mM,4mM,4.1mM,4.2mM,4.3mM,4.4mM,4.5mM,4.6mM,4.7mM,4.8mM,4.9mM,或5mM的钙螯合剂。

[0057] 任何本文公开的组合物的生理盐溶液可含有钾离子源，钾离子可以钾盐的形式被添加到生理盐溶液中，如选自由$KAsO_2$,KBr,$KBrO_3$,KCN,KCNO,KCl,$KClO_3$,$KClO_4$,KF,KH,$KHCO_2$,$KHCO_3$,KHF_2,KHS,$KHSO_3$,$KHSO_4$,KH_2AsO_4,KH_2PO_3,KH_2PO_4,KI,KIO_3,KIO_4,$KMnO_4$,KN_3,KNH_2,KNO_2,KNO_3,KOCN,KOH,KO_2,KPF_6,KCH_3COO,$K_2Al_2O_4$,K_2CO_3,K_2CrO_4,$K_2Cr_2O_7$,K_2FeO_4,K_2HPO_4,K_2MnO_4,K_2O,K_2O_2,K_2S,K_2SeO_4,K_2SO_3,K_2SO_4,$KHSO_5$,$K_2S_2O_5$,$K_2S_2O_7$,$K_2S_2O_8$,K_2SiO_3,$K_3[Fe(C_2O_4)_3]$,$K_4[Fe(CN)_6]$,K_3PO_4,和$K_4Mo_2Cl_8$组成的组中的一种或多种钾盐。在一些实施方案中，钾离子在储存血小板组合物中的浓度是在约0.01-1mM之间，例如约0.1mM，约0.15mM，约0.2mM，约0.25mM，约0.3mM，约0.35mM，约0.4mM，约0.45mM，约0.5mM，约0.55mM，约0.6mM，约0.65mM，约0.7mM，约0.75mM，约0.8mM，约0.85mM，约0.9mM，或约1mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。

[0058] 在本文公开的其它实施方案中的组合物，所述生理盐溶液包含磷酸钾。磷酸钾在储存血小板组合物中的浓度可为约0.3-0.5mM之间，例如约0.35mM，0.4mM，0.45mM，或0.5mM，包含落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，磷酸钾的浓度为约0.44mM。在另一个实施方案中，储存血小板组合物可包含约0.66g/L磷酸钾。任何形式的磷酸钾均可以被用在本发明中，包括，但不限于，一元形式。

[0059] 本文公开的任何组合物的生理盐溶液可含有一个镁离子源。镁离子可以镁盐形式加到生理盐溶液中，如选自由MgB_2,$MgBr_2$,$MgCO_3$,MgC_2O_4,$MgC_6H_6O_7$,$MgC_{14}H_{10}O_4$,$MgCl_2$,$Mg(ClO_4)_2$,MgF_2,MgH_2,$Mg(HCO_3)_2$,MgI_2,$Mg(NO_3)_2$,MgO,MgO_2,$Mg(OH)_2$,MgS,$MgSO_3$,$MgSO_4$,Mg_2Al_3,Mg_2Si,Mg_2SiO_4,$Mg_2Si_3O_8$,Mg_3N_2,$Mg_3(PO_4)_2$,和$Mg_2(CrO_4)_2$组成的组中的一种或多种镁盐。在一些实施方案中，储存血小板组合物的镁离子浓度是在约0.01-1.5mM之间，如约0.1mM，约0.15mM，约0.2mM，约0.25mM，约0.3mM，约0.35mM，约0.4mM，约0.45mM，约0.5mM，约0.55mM，约0.6mM，约0.65mM，约0.7mM，约0.75mM，约0.8mM，约0.85mM，约0.9mM，约1mM，约1.05mM，约1.1mM，约1.15mM，约1.2mM，约1.25mM，约1.3mM，约1.35mM，约1.4mM，约1.45mM，或约1.5mM包括落入这些数值内的所有范围和数字。

[0060] 在本文公开的更进一步的实施方案中的组合物，所述生理盐溶液含有氯化镁。氯

化镁在储存血小板组合物中的浓度可以是约0.4-0.6mM之间，例如约0.45mM，0.5mM，0.55mM，或0.6mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，氯化镁的浓度为约0.5mM。在另一个实施方案中，储存血小板组合物可含有约0.110g/L氯化镁。任何形式的氯化镁可被用在本发明中，包含，但不限于六水合物形式。

[0061] 在本文公开的其它实施方案中的组合物，所述生理盐溶液含有硫酸镁。硫酸镁在储存血小板组合物中的浓度可以是约0.4-0.6mM之间，例如约0.45mM，0.5mM，0.55mM，或0.6mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，硫酸镁的浓度为约0.5mM。在另一个实施方案中，储存血小板的组合物可含有约0.123g/L硫酸镁。任何形式的硫酸镁可被用在本发明中，包含，但不限于，七水混合物形式。

[0062] B.其他成分

[0063] 除生理盐溶液外，本发明的组合物还可包含葡萄糖，谷胱甘肽，抗坏血酸，精氨酸，瓜氨酸苹果酸，腺苷，肌酸和小于100μM(例如1μM或更少)钙离子(例如有氯化钙等钙盐提供的钙离子)。

[0064] 糖，例如像葡萄糖这样的六碳糖(如D-葡萄糖或右旋糖)或五碳糖(如核糖)可以作为生产高能磷酸盐(如ATP)的底物，同时可以包含在本文所述的保存和储存血小板组合物中，其浓度在约5-15mM之间，例如任何约5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，10mM，11mM，12mM，13mM，14mM，或15mM，包含落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，葡萄糖的浓度是约1.98g/L。在另一个实施方案中，葡萄糖在以约11mM的浓度存在。

[0065] 储存血小板期间可以产生活性氧物质，然而，存在于溶液中的抗坏血酸和还原型谷胱甘肽(即还原剂)在储存期间可以消耗氧自由基。如此，抗坏血酸和还原型谷胱甘肽都可以存在于本文所述的保存和储存血小板组合物中，浓度在约0.5mM到3mM之间，例如任何约0.5mM，1mM，1.5mM，2mM，2.5mM，或3mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，抗坏血酸的浓度是约0.178g/L。在另一个实施方案中，抗坏血酸以约1mM的浓度存在。在一些实施方案中，还原型谷胱甘肽的浓度是约0.462g/L。在另一个实施方案中，还原型谷胱甘肽以约1.5mM的浓度存在。

[0066] 本文公开的储存血小板的其他成分有助于通过三羧酸(TCA)循环产生ATP。在瓜氨酸苹果酸-精氨酸循环中，苹果酸(从瓜氨酸裂解)进入TCA循环以产生更多的ATP。同样，瓜氨酸苹果酸转化为精氨酸和富马酸；富马酸进入TCA循环以促进更多的ATP产生。TCA循环中的苹果酸和富马酸都导致更多的ATP产生。因此，本文所述的保存和储存血小板组合物中的精氨酸(例如L-精氨酸)和瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸)浓度可以在约0.5mM到7mM之间，例如任何约0.5mM，1mM，1.5mM，2mM，2.5mM，3mM，3.5mM，4mM，4.5mM，5mM，5.5mM，6mM，6.5mM，或7mM，包含落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，精氨酸的浓度为约1.074g/L。在另一个实施方案中，精氨酸以约5mM的浓度存在。在一些实施方案中，瓜氨酸苹果酸的浓度约为0.175g/L。在另一个实施方案中，瓜氨酸苹果酸以约0.175mM的浓度存在。任选地，瓜氨酸(例如L-瓜氨酸)，通过精氨酸琥珀酸和富马酸循环促进NO合成，并且也可以通过独立的添加中间体富马酸到组合物中在三羧酸循环中促进ATP合成，其中分别含有瓜氨酸约1-10mM之间(例如任何约1mM，2mM，3mM，4mM，5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，或10mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字)和约1-5mM之间的苹果酸(例如任何约1mM，2mM，3mM，4mM，或5mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字)。

[0067] 另一个对维持ATP水平有用的成分是腺苷。腺苷在本文所述的组合物中的浓度可以在约1-4mM之间，例如任何约1mM，1.5mM，2mM，2.5mM，3mM，3.5mM，或4mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，腺苷的浓度约为0.534g/L。在另一个实施方案中，腺苷在以约2mM的浓度存在。

[0068] 在其它实施方案中，本文公开的储存血小板组合物还含有乳清酸。乳清酸在组合物中的浓度可以在约0.5-2mM之间，例如任何约0.5mM，1mM，1.5mM，或2mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，腺苷的浓度是约0.274g/L。在另一个实施方案中，腺苷在以约0.5mM的浓度存在。

[0069] 在在本文公开的一些实施方案中储存血小板组合物，所述组合物溶液含有肌酸。储存血小板组合物中肌酸的浓度可以在约2-5mM之间，例如约2mM，约3mM，约4mM，或约5mM。在另一个实施方案中，储存血小板组合物可以含有0.373g/L肌酸钾。任何形式的肌酸都可以用于本发明中，包含，但不限于，肌酸一水合物。但是，在本文所述的一些实施方案中的任何组合物，不含有肌酸乳清酸。

[0070] 在本文公开的一些实施方案中的组合物，所述组合物溶液包含细胞内酸性缓冲剂，例如肌肽(例如L-肌肽)。所述组合物中的肌肽的浓度可以在约5-10mM之间，例如约5mM，约6mM，约7mM，约8mM，约9mM，或约10mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，所述组合物可以含有约2.26g/L的L-肌肽。

[0071] 在本文公开的其他实施方案中的组合物，所述溶液含有肉碱(例如L-肉碱)，其促进心肌减少乳酸分泌，从而降低酸度。所述组合物种的肉碱浓度可以在5-10mM之间，例如约5mM，约6mM，约7mM，约8mM，约9mM，或约10mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，所述组合物可以含有2g/L的L-肉碱。

[0072] 二氯乙酸，如果存在在本文公开的储存组合物中，其可以在溶液中通过降低乳酸水平来控制酸度。它也可以促进乳酸通过PDH途径进入三羧酸循环。所述组合物中二氯乙酸的浓度可以在约0.5-2.5mM之间，例如约0.5mM，约0.6mM，约0.7mM，约0.8mM，约0.9mM，约1mM，约1.1mM，约1.2mM，约1.3mM，约1.4mM，约1.5mM，约1.6mM，约1.7mM，约1.8mM，约1.9mM，约2mM，约2.1mM，约2.2mM，约2.3mM，约2.4mM，或约2.5mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字。在另一个实施方案中，所述组合物可以含有0.08g/L的二氯乙酸。在其他实施方案中，所述组合物中的二氯乙酸浓度可以在约0.001mM和0.5mM之间，例如任何约0.001mM，约0.01mM，约0.1mM，约0.15mM，约0.2mM，约0.25mM，约0.3mM，约0.35mM，约0.4mM，约0.45mM，或约0.5mM。在一些实施方案中，二氯乙酸存在于在环境温度(例如，在约21±2℃)下储存血小板的组合物中。在其他实施方案中，二氯乙酸不存在于亚环境温度(例如，从约0℃到约18℃)下储存血小板的组合物中。

[0073] 在本文公开的一些实施方案中的储存血小板组合物中，所述组合物不含有一种或多种钙离子，肌酸乳清酸，二氯乙酸，瓜氨酸(例如瓜氨酸苹果酸)，或胰岛素。

[0074] 本文公开的储存血小板组合物可以保持在中性或弱碱性pH值，例如约pH值7，7.1，7.2，7.3，7.4，7.5，7.6，或7.7，包含落入这些数值内的所有范围和数字。在一些实施方案中，储存血小板组合物的pH值为7.5。

[0075] 在其它实施方案中，储存血小板的组合物包含以下如表1所示结合去离子水和/或抑菌水的名词或基本成分。

[0076] 表1用于储存血小板的溶液的示例性制剂

[0077]

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	<1μM
氯化钾	4-5mM
磷酸钾	0.44-10mM
氯化镁	0.5-2.5mM
硫酸镁	0.5-2.5mM
氯化钠	100-115mM
碳酸氢钠	5-15mM
磷酸钠	10-40mM
二氯乙酸	0-2.5mM(任选)
谷胱甘肽	1.5-5.0mM
抗坏血酸	1.0-5mM
腺苷	2-5mM

