(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114450066 A
(43)申请公布日 2022.05.06

(21)申请号 202080065262.X

(22)申请日 2020.08.14

(30)优先权数据
62/887,923 2019.08.16 US
63/065,337 2020.08.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/046525 2020.08.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/034719 EN 2021.02.25

(71)申请人 塞尔菲乐有限公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 基思·安德鲁·莫斯科维茨
布雷登·卡尔·伊舍勒
威廉·马修·迪克森
纳伦德拉·纳特·坦登
安波·妮可·李

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
专利代理师 肖善强

(51)Int.Cl.
A61P 7/02(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)
A01N 1/02(2006.01)

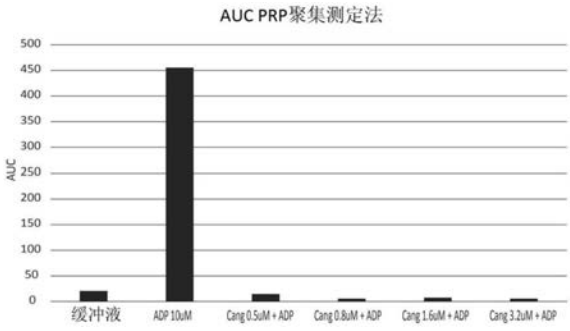
权利要求书3页 说明书32页 附图29页

(54)发明名称

作为抗血小板剂逆转剂的血栓小体

(57)摘要

在本文提供的一些实施例中是一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。



CN 114450066 A

1.一种在受试者中恢复正常止血的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂(incubating agent),所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

2.一种在受试者中恢复正常止血的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成所述组合物的工艺来制备,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

3.一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

4.一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成所述组合物的工艺来制备,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

5.一种使受试者做好手术准备的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

6.一种使受试者做好手术准备的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成所述组合物的工艺来制备,其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。

7.根据权利要求5至6中任一项所述的方法,其中所述手术是紧急手术。

8.根据权利要求5至6中任一项所述的方法,其中所述手术是预定手术。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者正在用抗血小板剂治疗。

10.根据权利要求9所述的方法,其中停止用所述抗血小板剂的治疗。

11.根据权利要求9所述的方法,其中继续用所述抗血小板剂的治疗。

12.一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

13.一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法,所述方法包括向需要其的所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成所述组合物的工艺来制备。

14.根据权利要求12或权利要求13所述的方法,其中所述抗血小板剂的作用是所述抗血小板剂的过剂量的结果。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含抗纤维蛋白溶解剂。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述抗纤维蛋白溶解剂选自由ε-氨基己酸(EACA)、氨甲环酸、抑肽酶、氨基甲基苯甲酸、纤维蛋白原及其组合组成的群组。

17.根据权利要求15或权利要求16所述的方法，其中所述血小板或血小板衍生物加载有所述抗纤维蛋白溶解剂。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、补充剂及其组合组成的群组。

19.根据权利要求1至17中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特鲁曲班、匹考他胺、依利格雷、噻氯匹定、布洛芬、沃拉帕沙、阿托帕沙及其组合组成的群组。

20.根据权利要求1至17中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷(clopidogrel)、普拉格雷(prasugrel)、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特鲁曲班(terutroban)、匹考他胺(picotamide)、依利格雷、噻氯匹定(ticlopidine)、布洛芬、沃拉帕沙(vorapaxar)、阿托帕沙(atopaxar)、西洛他唑、前列腺素E1、依前列醇、双嘧达莫、曲前列素钠、沙格雷酯(sarpogrelate)及其组合组成的群组。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括局部施用。

22.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括肠胃外施用。

23.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括静脉内施用。

24.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括肌内施用。

25.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括鞘内施用。

26.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括皮下施用。

27.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中施用包括腹膜内施用。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的方法，其中所述组合物在所述施用步骤之前被干燥。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述组合物在所述干燥步骤后被再水合。

30.根据权利要求1至28中任一项所述的方法，其中所述组合物在施用步骤之前被冻干。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述组合物在所述冷冻干燥步骤之后被再水合。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的方法，其中所述孵育剂包括一种或多种选自磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐及其两种或更多种的组合的盐。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法，其中所述孵育剂包括载体蛋白。

34.根据权利要求1至33中任一项所述的方法，其中所述缓冲液包括HEPES、碳酸氢钠($NaHCO_3$)或其组合。

35.根据权利要求1至34中任一项所述的方法，其中所述组合物包含一种或多种糖。

36.根据权利要求35所述的方法，其中所述一种或多种糖包括海藻糖。

37.根据权利要求35或权利要求36所述的方法，其中所述一种或多种糖包括聚蔗糖。

38.根据权利要求35至37中任一项所述的方法，其中所述一种或多种糖包括右旋糖。

39.根据权利要求1至38中任一项所述的方法，其中所述组合物包含有机溶剂。

40.根据权利要求1至39中任一项所述的方法，其中所述血小板或血小板衍生物包括血

栓小体(thrombosome)。

作为抗血小板剂逆转剂的血栓小体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年8月16日提交的美国临时申请序列号62/887,923和2020年8月13日提交的美国临时申请序列号63/065,337的优先权,这些申请各自通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开用于描述血栓小体(thrombosome)作为用于药物诱导的凝血病的治疗的用途。使用诸如阿司匹林或氯吡格雷(clopidogrel)的抗血小板药物可能导致出血可能性增加。在本文中,我们证明血栓小体可以规避或克服这种抑制,以恢复止血。

背景技术

[0004] 抗血小板药物(本文也被称为抗血小板剂)在美国成年人群中很常见,并且采用多种抑制血小板的作用的机制。抗血小板药物用于治疗和/或预防多种脑血管和心血管疾病。

[0005] 然而,抗血小板药物是许多药物相关不良事件(ADE)的原因。与这些药物相关的用药过量和不良事件会在患者群体中带来严重出血和相关并发症的风险。此外,用抗血小板药物治疗的受试者还面临手术并发症,因为受试者可能需要在手术前逐渐停用药物,尽管停止疗法可能会使受试者处于心脏病发作、中风或死亡的增加的风险。

[0006] 因此,在本领域中需要治疗凝血病,诸如抗血小板剂诱导的凝血病,以及需要为服用抗血小板药物的受试者做好手术准备的解决方案。

发明内容

[0007] 在一些实施例中,本文提供了一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括血小板或血小板衍生物和孵育剂(incubating agent),所述孵育剂包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0008] 在一些实施例中,本文提供了一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0009] 在一些实施例中,本文提供了一种在受试者中恢复正常止血的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0010] 在一些实施例中,本文提供了一种在受试者中恢复正常止血的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0011] 在一些实施例中，本文提供了一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包括血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。实施方式可以包括以下特征中的一个或多个。手术可以是紧急手术。手术可以是预约手术。

[0012] 在一些实施例中，本文提供了一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。实施方式可以包括以下特征中的一个或多个。手术可以是紧急手术。手术可以是预约手术。

[0013] 在上述方法的一些实施例中，受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗。在一些实施例中，可以停止用抗血小板剂的治疗。在一些实施例中，可以继续用抗血小板剂的治疗。

[0014] 在一些实施例中，本文提供了一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包括血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0015] 在一些实施例中，本文提供了一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0016] 在一些实施例中，抗血小板剂的作用可以是抗血小板剂的过剂量的结果。

[0017] 在一些实施例中，抗血小板剂可以选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷(prasugrel)、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗和补充剂组成的群组。

[0018] 本文的任何方法的一些实施例可以包括以下特征中的一个或多个。施用可以包括局部施用。施用可以包括肠胃外施用。施用可以包括静脉内施用。施用可以包括肌内施用。施用可以包括鞘内施用。施用可以包括皮下施用。施用可以包括腹膜内施用。所述组合物可以在施用步骤之前被干燥。所述组合物可以在干燥步骤后被再水合。所述组合物可以在施用步骤之前被冷冻干燥。所述组合物可以在冷冻干燥步骤后被再水合。孵育剂可以包括一种或多种选自磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐及其两种或更多种的组合的盐。孵育剂可以包括载体蛋白。缓冲液可以包括HEPES、碳酸氢钠($NaHCO_3$)或其组合。所述组合物可以包含一种或多种糖。一种或多种糖可以包括海藻糖。一种或多种糖可以包括多糖。一种或多种糖可以包括葡萄糖。所述组合物可以包括有机溶剂。血小板或血小板衍生物可以包括血栓小体。

附图说明

[0019] 图1示出了在富含血小板的血浆中，在有和没有增加浓度的坎格雷洛的情况下由10μM二磷酸腺苷(ADP)活化诱导的坎格雷洛(“Cang”)的透射光聚集测定，其被表示为综合聚集曲线。

[0020] 图2示出了使用T-TAS®技术，坎格雷洛、ADP或其组合对血小板闭塞的影响。

[0021] 图3是来自图2的数据集的曲线下面积(AUC)的条形图。来自图2的重复数据集作为

平均值呈现。

[0022] 图4是来自图2的数据集的闭塞时间的条形图。来自图2的重复数据集以平均值呈现。

[0023] 图5示出了使用T-TAS®技术，在再水合后60、90或115分钟，在ADP和坎格雷洛的存在和不存在的情况下，补充到富含血小板的血浆中的血栓小体(“thromb”;300,000/μL)对血小板闭塞的影响。

[0024] 图6是来自图5的数据集的AUC的条形图。来自图5的重复数据集被显示为平均值。

[0025] 图7是来自图5的数据集的闭塞时间的条形图。来自图5的重复数据集被显示为平均值。

[0026] 图8是来自用胶原蛋白(10μg/mL)和各种浓度的依替巴肽(“Epti”)处理的血小板(浓度为250,000个血小板/μL)的聚集实验的AUC的条形图。

[0027] 图9示出了使用T-TAS®技术，不同浓度的依替巴肽对全血的影响。

[0028] 图10示出了使用T-TAS®技术在有和没有不同浓度的依替巴肽的情况下血栓小体(“Tsomes”)补充(大约200,000/μL)对全血的影响。

[0029] 图11是来自图10的数据集的闭塞时间的条形图。

[0030] 图12是来自图10的数据集的AUC的条形图。

[0031] 图13显示，在贫血小板血浆(PPP)中存在依替巴肽时，血栓小体(不同批次)产生闭塞。

[0032] 图14是来自图13的数据集的AUC的条形图。来自图13的复制数据集被显示为平均值。

[0033] 图15是来自图13的数据集的闭塞时间的条形图。来自图13的复制数据集被显示为平均值。

[0034] 图16是来自用含有和不含不同浓度的阿司匹林(“ASA”)的胶原蛋白(10μg/mL)或花生四烯酸(“AA”;500μg/mL)处理的血小板的聚集实验的AUC的条形图。

[0035] 图17是全血、用各种浓度的阿司匹林(ASA)处理的全血和用各种浓度的阿司匹林处理并补充有血栓小体(约200,000-400,000μL)的全血的闭塞时间的条形图，如通过使用T-TAS®技术在剪切下对胶原涂覆的塑料的响应所测量的。

[0036] 图18示出了在存在ASA(200微摩尔)、坎格雷洛(1微摩尔)、AP2 6F1(40微克)时，由全血中的血栓小体促进的血栓形成的恢复，如在涂覆有促凝血酶原激酶和胶原的T-TAS AR芯片上通过闭塞时间测量的。

[0037] 图19示出了在存在ASA(200微摩尔)、坎格雷洛(1微摩尔)和6F1(40微克/mL)时，由全血中的血栓小体促进的血栓形成的恢复情况，如通过随时间变化的闭塞(压力)所测量的。

[0038] 图20示出了在高剪切下，向阿司匹林-(ASA-)抑制的全血(500微摩尔)中补充血栓小体对与塑料固定的猪胶原蛋白相互作用的影响，如通过AUC测量的。

[0039] 图21示出了在高剪切下，向阿司匹林-(ASA-)抑制的全血(500微摩尔)中补充血栓小体对与塑料固定的猪胶原蛋白相互作用的影响，如通过随时间变化的闭塞(压力)所测量的。

[0040] 图22示出了在高剪切下，向阿司匹林-(ASA-)抑制的全血(100微摩尔)中补充血栓

小体对与塑料固定的猪胶原蛋白相互作用的影响，如通过AUC测量的。

[0041] 图23示出了在高剪切下，向阿司匹林-(ASA-)抑制的全血(100微摩尔)中补充血栓小体对与塑料固定的猪胶原相互作用的影响，如通过随时间变化的闭塞(压力)所测量的。

[0042] 图24示出了向正常和阿司匹林抑制的血浆中补充血栓小体对峰值凝血酶的影响。

[0043] 图25A示出了使用T-TAS®技术，单独的坎格雷洛或坎格雷洛加上血栓小体对血小板闭塞的影响。

[0044] 图25B是来自图25A的数据集的闭塞时间的条形图。

[0045] 图26A示出了使用T-TAS®技术，单独的替罗非班，或替罗非班与随机供体血小板(RDP)或血栓小体一起对血小板闭塞的影响。

[0046] 图26B是来自图26A的数据集的闭塞时间的条形图。

[0047] 图27A示出了使用T-TAS®技术，单独的依替巴肽，或依替巴肽与RDP或血栓小体一起对血小板闭塞的影响。

[0048] 图27B是来自图27A的数据集的闭塞时间的条形图。

[0049] 图28A示出了使用T-TAS®技术，单独的AP2，或AP2与RDP或血栓小体一起对血小板闭塞的影响。

[0050] 图28B是来自图28A的数据集的闭塞时间的条形图。

[0051] 图29A示出了使用T-TAS®技术，血栓小体对从接受阿司匹林疗法的受试者获取的PRP的影响。

[0052] 图29B是来自图29A的数据集的闭塞时间的条形图。

[0053] 图30A示出了取自接受阿司匹林疗法的受试者的PRP的血栓小体对凝血酶生成的影响。

[0054] 图30B是取自接受阿司匹林疗法的受试者(在有或没有添加血栓小体的情况下)的PRP的凝血酶生成参数的条形图。

[0055] 图31A示出了取自接受布洛芬疗法的受试者的PRP的聚集测定，其中添加了缓冲液、花生四烯酸或胶原蛋白。

[0056] 图31B示出了ADP对取自接受布洛芬疗法(含或不含血栓小体)的受试者的PRP的影响。

[0057] 图32示出了给药血栓小体对用超药理剂量的氯吡格雷治疗的小鼠的出血时间的影响。

具体实施方式

[0058] 在详细地描述本发明的实施例之前，应当理解，本文使用的术语仅仅是用于描述特定的实施例的目的，而不是旨在进行限制。除非另有定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与该术语所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管在本发明的实践中可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料，但是现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物都通过引用并入本文，以公开和描述与引用这些出版物相关的方法和/或材料。本公开在其与任何并入的出版物相冲突的程度上受到控制。

[0059] 如本文和所附权利要求书中所使用的，单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述

(the)”包括复数指代物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一种糖”包括提及一种或多种糖及其本领域技术人员已知的等同物。此外,可以使用等同术语描述的术语的使用包括这些等同术语的使用。因此,例如,术语“受试者”的使用应被理解为包括术语“患者”、“人”、“动物”、“人类”以及本领域中用于表示接受医学治疗的人的其他术语。使用多个术语来包含单个概念不应被解释为将该概念仅限于所使用的那些术语。