[0078] 在一些实施方案中，用于表1所示的非限制性制剂中的磷酸钾盐可以是磷酸二氢钾。在另一个实施方案中，用于表1所示的非限制性制剂中的氯化镁盐可以是六水合氯化镁。在其它实施方案中，用于表1所示的非限制性制剂中的硫酸镁盐可以是七水合硫酸镁。在其它实施方案中，用于表1所示的非限制性制剂中的磷酸钠盐可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施方案中，用于表1中所示的非限制性制剂中的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。在另一个实施方案中，用于表1中所示非限制性制剂的肌酸可以是肌酸一水合物。

[0079] 在进一步的实施方案中，表1所示的非限制性制剂可以进一步含有浓度在约2到约10mM之间的一种或多种精氨酸(例如L-精氨酸)，例如任何约2mM，3mM，4mM，5mM，6mM，7mM，8mM，9mM或10mM，浓度约5到约10mM之间的肌肽(例如L-肌肽)，例如任何约5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，或10mM(2.26g/L中含10mM)，浓度为约5到约10mM之间的肉碱(例如，L-肉碱)，例如任何约5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，或10mM(2.26g/L中含10mM)，乳清酸，例如，浓度在约0.5-2mM之间，例如任何约0.5，1，1.5，或2mM，或肌酸(例如，肌酸一水合物)，浓度在约2-5mM之间，例如任何约2mM，3mM，4mM，或5mM。

[0080] 在其它实施方案中，表1中所示的非限制性制剂中可以进一步含有糖，例如但不限于六碳糖(例如，阿洛糖，阿卓糖，半乳糖，葡萄糖(包含D-葡萄糖(亦称右旋糖)和L-葡萄糖)，古洛糖，艾杜糖，甘露糖，塔罗糖，果糖，阿洛酮糖，山梨糖，塔格糖，岩藻糖，核酮糖或鼠李糖)或五碳糖(例如阿拉伯糖，来苏糖，核糖，木糖，酮戊糖，核酮糖或木酮糖)，浓度为约11mM到约25mM，例如任何约11mM，12mM，13mM，14mM，15mM，16mM，17mM，18mM，19mM，20mM，21mM，22mM，23mM，24mM，或25mM的糖。

[0081] 在其它实施方案中，表1所示的非限制性制剂中可以任选地包含1-10mM的瓜氨酸(例如，L-瓜氨酸)或其盐浓度为约2至约10mM，例如任何约2mM，3mM，4mM，5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，或10mM。在另一个实施方案中，表2所示的非限制性制剂可以任选地含有瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸)代替浓度为约0mM到约10mM或约2mM到约7mM的苹果酸和/或瓜氨酸，

例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM瓜氨酸苹果酸。

[0082] 在其它实施方案中,表1所示的非限制性制剂可以任选地含有钙螯合剂(例如但不限于,一种或多种乙二胺四乙酸(EDTA),乙二醇四乙酸(EGTA),二乙烯三胺五乙酸(DTPA),羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA),二氨基环己烷四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸),浓度为约0mM到5mM之间,例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,或5mM。在任何本文所述的储存血小板组合物中有必要使用钙螯合剂,当用于结合多种成分的水完全不含有或基本上不含有钙离子(例如水有钙离子浓度>100μM(或>任何约0μM,1μM,2μM,3μM,4μM,5μM,10μM,15μM,20μM,25μM,30μM,35μM,40μM,45μM,50μM,55μM,60μM,65μM,70μM,75μM,80μM,85μM,90μM,或95μM)。溶液中钙离子的检测和定量很容易通过本领域已知的方法例如通过原子吸收光谱来确定。

[0083] 在其它实施方案中,并且作为非限制性示例中,储存血小板组合物包含如表2所示的以下成分,结合去离子和/或抑菌水:

[0084] 表2用于储存血小板的溶液的示例性制剂

[0085]

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	< 1μM
氯化钾	4-5 mM
磷酸钾（一元的）	0.44-10 mM
氯化镁（六水合物）	0.5-2.5 mM
硫酸镁（五水合物）	0.5-2.5 mM
氯化钠	100-115 mM
碳酸氢钠	5-15 mM
磷酸钠（二元的；五水合物）	10-40 mM
D-葡萄糖	11-25 mM
二氯乙酸	0-0.5 mM (任选的)
谷胱甘肽（还原型）	1.5-5.0 mM
抗坏血酸	1.0-5 mM
L-精氨酸	2-10 mM
L-瓜氨酸苹果酸*	2-10 mM
腺苷	2-5 mM
乳清酸	0.5-2 mM (任选的)
一水合肌酸	2-5 mM (任选的)
L-肌肽	5-10mM(2.26gm/L 中含 10mM)(任选的)
L-肉碱	5-10mM(2.00gm/L 中含 10mM)(任选的)
EGTA	0-5mM (任选的)

[0086] *任选地，1-10mM的L-瓜氨酸和1.5mM的苹果酸可能代替L-瓜氨酸苹果酸

[0087] III发明方法

[0088] A.保存血小板的方法

[0089] 本发明还提供了使用本文公开的组合物储存血小板的有效方法。血小板可以在环

境温度或室温(21±2℃)下在血小板转运袋中储存在本文公开的溶液中。在一些实施方案中,用于在环境或室温下储存血小板的组合物包含二氯乙酸。在另一个实施方案中,在本文所公开的溶液中血小板可以在亚环境温度(4±1℃或13±3℃)下储存。在一些实施方案中,用于在亚环境温度下储存血小板的组合物缺少(即不含)二氯乙酸。在其它实施方案中,可以储存在本文所公开的溶液中,温度范围从约3℃到约23℃之间,例如任何约3℃,4℃,5℃,6℃,7℃,8℃,9℃,10℃,11℃,12℃,13℃,14℃,15℃,16℃,17℃,18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃,或25℃。

[0090] 在一些实施方案中,储存在本公开组合物中的血小板可以在全部或部分储存过程期间轻轻搅动,例如在平板摇床或任何类似的搅拌装置上。根据本文提供的方法,血小板在本文公开的溶液中可能储存长达15天,例如任何1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,或15天,没有显著的储存损伤积累,例如,血小板在储存>5天后适于输血。

[0091] 一氧化氮(NO)是一种生物调解分子,在心血管稳态,神经传递和免疫反应中具有不同的功能作用。如实施例部分中所讨论的,本申请的发明人已经发现,储存的血小板中的NO产生对于血小板的生理健康是关键的并且与血小板储存损伤的减少以及对血小板聚集的抑制有关。因此,理想的储存方案将确保在储存过程中的血小板的NO产生保持正常。根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的血小板比没有储存在本文公开的溶液中的血小板显示出明显更多的NO产生(例如任何约10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,或75%,更多的NO产生,包括落入这些百分比内的所有范围和数字)。在本文所述的组合物中,例如瓜氨酸(例如瓜氨酸苹果酸)和精氨酸(例如,L-精氨酸)的组分有助于维持储存的血小板中的NO产生。

[0092] 长期储存期间维持血小板中的高能磷酸盐浓度(例如ATP)对于减少储存损伤也是重要的。根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的血小板相比没有储存在本文公开的溶液中的血小板显示出显著更高的高能磷酸盐(例如任何约10%,15%,20%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,或75%以上的高能磷酸盐包括落入这些百分比内的所有范围和数字)。

[0093] 在储存后3天,血小板通常会聚集。血小板的聚集与血小板储存损伤的发生相关,因此理想的血小板储存溶液将维持血小板基本上不聚集的状态。根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的血小板相比没有储存在本文公开的溶液中的血小板表现出显著更少的聚集(例如任何约10%,15%,20%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,或75%,更少聚集,包括落入这些百分比内的所有范围和数字)。类似地,储存在本文公开的溶液中的血小板相比没有储存在本文公开的溶液中的血小板,在相当的时间段内表现出显著更少的形态变化(例如盘状形态学损失)。

[0094] 在储存的血小板中经常观察到的另一个典型的损伤是磷脂磷脂酰丝氨丝(PS)从内部向外部血小板膜易位。根据本文公开的方法储存在本文公开的溶液中的血小板相比未储存在本文公开的任何溶液中的血小板变现出显著更少的PS易位(例如约10%,15%,20%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,或75%,更少的PS易位,包括落入这些百分比的所有范围和数字)。

[0095] 储存较长时间的血小板显示出乳酸产量的显著增加,这可能负面影响储存介质的pH值,导致储存介导的损伤增加。根据本文公开的方法储存在本文公开的任何溶液中的血

小板比未储存在本文公开的溶液中的血小板显示出显著的更少的乳酸产量(例如任何约10%,15%,20%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,或75%,更少的乳酸产量,包括落入这些百分比内的所有范围和数字)。

[0096] B.血小板储存组合物的生产方法

[0097] 本文提供生产一种保存血小板的组合物的方法,如本文公开的任何组合物。该方法包括混合一种或多种下述如表三所示成分及所标明的浓度在蒸馏的,去离子的,和/或抑菌水以产生储存血小板组合物的非限制性示例。

[0098] 表3

[0099]

成分	mM
钙离子	<1μM
氯化钾	4.0
磷酸钾	0.44
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
葡萄糖或右旋糖	11.00
二氯乙酸	0.50 (任选的)
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
精氨酸	5.00
苹果酸	1.00
腺苷	2.00
乳清酸	0.50
肌酸	2.50
肌肽	10
肉碱	10
EGTA	2.5(任选的)

[0100] 在本文公开的方法的一个实施方案中，不是添加瓜氨酸苹果酸(例如，L-瓜氨酸苹果酸)到组合物中，而是分别的添加1-10mM(例如任何约1mM，2mM，3mM，4mM，5mM，6mM，7mM，8mM，9mM，或10mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字)的瓜氨酸(例如，L-瓜氨酸)连同1-5mM(例如任何约1mM，2mM，3mM，4mM，或5mM，包括落入这些数值内的所有范围和数字)的苹果酸。

[0101] 在一些实施方案中，用于生产表3中所示的非限制性制剂的磷酸钾盐可以是磷酸二氢钾。在另一个实施方案中，用于表3中所示的非限制性制剂的氯化镁盐可以是氯化镁六水合物。在其它实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂中的硫酸镁盐可以是七水合硫酸镁。在其它实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂中的磷酸钠盐可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。在另一个实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂的肌酸可以是肌酸一水合物。在另一个实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂的精氨酸可以是L-精氨酸。在另一个实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂的肌肽可以是L-肌肽。在另一个实施方案中，用于表3所示的非限制性制剂的肉碱可以是L-肉碱。

[0102] 在其它的实施方案中，用于生产一种保存血小板的组合物的方法包括混合一种或多种下述成分如表四所示浓度在蒸馏的，去离子和/或抑菌水以产生储存血小板组合物的非限制性示例。

[0103] 表四：

[0104]

成分	mM
钙离子	<1μM
氯化钾	4.0
磷酸钾	0.44
氯化镁	0.5
硫酸镁	0.5
氯化钠	100.00
碳酸氢钠	5.00
磷酸钠	30.00
二氯乙酸	0.50(任选的)
谷胱甘肽	1.50
抗坏血酸	1.00
腺苷	2.00
钙螯合剂	2.5(任选的)

[0105] 在一些实施方案中，用于表4所示的非限制性制剂中的磷酸钾盐可以是磷酸二氢钾。在另一个实施方案中，用于表4所示的非限制性制剂中的氯化镁盐可以是氯化镁六水合物。在其它实施方案中，用于表4所示的非限制性制剂中的硫酸镁盐可以是七水合硫酸镁。在其它实施方案中，用于表4中所示的非限制性制剂的磷酸钠盐可以是磷酸氢二钠七水合物。在一些实施方案中，用于表4中所示的非限制性制剂的谷胱甘肽可以是还原型谷胱甘肽。

[0106] 在进一步实施方案中，表4中所示的非限制性制剂可以进一步包含一种或多种浓度为约2mM至约10mM的精氨酸(例如L-精氨酸)，例如任何约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM,浓度为约5至10mM之间的肌肽(例如L-肌肽)，例如任何约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(2.26g/L中含10mM)，浓度为约5至10mM之间的肉碱(例如L-肉碱)，例如任何约5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM(2.26g/L中含10mM)，乳清酸，例如浓度在0.5-2mM之间，例如任何约0.5,1,1.5,或2mM,或者肌酸(例如，肌酸一水合物)，浓度约在2-5mM之间，例如任何约2mM,3mM,4mM,或5mM.

[0107] 在其它实施方案中，表4所示的非限制性制剂可以进一步含有糖，例如但不限于六碳糖(如阿洛糖，阿卓糖，半乳糖，葡萄糖(包括D-葡萄糖(亦称右旋糖)和L-葡萄糖)，古洛糖，艾杜糖，甘露糖，塔罗糖，果糖，阿洛酮糖，山梨糖，塔格糖，岩藻糖，核酮糖或鼠李糖)或五碳糖(如阿拉伯糖，来苏糖，核糖，木糖，酮戊糖，核酮糖或木酮糖)，浓度从约11mM到约25mM之间，例如任何约11mM,12mM,13mM,14mM,15mM,16mM,17mM,18mM,19mM,20mM,21mM,22mM,23mM,24mM,或25mM的糖。

[0108] 在其它实施方案中，表4所示的非限制性制剂可以任选地包含1-10mM的瓜氨酸(例如，L-瓜氨酸)或其盐，浓度为在约2到约10mM之间，例如任何约2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,或10mM。在另一个实施方案中，表4所示费非限制性制剂可以任选地包含0-10mM苹果酸，例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,或10mM。在另一个实施方案中，表4所示的非限制性制剂可以任选地包含瓜氨酸苹果酸(例如L-瓜氨酸苹果酸)代替苹果酸和/或瓜氨酸，浓度在约0mM到约10mM之间或约2mM到约7mM之间，例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM或10mM瓜氨酸苹果酸。

[0109] 在其它实施方案中，表4中所示的非限制性制剂可以任选地包含钙螯合剂(例如，但不限于，以下一种或多种乙二胺四乙酸(EDTA)，乙二醇四乙酸(EGTA)，二乙烯三胺五乙酸(DTPA)，羟乙基乙二胺三乙酸(HEEDTA)，二氨基环己烷四乙酸(CDTA)1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和柠檬酸)浓度在约0mM至约5mM之间，例如任何约0mM,1mM,2mM,3mM,4mM,或5mM。当水不完全或基本不含钙离子时(即水的钙离子浓度>0μM或>1μM)，使用钙螯合剂来制备本文所述的任何血小板储存组合物是必要的。溶液中钙离子的检测和定量很容易通过本领域已知的方法例如通过原子吸收光谱来确定。

[0110] 所述方法还可以包括将溶液的pH值调节至中性或轻微碱性水平的步骤，例如约pH7,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6或7.7,包括落入这些数值内的所有范围和数字。在一个实施方案中，储存血小板组合物的pH值被调节至7.5。

[0111] 在其它实施方案中，生产用于保存血小板的组合物的方法包括在蒸馏水，去离子水，和/或抑菌水中混合表5指定浓度的一种或多种下述成分，以产生一种储存血小板组合物的非限制性样品。

[0112] 表五:用于储存血小板的溶液的示例性制剂

[0113]

成分	计量
蒸馏水	1L
钙离子	<1μM
氯化钾	4-5mM
磷酸钾	0.44-10mM
氯化镁	0.5-2.5mM
硫酸镁	0.5-2.5mM
氯化钠	100-115mM
碳酸氢钠	5-15mM
磷酸钠	10-40mM
D-葡萄糖	11-25mM
二氯乙酸	0-0.5mM(任选的)
谷胱甘肽	1.5-5.0mM
抗坏血酸	1.0-5mM
精氨酸	2-10mM
瓜氨酸	1-10mM
苹果酸	0-7mM(任选的)

[0114]

腺苷	2-5mM
乳清酸	0.5-2mM
肌酸	2-5mM
肌肽	5-10mM(2.26gm/L 中含10mM)
肉碱	5-10mM(2.00gm/L 中含10mM)
EGTA	0-5mM(任选的)

[0115] C.实时检测血小板中的一氧化氮的存在的方法

[0116] 本文还提供了用于实时监测血小板中基础一氧化氮(NO)的存在的方法。这些方法提供了相对快速和准确的技术,其可以与所公开的血小板储存组合物和相关方法结合使用,以在整个储存期间检测血小板的健康。

[0117] 所述方法包括用含一氧化氮的荧光染料标记含有储存的血小板的样品。任何一氧化氮特异性荧光染料都可以与所述方法结合使用,并且包括那些可以在市场上买到的(例如DAF-FM,2,3,-二氨基萘,1,2-二氨基蒽醌,或NBD甲基肼,来自Life Technologies或来自Enzo Life Sciences的DAF-2DA)。

[0118] 在用一氧化氮特异性荧光染料标记之后,可以任选地使用本领域已知的任何合适的固定剂来固定血小板,例如但不限于戊二醛,福尔马林,甲醛,乙醇,甲醇,四氧化锇,重铬酸钾,铬酸或高锰酸钾。可以固定在,例如,显微镜载玻片上或任何其他可用于荧光成像的介质上。

[0119] 荧光标记的血小板可以使用本领域已知的用于检测荧光的任何方式,例如但不限于荧光显微镜检查术(例如共聚焦显微镜术),流式细胞仪技术例如荧光激活细胞分选(FACS)或荧光计。

[0120] IV.试剂盒

[0121] 用于制备储存/复苏溶液的组合物任选地被包装在具有下面所列成分及其倍数的试剂盒中,其所需量按溶液的量的比例增加2,3,5,10,20倍。示例性试剂盒包含一种或多种谷胱甘肽,抗坏血酸,腺苷,氯化钾,磷酸钾镁,硫酸镁,氯化钠,碳酸氢钠,磷酸钠,糖(如核糖,葡萄糖或右旋糖),精氨酸,瓜氨酸苹果酸,腺苷,乳清酸,肌酸,钙螯合剂(例如EGTA)和二氯乙酸(例如,一种或多种约0.3g/L氯化钾,0.06g/L磷酸钾(一元的),0.110g/L镁氯化钠(六水合物),0.123g/L硫酸镁(七水合物),5.84g/L氯化钠,0.42g/L碳酸氢钠,7.9g/L磷酸钠(二元的;七水合物),1.98g/L D-葡萄糖,0.462g/L谷胱甘肽(还原型),0.178g/L抗坏血酸,1.074g/L精氨酸,0.175g/L L-瓜氨酸苹果酸,0.534g/L腺苷,0.274g/L乳清酸,0.373g/L肌酸一水合物,0.001-5mM EGTA,和/或0.075gm/L二氯乙酸)。试剂盒还可以任选地含有瓜氨酸(例如L-瓜氨酸),和/或苹果酸。

[0122] 这些成分可以与使用说明一起包装，并在0.01-2.0L的蒸馏水中混合。所述试剂盒中还可以含有调节血小板联合保存溶液的pH值的方法(如，THAM)。该试剂盒可以在有或没有无菌水成分情况下包装或销售。。

[0123] 本文还提供了用于实时监测血小板中一氧化氮存在的试剂盒。这些试剂盒可以含有一种或多种一氧化氮特异性荧光染料和/或用于测量荧光信号的手段，例如，但不限于，荧光计。试剂盒的其它组分可以包括固定试剂，显微镜载玻片和用于进行血小板一氧化氮评估测定的书面说明。

[0124] 本说明书通篇给出的每个最大的数值限制都包含每个较低的数值限制，就好像这些较低的数值限制被明确的在此写出一样。本说明书通篇给出的每个最小的数值限制都包含每个更高的数值限制，就好像这些较高的数值限制被明确的在此写出一样。本说明书通篇给出的每个数值范围都包含落入这些更宽的数值范围内的每个更窄的数值范围，就好像这些更窄的数值范围全部被明确的在此写出一样。

[0125] 通过参考以下实施例可以进一步理解本发明，这些实施例是作为说明提供的而不是用来限制性的。

[0126] 实施例

[0127] 实施例1

[0128] 在以下实施例中，表格均使用阿拉伯数字(例如，表1，表2，表3等)。本实施例显示，与储存在PASIII-M中的血小板相比，储存在Aayusol溶液中的血小板产出更多的一氧化氮以及更少的聚集水平。

[0129] 材料和方法

[0130] 血小板浓缩物和富含血小板的血浆的制备和储存：PASIII-M(Kaufman Hematology Am Soc Hematol Educ Program.2006,492-496;AlhuMaidan J Clinical ApHeresis 2012;27:93-98)和Aayusol(Ph值7.5)的成分如表1所示。血小板浓缩物从Research Blood Components(剑桥，马萨诸塞州)获得。按描述(Hou等人，Vox Sanguinis,(2011)100,187-195;Gao等人，Thromb Haemost,2012,;107:681-689)准备的富含血小板的血浆(PRP)来自三个已同意的志愿捐赠者。简言之，从健康志愿者身上采集的静脉血(40-60ml)到含有标准抗凝剂ACD-A(9:1,vol/vol)的管中。用离心机分离(15分钟，200克)的样品，收集顶部三分之二的富含血小板的血浆(PRP)。将获得的血小板(PRP)转移到含有PASIII-M或Aayusol(20:80v/v)的透气的储存袋中。所有样品均出现显著的白细胞减少，白细胞数量少于$5*10^6$/单位。根据美国血库协会标准，将样品血小板含量标准化为3*1011单位以上。

[0131] 表1:Aayusol溶液的组成

[0132]

成分	mM	g/L
氯化钾	4.00	0.300
磷酸钾（一元的）	0.44	0.060
氯化镁（六水合物）	0.50	0.111
硫酸镁（五水合物）	0.50	0.123
氯化钠	100.00	5.840
碳酸氢钠	5.00	0.420

[0133]

磷酸钠（二元的；五水合物）	30.00	7.900
D-葡萄糖	11.00	1.980
二氯乙酸	0.50	0.075gm/L
谷胱甘肽（还原型）	1.50	0.462
抗坏血酸	1.00	0.178
L-精氨酸	5.00	1.074
L-瓜氨酸苹果酸	1.00	0.175
腺苷	2.00	0.534
乳清酸	0.50	0.274
一水合肌酸	2.50	0.373
肌肽	10.00	2.26
肉碱	10.00	2.0

[0134] 将血小板转移袋储存在21±2℃，并在无菌环境下，在平板式振动器(Helmer PC 100，诺贝斯威，印第安纳州)上恒定温和搅拌。在9到14天的储存期间，储存的血小板被轻轻地取样做即时评估。将血小板储存在自体血液转移袋(300ml容量；Medtronics，明尼阿波利斯市，明尼苏达州；产品目录编号ATBAG300)中。

[0135] 共聚焦显微术：通过在室温培养60分钟，用DAF2-DA(50μM，一氧化氮特异性荧光染料)定期标记血小板。将血小板迅速固定在1％戊二醛中并使用共聚焦显微镜成像。用488nm

氪氩激光器激发样品，使用窄带通滤波器来限制发射波长重叠。扫描血小板并在共聚焦显微镜(Carl Zeiss GmbH，耶拿，德国)上成像。

[0136] 一氧化氮合成的流式细胞术分析：在PASIII-M(Kaufman Hematology Am Soc Hematol Educ Program.2006,492-496;AlhuMaidan J Clinical ApHeresis 2012;27:93-98)和Aayusol中储存1-9天的血小板，在室温下培养60分钟，并用DAF2-DA定期标记。然后，该混合物在200μlTyrode的缓冲液或Aayusol溶液中稀释并通过流式细胞术进行评估。在前向散射和侧向散射强度点表示中识别直径小于1至6μM的项目。每个样品进行一分钟的采集，在此期间用流式细胞术分析约60μl的悬浮液。如前所述计算微粒浓度(Hou;Gao)。结果表示为每ml微粒的数量。每个样本重复至少三次，获得平均值。使用BD LSR Fortessa(Becton-Dickinson，圣何塞，加利福尼亚州)分析样品。

[0137] 结果

[0138] 保存在PASIII-M和Aayusol(20:80)中的血小板在环境温度下标准300ml转移袋(Medtronics)中温和振荡9天。图1显示了n＝5次试验的代表性图像；放大200倍。图像显示，在储存第5天后，如绿色荧光的亮度所示，与PAS中的相比，Aayusol中的血小板产生更大量的强直的一氧化氮。此外，在Aayusol中血小板保持其形态不变并且没有表现出任何聚集。相比之下，储存在PASIII-M中的血小板早在第三天，便出现肿大(部分活化)并开始形成聚集体(见图1A(左图))。相比之下，在Aayusol中的血小板在储存了九天之后才观察到有部分聚集。这是使用荧光成像技术测量血小板中一氧化氮生成的第一个证明。如图1B所示，使用FACS扫描仪分析DAF标记的样品。总荧光(光子)计数以任意单位表示。一氧化氮的产生随着时间的推移而降低，但在Aayusol中储存的血小板中的一氧化氮的产生却显著增强。储存在PASIII-M中的血小板中的一氧化氮的基础含量几乎立即减少。相比之下，储存在Aayusol中的血小板，在整个9天的储存期间稳定地维持一氧化氮的基础含量。这些结果表明，与PASIII-M相比，在Aayusol中血小板出现最小的聚集是由于储存的血小板稳定的产生一氧化氮，因为一氧化氮降低血小板的聚集和活化。(数据代表平均值±SD，n＝5，$p<0.005$)。