[0060] 应当理解,本文使用的术语仅仅是用于描述特定的实施例的目的,而不是旨在进行限制。此外,在公开值的范围的情况下,本领域技术人员将理解,所公开的范围内的所有其他特定值固有地由这些值和它们所代表的范围公开,而不需要在本文中公开每个特定值或范围。例如,公开的1-10的范围包括1-9、1-5、2-10、3.1-6、1、2、3、4、5等。此外,每个公开的范围包括范围的低值低多达5%和范围的高值高多达5%。例如,公开的4-10的范围包括3.8-10.5。这一概念在本文件中被术语“约”所捕捉。

[0061] 如本文和所附权利要求中所使用的,术语“血小板”可以包括全血小板、碎片化的血小板、血小板衍生物或血栓小体。上述定义内的“血小板”可以包括,例如,全血中的血小板、血浆中的血小板、任选地补充有选择的血浆蛋白的缓冲液中的血小板、冷储存的血小板、干燥的血小板、低温冷藏的血小板、解冻的低温冷藏的血小板、再水合的干燥的血小板、再水合的低温冷藏的血小板、冷冻保存的血小板、解冻的冷冻保存的血小板或再水合的冷冻保存的血小板。“血小板”可以是哺乳动物的“血小板”,诸如人类的“血小板”,或诸如非人的哺乳动物的“血小板”。

[0062] 如本文所使用的,“血栓小体”(本文中有时也被称为“Tsomes”或“Ts”,特别是在示例和附图中)是已经用孵育剂(例如本文所述的任何孵育剂)处理并冷冻保存(诸如冻干)的血小板衍生物。在一些情况下,可以从汇集的血小板制备血栓小体。在环境温度下,血栓小体在干燥形式下可以具有2-3年的保存期,并且可以在数分钟内用无菌水再水合,以用于立即输注。血栓小体的一个示例是THROMBOSOMES®,其正处于治疗血小板减少患者的急性出血的临床试验中。通常,抑制因子IIa、VIIa、IX、Xa、XI、组织因子或维生素K依赖性凝血因子(例如,因子II、VII、IX或X)合成或激活抗凝血酶(例如抗凝血酶III)的药剂被视为抗凝血剂。抗凝剂的其他作用机制是已知的。抗凝剂包括达比加群、阿加曲班、水蛭素、利伐沙班、阿哌沙班、依度沙班、磺达肝癸钠(fondaparinux)、华法林、肝素和低分子量肝素。

[0063] 如本文所使用的,“抗血小板剂”是抗血栓形成剂,并且不包括抗凝剂。抗血小板剂的示例包括阿司匹林(也被称为乙酰水杨酸或ASA)、坎格雷洛(例如,KENGREAL®)、替卡格雷(例如,BRILINTA®)、氯吡格雷(例如,PLAVIX®)、普拉格雷(例如,EFFIENT®)、依替巴肽(例如,INTEGRILIN®)、替罗非班(例如,AGGRASTAT®)和阿昔单抗(例如,REOPRO®)。出于本公开的目的,抗血小板剂包括抑制P2Y受体(例如$P2Y_{12}$)、糖蛋白IIb/IIIa或拮抗血栓烷(thromboxane)合酶或血栓烷受体的药剂。血栓烷A_2拮抗剂的非限制性示例为阿司匹林、特鲁曲班(terutroban)和匹考他胺(picotamide)。P2Y受体拮抗剂的非限制性示例包括坎格雷洛、替卡格雷、依利格雷、氯吡格雷、普拉格雷和噻氯匹定(ticlopidine)。糖蛋白IIb/IIIa的非限制性示例包括阿昔单抗、依替巴肽和替罗非班。出于本公开的目的,NSAIDS(如布洛芬)也被视为抗血小板剂。抗血小板剂的其他机制是已知的。抗血小板剂还包括PAR1拮抗剂、PAR4拮抗剂GPVI拮抗剂和α2β1胶原受体拮抗剂。PAR-1拮抗剂的非限制性示例包括沃拉帕沙(vorapaxar)和阿托帕沙(atopaxar)。如本文所使用

的,阿司匹林被认为是抗血小板剂,但不是抗凝剂。抗血小板剂的另外的非限制性示例包括西洛他唑、前列腺素E1、依前列醇、双嘧达莫、曲前列素钠和沙格雷酯(sarpogrelate)。

[0064] 在一些实施例中,抗血小板剂可以选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗及其组合组成的群组。在一些实施例中,抗血小板剂可以选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特鲁曲班、匹考他胺、依利格雷、噻氯匹定、布洛芬、沃拉帕沙、阿托帕沙及其组合组成的群组。在一些实施例中,抗血小板剂可以选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特鲁曲班、匹考他胺、依利格雷、噻氯匹定、布洛芬、沃拉帕沙、阿托帕沙、西洛他唑、前列腺素E1、依前列醇、双嘧达莫、曲前列素钠、沙格雷酯及其组合组成的群组。在一些实施例中,抗血小板剂可以包括多种抗血小板剂,诸如本文所述的任何抗血小板剂中的2种(或更多种)。在一些实施例中,抗血小板剂可以是阿司匹林和氯吡格雷。

[0065] 与氯吡格雷、替卡格雷和普拉格雷一样,坎格雷洛可阻断血小板上的$P2Y_{12}$(ADP)受体。在一些情况下,可以使用坎格雷洛作为此类药物的代表。与氯吡格雷和普拉格雷不同,坎格雷洛不需要肝脏代谢来变成生物学上活性的。

[0066] 依替巴肽是一种肽治疗药,其阻断血小板上GPIIb-IIIa受体的纤维蛋白结合作用。该药物通常以180μg/kg推注通过IV施用,随后是2μg/kg/分钟连续输注施用。依替巴肽的血液浓度通常为约1-2μM。出血时间通常在停药后约1小时内恢复正常。

[0067] 阿司匹林是一种不可逆的环氧化酶(COX)抑制剂。血小板中的COX酶负责血栓烷A2、前列腺素E2和前列环素(PGI2)的合成。阿司匹林会使血小板中的COX酶永久失活,并且由于血小板不具有合成新酶的核材料,因此必须产生新的血小板以克服阿司匹林效应。在没有血栓烷A2、前列腺素E2和前列环素(PGI2)的情况下,血小板的促聚集活性会受到限制。许多人维持低剂量的阿司匹林,以防止不期望的凝血事件。阿司匹林的生物利用度在很大程度上会随施用途径而变化,其中单次500mg剂量IV的峰值为500μM,而相同剂量的口服剂量的峰值为44μM。

[0068] 抗血小板类药物被广泛用于预防导致心力衰竭、中风等的不期望的凝血发作。在许多情况下,可能需要逆转或停用抗血小板药物。在提前通知的情况下,如在预先计划的手术情况下,有时可以在手术前停止抗血小板药物剂量,以防止手术期间不期望的出血。在抗血小板剂需要快速逆转的情况下,逆转剂通常不容易获得、昂贵或对患者来说具有重大风险。在需要快速抗血小板逆转的情况下,通常施用血小板输注,尽管对此的应答通常只是部分逆转。这种逆转过程的限制性在于,新输注的血小板本身易受循环药物抗血小板活性的影响,而在一些实施例中,如本文所述的组合物(例如,包括血栓小体)不受此影响。在一些实施例中,如本文所述的组合物(例如,包括血栓小体)是活性逆转剂。在一些实施例中,如本文所述的组合物(例如,包括血栓小体)的止血活性不屈服于抗血小板药物。

[0069] 下面描述了一些示例性的抗血小板剂和潜在的逆转方法。

[0070] 乙酰水杨酸(ASA;阿司匹林)-阿司匹林在血小板中充当COX-1阻断剂,其通过不可逆地抑制血小板衍生的血栓烷形成而使血小板失活。临床上,阿司匹林有时会在紧急情况下通过血小板输注或在未来计划手术的情况下通过停止治疗而被逆转。

[0071] 氯吡格雷(例如,PLAVIX®)-氯吡格雷用于防止ADP与其血小板上的受体结合。

ADP结合导致血小板形态改变和聚集。氯吡格雷是不可逆的。临床上，氯吡格雷有时会在紧急情况下通过血小板输注或在未来计划手术的情况下通过停止治疗而被逆转。

[0072] 坎格雷洛(例如，KENGREAL®)-坎格雷洛用于防止ADP与其血小板上的受体结合。ADP结合导致血小板形态改变和聚集。氯吡格雷是可逆的，并且在停止输注约1小时后血小板功能被恢复。临床上，当手术后需要逆转时，它通常是优选的。

[0073] 替卡格雷(例如，BRILINTA®)-替卡格雷用于防止ADP与其受体结合，并且充当可逆激动剂。替卡格雷可逆转，并且在末次给药大约72小时后血小板功能可以恢复。替卡格雷的作用的逆转可能受末次给药后时间的影响。如果最后一次给药时间长于之前的24小时，则血小板输注有时可以是治疗性的，以逆转结果。

[0074] 普拉格雷(例如，PRASUGREL®)-普拉格雷用于防止ADP与其受体结合，并且充当不可逆拮抗剂。它是一种不可逆的拮抗剂，必须形成新的血小板才能克服它的作用。临床上，普拉格雷在紧急情况下通过血小板输注或在未来计划进行手术的情况下通过停止治疗而被逆转。

[0075] 依替巴肽(埃替非巴肽(Integrilin))-依替巴肽用于阻断GpIIb/IIIa，并且充当可逆拮抗剂。临床上，埃替非巴肽在紧急情况下通过血小板输注或在未来计划手术的情况下通过停止治疗而被逆转。

[0076] 血小板输注目前被用作抗血小板药物的治疗方法，但血小板输注仅用于稀释这些药物的作用。在一些实施例中，血栓小体对这些药物不具有反应性，并且维持其辅助凝血的能力。这使得通过血栓小体的治疗变得完全独特，并且为产品引入新的应用。

[0077] 血小板衍生的产品目前未被用作抗凝血/抗血小板药物的治疗方法，并且目前也没有经批准的用于抗血小板剂的逆转剂。因此，紧急治疗(术前、外伤等)通常是避免或减轻出血的全面预防措施。非限制性的示例包括输注血浆、红细胞和抗纤溶药。血小板衍生物(例如，冷冻储存的血小板(例如，血栓小体))可能是这些常规治疗的有效替代物或补充剂。

[0078] 不受任何特定理论的限制，据信血栓小体可以至少部分地通过提供促凝血剂的带负电荷的表面来工作，以增加凝血酶生成高于和超过抗凝血剂所抑制的凝血酶生成。类似地，不受任何特定理论的限制，据信血栓小体可以至少部分地通过结合至循环血小板并与循环血小板共聚集而发挥作用。

[0079] 本文描述了用于控制出血和改善愈合的产品和方法。本文所述的产品和方法也可以用于对抗抗血小板剂(例如阿司匹林(也被称为乙酰水杨酸或ASA)、坎格雷洛(例如KENGREAL®)、替卡格雷(例如BRILINTA®)、氯吡格雷(例如PLAVIX®)、普拉格雷(例如EFFIENT®)、依替巴肽(例如INTEGRILIN®)、替罗非班(例如AGGRASTAT®)或阿昔单抗(例如REOPRO®))的活性。本文所述的产品和方法针对可以有助于伤口的闭合和愈合的实施例。

[0080] 在某些实施例中，包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物的组合物可以被递送至患者的表面上或患者内部的伤口。在各种实施例中，包含血小板例诸如冻干的血小板或血小板衍生物的组合物可以以选择的形式施用，包括但不限于粘合绷带、压迫绷带、液体溶液、气溶胶、基质组合物和涂覆的缝合线或其它医用封闭物。在实施例中，可以将包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物的组合物施用至患者的表面上的全部或仅一部

分受影响的区域。在其它实施例中，包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物的组合物可以例如通过血流全身性施用。在实施例中，施用血小板衍生物可以产生2或3天，优选地5至10天，或最优选地最多14天的止血效果。

[0081] 一些实施例提供了一种治疗受试者的凝血病的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂(也被称为冻干剂)和任选地有机溶剂。

[0082] 一些实施例提供了一种治疗受试者的凝血病的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包括一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0083] 在本文所述的任何方法的一些实施例中，凝血病是抗血小板剂的结果。

[0084] 一些实施例提供了一种治疗受试者的凝血病的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0085] 一些实施例提供了一种治疗受试者的凝血病的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0086] 一些实施例提供了一种在受试者中恢复正常止血的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0087] 一些实施例提供了一种在受试者中恢复正常止血的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育的方法制备。

[0088] 一些实施例提供了在受试者中恢复正常止血的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0089] 一些实施例提供了一种在受试者中恢复正常止血的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0090] 在一些情况下，也可以施用如本文所述的组合物以使受试者做好手术准备。对于一些服用抗血小板剂的患者，在手术前减少抗血小板剂的剂量可能是困难的或不可能的(例如，在外伤或其他紧急手术的情况下)。对于一些服用抗血小板剂的患者，术前减少抗血小板剂的剂量可能是不可取的(例如，如果随着时间的推移减少抗血小板剂的剂量，患者将有血栓形成事件(例如，深静脉血栓形成、肺栓塞或中风)的风险)。

[0091] 因此，一些实施例提供了一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需

要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐的、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0092] 一些实施例提供了一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0093] 一些实施例提供了一种使受试者做好手术准备的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0094] 一些实施例提供了一种使受试者做好手术准备的方法，其中所述受试者已经用抗血小板剂治疗或正在用抗血小板剂治疗，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0095] 在一些示例中，手术可以是紧急手术(例如，在外伤的情况下)或预定手术。

[0096] 在一些实施例中，可以停止用抗凝剂的治疗(例如，为手术做准备)。在一些实施例中，可以继续用抗凝剂的治疗。

[0097] 一些实施例提供了一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0098] 一些实施例提供了一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0099] 在一些情况下，由于抗血小板剂的不正确的剂量，可能需要改善抗血小板剂的作用。例如，在一些实施例中，抗血小板剂的作用可以在抗血小板剂的过剂量后被改善。在一些情况下，由于可能与另一种药物(例如，第二种抗血小板剂)相互作用，可能需要改善抗血小板剂的作用。例如，在一些实施例中，抗血小板剂的作用可以在两种或更多种药物(其中至少一种是抗血小板剂)的错误给药之后被改善。

[0100] 在本文所述的任何方法的一些实施例中，组合物可以进一步包含活性剂，诸如纤维蛋白溶解剂。抗纤维蛋白溶解剂的非限制性示例包括ε-氨基己酸(EACA)、氨甲环酸(tranexamic acid)、抑肽酶、氨基甲基苯甲酸和纤维蛋白原。在一些实施例中，血小板或血小板衍生物可以加载有活性剂，诸如抗纤维蛋白溶解剂。

[0101] 可以在本文所述方法期间的任何适当时间评估血液(例如，受试者的血液)的凝血参数。例如，可以在施用如本文所述的包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物的组合物之前评估血液的一个或多个凝血参数，例如，以便确定施用如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物的需要。作为另一个示例，在施用如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物之后，可以评估血液的一个或多个凝血参数，例如，以便确定施用的组

合物的有效性，确定是否需要额外施用所述组合物，或确定进行手术程序是否安全。

[0102] 因此，本文所述的任何方法可以包括在施用如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物之前评估血液的一个或多个凝血参数、在施用如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物之后评估血液的一个或多个凝血参数或两者的步骤。

[0103] 任何适当的方法均可以用于评估血液的凝血参数。方法的非限制性示例包括凝血酶原时间测定、国际标准化比率(INR)、凝血酶生成(TGA;其可以用于产生参数，诸如例如，峰值凝血酶、内源性凝血酶电位(ETP)和滞后时间)、血栓前动脉造影术(TEG)、活化凝血时间(ACT)和部分促凝血酶原激酶时间(PTT或aPTT)。