[0139] 实施例2

[0140] 本实施例显示高能量磷酸盐的保存有助于维持储存的血小板的稳态。

[0141] 材料和方法

[0142] ATP和磷酸肌酸测定：如(Besho等，1991)所述，在血小板提取物中测量ATP和磷酸肌酸(CP)。简言之，将血小板悬浮于400μl，0.4M冰冷的高氯酸溶液中并均质化两次持续30秒。均匀混合物在0℃下以1970g离心10分钟。用等体积的冰冷的0.4MKHCO$_3$溶液中和等分的上清液，并如上所述离心。将上清液在零下80℃保存以进行ATP(和CP)的测量。将沉淀颗粒溶解于等体积的0.1MNaOH中，离心并用于蛋白质的测定。使用生物发光测定试剂盒(Sigma-Aldrich和GloMax-Multi+检测系统，Promega)根据制造商提供的议定书测量ATP和CP。

[0143] 结果

[0144] 结果显示在图2中。将血小板在环境温度(21±2℃)下温和振荡储存在Aayusol和现行标准PASIII-M中15天。用PRP(富血小板血浆)作为实验对照。定期评估血小板的ATP和磷酸肌酸(CP)浓度。在储存过程中，ATP和CP浓度(pMoles)有瞬时的下降。然而，储存9天后，Aayusol中的血小板中的ATP和CP浓度显著大于在PP中的和储存在PASIII-M中的血小板中的ATP和CP浓度。(数据代表平均值±SD；n＝3，$p<0.05$)。

[0145] 实施例3

[0146] 本实例证明，在长期储存期间，使用Aayusol保存血小板可减少磷酯酰丝氨酸(PS)暴露和削弱诱导细胞凋亡。

[0147] 材料和方法

[0148] 磷酯酰丝氨酸(PS)暴露：通过它们结合FITC-乳凝集素(Haematologic Technologies,Inc.,埃塞克斯章克申，佛蒙特州，美国)的能力来检测活化血小板，它们的聚集体和微粒，其与磷脂酰丝氨酸(PS)在活化和早起凋亡过程中的相互作用，已在之前被报告了(Hou等人，Vox Sanguinis,(2011)100,187-195;Gao等人，Thromb Haemost,2012;107:681-689)。

[0149] PS暴露的流式细胞术分析：将血小板在环境温度21±2℃下在Aayusol中储存0,1,2,3,4,5,7,8和9天。将血小板(50μl)再悬浮于Tyrode的缓冲液或Aayusol溶液中，并在室温下黑暗中与5μlFITC-乳凝集素一起培养10分钟。然后，将混合物在200μlTyrode的缓冲液或Aayusol溶液中稀释并通过流式细胞术评估。在前项散射和侧向散射强度点表示中识别直径小于1至6μM的事件。每个样品进行一分钟的数据采集，在此期间用流式细胞术分析约60μl的悬浮液。通过乳凝集素/抗CD41正向标记在血小板，微粒和聚集体上的PS暴露。如前所述(Hou等人，Vox Sanguinis,(2011)100,187-195;Gao等人，Thromb Haemost,2012,;107:681-689)计算微粒浓度。结果表示为每ml微粒的数量。每个样本至少重复三次，获得平均值。样品是用BD LSR Fortessa(Becton-Dickinson，圣何塞，加利福尼亚州)进行分析。

[0150] 共聚焦显微术：将盖玻片在室温下用10ug/ml纤维蛋白原包裹在FBS中2小时，用Tyrode缓冲液洗涤3次，用BSA(牛血清血蛋白)密封30分钟，然后用Tyrode缓冲液洗涤2次。在室温下(RT)将200微升储存的血小板悬浮液转移到载玻片上培养40分钟。培养之后，将载玻片洗涤，并在室温下在黑暗中用5μlFITC-乳凝集素培养10分钟。此后，将培养的混合物在1mlAayusol中洗涤以除去未结合的染料。用488nm的氪氩激光器激发样品，使用窄带滤光片来限制发射波长重叠。扫描血小板并在共焦显微镜(Carl Zeiss GmbH，耶拿，德国)上成像。使用Zeiss LSM 710公交显微镜搭配63倍油浸物镜使细胞成像。

[0151] 血液化学：使用Abaxis Vetscan VS2或i-Stat系统配置CG4和CG8试卡盒定期评估储存的血小板培养基中溶解的O_2，CO_2，碳酸氢钠，碱的效率，离子组成和乳酸水平。

[0152] 结果

[0153] 图3A显示用流式细胞术分析的储存在血小板中的PS暴露。使用488nm激发和530nm发射波长分别分析样品。结果显示，在9天储存结束时，在Aayusol(如图3A上排)中储存的血小板只有7.7+/-0.5％显示PS暴露。相比之下，储存在PAS-IIIM(如图3A下排)中的血小板的29.20+/-3％显著PS阳性(深蓝色箭头)，表明潜在诱导细胞凋亡。Aayusol中的血小板保存显著优于PASIIIM中的血小板。($p<0.001$;$n=5$)。图3B显示了储存血小板中形成的聚集体(浅蓝色箭头)和微粒(黑色箭头)的流式细胞术分析。在图3B中，顶层组，储存在Aayusol中的血小板在9天储存期间显示出最小的聚集和微粒形成。相比之下，通过对储存在PASIII-M溶液中的血小板的检测显示了大量的聚集和微粒形成。这些结果清楚地表明，与目前使用的PASIII-M溶液相比，Aayusol中储存的血小板更有优势。

[0154] 表2显示了乳酸产量的即时测量。

[0155] 表2：储存血小板中的乳酸产量(mMoles/Liter)

[0156]

储存天数	0	3	5	7	9	
PASIII-M	0.72±0.35		3.85±0.91		6.50±1.40	n=3
Aayusol	0.85±0.26	0.99±0.30	1.76±0.63	2.63±0.90	3.47±1.26	n=3

[0157] 图4显示在储存期间的P-选择蛋白的表达。如所述将血小板储存在Aayusol和PASIII-M中9天。用FITC-抗CD62抗体即时标记血小板并使用FACS检测。在Aayusol中储存的血小板,P-选择蛋白表达,一种活性化标记物,大幅度减弱。相比之下,在整个9天的储存期间,储存在PASIII-M中的血小板中的P-选择蛋白表达显著增加。这些结果表明储存在PASIII-M中的血小板被激活,但是最低限度的表现在Aayusol中储存的血小板,这表明在Aayusol中保存的优越性。(数据代表平均值±SD;n=3,p<0.001)。

[0158] 图5是储存血小板的共聚焦显微镜图像。将血小板保存在PASIII-M或Aayusol中0-9天,并定期用FITC-乳凝集素标记以鉴定PS暴露(诱导细胞凋亡)。血小板显示出PS暴露的逐渐增加。在第0天和第1天,具有或不具有伪足的盘状型血小板显示没有乳凝集素染色。到第3-7天,血小板的形态变成不规则形状,在血小板和微粒的分散和褶皱区域发现PS暴露。到第7-9天,更多的血小板具有乳凝集素阳性细胞膜,其特征在于细胞皱缩,细胞边缘区域的伪足以及偶尔的圆形突起。到第9天时,在PASIII-M中,PS暴露的强度增加,而细胞质凝聚,细胞膜出现褶饰边,形成更多的微囊泡、水泡,大量长的丝状伪足样扩展出现,并且细胞成为圆形以及非粘连的。相比之下,在9天的储存期间,在Aayusol中储存的血小板零星的有PS暴露。显著数量的血小板保持它们的形态,并且在储存结束时一些仍保持粘附。

[0159] 用FACS分析定量PS暴露(表3)

[0160] 表3:储存血小板中PS暴露(%)的即时评估

[0161]

储存天数	0	3	5	7	9	
PASIII-M	0.10±0.30	5.91±2.40	15.20±6.90	24.50±5.90	35.10±5.80	n = 5
Aayusol	0.10±0.14	1.80±0.87	4.70±1.82	7.65±2.20	8.53±0.89	n = 5

[0162] 实施例4

[0163] 本实施例显示Aayusol可以用于在亚环境温度下保存血小板。

[0164] 将血小板在4±1℃和13±3℃下温和振荡的储存在Aayusol中15天,并使用共聚焦显微镜在0,5,9和15天成像(图6)。在两个温度下,血小板在整个储存过程中都保持其形态,尽管出现皱褶边缘逐渐缩回并使细胞变圆。在储存9天后,微粒(MP)开始出现。

[0165] 前向散射光(FSC)与细胞表面积或大小成正比。因此,FSC提供了一种合适的方法来检测大于给定尺寸的颗粒而不依赖于它们的荧光,因此用于区分血小板与血小板聚集体和微粒的形成。侧向散射光(SSC)与细胞粒度或内部复杂度成正比。图7是代表性的一组点图,显示了在4℃(上组图)和13℃(下组图)储存的血小板、聚集体和MPs。在储存过程中微粒(P;绿色)和聚集体(P7;蓝色)的形成有一个递增但不显著的增加,(在4℃时更高),然而,两个温度下的血小板种群(红色)在储存期间一致。

[0166] 在0,3,5,7,9,12和15天定期采集血小板并用荧光标记的抗CD41a,CD42b,CD62p(p-选择蛋白)抗体标记。PS用FITC-乳凝集素标记。用荧光共焦显微镜(图8上组)和定量流式细胞术(图8下组)对样品成像。使用前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)斑点印记(如图

8所示)定量微粒(MP)和血小板聚集体和血小板。在整个储存期间用荧光标记物强力标记血小板。在这两种温度下储存15天的血小板细胞表面标记物(CD41和42b)保持完整和稳定。在两种温度下血小板活化标记物(CD62p),微粒形成和血小板聚集都是最小的。这些标记物在4℃储存的血小板中比13℃更明显,尽管没有显著差异。相比之下,在4℃储存的血小板中,PS暴露显著增加,但在13℃时最低。然而,使用JC1荧光染料的线粒体极性测定显示这些血小板没有凋亡而是仍然存活(未显示)。不受理论束缚,这种部分活化的血小板可快速归巢至患者的活跃出血部位,快速止血,因为PS暴露是凝血级联激活的已知催化剂,因此可用于急性出血患者。

[0167] 在亚环境温度下储存在Aayusol溶液中的血小板中也检查出了许多生化标记物。

[0168] 表4:亚环境温度下储存在Aayusol溶液中的血小板的生物化学变化。

[0169]

储存 (天数)		0	3	6	9	12	15
pH	4°C	7.31	7.21	7.23	7.26	7.29	7.30
	10°C	7.24	7.22	7.25	7.26	7.25	7.24
	13°C	7.24	7.30	7.29	7.29	7.27	7.25
二氧化碳分压 (mmHg)	4°C	14	16.8	14.9	14.1	12.6	12.7
	10°C	16.9	15.2	13.4	12.3	11.6	11.4
	13°C	15.6	13	12.6	11.8	11.6	11.3
氧分压 (mmHg)	4°C	166	196	199	200	180	213
	10°C	162	190	180	197	180	194
	13°C	161	186	185	191	194	199
碱效率 (mmol/L)	4°C	-19	-21	-21	-21	-20	-20
	10°C	-20	-21	-21	-22	-22	-22
	13°C	-21	-20	-20	-21	-22	-22
碳酸氢根 (mmol/L)	4°C	7.1	6.7	6.3	6.3	6.1	6.2
	10°C	7.2	6.2	5.9	5.5	5.1	4.9
	13°C	7	6.4	6.1	5.7	5.3	4.9
乳酸 (mmol/L)	4°C	<0.3	<0.3	0.39	0.47	0.52	0.63
	10°C	0.35	0.43	0.89	1.27	1.61	1.93
	13°C	<0.3	0.68	1.11	1.64	2.06	2.4

[0170] 从表4可以看出,pH值和碱效率(BE eff)在整个储存期间在所有调查的温度下都保持不变,这显示Aayusol的强大的缓冲能力。正如所预料的那样,乳酸随时间推移而增加,表明葡萄糖代谢强劲(从观察到的HEP产生的增加中确定;见图10,下述)。尽管如此,乳酸的