[0104] 凝血酶生成

[0105] 凝血酶生成测定法通过促凝剂测量样品活化后凝血酶的产生，促凝剂导致凝血酶酶促切割荧光肽并释放荧光分子。峰值凝血酶是对产生的最大凝血酶、滞后时间(开始产生凝血酶的时间)和ETP(可能产生的总凝血酶)的度量。

[0106] 在一些实施例中，在施用如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物之前，患者可以具有约60nM至约170nM，诸如约65nM至约170nM，诸如约65nM至约120nM，诸如约80nM的峰值凝血酶。

[0107] TEG通过血块强度随时间的变化图来评估内在止血作用。氯化钙($CaCl_2$)通常用作引发试剂。TEG波形(参见，例如，图16)具有多个可以提供关于凝血的信息的参数。

[0108] R-时间＝反应时间-从测试开始到初始纤维蛋白形成的潜伏期时间。

[0109] K＝动力学-初始纤维蛋白形成的速度，达到一定水平的凝块强度(例如，20mm的幅度)所用的时间

[0110] α角＝R与K之间直线的斜率-测量凝块形成的速率。

[0111] MA＝最大振幅(mm)-表示纤维蛋白凝块的极限强度。

[0112] A_{30}＝达到最大振幅后30分钟的振幅-表示溶解期的速率。

[0113] 在低凝血液状态下，R-时间增加，并且MA减少。R-时间通常比MA提供更宽的响应范围。

[0114] 在总血栓形成分析系统(T-TAS®，FUJIMORI KOGYO CO.,LTD)中，使用矿物油迫使样品通过胶原包被的微通道。压力的变化用于评估血栓形成。闭塞开始时间是达到10kPa所需的时间，并且闭塞时间＝使用AR芯片(例如，Zacros项目编号，TC0101)达到每个Δ80kPa所需的时间。根据制造商，AR芯片可以用于分析主要由纤维蛋白和活化血小板组成的混合白色血栓的形成。它具有涂覆有胶原蛋白和组织因子的流动通道(300μm宽×50μm高)并且可以用于分析凝血功能和血小板功能。相比之下，PL芯片可以用于分析主要由活化血小板组成的血小板血栓的形成。PL芯片只具有涂覆有胶原蛋白的流动通道，并且可以用于分析血小板功能。

[0115] ACT测定是测量凝血时间(t_{ACT})的最基本但也可能是最可靠的方法，凝血时间由磁体在其周围形成凝块时对重力的阻力决定。典型的供体血液具有仅使用$CaCl_2$的t_{ACT}～200-300秒。

[0116] 一些实施例提供了一种增加受试者的凝血酶生成的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0117] 一些实施例提供了一种增加受试者的凝血酶生成的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0118] 一些实施例提供了一种增加受试者的峰值凝血酶的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0119] 一些实施例提供了一种增加受试者的峰值凝血酶的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0120] 在一些实施例中，在施用前，受试者的峰值凝血酶低于66nM(例如，低于64nM、62nM、60nM、55nM、50nM、45nM、40nM、35nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM或5nM)。在一些实施例中，在施用后，受试者的峰值凝血酶高于66nM(例如，高于68nM、70nM、75nM、80nM、85nM、90nM、95nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM或150nM)。在一些实施例中，在施用后，受试者的峰值凝血酶在66nM与166nM之间。可以通过任何合适的方法来测定峰值凝血酶。

[0121] 如本文所使用的“有效量”是包含有效地治疗受试者的一定量的血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)的组合物的量。此类量的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)包括可以施用于受试者的如本文所述的包含血小板或血小板衍生物的组合物的任何合适剂量。例如，在一些实施例中，包含血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)的组合物的剂量可以包括约1.0×10^{7}个颗粒至约1.0×10^{10}个颗粒，诸如约1.6×10^{7}个颗粒(例如，血栓小体)/kg至约1.0×10^{10}个颗粒/kg(例如，约1.6×10^{7}至约5.1×10^{9}个颗粒/kg、约1.6×10^{7}至约3.0×10^{9}个颗粒/kg、约1.6×10^{7}至约1.0×10^{9}个颗粒/kg、约1.6×10^{7}至约5.0×10^{8}个颗粒/kg、约1.6×10^{7}至约1.0×10^{8}个颗粒/kg、约1.6×10^{7}至约5.0×10^{7}个颗粒/kg、约5.0×10^{7}至约1.0×10^{8}个颗粒/kg、约1.0×10^{8}至约5.0×10^{8}个颗粒/kg、约5.0×10^{8}至约1.0×10^{9}个颗粒/kg、约1.0×10^{9}至约5.0×10^{9}个颗粒/kg或约5.0×10^{9}至约1.0×10^{10}个颗粒/kg)。

[0122] 在本文方法的一些实施例中，局部施用所述组合物。在一些实施例中，局部施用可以包括通过溶液、乳膏、凝胶、悬浮液、油灰、颗粒或粉末施用。在一些实施例中，局部施用可以包括通过绷带(例如，粘性绷带或压迫性绷带)或医学封闭物(例如，缝线、钉)施用；例如，血小板衍生物(例如，冷冻保存的血小板(例如，血栓小体))可以被包埋于其中或包被在其上)，如对应于美国专利申请序列号15/776,255的PCT公开号WO2017/040238(例如，段落[013]-[069])中所述，其全部内容通过引用并入本文。

[0123] 在本文方法的一些实施例中，组合物被肠胃外施用。

[0124] 在本文方法的一些实施例中，组合物被静脉内施用。

[0125] 在本文方法的一些实施例中，组合物被肌内施用。

[0126] 在本文方法的一些实施例中，组合物被鞘内施用。

[0127] 在本文方法的一些实施例中，组合物被皮下施用。

[0128] 在本文方法的一些实施例中，组合物被腹膜内施用。

[0129] 在本文方法的一些实施例中，组合物在施用步骤之前被干燥。在所述方法的一些实施例中，组合物在施用步骤之前被冷冻干燥。在所述方法的一些实施例中，在干燥或冷冻

干燥步骤后,组合物被再水合。

[0130] 在一些实施例中,抗血小板剂选自由阿司匹林(也被称为乙酰水杨酸或ASA);P2Y12抑制剂诸如坎格雷洛(例如KENGREAL®)、替卡格雷(例如BRILINTA®)、氯吡格雷(例如PLAVIX®)或普拉格雷(例如EFFIENT®);糖蛋白IIb/IIIa抑制剂,诸如依替巴肽(例如INTEGRILIN®)、替罗非班(例如AGGRASTAT®)或阿昔单抗(例如REOPRO®));补充剂,诸如草药补充剂;或者它们的任意组合组成的群组。补充剂的示例包括生姜、人参、银杏、绿茶、卡瓦胡椒(kava)、锯棕榈(saw palmetto)、波耳多叶(Peumus boldus)、丹参(Salvia miltiorrhiza)、当归(Angelica sinensis)木瓜(papaya)(Carica papaya)、鱼油和维生素E。草药补充剂的示例包括生姜、人参和银杏。

[0131] 在一些实施例中,抗血小板剂是阿司匹林。

[0132] 在一些实施例中,抗血小板剂是坎格雷洛(例如KENGREAL®)。

[0133] 在一些实施例中,抗血小板剂是替卡格雷(例如BRILINTA®)。

[0134] 在一些实施例中,抗血小板剂是氯吡格雷(例如PLAVIX®)。

[0135] 在一些实施例中,抗血小板剂是普拉格雷(例如EFFIENT®)。

[0136] 在一些实施例中,抗血小板剂是依替巴肽(例如INTEGRILIN®)。

[0137] 在一些实施例中,抗血小板剂是替罗非班(例如AGGRASTAT®)。

[0138] 在一些实施例中,抗血小板剂是阿昔单抗(例如REOPRO®)。

[0139] 在一些实施例中,抗血小板剂是特鲁曲班。

[0140] 在一些实施例中,抗血小板剂是匹考他胺。

[0141] 在一些实施例中,抗血小板剂是依利格雷。

[0142] 在一些实施例中,抗血小板剂是噻氯匹定。

[0143] 在一些实施例中,抗血小板剂是布洛芬。

[0144] 在一些实施例中,抗血小板剂是沃拉帕沙。

[0145] 在一些实施例中,抗血小板剂是阿托帕沙。

[0146] 在一些实施例中,抗血小板药物是西洛他唑。

[0147] 在一些实施例中,抗血小板剂是前列腺素E1。

[0148] 在一些实施例中,抗血小板剂是依前列醇。

[0149] 在一些实施例中,抗血小板剂是双嘧达莫。

[0150] 在一些实施例中,抗血小板剂是曲前列素钠。

[0151] 在一些实施例中,抗血小板剂是沙格雷酯。

[0152] 在一些实施例中,抗血小板剂是补充剂。

[0153] 在一些实施例中,抗血小板剂是草药补充剂。

[0154] 在一些实施例中,再水合包含血小板或血小板衍生物的组合物包括向血小板中加入水性液体。在一些实施例中,水性液体是水。在一些实施例中,水性液体是水溶液(例如,缓冲液)。在一些示例中,水性液体是盐水溶液。在一些实施例中,水性液体是悬浮液。

[0155] 在一些实施例中,再水合的血小板或血小板衍生物(例如,血栓小体)具有以40国际单位(IU)或更高显示与血液凝固相关的所有单独的因子(例如,因子VII、VIII和IX)的凝血因子水平。

[0156] 在一些实施例中，血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)具有小于约10％，诸如小于约8％，诸如小于约6％，诸如小于约4％，诸如小于约2％，诸如小于约0.5％的血小板膜通过膜上存在的蛋白质和/或脂质的交联。在一些实施例中，再水合的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)具有少于约10％，诸如少于约8％，诸如少于约6％，诸如少于约4％，诸如少于约2％，诸如少于约0.5％的血小板膜通过存在于膜上的蛋白质和/或脂质的交联。

[0157] 在一些实施例中，血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)具有至少约0.2μm(例如，至少约0.3μm、至少约0.4μm、至少约0.5μm、至少约0.6μm、至少约0.7μm、至少约0.8μm、至少约0.9μm、至少约1.0μm、至少约1.2μm、至少约1.5μm、至少约2.0μm、至少约2.5μm或至少约5.0μm)的粒径(例如直径、最大尺寸)。在一些实施例中，粒径小于约5.0μm(例如，小于约2.5μm、小于约2.0μm、小于约1.5μm、小于约1.0μm、小于约0.9μm、小于约0.8μm、小于约0.7μm、小于约0.6μm、小于约0.5μm、小于约0.4μm或小于约0.3μm)。在一些实施例中，粒径为约0.3μm至约5.0μm(例如，约0.4μm至约4.0μm、约0.5μm至约2.5μm、约0.6μm至约2.0μm、约0.7μm至约1.0μm、约0.5μm至约0.9μm或约0.6μm至约0.8μm)。

[0158] 在一些实施例中，至少50％(例如，至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％或至少约99％)的血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)具有在约0.3μm至约5.0μm的范围内(例如，约0.4μm至约4.0μm、约0.5μm至约2.5μm、约0.6μm至约2.0μm、约0.7μm至约1.0μm、约0.5μm至约0.9μm或约0.6μm至约0.8μm)的粒径。在一些实施例中，至多99％(例如，至多约95％、至多约80％、至多约75％、至多约70％、至多约65％、至多约60％、至多约55％或至多约50％)的血小板诸如冻干的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)在约0.3μm至约5.0μm的范围内(例如，约0.4μm至约4.0μm、约0.5μm至约2.5μm、约0.6μm至约2.0μm、约0.7μm至约1.0μm、约0.5μm至约0.9μm或约0.6μm至约0.8μm)。在一些实施例中，约50％至约99％(例如，约55％至约95％、约60％至约90％、约65％至约85％、约70％至约80％)的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)在约0.3μm至约5.0μm的范围内(例如，约0.4μm至约4.0μm、约0.5μm至约2.5μm、约0.6μm至约2.0μm、约0.7μm至约1.0μm、约0.5μm至约0.9μm或约0.6μm至约0.8μm)。

[0159] 在一些实施例中，在治疗受试者之前，例如在液体介质中分离血小板。

[0160] 在一些实施例中，血小板是供体来源的血小板。在一些实施例中，血小板通过包括单采步骤的工艺获得。在一些实施例中，血小板是汇集的血小板。

[0161] 在一些实施例中，从多个供体汇集血小板。此类从多个供体汇集的血小板在本文中也可以被称为汇集的血小板。在一些实施例中，供体多于5个，诸如多于10个，诸如多于20个，诸如多于50个，诸如至多约100个供体。在一些实施例中，供体为约5至约100，诸如约10至约50，诸如约20至约40，诸如约25至约35。汇集的血小板可以用于制备本文所述的任何组合物。

[0162] 在一些实施例中，血小板是体外衍生的。在一些实施例中，血小板是在培养物中衍生或制备的。在一些实施例中，制备血小板包括从巨核细胞的培养物衍生或生长血小板。在一些实施例中，制备血小板包括从人多能干细胞(PCS)(包括胚胎干细胞(ESC)和/或诱导多能干细胞(iPSC))的培养物衍生或生长血小板(或巨核细胞)。

[0163] 因此，在一些实施例中，如本文所述在治疗受试者之前制备血小板。在一些实施例中，将血小板冻干。在一些实施例中，将血小板低温冷藏保存。

[0164] 在一些实施例中，在用孵育剂孵育之前，可以将血小板或汇集的血小板酸化至约6.0至约7.4的pH。在一些实施例中，所述方法包括将血小板酸化至约6.5至约6.9的pH。在一些实施例中，所述方法包括将血小板酸化至约6.6至约6.8的pH。在一些实施例中，酸化包括向汇集的血小板中加入包含柠檬酸葡萄糖酸(ACD)的溶液。

[0165] 在一些实施例中，在用孵育剂孵育之前分离血小板。在一些实施例中，所述方法进一步包括通过使用离心来分离血小板。在一些实施例中，离心发生在约1000×g至约2000×g的相对离心力(RCF)。在一些实施例中，离心发生在约1300×g至约1800×g的相对离心力(RCF)。在一些实施例中，离心在约1500×g的相对离心力(RCF)。在一些实施例中，离心进行约1分钟至约60分钟。在一些实施例中，离心进行约10分钟至约30分钟。在一些实施例中，离心进行约30分钟。

[0166] 孵育剂可以包括任何合适的组分。在一些实施例中，孵育剂可以包含液体介质。在一些实施例中，孵育剂可以包含一种或多种盐，所述盐选自磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和可以在血液或血液产品中发现的、或已知可用于干燥血小板的任何其它盐，或这些中的两种或更多种的任何组合。

[0167] 在一些实施例中，孵育剂包括一种或多种盐，诸如磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和可以在血液或血液产品中发现的任何其它盐。示例性的盐包括氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)及其组合。在一些实施例中，孵育剂包括约0.5mM至约100mM的一种或多种盐。在一些实施例中，孵育剂包括约0.5mM至约100mM(例如，约0.5mM至约2mM、约2mM至约90mM、约2mM至约6mM、约50mM至约100mM、约60mM至约90mM、约70mM至约85mM)约的一种或多种盐。在一些实施例中，孵育剂包括约5mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM或约80mM的一种或多种盐。在一些实施例中，孵育剂包含浓度为约0.5mM至约2mM的一种或多种选自钙盐、镁盐和两者的组合的盐。

[0168] 优选地，这些盐以与在全血中发现的量大致相同的量存在于包含血小板或血小板衍生物诸如冻干的血小板的组合物中。

[0169] 在一些实施例中，孵育剂进一步包含载体蛋白。在一些实施例中，载体蛋白包括人血清白蛋白、牛血清白蛋白或其组合。在一些实施例中，载体蛋白以约0.05％至约1.0％(w/v)的量存在。

[0170] 孵育剂可以是对血小板无毒的任何缓冲液，并且在本文提供的工艺期间溶液将暴露的温度下为溶液提供足够的缓冲能力。因此，缓冲液可以包括任何市售的已知生物相容性缓冲液，诸如磷酸盐缓冲液，诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS)，碳酸氢盐/碳酸，诸如碳酸氢钠缓冲液，N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)，和基于tris的缓冲液，诸如tris缓冲盐水(TBS)。同样，它可以包含下列缓冲液中的一种或多种：丙烷-1,2,3-三羧酸(丙三羧酸)；苯五羧酸；马来酸；2,2-二甲基琥珀酸；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)；哌嗪-1,4-双-(2-乙磺酸)(PIPES)；N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙烷磺酸(ACES)；1,1-环己烷二乙酸；3,6-桥亚甲基-1,2,3,6-四氢邻苯二甲酸(EMTA；ENDCA)；咪唑；2-(氨乙基)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(β-甲基三丙羧酸);2-(N-吗啉代)丙烷-亚磺酸(MOPS);磷酸;和N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸(TES)。在一些实施例中,孵育剂包括一种或多种缓冲液,例如N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)或碳酸氢钠($NaHCO_3$)。在一些实施例中,孵育剂包括约5mM至约100mM的一种或多种缓冲液。在一些实施例中,孵育剂包括约5mM至约50mM(例如,约5mM至约40mM、约8mM至约30mM、约10mM至约25mM)的一种或多种缓冲液。在一些实施例中,孵育剂包括约10mM、约20mM、约25mM或约30mM的一种或多种缓冲液。

[0171] 在一些实施例中,孵育剂包括一种或多种糖,诸如单糖和二糖,包括蔗糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖、甘露糖、右旋糖和木糖。在一些实施例中,糖是单糖。在一些实施例中,糖是二糖。在一些实施例中,糖包括单糖、二糖或其组合。在一些实施例中,糖是非还原二糖。在一些实施例中,糖包括蔗糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖(例如右旋糖)、甘露糖或木糖。在一些实施例中,糖包括海藻糖。在一些实施例中,孵育剂包括淀粉。在一些实施例中,孵育剂包括聚蔗糖、蔗糖和表氯醇的聚合物。在一些实施例中,孵育剂包括约10mM至约1,000mM的一种或多种糖。在一些实施例中,孵育剂包括约50mM至约500mM的一种或多种糖。在一些实施例中,一种或多种糖以10mM10至500mM的量存在。在一些实施例中,一种或多种糖以50mM至200mM的量存在。在实施例中,一种或多种糖以100mM至150mM的量存在。在一些实施例中,一种或多种糖是冻干剂;例如,在一些实施例中,冻干剂包括海藻糖、多糖或其组合。

[0172] 在一些实施例中,包含血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)的组合物可以包含水或盐水溶液中的一种或多种。在一些实施例中,包含血小板或血小板衍生物诸如冻干的血小板的组合物可以包含DMSO。

[0173] 在一些实施例中,孵育剂包括有机溶剂,诸如醇(例如乙醇)。在这种孵育剂中,溶剂的量可以在0.1%至5.0%(v/v)的范围内。在一些实施例中,有机溶剂可以在约0.1%(v/v)至约5.0%(v/v),诸如约0.3%(v/v)至约3.0%(v/v)、或约0.5%(v/v)至约2%(v/v)的范围内。

[0174] 在一些实施例中,合适的有机溶剂包括但不限于醇、酯、酮、醚、卤化溶剂、烃、腈、二醇、烷基硝酸盐、水或其混合物。在一些实施例中,合适的有机溶剂包括但不限于甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、乙酸、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、异丙醚(IPE)、叔丁基甲基醚、二噁烷(例如1,4-二噁烷)、乙腈、丙腈、二氯甲烷、氯仿、甲苯、苯甲醚、环己烷、己烷、庚烷、乙二醇、硝基甲烷、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、二甲基乙酰胺及其组合。在一些实施例中,有机溶剂选自由乙醇、乙酸、丙酮、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜(DMSO)、二噁烷、甲醇、正丙醇、异丙醇、四氢呋喃(THF)、N-甲基吡咯烷酮、二甲基乙酰胺(DMAC)或其组合组成的群组。在一些实施例中,有机溶剂包括乙醇、DMSO或其组合。有机溶剂诸如乙醇的存在可以有益于血小板、血小板衍生物或血栓小体(例如冻干的血小板衍生物)的加工。

[0175] 在一些实施例中,在水性介质的存在下将孵育剂孵育到血小板中。在一些实施例中,在包含DMSO的培养基的存在下孵育所述孵育剂。

[0176] 在一些实施例中,一种或多种其它组分可以在血小板中孵育。示例性的组分可以包括前列腺素E1或前列环素和或EDTA/EGTA,以防止在孵育过程期间血小板的聚集和活化。

[0177] 在表1-5中显示了可以使用的孵育剂组合物的非限制性示例。

[0178] 表1

缓冲液	
组分	**浓度（mM，除非另有说明）**
NaCl	75.0
KCl	4.8
HEPES	9.5
$NaHCO_3$	12.0
右旋糖	3
海藻糖	100
乙醇（任选的）	1%（v/v）

[0179]

[0180] 表2

缓冲液 A	
组分	**浓度（mM，除非另有说明）**
$CaCl_2$	1.8
$MgCl_2$	1.1
KCl	2.7
NaCl	137
NaH_2PO_4	0.4
HEPES	10
D-葡萄糖	5.6
pH	6.5

[0181]

[0182] 表3

缓冲液 B	
组分	**浓度（mM，除非另有说明）**
缓冲剂和盐	表 4（下面）
BSA	0.35%
右旋糖	5
pH	7.4

[0183]

[0184] 表3.当孵育血小板时，可以使用缓冲液B，例如用于流式细胞术。此类孵育可以在室温下在黑暗中进行。白蛋白是缓冲液B的任选组分。

[0185] 表4

[0186]

缓冲液 B 中 HEPES 的浓度和盐的浓度	
组分	**浓度（mM，除非另有说明）**
HEPES	25
NaCl	119
KCl	5
$CaCl_2$	2
$MgCl_2$	2
葡萄糖	6 g/l

[0187] 表4是另一种示例性的孵育剂。使用NaOH可以将pH调节至7.4。白蛋白是缓冲液B的任选组分。

[0188] 表5.

[0189]

Tyrode 的 HEPES 缓冲液（加上 PGE1）	
组分	浓度（mM）
$CaCl_2$	1.8
$MgCl_2$	1.1
KCl	2.7
NaCl	137
NaH_2PO_4	0.4
HEPES	10
D-葡萄糖	5.6
pH	6.5
前列腺素 E1（PGE1）	1 μg/ml

[0190] 表5是另一种示例性的孵育剂。

[0191] 在一些实施例中，血小板(例如，单采血小板、从全血分离的血小板、汇集的血小板或其组合)与孵育剂在或在15-45℃或约37℃的不同温度下孵育不同的持续时间。

[0192] 在一些实施例中，血小板(例如，单采血小板、从全血分离的血小板、汇集的血小板或其组合)在包含浓度为10,000个血小板/μL至10,000,000个血小板/μL，诸如50,000个血小板/μL至2,000,000个血小板/μL，诸如100,000个血小板/μL至500,000个血小板/μL，诸如150,000个血小板/μL至300,000个血小板/μL，诸如200,000个血小板/μL的液体介质的孵育剂中形成悬浮液。

[0193] 血小板(例如，单采血小板、从全血分离的血小板、汇集的血小板或其组合)可以与孵育剂一起孵育不同的持续时间，诸如例如至少约5分钟(分钟)(例如，至少约20分钟、约30分钟、约1小时(hr)、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约12小时、约16小时、约20小时、约24小时、约30小时、约36小时、约42小时、约48小时或至少约48小时。在一些实施例中，血小板可以与孵育剂一起孵育不超过约48小时(例如，不超过约20分钟、约30分钟、约1小时(小时)、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约12小时、约16小时、约20小时、约24小时、约30小时、约36小时或不超过约42小时)。在一些实施例中，血小板可以与孵育剂一起孵育约10分钟至约48小时(例如，约20分钟至约36小时、约30分钟至约24小时、约1小时至约20小时、约2小时至约16小时、约10分钟至约24小时、约20分钟至约12小时、约30分钟至约10小

时或约1小时至约6小时。在一些实施例中，血小板、血小板衍生物或血栓小体与孵育剂一起孵育5分钟至48小时，诸如10分钟至24小时，诸如20分钟至12小时，诸如30分钟至6小时，诸如1小时分钟至3小时，诸如约2小时的时间段。

[0194] 在一些实施例中，将血小板(例如，单采血小板、从全血中分离的血小板、汇集的血小板或其组合)与孵育剂在不同的温度下孵育。在实施例中，孵育在37℃下进行。在某些实施例中，孵育在4℃至45℃，诸如15℃至42℃下进行。例如，在实施例中，孵育在35℃至40℃(例如37℃)下进行110至130(例如120)分钟，并持续长达24-48小时。在一些实施例中，血小板与孵育剂在如本文公开的不同持续时间内并且在15-45℃或约37℃的温度下孵育。

[0195] 在一些实施例中，血小板(例如，单采血小板、从全血分离的血小板、汇集的血小板或其组合)加载有一种或多种活性剂。在一些实施例中，血小板可以加载有抗纤维蛋白溶解剂。抗纤维蛋白溶解剂的非限制性示例包括ε-氨基己酸(EACA)、氨甲环酸、抑肽酶、氨基甲基苯甲酸和纤维蛋白原。

[0196] 使血小板(例如，单采血小板、从全血分离的血小板、汇集的血小板或其组合)加载有活性剂(例如抗纤维蛋白溶解剂)可以通过任何合适的方法进行。参见例如PCT公开号WO2020113090A1、WO2020113101A1、WO2020113035A1和WO2020112963A1。通常，加载包括使血小板与抗纤维蛋白溶解剂接触。在一些实施例中，可以通过将活性剂与孵育剂结合来进行加载。在一些实施例中，加载可以在与孵育步骤分离的步骤中进行。例如，可以在孵育步骤之前的步骤中进行加载。在一些这样的实施例中，活性剂可以作为本文所述的任何孵育剂中的溶液或悬浮液提供给血小板，所述溶液或悬浮液可以与在孵育步骤中使用的孵育剂相同或者可以不与在孵育步骤中使用的孵育剂相同。在一些实施例中，加载步骤可以在孵育步骤期间进行。在一些这样的实施例中，可以在孵育期间)将活性剂加入到孵育剂中(例如，作为固体或在溶液或悬浮液中)。在一些实施例中，加载步骤可以在孵育步骤之后的步骤中进行。在一些这样的实施例中，作为本文所述的任何孵育剂中的溶液或悬浮液提供给血小板，所述溶液或悬浮液可以与在孵育步骤中使用的孵育剂相同或者可以不与在孵育步骤中使用的孵育剂相同。

[0197] 活性剂可以以任何合适的浓度施加到血小板上。在一些实施例中，活性剂可以以约1μM至约100mM(例如约1μM至约10μm、约1μM至约50μM、约1μM至约100μM、约1μM至约500μM、约1μM至约1mM、约1μM至约10mM、约1μM至约25mM、约1μM至约50mM、约1μM至约75mM、约10μM至约100mM、约50μM至约100mM、约100μM至约100mM、约500μM至约100mM、约1mM至约100mM、约10mM至约100mM、约25mM至约100mM、约50mM至约100mM、约75mM至约100mM、约10μM至约100mM、约200μM至约1mM、约800μM至约900μM、约400μM至约800μM、约500μM至约700μM、约600μM、约5mM至约85mM、约20mM至约90mM、约25mM至约75mM、约30mM至约90mM、约35mM至约65mM、约40mM至约60mM、约50mM至约60mM、约40mM至约70mM、约45mM至约55mM或约50mM)的浓度被施加至血小板(例如，作为孵育剂或另一种溶液或悬浮液的一部分)。

[0198] 在一些实施例中，所述方法进一步包括干燥血小板。在一些实施例中，干燥步骤包括冻干血小板。在一些实施例中，干燥步骤包括冷冻干燥血小板。在一些实施例中，所述方法进一步包括将从干燥步骤获得的血小板再水合。

[0199] 在一些实施例中，在用于疗法或功能性测定之前，将血小板冷储存、低温冷藏保存或冻干(例如，以产生血栓小体)。

[0200] 根据本公开，可以使用任何已知的用于干燥血小板的技术，只要该技术可以获得小于5％的最终残余水分含量。优选地，该技术获得小于2％，诸如1％、0.5％或0.1％的最终残余水分含量。合适技术的非限制性示例是冷冻干燥(冻干)和喷雾干燥。合适的冻干方法在表A中呈现。另外的示例性冻干方法可以在美国专利第7,811,558号、美国专利第8,486,617号和美国专利第8,097,403中找到。一种示例性的喷雾干燥方法包括：将作为干燥气体的氮气与根据本公开的孵育剂结合，然后将混合物引入到具有双流体喷嘴构造的来自GEA加工工程公司(GEA Processing Engineering,Inc.)(Columbia MD,USA)的GEA移动式小型喷雾干燥器中，在150℃至190℃的范围内的入口温度下，在65℃至100℃的范围内的出口温度下，在0.5至2.0巴的范围内的原子速率下，在5至13kg/小时的范围内的原子速率下，在60至100kg/小时的范围内的氮用量下和10至35分钟的运行时间下喷雾干燥混合物。喷雾干燥的最后一步是优先地收集干燥的混合物。在一些实施例中，干燥的组合物在-20℃或更低至90℃或更高的范围内的温度下在至少6个月内是稳定的。

[0201] 表A：示例性的冻干方案

	步骤	温度设置	类型	持续时间	压力设置
冷冻步骤	F1	-50°C	斜升	变化	N/A
	F2	-50°C	保持	3 小时	N/A
真空下拉	F3	-50°	保持	变化	N/A

[0202]

初级干燥	P1	-40°	保持	1.5 小时	0 mT
	P2	-35°	斜升	2 小时	0 mT
	P3	-25°	斜升	2 小时	0 mT
	P4	-17°C	斜升	2 小时	0 mT
	P5	0°C	斜升	1.5 小时	0 mT
	P6	27°C	斜升	1.5 小时	0 mT
	P7	27°C	保持	16 小时	0 mT
二次干燥	S1	27°C	保持	> 8 小时	0 mT

[0203] 在一些实施例中，干燥如本文所公开获得的血小板的步骤，诸如冷冻干燥如本文所公开获得的血小板的步骤，包括将血小板与冻干剂(例如，非还原性二糖)一起孵育。因此，在一些实施例中，用于制备血小板的方法进一步包括将血小板与冻干剂一起孵育。在一些实施例中，冻干剂是糖。在一些实施例中，糖是二糖，诸如非还原性二糖。

[0204] 在一些实施例中，将血小板与冻干剂一起孵育足够量的时间，并在合适的温度下将血小板与冻干剂一起孵育。合适的冻干剂的非限制性示例是糖，诸如单糖和二糖，包括蔗糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖(例如右旋糖)、甘露糖和木糖。在一些实施例中，冻干剂的非限制性示例包括血清白蛋白、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、淀粉和羟乙基淀粉(HES)。在一