增加量明显低于储存在常规环境温度下。并不影响pH值。

[0171] 还测定了亚环境温度下储存血小板中的一氧化氮产量。根据其FSC/SSC分布(i)和表面标记物辨别(未显示),用流式细胞术鉴定血小板。图9描述了血小板门中测量的绿色荧光信号的分布以及FSC和SSC。用共聚焦显微镜(上组图)在0,5,9和15天用可渗透细胞的荧光前体4-氨基-5-甲基氨基-2',7'-二氟荧光素(DAF-FM)二乙酸盐观察一氧化氮合成。另外,储存血小板中的一氧化氮合成还通过流式细胞仪从载有DAF-FM的血小板的荧光分布图(下组图)中定量。血小板中的一氧化氮表达在储存期间保持一致(左图),在4℃下储存的血小板中一氧化氮产量线性减低约35%在15天,而在13℃储存约减少10%。这代表了第一次在储存的血小板中成功进行了一氧化氮的定量成像。

[0172] 在4℃和13℃储存15天的Aayusol中的血小板也被评估高能磷酸盐(HEP)水平。使用既定程序定期评估HEP,包括ATP和CP水平。如图10所示,在超过9天的储存,血小板在两种温度下继续合成HEP。然而,在随后的储存中合成减少;ATP在第15天在两种温度下达到约50%;相比之下,CP下降了大约15%在两个样本中。虽然如此,在储存的最后血小板保留了显著水平的HEP。因此Aayusol能够有效支持在亚环境温度下的长期储存期间的HEP的代谢。

[0173] 另外的实验显示,在亚环境温度下储存在Aayusol中的血小板在激动剂刺激后保持功能活性。在0,1,3,5,7,9,12和15天,用50μMADP和/或2μM A23187/刺激所储存的血小板,用FITC-乳凝集素(一种PS探针)和Alexa 647抗-CD62p Ab染色,并通过流式细胞术分析(图11)。分析在储存中的对激动剂反应的血小板的百分比,并与基线(0天)获得的值进行比较。在13℃储存的血小板的功能活性优于在4℃储存的血小板。尽管如此,在长期储存期间,血小板在两种温度下都保持功能可行。

[0174] 这些结果第一次清楚地表明血小板可以在亚环境温度下在Aayusol中以可行的和功能活性的形式储存。

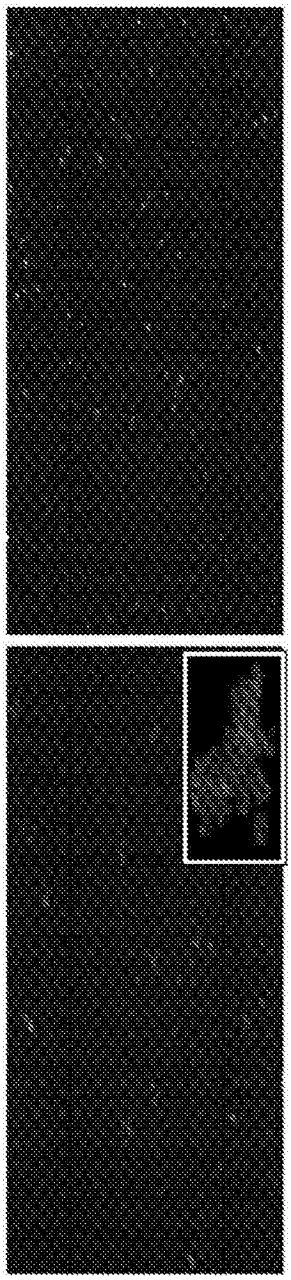


图1A

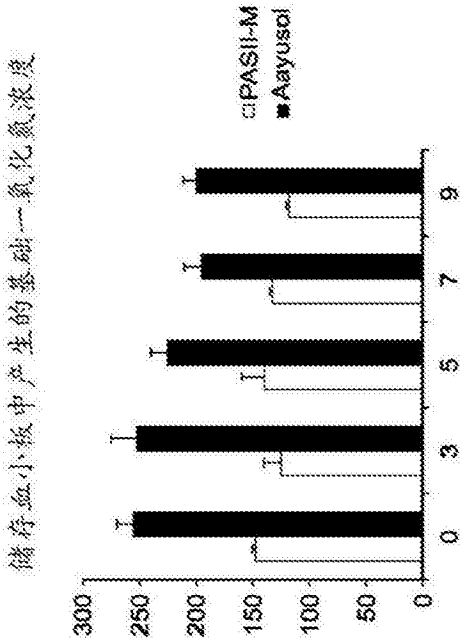

储存血小板中产生的基础一氧化氮浓度
PASII-M
Aayusol
300
250
200
150
100
50
0
0
3
5
7
9

图1B

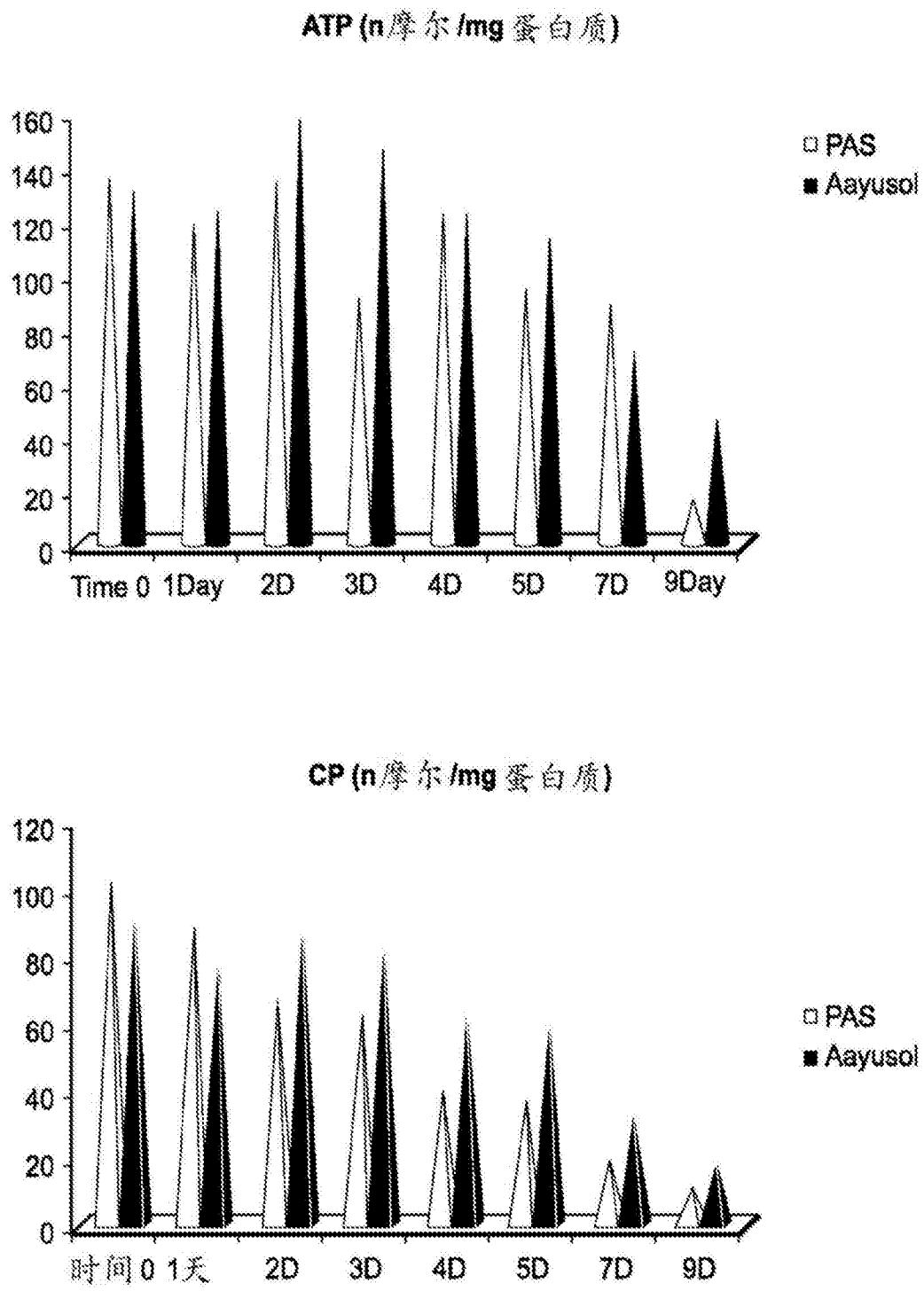

ATP (n摩尔/mg蛋白质)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Time 0 1Day 2D 3D 4D 5D 7D 9Day
PAS
Aayusol
CP (n摩尔/mg蛋白质)
120
100
80
60
40
20
0
时间 0 1天 2D 3D 4D 5D 7D 9D
PAS
Aayusol

图2

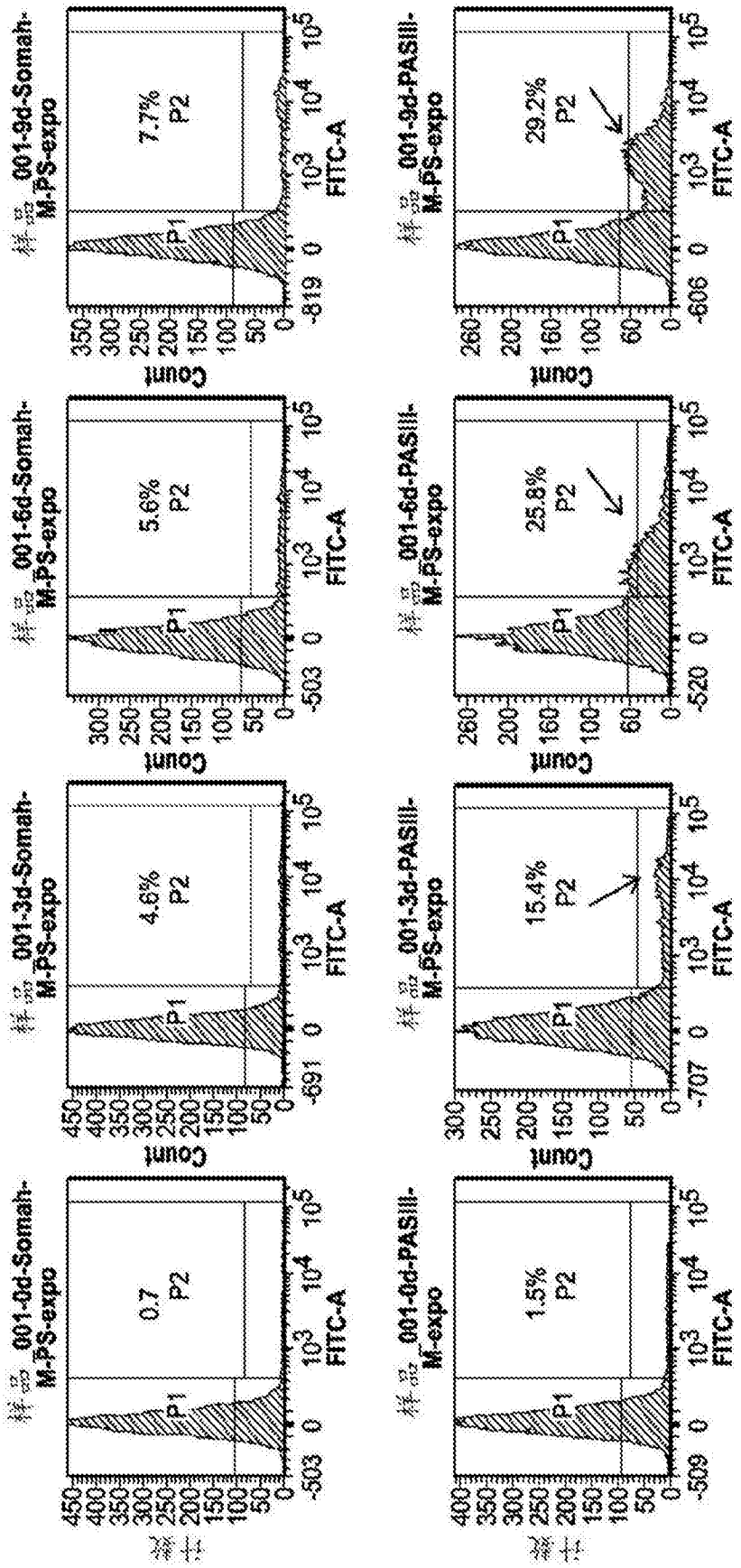

样品 001-0d-Somah-M-PS-expo
0.7
P2
P1
计数
FITC-A
样品 001-3d-Somah-M-PS-expo
4.6%
P2
样品 001-6d-Somah-M-PS-expo
5.6%
P2
样品 001-9d-Somah-M-PS-expo
7.7%
P2
样品 001-0d-PASIII-M-expo
1.5%
P2
样品 001-3d-PASIII-M-PS-expo
15.4%
P2
样品 001-6d-PASIII-M-PS-expo
25.8%
P2
样品 001-9d-PASIII-M-PS-expo
29.2%
P2

图3A

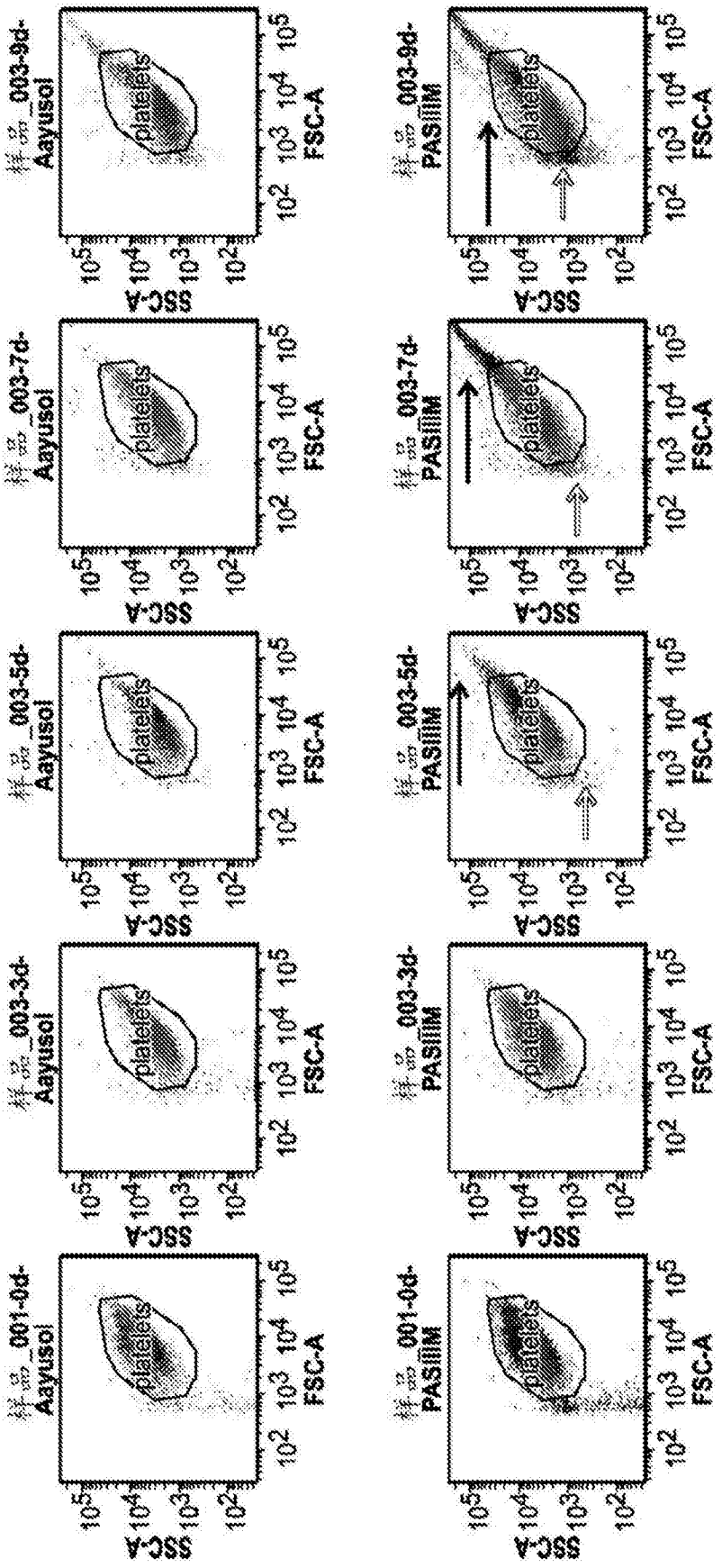

样品_001-0d-Aayusol
样品_003-3d-Aayusol
样品_003-5d-Aayusol
样品_003-7d-Aayusol
样品_003-9d-Aayusol
样品_001-0d-PASIIIM
样品_003-3d-PASIIIM
样品_003-5d-PASIIIM
样品_003-7d-PASIIIM
样品_003-9d-PASIIIM
platelets
SSC-A
FSC-A
10^2 10^3 10^4 10^5