些实施例中，示例性的冻干剂可以包括高分子量聚合物。“高分子量”意指平均分子量为约或高于70kDa且高达1,000,000kDa的聚合物。非限制性的示例是蔗糖和表氯醇的聚合物(例如，聚蔗糖)。在一些实施例中，冻干剂是聚蔗糖。尽管可以使用任何量的高分子量聚合物作为冻干剂，但优选的是使用达到约3％至10％(w/v)例如3％至7％例如6％的最终浓度的量。

[0205] 用于本文公开的组合物的示例性的糖是海藻糖。无论糖的特性如何，它都可以以任何合适的量存在于组合物中。例如，它可以以1mM至1M的量存在。在实施例中，它以10mM至10至500mM的量存在。在一些实施例中，它以20mM至200mM的量存在。在实施例中，它以40mM至100mM的量存在。在各种实施例中，糖以在上述范围内的不同特定浓度存在，并且本领域技术人员可以立即理解各种浓度，而不需要在本文中具体列举每一种浓度。在组合物中存在多于一种糖的情况下，每种糖可以以根据上述范围和特定浓度的量存在。

[0206] 在本文提供的用于制备本文提供的组合物的工艺中，加入冻干剂可以是干燥前的最后一步。然而，在一些实施例中，冻干剂与组合物的其它组分诸如盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂或其它组分同时或在它们之前加入。在一些实施例中，将冻干剂加入到孵育剂中，充分地混合以形成干燥溶液，分配到干燥容器(例如玻璃或塑料血清小瓶、冻干袋)中，并且经受允许干燥溶液以形成干燥的组合物的条件。

[0207] 将血小板与冷冻保护剂一起孵育的步骤可以包括将血小板孵育一段适合加载的时间，只要该时间与温度相结合，足以使冷冻保护剂与血小板接触，并且优选地，至少在一定程度上被掺入血小板中。在实施例中，孵育进行约1分钟至约180分钟或更长。

[0208] 将血小板与冷冻保护剂一起孵育的步骤可以包括在一定温度下孵育血小板和冷冻保护剂，当结合所分配的时间量进行选择时，该温度适合于孵育。通常，将组合物在高于冷冻的温度下孵育至少足够的时间，以使冷冻保护剂与血小板接触。在实施例中，孵育在37℃下进行。在某些实施例中，孵育在20℃至42℃下进行。例如，在实施例中，孵育在35℃至40℃(例如，37℃)下进行110至130(例如，120)分钟。

[0209] 在各种实施例中，冻干袋是气体可渗透袋，所述气体可渗透袋被配置为在加工期间允许气体通过袋的至少一部分或所有部分。气体可渗透袋可以允许袋的内部的气体与周围环境中存在的大气气体交换。气体可渗透袋可以是气体可渗透的，诸如氧气、氮气、水、空气、氢气和二氧化碳，允许在本文提供的组合物中发生气体交换。在一些实施例中，气体可渗透袋通过允许二氧化碳透过其壁而允许去除存在于袋内部的一些二氧化碳。在一些实施例中，从袋中释放二氧化碳可以有利于保持袋中包含的组合物的所需pH水平。

[0210] 在一些实施例中，本文工艺的容器是封闭或密封的气体可渗透容器。在一些实施例中，容器是封闭或密封的且其一部分是气体可渗透的容器。在一些实施例中，可以调节封闭的或密封的容器(例如袋)的气体可渗透部分的表面积相对于容器中包含的产品的体积(在下文中被称为“SA/V比”)以改善本文提供的组合物的pH维持。例如，在一些实施例中，容器的SA/V比可以是至少约2.0cm^2/mL(例如，至少约2.1cm^2/mL、至少约2.2cm^2/mL、至少约2.3cm^2/mL、至少约2.4cm^2/mL、至少约2.5cm^2/mL、至少约2.6cm^2/mL、至少约2.7cm^2/mL、至少约2.8cm^2/mL、至少约2.9cm^2/mL、至少约3.0cm^2/mL、至少约3.1cm^2/mL、至少约3.2cm^2/mL、至少约3.3cm^2/mL、至少约3.4cm^2/mL、至少约3.5cm^2/mL、至少约3.6cm^2/mL、至少约3.7cm^2/mL、至少约3.8cm^2/mL、至少约3.9cm^2/mL、至少约4.0cm^2/mL、至少约4.1cm^2/mL、至少约4.2cm^2/mL、至少约4.3cm^2/mL、至少约4.4cm^2/mL、至少约4.5cm^2/mL、至少约4.6cm^2/mL、至少约

4.7cm^2/mL、至少约4.8cm^2/mL、至少约4.9cm^2/mL或至少约5.0cm^2/mL。在一些实施例中，容器的SA/V比可以为至多约10.0cm^2/mL(例如，至多约9.9cm^2/mL、至多约9.8cm^2/mL、至多约9.7cm^2/mL、至多约9.6cm^2/mL、至多约9.5cm^2/mL、至多约9.4cm^2/mL、至多约9.3cm^2/mL、至多约9.2cm^2/mL、至多约9.1cm^2/mL、至多约9.0cm^2/mL、至多约8.9cm^2/mL、至多约8.8cm^2/mL、至多约8.7cm^2/mL、至多约8.6,cm^2/mL至多约8.5cm^2/mL、至多约8.4cm^2/mL、至多约8.3cm^2/mL、至多约8.2cm^2/mL、至多约8.1cm^2/mL、至多约8.0cm^2/mL、至多约7.9cm^2/mL、至多约7.8cm^2/mL、至多约7.7cm^2/mL、至多约7.6cm^2/mL、至多约7.5cm^2/mL、至多约7.4cm^2/mL、至多约7.3cm^2/mL、至多约7.2cm^2/mL、至多约7.1cm^2/mL、至多约6.9cm^2/mL、至多约6.8cm^2/mL、至多约6.7cm^2/mL、至多约6.6cm^2/mL、至多约6.5cm^2/mL、至多约6.4cm^2/mL、至多约6.3cm^2/mL、至多约6.2cm^2/mL、至多约6.1cm^2/mL、至多约6.0cm^2/mL、至多约5.9cm^2/mL、至多约5.8cm^2/mL、至多约5.7cm^2/mL、至多约5.6cm^2/mL、至多约5.5cm^2/mL、至多约5.4cm^2/mL、至多约5.3cm^2/mL、至多约5.2cm^2/mL、至多约5.1cm^2/mL、至多约5.0cm^2/mL、至多约4.9cm^2/mL、至多约4.8cm^2/mL、至多约4.7cm^2/mL、至多约4.6cm^2/mL、至多约4.5cm^2/mL、至多约4.4cm^2/mL、至多约4.3cm^2/mL、至多约4.2cm^2/mL、至多约4.1cm^2/mL或至多约4.0cm^2/mL。在一些实施例中，容器的SA/V比可以在约2.0至约10.0cm^2/mL(例如，约2.1cm^2/mL至约9.9cm^2/mL、约2.2cm^2/mL至约9.8cm^2/mL、约2.3cm^2/mL至约9.7cm^2/mL、约2.4cm^2/mL至约9.6cm^2/mL、约2.5cm^2/mL至约9.5cm^2/mL、约2.6cm^2/mL至约9.4cm^2/mL、约2.7cm^2/mL至约9.3cm^2/mL、约2.8cm^2/mL至约9.2cm^2/mL、约2.9cm^2/mL至约9.1cm^2/mL、约3.0cm^2/mL至约9.0cm^2/mL、约3.1cm^2/mL至约8.9cm^2/mL、约3.2cm^2/mL至约8.8cm^2/mL、约3.3cm^2/mL至约8.7cm^2/mL、约3.4cm^2/mL至约8.6cm^2/mL、约3.5cm^2/mL至约8.5cm^2/mL、约3.6cm^2/mL至约8.4cm^2/mL、约3.7cm^2/mL至约8.3cm^2/mL、约3.8cm^2/mL至约8.2cm^2/mL、约3.9cm^2/mL至约8.1cm^2/mL、约4.0cm^2/mL至约8.0cm^2/mL、约4.1cm^2/mL至约7.9cm^2/mL、约4.2cm^2/mL至约7.8cm^2/mL、约4.3cm^2/mL至约7.7cm^2/mL、约4.4cm^2/mL至约7.6cm^2/mL、约4.5cm^2/mL至约7.5cm^2/mL、约4.6cm^2/mL至约7.4cm^2/mL、约4.7cm^2/mL至约7.3cm^2/mL、约4.8cm^2/mL至约7.2cm^2/mL、约4.9cm^2/mL至约7.1cm^2/mL、约5.0cm^2/mL至约6.9cm^2/mL、约5.1cm^2/mL至约6.8cm^2/mL、约5.2cm^2/mL至约6.7cm^2/mL、约5.3cm^2/mL至约6.6cm^2/mL、约5.4cm^2/mL至约6.5cm^2/mL、约5.5cm^2/mL至约6.4cm^2/mL、约5.6cm^2/mL至约6.3cm^2/mL、约5.7cm^2/mL至约6.2cm^2/mL或约5.8cm^2/mL至约6.1cm^2/mL的范围内。

[0211] 气体可渗透的密闭容器(例如袋)或其部分可以由一种或多种各种气体可渗透材料制成。在一些实施例中，气体可渗透袋可以由一种或多种聚合物制成，所述聚合物包括含氟聚合物(诸如聚四氟乙烯(PTFE)和全氟烷氧基(PFA)聚合物)、聚烯烃(诸如低密度聚乙烯(LDPE)、高密度聚乙烯(HDPE))、氟化乙烯丙烯(FEP)、聚苯乙烯、聚氯乙烯(PVC)、硅酮及其任意组合。

[0212] 在一些实施例中，干燥的血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)可以经受热处理。加热可以在高于约25℃(例如，大于约40℃、50℃、60℃、70℃、80℃或更高)的温度下进行。在一些实施例中，加热在约70℃与约85℃之间(例如，在约75℃与约85℃之间，或在约75℃或80℃下)进行。可以结合要进行加热的时间长度来选择加热温度。尽管可以使用任何合适的时间，但通常将冻干的血小板加热至少1小时，但不超过36小时。因此，在实施例中，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小时或至少30

小时。例如，冻干的血小板可以加热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30小时。非限制性的示例性组合包括：在高于30℃的温度下加热干燥的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)至少30分钟；在高于50℃的温度下加热干燥的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)至少10小时；在高于75℃的温度下加热干燥的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)至少18小时；和在80℃下加热干燥的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)24小时。在一些实施例中，加热可以在密封的容器诸如有盖的小瓶中进行。在一些实施例中，密封的容器在加热之前经受真空。已经发现热处理步骤，特别是在存在诸如白蛋白或聚蔗糖的冷冻保护剂的情况下，可改善冷冻干燥的血小板的稳定性和保存期。实际上，与没有热处理步骤的那些冷冻保护剂相比，使用血清白蛋白或聚蔗糖的特定组合和冻干后热处理步骤已经获得了有利的结果。冷冻保护剂(例如，蔗糖)可以以任何合适的量(例如，以血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)的质量或体积计，约3％至约10％)存在。

[0213] 在一些实施例中，如本文所公开的通过包括用孵育剂孵育的工艺制备的血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)具有至少约等于孵育前血小板的储存稳定性的储存稳定性。

[0214] 在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板或血小板衍生物(例如，与孵育剂，例如，本文所述的孵育剂)之前低温冷藏保存血小板或血小板衍生物。

[0215] 在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)之前干燥包含血小板或血小板衍生物(例如，与孵育剂，例如本文所述的孵育剂)的组合物。在一些实施例中，所述方法可以进一步包括在干燥步骤之后加热组合物。在一些实施例中，所述方法可以进一步包括在冷冻干燥步骤或加热步骤之后再水合组合物。

[0216] 在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板或血小板衍生物(例如血栓小体)之前将包含血小板或血小板衍生物(例如，与孵育剂，例如本文所述的孵育剂)的组合物冷冻干燥在一些实施例中，所述方法可以进一步包括在冷冻干燥步骤之后加热所述组合物。在一些实施例中，所述方法可以进一步包括在冷冻干燥步骤或加热步骤之后再水合所述组合物。

[0217] 在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板、血小板衍生物或血栓小体(例如，与孵育剂，例如，本文所述的孵育剂)之前冷储存血小板、血小板衍生物或血栓小体。

[0218] 储存条件包括例如标准室温储存(例如，在约20至约30℃的范围内的温度下储存)或冷储存(例如，在约1℃至约10℃的范围内的温度下储存)。在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)之前，将包含血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)(例如，与孵育剂，例如，本文所述的孵育剂)的组合物低温冷藏保存、冷冻干燥、解冻、再水合及其组合。例如，在一些实施例中，所述方法进一步包括在施用血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)之前干燥(例如，冷冻干燥)包含血小板或血小板衍生物(例如，与孵育剂，例如本文所述的孵育剂)的组合物(例如，以形成血栓小体)。在一些实施例中，所述方法可以进一步包括将从干燥步骤获得的组合物再水合。

[0219] 在一些实施例中，本文提供了包含血小板或血小板衍生物(例如，血栓小体)、聚蔗糖和海藻糖的组合物，其通过以下工艺制备：获得新鲜的血小板，任选地在DMSO中孵育血小板，通过离心分离血小板，将血小板再悬浮在包含海藻糖和乙醇的孵育剂中从而形成第一混合物，孵育第一混合物，将聚蔗糖与第一混合物混合从而形成第二混合物，以及冻干第二

混合物以形成包含血小板或血小板衍生物(例如,血栓小体)、聚蔗糖和海藻糖的冷冻干燥的组合物。

[0220] 在一些实施例中,本文提供了一种制备包含血小板或血小板衍生物(例如,血栓小体)、聚蔗糖和海藻糖的冷冻干燥的血小板组合物的方法,所述方法包括获得新鲜的血小板,任选地在DMSO中孵育血小板,通过离心分离血小板,将血小板再悬浮在包含海藻糖和乙醇的孵育剂中从而形成第一混合物,孵育第一混合物,将聚蔗糖与第一混合物混合从而形成第二混合物,以及冻干第二混合物以形成包含血小板或血小板衍生物(例如,血栓小体)、聚蔗糖和海藻糖的冷冻干燥的组合物。

[0221] 在一些实施例中,本文提供了一种用于制备冷冻干燥的血小板的工艺,所述工艺包括在至少一种糖的存在下在20℃至42℃的温度下孵育分离的血小板持续约10分钟至约180分钟,向血小板中添加至少一种冷冻保护剂,以及冻干血小板,其中所述工艺任选地不包括在孵育步骤与添加步骤之间分离血小板,并且任选地其中所述工艺不包括将血小板暴露于血小板活化抑制剂。冷冻保护剂可以是多糖(例如,聚蔗糖)。所述工艺可以进一步包括将冻干的血小板在70℃至80℃的温度下加热8至24小时。向血小板中添加至少一种冷冻保护剂的步骤可以进一步包括将血小板暴露于乙醇。在至少一种糖的存在下孵育分离的血小板的步骤可以包括在至少一种糖的存在下孵育。在至少一种糖的存在下孵育分离的血小板的步骤可以包括在至少一种糖的存在下孵育。用于孵育的条件可以包括孵育约100分钟至约150分钟。用于孵育的条件可以包括孵育约110分钟至约130分钟。用于孵育的条件可以包括孵育约120分钟。用于孵育的条件可以包括在35℃至40℃下孵育。用于孵育的条件可以包括在37℃下孵育。用于孵育的条件可以包括在35℃至40℃下孵育110分钟至130分钟。用于孵育的条件可以包括在37℃下孵育120分钟。所述至少一种糖可以是海藻糖、蔗糖或海藻糖和蔗糖两者。所述至少一种糖可以是海藻糖。所述至少一种糖可以是蔗糖。