图3B

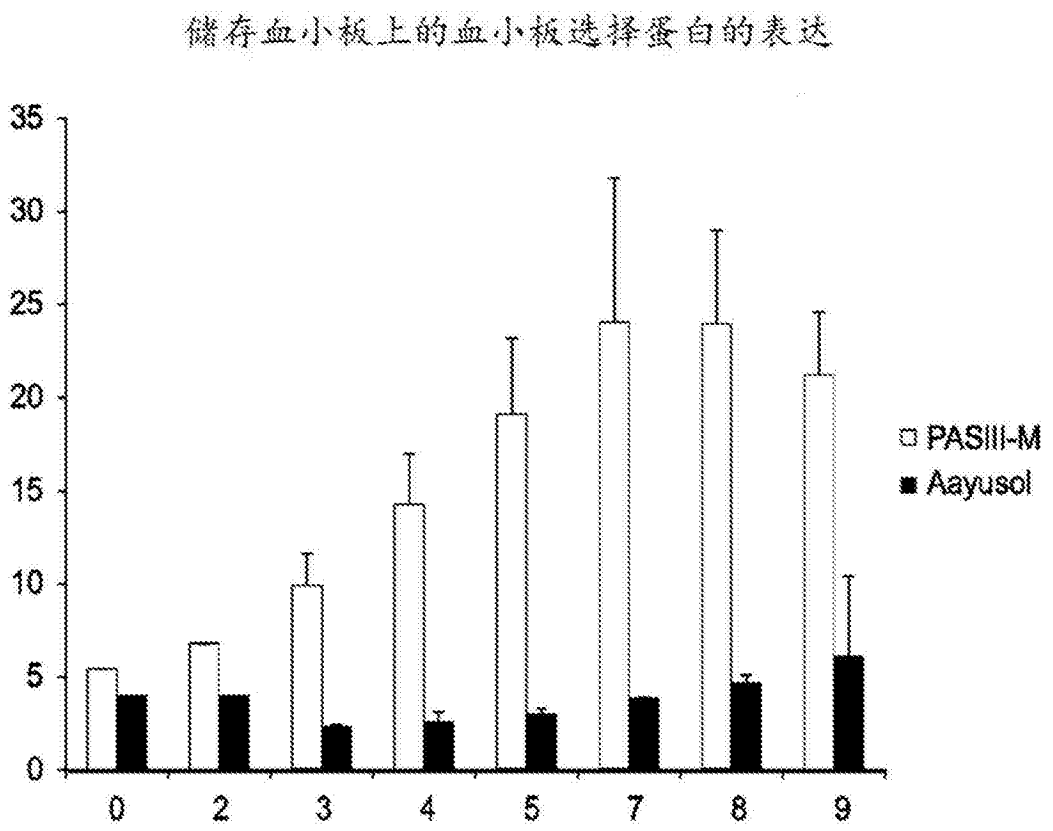

储存血小板上的血小板选择蛋白的表达
35
30
25
20
15
10
5
0
0
2
3
4
5
7
8
9
PASIII-M
Aayusol

图4

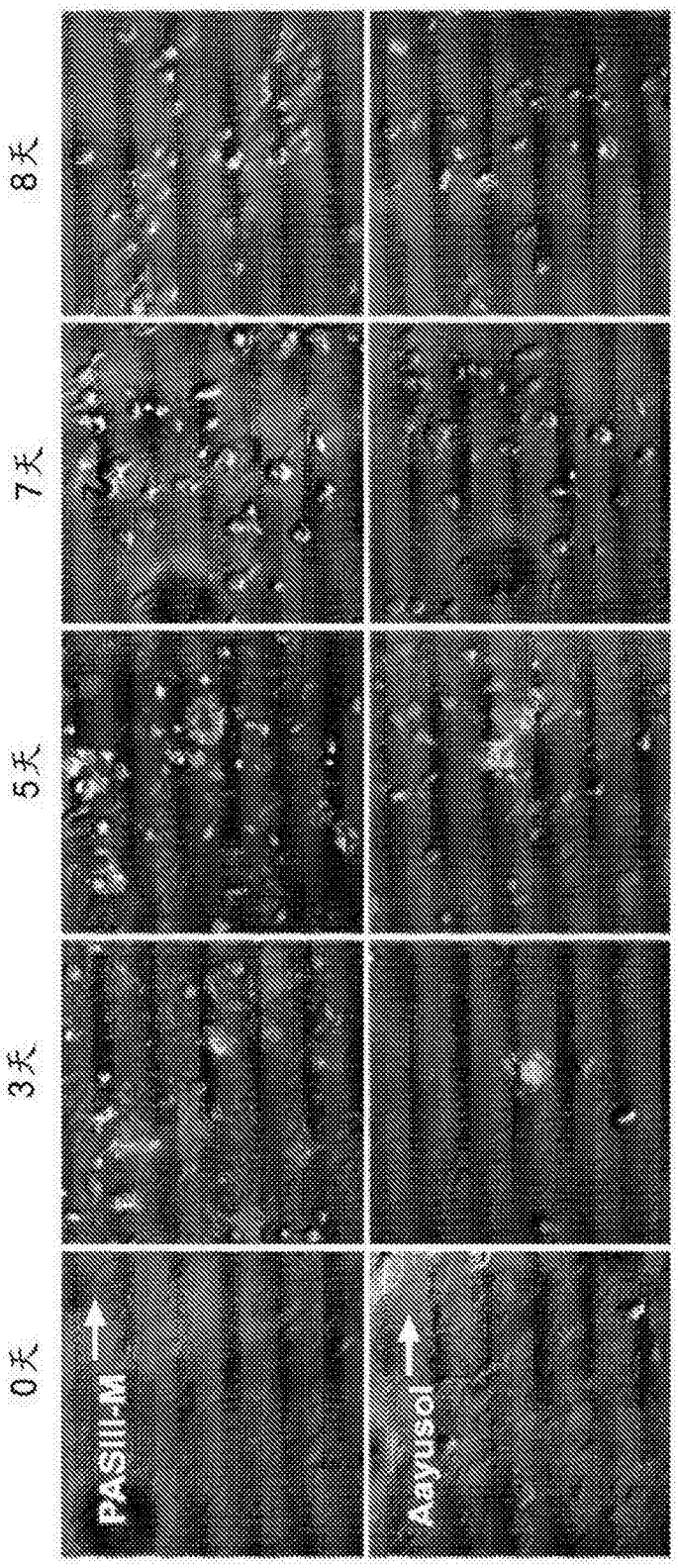


图5

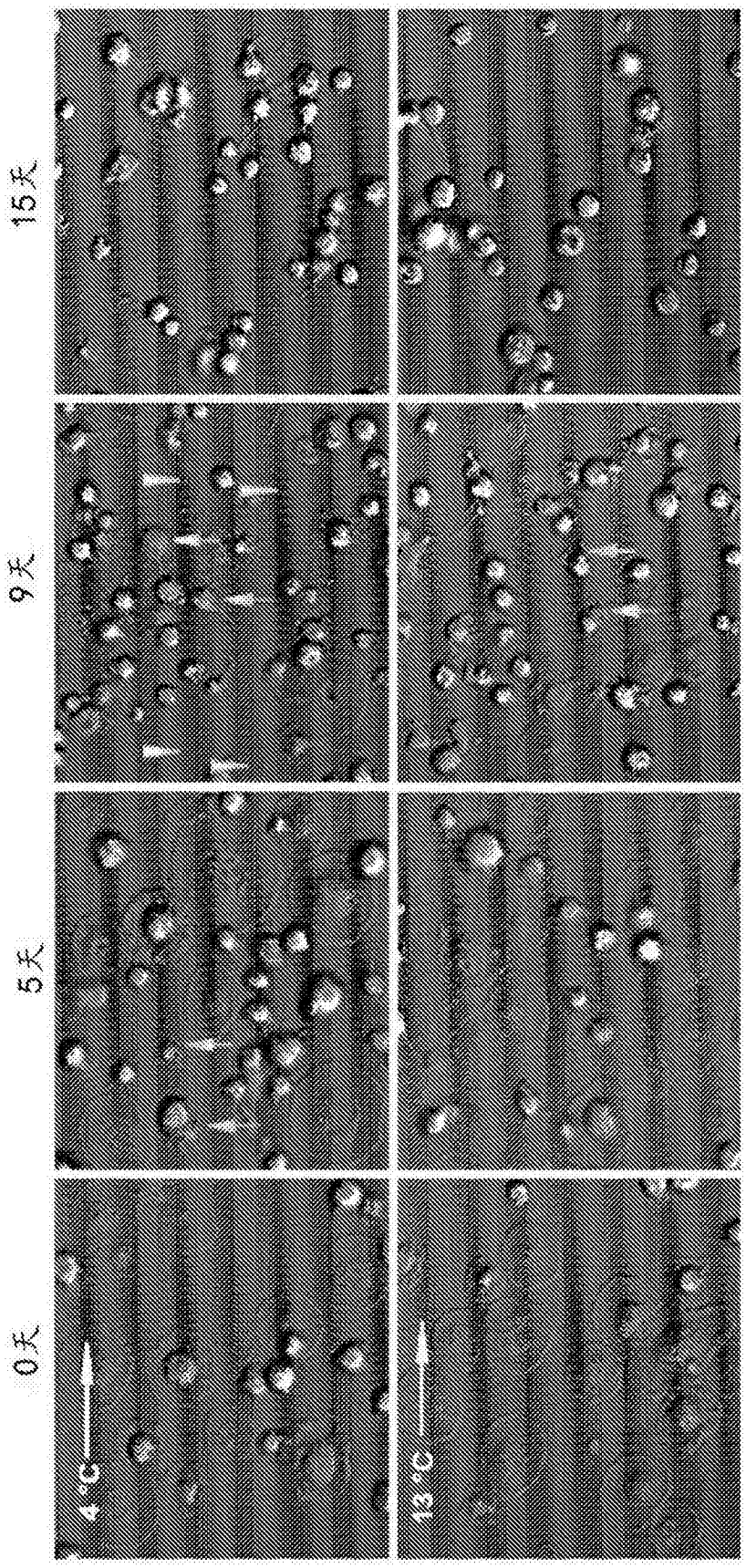


图6

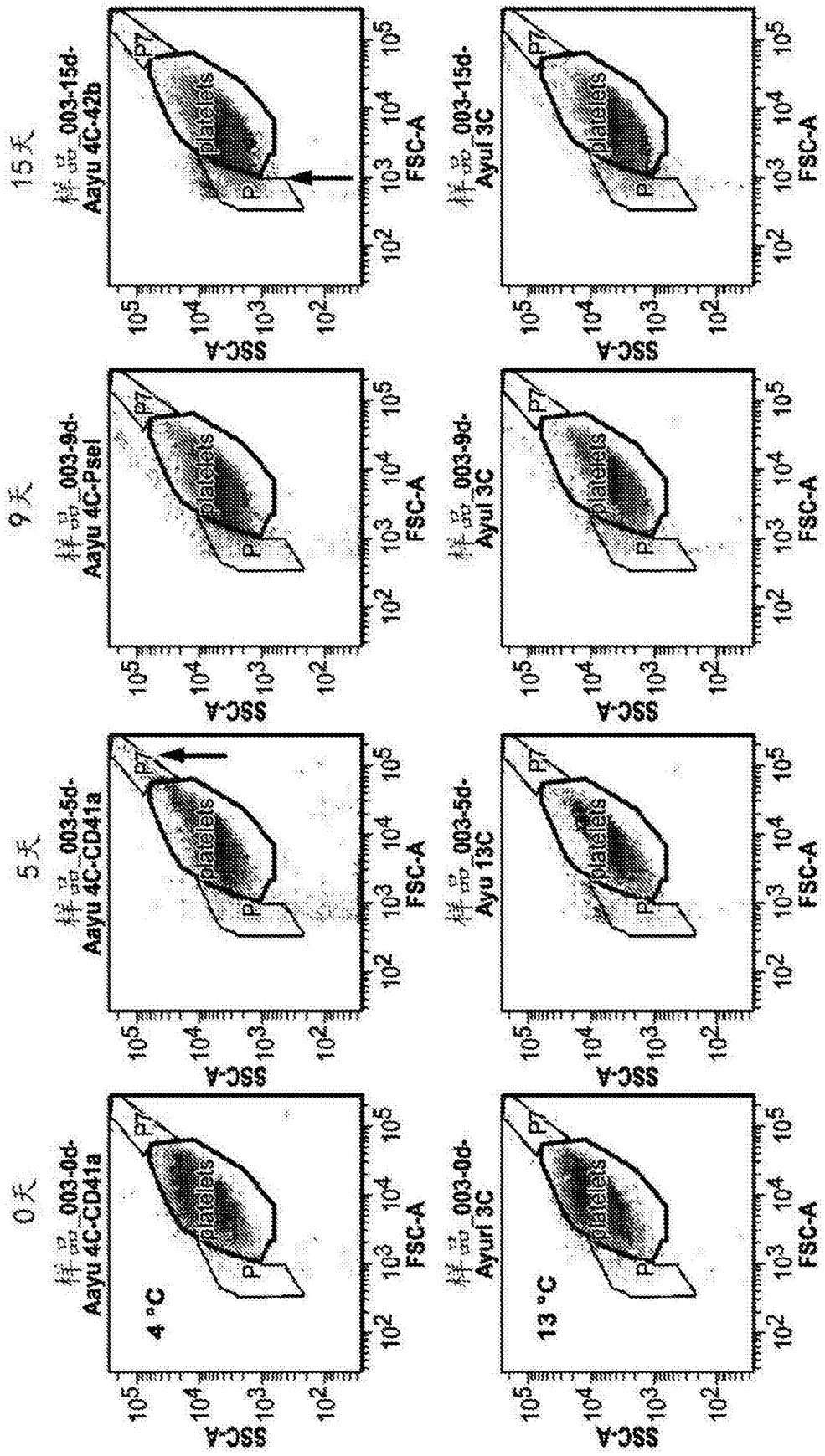

0天
5天
9天
15天
样品 003-0d-Aayu 4C-CD41a
样品 003-5d-Aayu 4C-CD41a
样品 003-9d-Aayu 4C-Psel
样品 003-15d-Aayu 4C-42b
样品 003-0d-Ayuri 3C
样品 003-5d-Ayu 13C
样品 003-9d-Ayul 3C
样品 003-15d-Ayul 3C
4 °C
13 °C
platelets
P7
P
SSC-A
FSC-A

图7

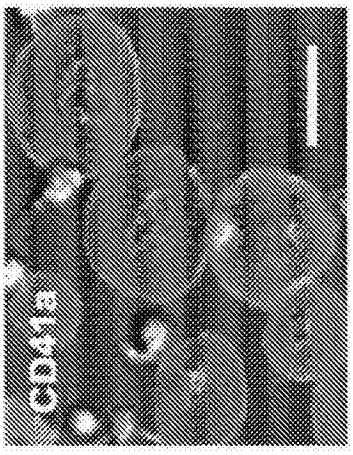


图8A

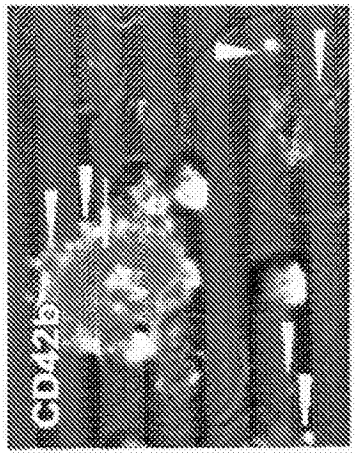


图8B

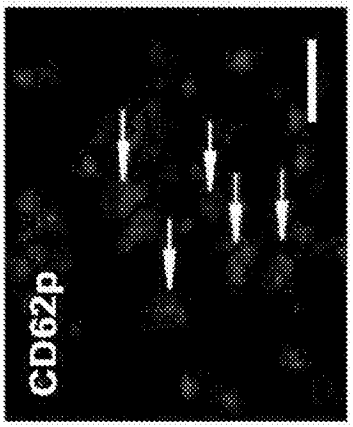


图8C

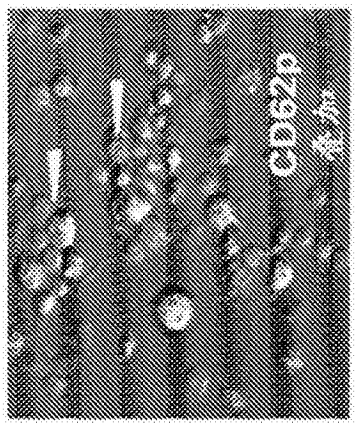

CD62p

图8D

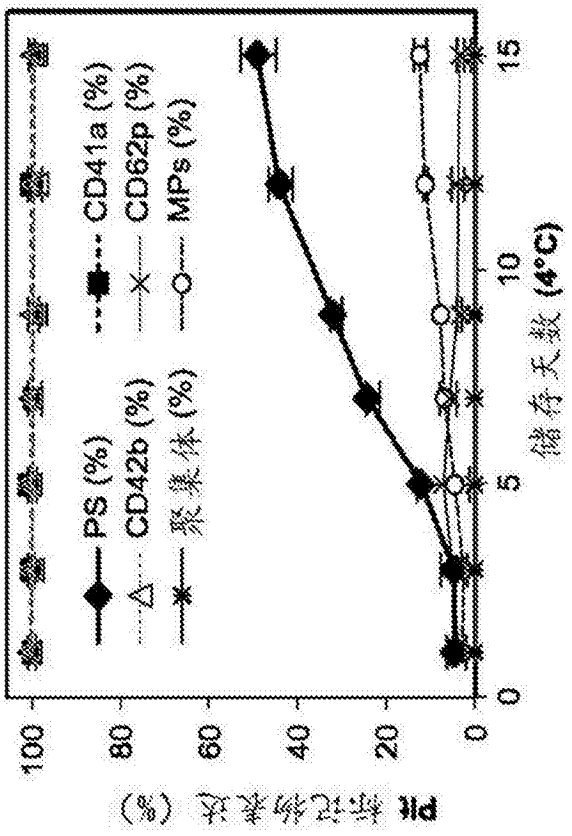

PS (%)
CD41a (%)
CD42b (%)
CD62p (%)
聚集体 (%)
MPs (%)
pit 标记物表达 (%)
储存天数 (4°C)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15

图8E

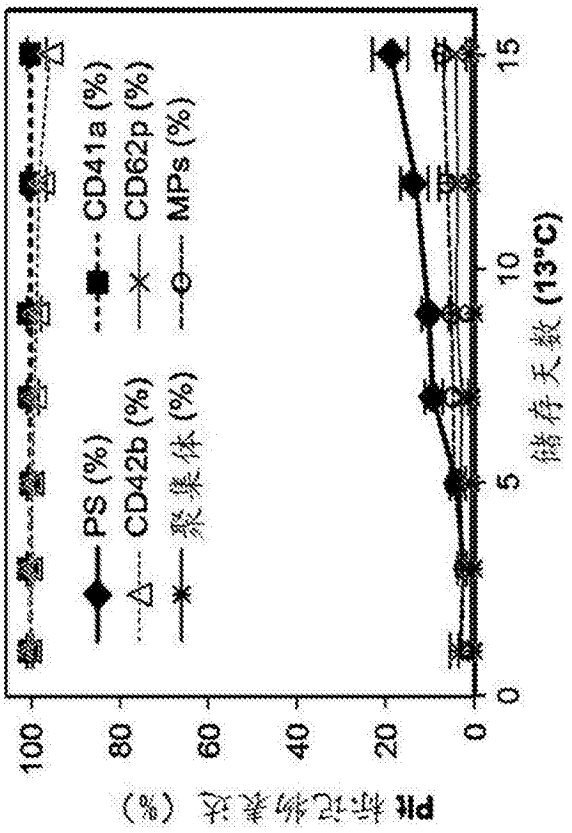


图8F

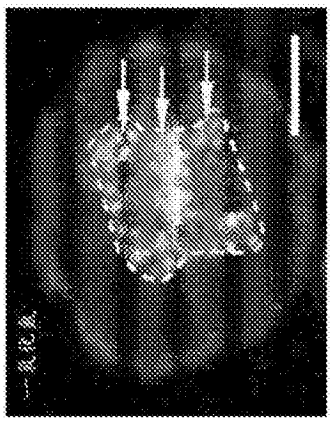


图9A

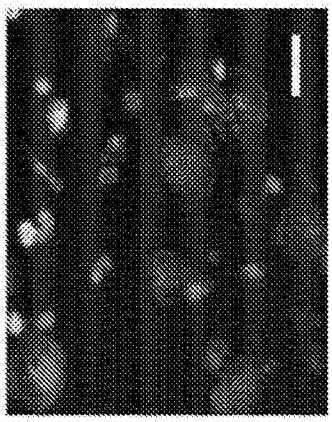


图9B

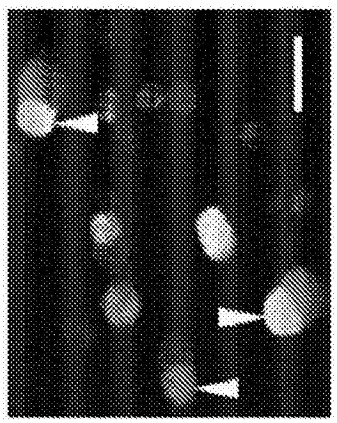


图9C



图9D

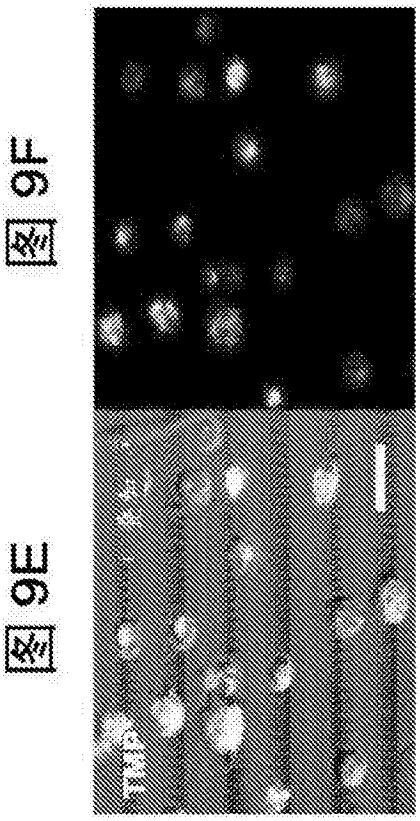


图 9E

图 9F

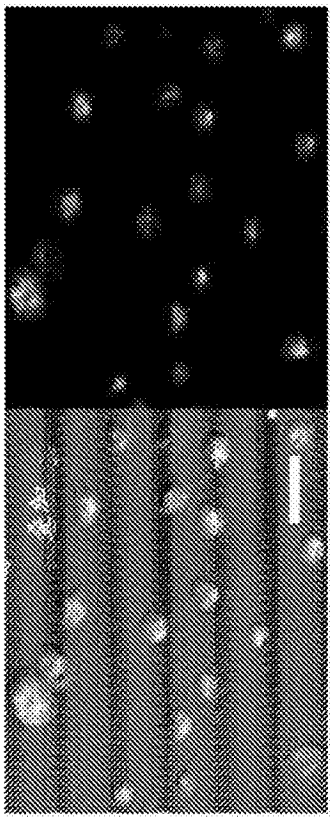


图 9G

图 9H

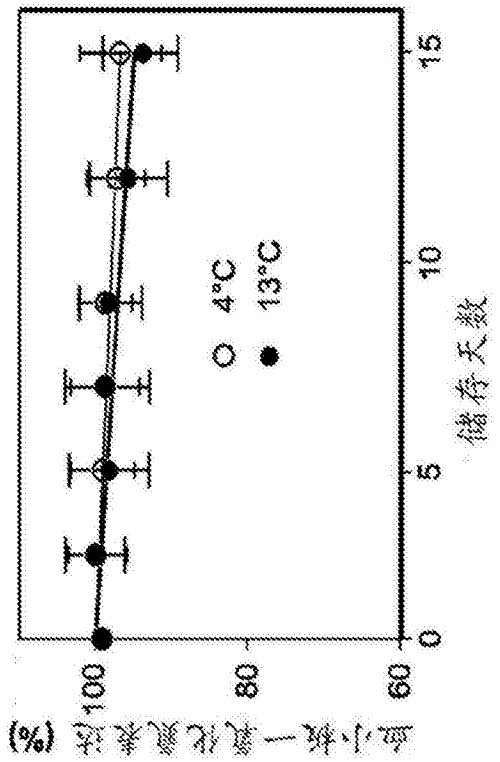


图9I

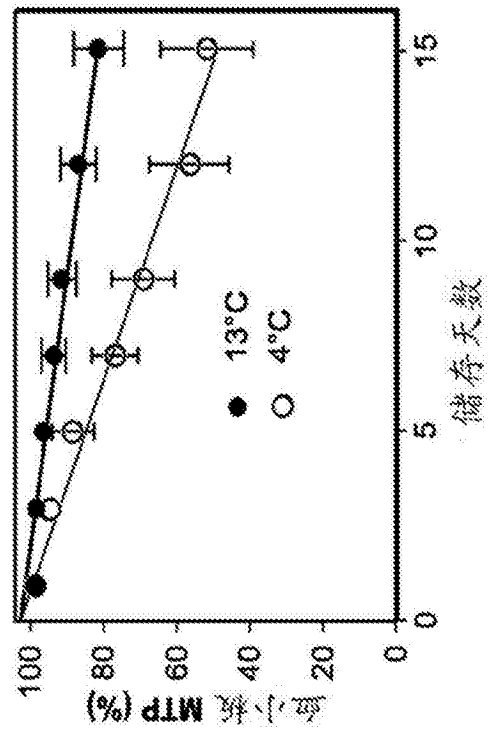


图9J

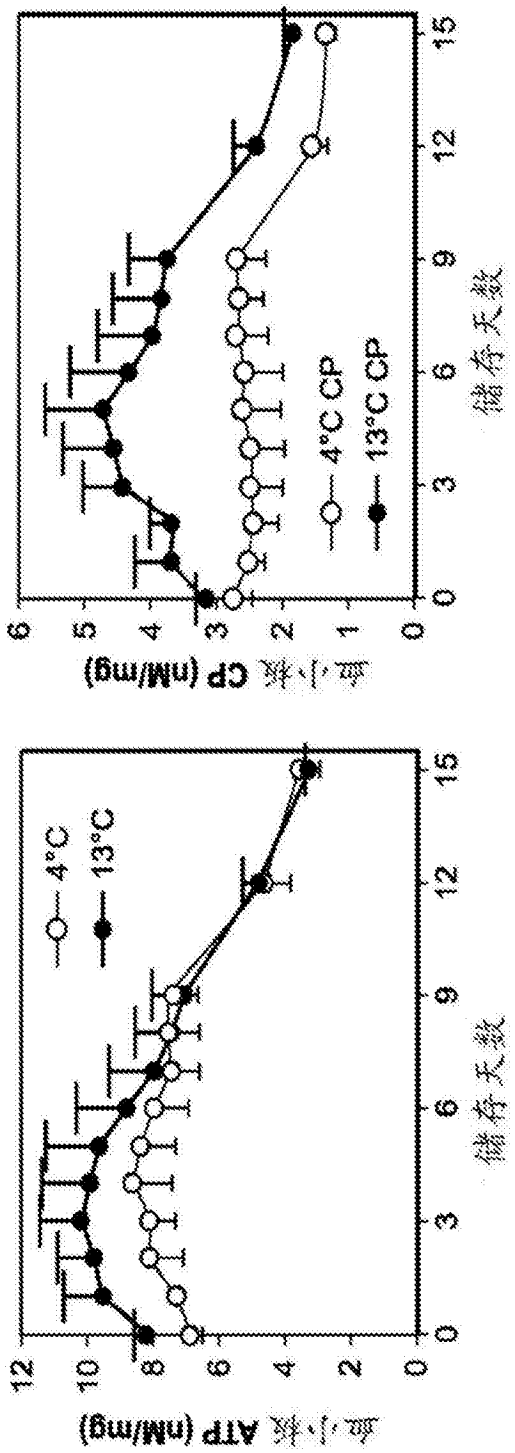

血小板 CP (nM/mg)
0
1
2
3
4
5
6
储存天数
0
3
6
9
12
15
4°C CP
13°C CP
血小板 ATP (nM/mg)
0
2
4
6
8
10
12
储存天数
0
3
6
9
12
15
4°C
13°C

图10

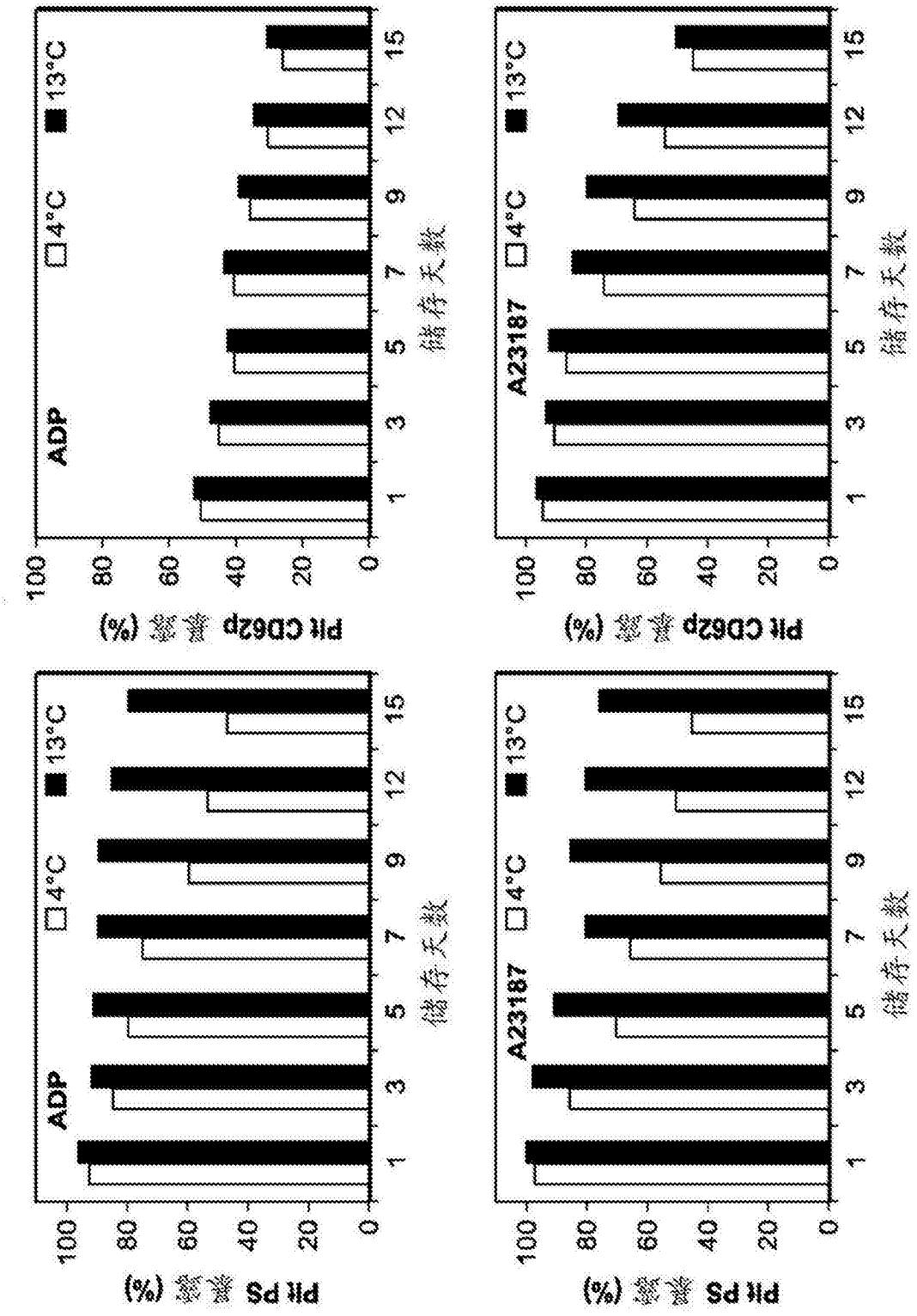

ADP
A23187
4°C
13°C
储存天数
Plt CD62p 表达 (%)
Plt PS 表达 (%)
0
20
40
60
80
100
1
3
5
7
9
12
15

图11