[0222] 在一些实施例中,本文提供了一种制备冷冻干燥的血小板的方法,所述方法包括提供血小板,将血小板悬浮在包含约100mM海藻糖和约1%(v/v)乙醇的盐缓冲液中以制备第一组合物,在约37℃下孵育第一组合物约2小时,加入聚蔗糖(例如聚蔗糖400)至约6%(w/v)的最终浓度以制备第二组合物,冻干第二组合物以制备冷冻干燥的血小板,以及在80℃下加热冷冻干燥的血小板持续24小时。

[0223] 本文公开的特定实施例可以在权利要求中使用“由……组成”或“基本上由……组成”的语言来进一步限制。

[0224] 示例性的实施例

[0225] 实施例1是一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0226] 实施例2是一种治疗受试者的凝血病的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂一起孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0227] 实施例3是一种在受试者中恢复正常止血的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂,所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0228] 实施例4是一种在受试者中恢复正常止血的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂一起孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0229] 实施例5是一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0230] 实施例6是一种使受试者做好手术准备的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0231] 实施例7是实施例5至6中任一项所述的方法，其中手术为紧急手术。

[0232] 实施例8是实施例5至6中任一项所述的方法，其中手术为预约手术。

[0233] 实施例9是实施例1至8中任一项所述的方法，其中所述受试者已经用或正在用抗血小板剂治疗。

[0234] 实施例10是实施例9的方法，其中停止用抗血小板剂的治疗。

[0235] 实施例11是实施例9的方法，其中继续用抗血小板剂的治疗。

[0236] 实施例12是一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含血小板或血小板衍生物和孵育剂，所述孵育剂包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂。

[0237] 实施例13是一种改善抗血小板剂在受试者中的作用的方法，所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物通过包括将血小板与包含一种或多种盐、缓冲液、任选地冷冻保护剂和任选地有机溶剂的孵育剂孵育以形成组合物的工艺来制备。

[0238] 实施例14是实施例12或实施例13的方法，其中抗血小板剂的作用是抗血小板剂的过剂量的结果。

[0239] 实施例15是实施例1至14中任一项所述的方法，其中所述组合物进一步包含抗纤维蛋白溶解剂。

[0240] 实施例16是实施例15的方法，其中所述抗纤维蛋白溶解剂选自由ε-氨基己酸(EACA)、氨甲环酸、抑肽酶、氨基甲基苯甲酸、纤维蛋白原及其组合组成的群组。

[0241] 实施例17是实施例15或实施例16的方法，其中所述血小板或血小板衍生物加载有抗纤维蛋白溶解剂。

[0242] 实施例18是实施例9至16中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、补充剂及其组合组成的群组。

[0243] 实施例19是实施例9至16中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特鲁曲班、匹考他胺、依利格雷、噻氯匹定、布洛芬、沃拉帕沙、阿托帕沙及其组合组成的群组。

[0244] 实施例20是实施例9至16中任一项所述的方法，其中所述抗血小板剂选自由阿司匹林、坎格雷洛、替卡格雷、氯吡格雷、普拉格雷、依替巴肽、替罗非班、阿昔单抗、特优罗班、匹考他胺、依利格雷、噻氯匹定、布洛芬、沃拉帕沙、阿托帕沙、西洛他唑、前列腺素E1、依前列醇、双嘧达莫、曲前列素钠、沙格雷酯及其组合组成的群组。

[0245] 实施例21是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括局部施用。

[0246] 实施例22是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括肠胃外施用。

[0247] 实施例23是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括静脉内施用。

[0248] 实施例24是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括肌内施用。

[0249] 实施例25是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括鞘内施用。

[0250] 实施例26是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括皮下施用。

[0251] 实施例27是实施例1至20中任一项所述的方法，其中施用包括腹膜内施用。

[0252] 实施例28是实施例1至27中任一项所述的方法，其中在施用步骤之前干燥组合物。

[0253] 实施例29是实施例28所述的方法，其中组合物在干燥步骤后再水合。

[0254] 实施例30是实施例1至28中任一项所述的方法，其中所述组合物在施用步骤之前被冷冻干燥。

[0255] 实施例31是实施例30所述的方法，其中组合物在冷冻干燥步骤后再水合。

[0256] 实施例32是实施例1至31中任一项所述的方法，其中所述孵育剂包括一种或多种选自磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐及其两种或更多种的组合的盐。

[0257] 实施例33是实施例1至32中任一项所述的方法，其中所述孵育剂包含载体蛋白。

[0258] 实施例34是实施例1至33中任一项所述的方法，其中所述缓冲液包括HEPES、碳酸氢钠($NaHCO_3$)或其组合。

[0259] 实施例35是实施例1至34中任一项所述的方法，其中所述组合物包含一种或多种糖。

[0260] 实施例36是实施例35所述的方法，其中所述一种或多种糖包括海藻糖。

[0261] 实施例37是实施例35或实施例36所述的方法，其中所述一种或多种糖包括多糖。

[0262] 实施例38是实施例35至37中任一项所述的方法，其中所述一种或多种糖包括右旋糖。

[0263] 实施例39是实施例1至38中任一项所述的方法，其中所述组合物包含有机溶剂。

[0264] 实施例40是实施例1至39中任一项所述的方法，其中血小板或血小板衍生物包含血栓小体。

[0265] 实例

[0266] 以下结果证明了血栓小体产品在服用抗血小板药物的患者的体外模型中的影响。血栓小体和其他冻干的血小板产品设计用于在诊断出创伤或止血失败后输注到患者的血流中。这些药物利用多种形式的血小板抑制机制，这些血小板抑制机制抑制血小板对二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸、纤维蛋白原和血管性血友病因子结合等的应答。这些包括如阿司匹林、氯吡格雷、替卡格雷、普拉格雷、坎格雷洛和依替巴肽的药物。

[0267] 实例1-$P2Y_{12}$抑制剂

[0268] 与氯吡格雷、替卡格雷和普拉格雷一样，坎格雷洛可阻断血小板上的$P2Y_{12}$(ADP)受体。此处使用坎格雷洛作为此类药物的代表。

[0269] 按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行透射光聚集测定法和T-TAS®实验。

[0270] 坎格雷洛对富含血小板血浆中的血小板的聚集的影响(PRP;取自人全血并加工以分离血浆中没有白细胞(WBC)或红细胞(rbc)的血小板，通过透射光聚集测定法进行评估。

响应于激动剂诱导的活化的血小板的聚集(富含血小板的血浆)显示,坎格雷洛在0.5μM-3.5μM的治疗浓度下完全抑制10μM二磷酸腺苷(ADP)诱导的聚集(图1)。所研究的所有剂量的坎格雷洛完全消除了PRP中ADP诱导的血小板聚集。

[0271] 通过T-TAS®来评估坎格雷洛对剪切下血小板闭塞的影响。用10μM的ADP在体外刺激的新鲜富含血小板的血浆(血小板浓度278,000μL;PRP通常具有约200,000/μL至约300,000/μL的血小板浓度)在高剪切下比未刺激的血小板(PRP)更早地闭塞,如通过AR芯片(胶原蛋白和组织促凝血酶原激酶)使用T-TAS®技术确定的(图2)。单独的坎格雷洛(1μM)对闭塞没有呈现出抑制作用,但当与ADP(10μM)结合时,血小板粘附和闭塞基本上被消除。这些结果在图3和4中进一步说明。不受任何特定理论的束缚,据信观察到这种模式是因为血小板具有未被坎格雷洛阻断的其他ADP受体,这些受体对ADP有反应并导致形状改变和聚集,其中ADP受体P2Y12阻断抑制胶原蛋白结合,因此,血小板可能由于ADP刺激而彼此结合,但可能会阻止与包被的芯片上的胶原蛋白结合。

[0272] 在图3中,曲线下面积(AUC)值(来源于图2中的数据;复制品被平均并绘制一次)表示血栓发生速度有多快和血栓确实发生时有多严重的组合值。随着ADP刺激,PRP AUC升高。坎格雷洛对AUC值几乎没有影响,但当与ADP刺激组合时,AUC降至接近零。

[0273] 在图4中,评估了在药物治疗时ART-TAS®芯片的闭塞时间。在大约20分钟时,PRP使芯片通道闭塞,并且用ADP刺激血小板在那段时间减少。坎格雷洛对闭塞时间几乎没有影响,但在PRP样品中加入ADP刺激基本上完全抑制了闭塞。

[0274] 在以显示出抑制血小板的浓度用ADP刺激的坎格雷洛的存在下,血栓小体(图5-7中的“thromb”)没有被抑制,表明即使在治疗水平的坎格雷洛的存在下,血栓小体也可以帮助凝块形成。

[0275] 通过T-TAS®来评估坎格雷洛在剪切下对血栓小体的影响。图5显示,在存在ADP(10uM)的情况下,血栓小体(如所示,在再水合60、90或115分钟后)在不存在或存在坎格雷洛(1uM)的情况下保持止血功能。与血小板不同,T-TAS®AR芯片的血栓小体闭塞不受坎格雷洛+ADP的抗血小板作用的影响。这表明,当被注入到接受坎格雷洛和类似药剂的患者体内时,血栓小体将保持预期的功能。这些结果在图6和7中进一步说明。

[0276] 在图6中,AUC值(来自图5中的数据)表示血栓形成。坎格雷洛+ADP对血浆中T-TAS®AR芯片的血栓小体粘附和闭塞没有影响;血栓小体引起血栓形成,而与坎格雷洛和ADP无关。相同剂量的坎格雷洛和ADP完全抑制新鲜收获的血小板。

[0277] 在图7中,评估了在药物治疗的情况下AR T-TAS®芯片上的血栓小体的闭塞时间(来自图5中的数据)。使用血浆中的T-TAS®AR芯片,坎格雷洛+ADP对血栓小体闭塞时间没有影响。相同剂量的坎格雷洛和ADP完全抑制新鲜收获的血小板。

[0278] 实例2.GPIIb-IIIa抑制剂。

[0279] 以下结果证明了血栓小体在服用GPIIb-IIIa抑制剂的患者的体外模型中的影响。依替巴肽(一种常见的抗血小板药物)竞争性地抑制血小板上与纤维蛋白原和血管性血友病因子相互作用的GPIIb-IIIa受体。

[0280] 依替巴肽是一种肽治疗剂,其阻断血小板上GPIIb-IIIa受体的纤维蛋白结合作用。该药物通常以180μg/kg推注通过IV施用,然后以2μg/kg/分钟的连续输注被施用。依替

巴肽的血液浓度通常为约1-2μM。出血时间通常在停药后约1小时内恢复到正常。

[0281] 按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行透射光聚集测定法和T-TAS®实验。

[0282] 使用透射光聚集测定法来评估血小板的聚集(在富含血小板的血浆中)。在所有测试的浓度下,依替巴肽完全抑制在PRP中胶原诱导的(10μg/mL)血小板聚集,如在PRP中通过光传输聚集测定法检测的(图8)。

[0283] 还研究了在存在依替巴肽的情况下血栓小体对缩短凝血时间的作用。在T-TAS®系统上研究了血栓小体恢复闭塞时间的能力。T-TAS®系统在胶原蛋白和促凝血酶原激酶刺激下测量剪切力下的闭塞时间。在依替巴肽的情况下,ART-TAS®芯片上的闭塞的全血概况和AUC分别被延长和减少。依替巴肽以剂量依赖性方式延长了全血在T-TASAR®芯片上的闭塞时间。在本实验中,全血在8分钟时闭塞,并且在6μM依替巴肽的情况下闭塞时间被延长至16分钟(图9)。血栓小体逆转了依替巴肽对血栓形成的抑制作用。通过添加约200,000/μL(N=3)的血栓小体,逆转了依替巴肽在T-TAS®AR芯片上对全血闭塞的抑制。当血栓小体(大约200k/μL)被加入到用依替巴肽抑制的全血的样品中时,闭塞时间在9分钟时降至"正常"(图10)。

[0284] 与正常全血样品相比,在血栓小体处理的情况下曲线值下的面积也随着血栓小体而增加。图11显示了在药物治疗的情况下ART-TAS®芯片上血栓小体闭塞的时间;依替巴肽对T-TAS®AR芯片闭塞的抑制通过添加血栓小体(200,000/μL;N=3)几乎被完全逆转。在图12中,曲线值下的面积指示血栓形成,其中血栓小体通过依替巴肽的抑制而恢复至正常水平;通过添加血栓小体(200,000/μL;N=3)克服了依替巴肽对T-TAS®AR芯片的血小板粘附和闭塞的抑制作用。

[0285] 与血小板不同,在存在依替巴肽的情况下,血栓小体在剪切下闭塞的能力不受抑制(图13)。图13显示了ART-TAS®系统上不同批次血栓小体的血栓形成的概况在依替巴肽治疗的情况下未发生变化。贫血小板血浆(PPP)中的血栓小体流经含或不含6uM依替巴肽的T-TAS®AR芯片。依替巴肽对血栓小体粘附和闭塞没有影响。所有血栓小体浓度为大约300,000/μL。

[0286] T-TAS对血浆中血栓小体(大约300,000/μL)的AUC和闭塞值在使用和不使用依替巴肽的情况下相同(图14-15)。图14显示曲线下面积值指示血栓形成,并且在贫血小板血浆中在依替巴肽的情况下没有观察到变化。6uM依替巴肽对血栓小体T-TAS®AR芯片闭塞的AUC没有影响。图15显示了在ART-TAS®芯片上血栓小体的闭塞时间在依替巴肽的情况下没有改变。6μM依替巴肽对贫血小板血浆中T-TAS®AR芯片的血栓小体闭塞时间没有显著影响。

[0287] 实例3.COX抑制剂。

[0288] 以下结果证明了血栓小体在服用COX抑制剂的患者的体外模型中的影响。阿司匹林(一种常见的抗血小板药物)阻断血小板中的COX1酶。COX1负责将花生四烯酸转化为前列腺素。

[0289] 阿司匹林是一种不可逆的环氧化酶(COX)抑制剂。血小板中的COX酶负责血栓烷A2、前列腺素E2和前列环素(PGI2)的合成。阿司匹林会使血小板中的COX酶永久失活,并且

由于血小板不具有合成新酶的核物质，因此必须产生新的血小板以克服阿司匹林效应。在没有血栓烷A2、前列腺素E2和前列环素(PGI2)的情况下，血小板的促聚集活性会受到限制。许多人以低剂量的阿司匹林维持，以防止不期望的凝血事件。阿司匹林的生物利用度在很大程度上因施用途径而异，其中单次500mg剂量IV的峰值为500μM，并且相同剂量口服的峰值为44μM。

[0290] 按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行透射光聚集测定法和T-TAS®实验。

[0291] 血小板在胶原蛋白和花生四烯酸刺激下将聚集。通过花生四烯酸的刺激可以被完全抑制，而胶原刺激聚集仅可以在100-400μM阿司匹林的浓度下被部分抑制(图16)。图16显示了在PRP中在使用胶原蛋白(10ug/mL)和花生四烯酸(AA;500ug/mL)情况下的光传输聚集测定法，其诱导血小板聚集，并且该聚集被测试的所有剂量的阿司匹林(ASA)抑制。阿司匹林完全消除了花生四烯酸诱导的血小板聚集。使用T-TAS®上的PL芯片系统来模拟体外血小板结合和聚集，这是在剪切条件下脉管系统中的胶原的暴露所致。在100μM和500μM的阿司匹林的存在下，血小板的这种作用在很大程度上受到限制，但在存在血栓小体的情况下可以至少部分地被恢复(大约200,000至400,000/μL;图17)。图17通过全血的曲线测量下的面积显示，PL T-TAS®芯片上的血栓形成被阿司匹林抑制，其中血栓形成与血栓小体部分恢复。

[0292] 实例4.协议

[0293] 血栓小体的生成。按照美国专利第8,486,617号(诸如例如，实例1-5)和第8,097,403号(诸如例如，实例1-3)中所述的程序来制备血栓小体，这些专利通过引用以其整体并入本文。

[0294] 透射光聚集测定法

[0295] 将含有血小板或血栓小体或两者的组合的血浆样品装入比色皿中，并放入聚集测定法室中。所述室加热样品并提供恒定的搅拌。可以通过多种类型的抑制剂(不限于凝血酶、ADP、胶原蛋白和任何已知刺激血小板聚集的药剂)启动聚集。样品也可以被离体采集，或在体外补充有抑制剂。仪器通过首先记录刺激前2分钟的光传输开始测定。然后，通过技术人员引入感兴趣的刺激物，并记录光传输随时间的变化。光传输的增加对应于血小板聚集的增加。

[0296] 使用AR芯片通过T-TAS®进行的评估。AR芯片通过含有胶原蛋白和组织因子的单个通道来表征;它们可以用于分析凝血和血小板功能。

[0297] 按照制造商的说明准备使用T-TAS®仪器。将AR芯片(Diapharma目录号TC0101)和AR芯片钙玉米胰蛋白酶抑制剂(CaCTI;Diapharma目录号TR0101)加热至室温。将300uL的再水合的血栓小体转移至1.7mL的微量离心管中，并以3900g×10分钟离心，以形成沉淀。将血栓小体沉淀重新悬浮在George King(GK)混合的正常人血浆或自体血浆(含或不含自体血小板)中至约100,000-450,000/uL的浓度，如通过AcT计数(Beckman Coulter AcT Diff 2细胞计数器)测定的。使用温和移液器混合20uL的CaCTI与480uL的GK血浆中的血栓小体样品。根据制造商的说明，将样品装载并在T-TAS®上运行。

[0298] 使用PL芯片通过T-TAS®进行的评估。

[0299] PL芯片与AR芯片类似地运行，但该芯片仅包被有胶原蛋白。

[0300] 凝血酶生成

[0301] 试剂制备。对于凝血酶生成，如下使用了来自制造商的以下材料：FluCa试剂盒(Diagnostica Stago，目录号86197)，凝血酶校准品(Diagnostica Stago，目录号86197)，PRP试剂(Diagnostica Stago，目录号86196)，OCTOPLAS®(一种溶剂去污剂处理的人混合血浆)(Octapharma，目录号8-68209-952-04)。在使用前，将所有冷冻的试剂在37℃水浴中解冻。使用印在试剂标签上的体积，用无菌水对所有试剂进行再水合。在再水合后约2分钟，通过将小瓶倒置5次来混合试剂，因此没有大块或粉末残留；未使用涡流。在再水合后约10分钟重复该程序。所有试剂在室温下再孵育约10分钟(在再水合后总计约20分钟)。通过将4.66ml的血栓小体对照缓冲液(表B)与2ml的OCTOPLAS®混合来制备30％的OCTOPLAS®溶液。

[0302] 表B.血栓小体对照缓冲液

[0303]

组分	浓度 （mg/mL，除非另有说明）
NaCl	6.08
KCl	0.28
HEPES	2.47
$NaHCO_3$	0.77
右旋糖	0.41
海藻糖	28.83
乙醇	0.76%（v/v）

[0304] 样品分析-板制备和测试。对于包含血栓小体的实验，为每个实验血栓小体和参考血栓小体生成血栓小体稀释系列(通常使用194.4K/μL、64.8K/μL、21.6K/μL和7.2K/μL的稀释度；细胞计数通过流式细胞术确定)。除非另有说明，否则将血栓小体再水合。通过组合血栓小体、OCTAPLAS®和血栓小体对照缓冲液来制备最高浓度的稀释液(例如194.4k血栓小体)。稀释系列的其余部分是通过在OCTAPLAS®中按1:3连续稀释制备的。对于每个测试样品，将20uL的PRP试剂添加到每个样品孔(Immulon 2HB Clear，圆底96孔板(VWR，目录号62402-954))，并将20uL的凝血酶校准品添加到每个校准品孔中。向每个样品孔和校准品孔中加入80uL的血栓小体稀释系列中的每一个。继续直到最后一种稀释液。然后将板在Fluoroskan Ascent 96孔荧光板读取器(Thrombinoscope)(ThermoFisher Scientific)中孵育10分钟。在此孵育阶段期间，通过将40μL的FluCa底物添加到1.6ml的解冻的Fluo-Buffer中，涡旋，并将溶液返回到水浴中来制备FluCa溶液。当孵育完成时，根据制造商的说明书将FluCa溶液添加到Fluroskan仪器中。在40-41℃的温度以20秒的间隔监测板荧光75分钟。

[0305] 实例5.

[0306] 用坎格雷洛和阿司匹林进行了另外的实验。按照实例4中的程序制备血栓小体。根据实例4进行透射光聚集测定法、T-TAS®和凝血酶生成实验。

[0307] 使用T-TAS®技术和AR芯片来评估血栓小体对血栓形成恢复的影响。图18显示了用血栓小体(浓度为250,000个血栓小体/μL)、阿司匹林(200μM)、坎格雷洛(1μM)、抗整合素α-2(CD49B)抗体6F1(40μg；关于产品/制造商信息，参见dshb.biology.uiowa.edu/

integrin-alpha-2-alpha2beta1?sc＝7&category＝-107)和抗GPIIb/IIIa受体抗体AP2(20ug/mL;关于产品/制造商信息,参见kerafast.com/product/2010/anti-glycoprotein-gpiiiagpiib-complex-ap-2-antibody)的多种组合处理的全血的闭塞时间。图19显示了未处理的全血和用血栓小体(浓度为250,000个血栓小体/μL),含有6F1(40ug/mL;抗CD49b)、ASA(阿司匹林;200uM)和坎格雷洛(1uM)的混合物或其组合处理的全血随时间推移的闭塞。

[0308] 还使用T-TAS®技术和PL芯片来评估血栓小体对血栓形成恢复的影响。图20显示了仅用缓冲液、阿司匹林(500μM)或阿司匹林(500μM)和血栓小体(浓度为250,000个血栓小体/μL)处理的全血的闭塞时间。图21显示了全血、用阿司匹林(500μM)处理的全血、或用阿司匹林(500μM)和血栓小体(250,000/μL)处理的全血随时间推移的闭塞。图22和23显示了使用100μM阿司匹林代替500μM阿司匹林的类似实验数据。

[0309] 测量了阿司匹林治疗(浓度)对凝血酶生成的影响。在来自每天服用婴儿阿司匹林和标准血浆(INR＝1)的患者的PPP中以1450k/uL、1150k/uL、850k/uL、650k/uL、450k/uL、150k/uL、50k/uL和0k/uL的浓度评估血栓小体。图24显示了阿司匹林血浆的峰值凝血酶值在没有血栓小体的情况下低于正常范围(约45nM;正常范围为约66nM-166nM),但在添加血栓小体的情况下,它又回到正常范围内,即使是使用最低血栓小体浓度(50k/μL)。值再次在约800k血栓小体时达到饱和并上升到220nM——是没有血栓小体时这一血浆值的5倍(从45增加到220nM)。

[0310] 实例6.血栓小体逆转了由坎格雷洛诱导的延长的PRP闭塞时间

[0311] 用坎格雷洛进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行T-TAS®。

[0312] 图25A和25B显示了用100ng/mL坎格雷洛和ADP处理的富含血小板的血浆在T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上将闭塞时间从19分钟延长到26分钟。添加150k/μL血栓小体将时间缩短至15.3分钟。

[0313] 实例7.血栓小体而非随机供体血小板(RDP)逆转了在PRP中由替罗非班诱导的延长的闭塞时间

[0314] 用替罗非班进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行T-TAS®。从全血制备随机供体血小板。

[0315] 图26A和26B显示了用100ng/mL替罗非班处理的富含血小板的血浆将T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上的闭塞时间从18.43延长至无闭塞。添加150k/μL的血栓小体将时间缩短至12.94分钟,但RDP在相同计数下仅部分恢复。

[0316] 实例8.血栓小体而非随机供体血小板逆转了PRP中由依替巴肽诱导的延长的闭塞时间

[0317] 用依替巴肽进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行T-TAS®。从全血制备随机供体血小板。

[0318] 图27A和27B显示了用9μM依替巴肽处理的富含血小板的血浆在T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上将闭塞时间从18.43延长到超过30分钟。添加150k/μL的血栓小体可将时间缩短至11.56分钟,但在相同数量的RDP下未见阻塞。

[0319] 实例9.血栓小体逆转了PRP中由AP2(抗-GpIIb/IIIa)诱导的延长的闭塞时间

[0320] 用AP2进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行T-TAS®。从全血制备随机供体血小板。

[0321] 图28A和28B显示了用10μg/mL的AP-2处理的富含血小板的血浆在T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上将闭塞时间从18.43延长到超过30分钟。添加150k/μL的血栓小体将时间缩短至13.14分钟,并且在17.43分钟时在相同数量的RDP的情况下看到阻塞。

[0322] 实例10.血栓小体逆转了来自接受阿司匹林疗法的受试者的PRP中的长期闭塞

[0323] 用阿司匹林进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行T-TAS®。从全血制备随机供体血小板。受试者服用标准剂量81mg/天的阿司匹林。

[0324] 图29A和29B显示了取自阿司匹林患者的富含血小板的血浆未能在T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上阻塞。添加200k/μL的血栓小体使正常闭塞时间恢复到16分钟。

[0325] 实例11.血栓小体在离体阿司匹林富含血小板的血浆中恢复凝血酶生成

[0326] 用阿司匹林进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行凝血酶生成。

[0327] 图30A显示,来自阿司匹林患者的富含血小板的血浆的凝血酶生成相对于用PRP试剂刺激的正常人被50k/μL的血栓小体逆转。图30B显示了在使用血栓小体(50k/μL)的三次重复阿司匹林离体取样中,自正常凝血酶产生和恢复到正常凝血酶产生的变化、达到峰值产生的时间和滞后时间。(n=3个血栓小体批次,n=2个个体)。

[0328] 实例12.血栓小体在来自接受NSAID布洛芬疗法的受试者的PRP中恢复止血。

[0329] 用布洛芬(一种NSAID)进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。根据实例4进行聚集测定法和T-TAS®。

[0330] 富含血小板的血浆取自服用800mg布洛芬的受试者。图31A显示,响应于花生四烯酸的聚集的缺乏证实了在PRP中存在NSAID。图31B显示了T-TAS®流动系统(胶原蛋白和组织因子包被的通道)上的阻塞;来自布洛芬患者的PRP显示闭塞,而添加ADP消除了闭塞。添加150k/μL血栓小体恢复了闭塞。

[0331] 实例13.**Thrombosomes®**恢复用超药理学氯吡格雷治疗的NOD-SCID小鼠的出血时间

[0332] 用氯吡格雷进行了另外的实验。按照实例4中的程序来制备血栓小体。

[0333] 用氯吡格雷处理小鼠5天。将小鼠麻醉,剪掉尾端,然后立即施用血栓小体。通过目测来记录从断尾到断尾止血的时间。

[0334] NOD/SCID小鼠用约3倍临床剂量的氯吡格雷处理5天,然后在断尾出血模型中进行评估。用氯吡格雷处理出血时间(分钟)延长至17.8分钟,而未处理为9分钟(数据未显示)。用8μL/g的血栓小体(在200μL时1.8×10^9个颗粒/mL)的处理将出血减少到12.31分钟(图32)。

[0335] 尽管前面的描述针对本发明的优选实施例,但是应当注意,其他变化和修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的,并且可以在不背离本发明的精神或范围的情况下进行。此外,结合本发明的一个实施例描述的特征可以结合其他实施例使用,即使上面没有明

确说明。此外，本领域普通技术人员将容易地理解，如上讨论的本发明可以用不同顺序的步骤和/或用与所公开的配置不同的配置的硬件元件来实践。因此，尽管已经基于这些优选的实施例描述了本发明，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，某些修改、变化和替代结构将是显而易见的，同时保持在本发明的精神和范围内。如此要求保护的本发明的实施例在本文中固有地或明确地描述和实现。因此，为了确定本发明的界限和范围，应当参考所附的权利要求。

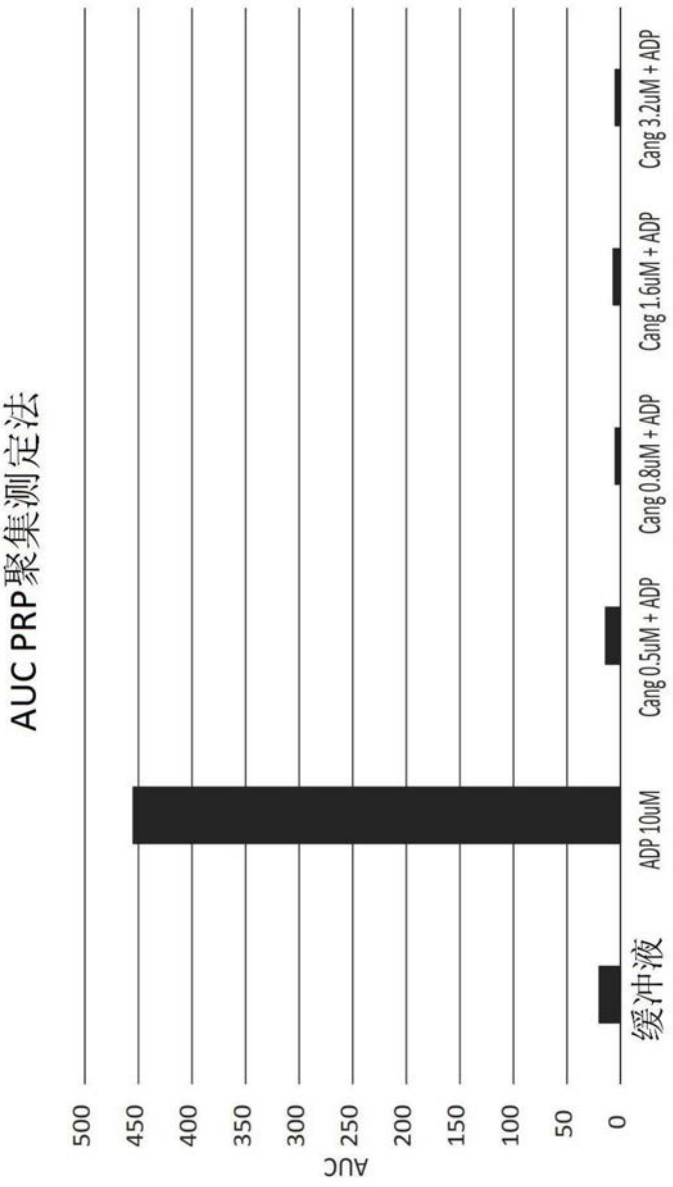

AUC PRP聚集测定法
AUC
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
缓冲液
ADP 10uM
Cang 0.5uM + ADP
Cang 0.8uM + ADP
Cang 1.6uM + ADP
Cang 3.2uM + ADP

图1

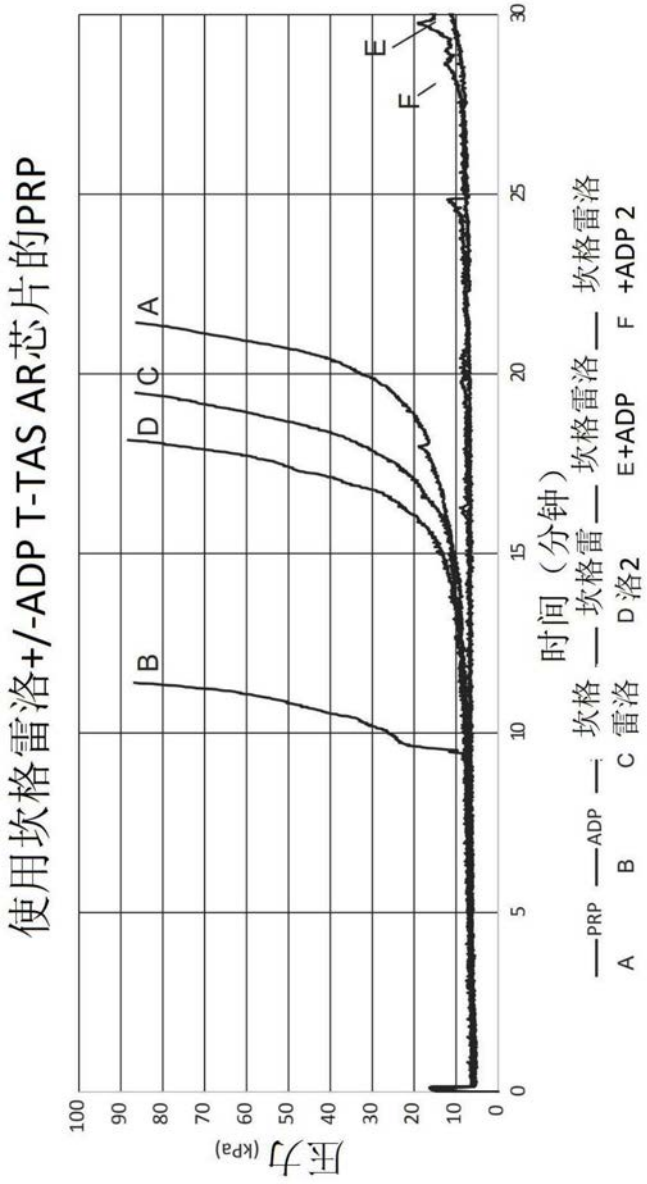

使用坎格雷洛+/-ADP T-TAS AR芯片的PRP
压力 (kPa)
时间（分钟）
PRP
ADP
坎格
坎格雷
坎格雷洛
坎格雷洛
A
B
C 雷洛
D 洛2
E+ADP
F +ADP 2
A
B
C
D
E
F

图2

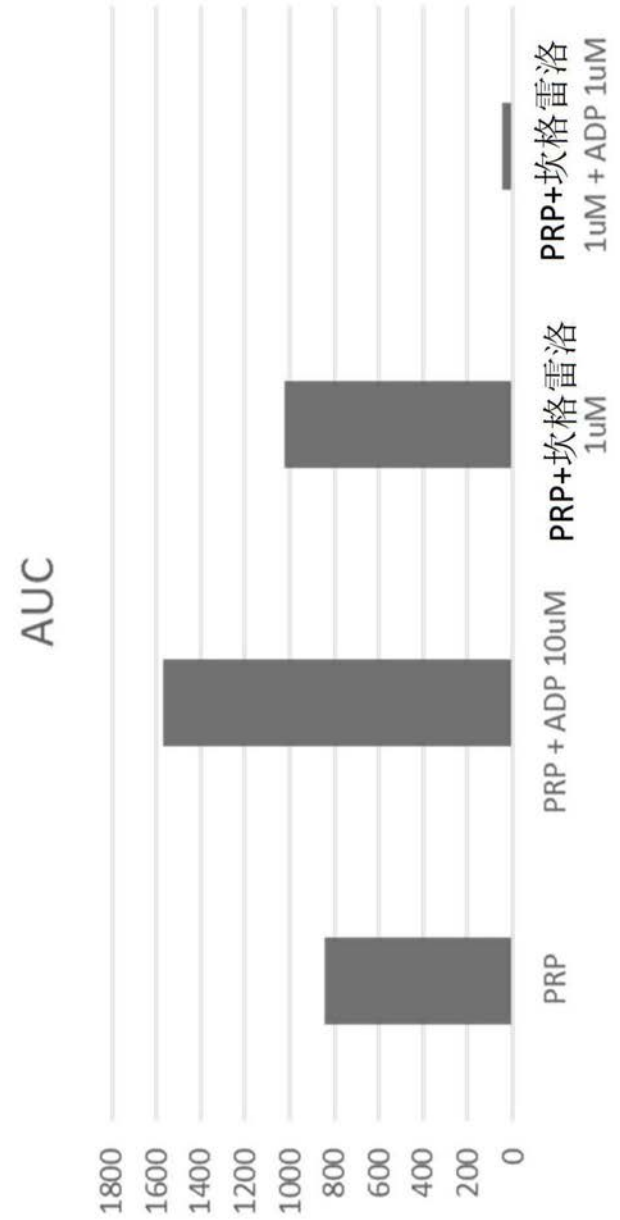

AUC
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PRP
PRP + ADP 10uM
PRP+坎格雷洛 1uM
PRP+坎格雷洛 1uM + ADP 1uM

图3

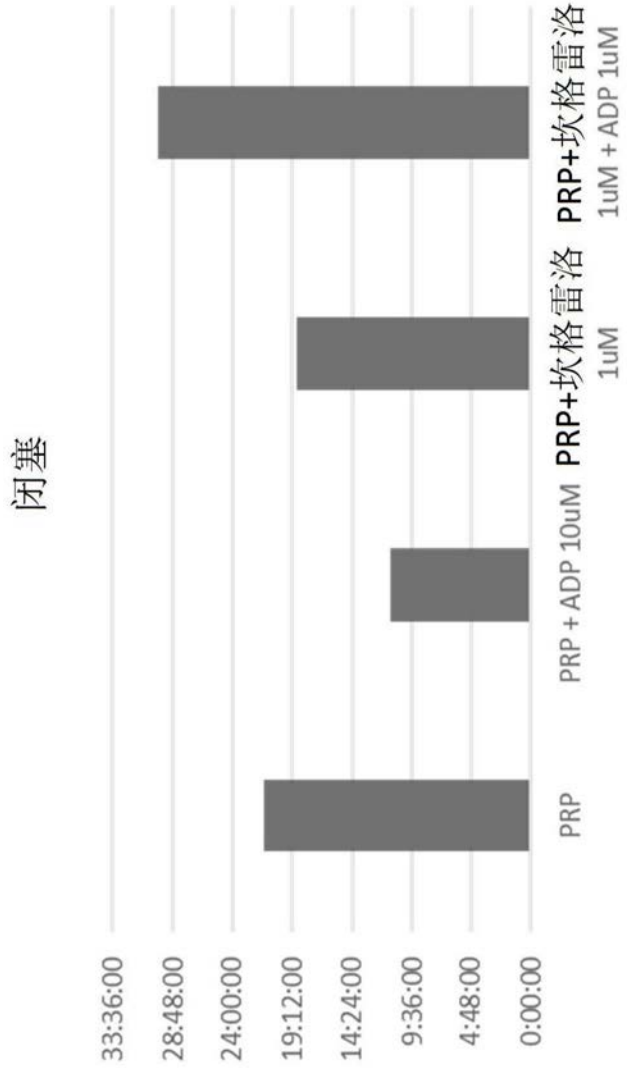

闭塞
33:36:00
28:48:00
24:00:00
19:12:00
14:24:00
9:36:00
4:48:00
0:00:00
PRP
PRP + ADP 10uM
PRP+坎格雷洛 1uM
PRP+坎格雷洛 1uM + ADP 1uM

图4

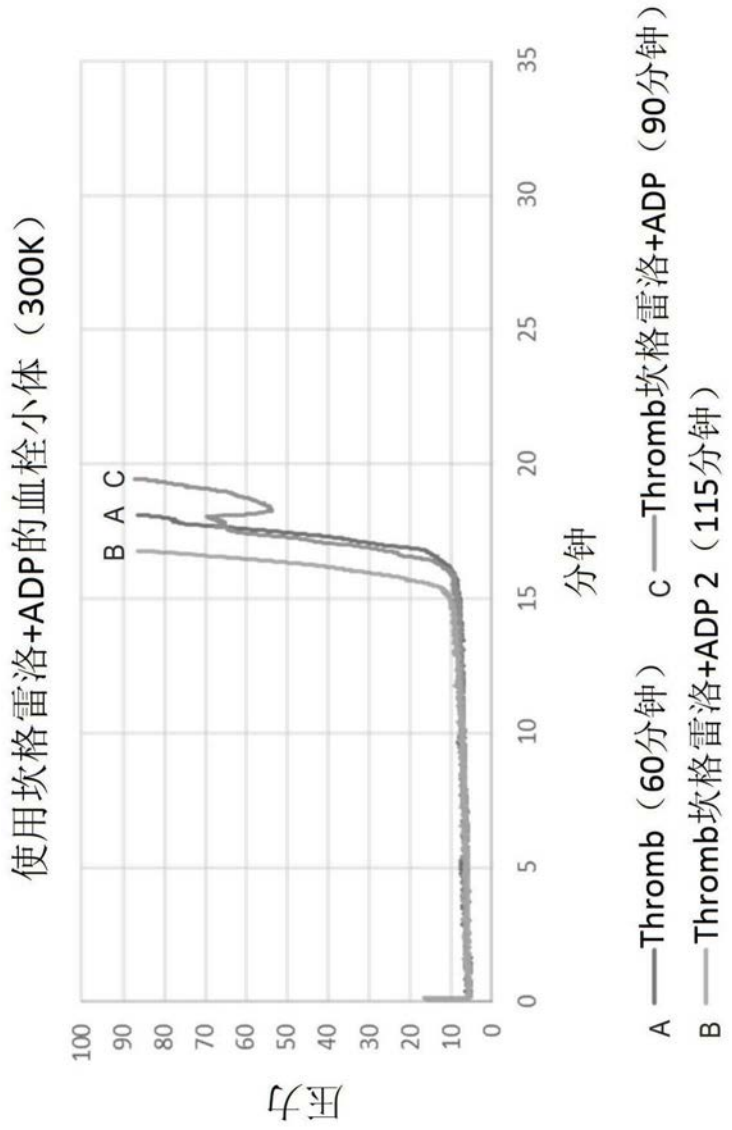

使用坎格雷洛+ADP的血栓小体（300K）
压力
分钟
B A C
A ——Thromb（60分钟）
B ——Thromb坎格雷洛+ADP 2（115分钟）
C ——Thromb坎格雷洛+ADP（90分钟）

图5

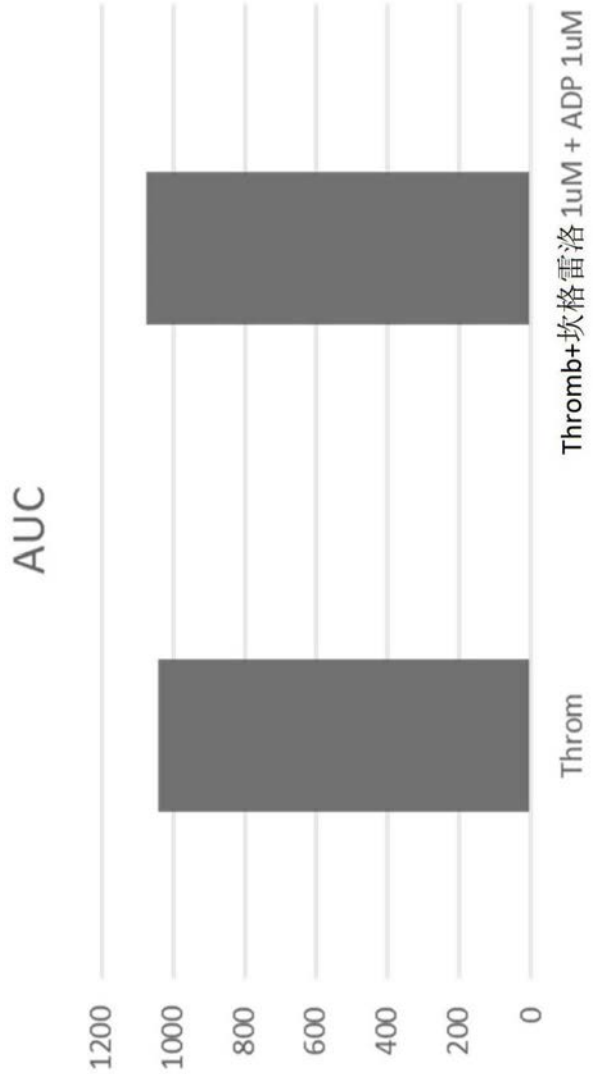


图6

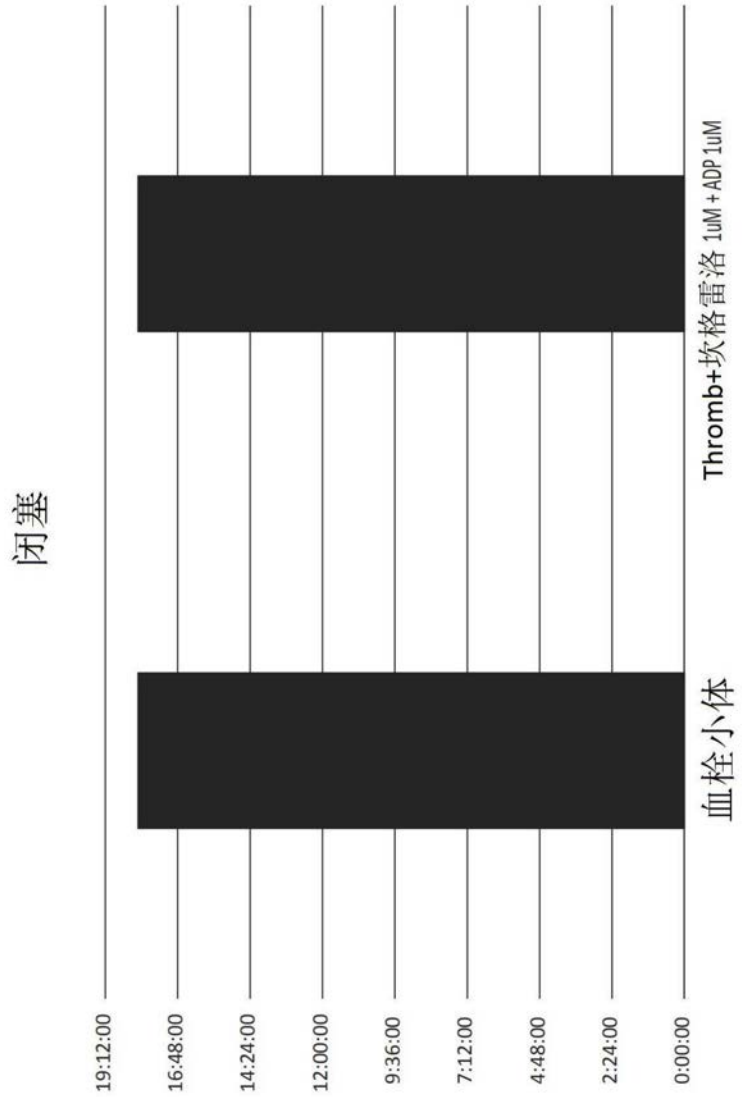

闭塞
血栓小体
Thromb+坎格雷洛 1uM+ADP 1uM
19:12:00
16:48:00
14:24:00
12:00:00
9:36:00
7:12:00
4:48:00
2:24:00
0:00:00

图7

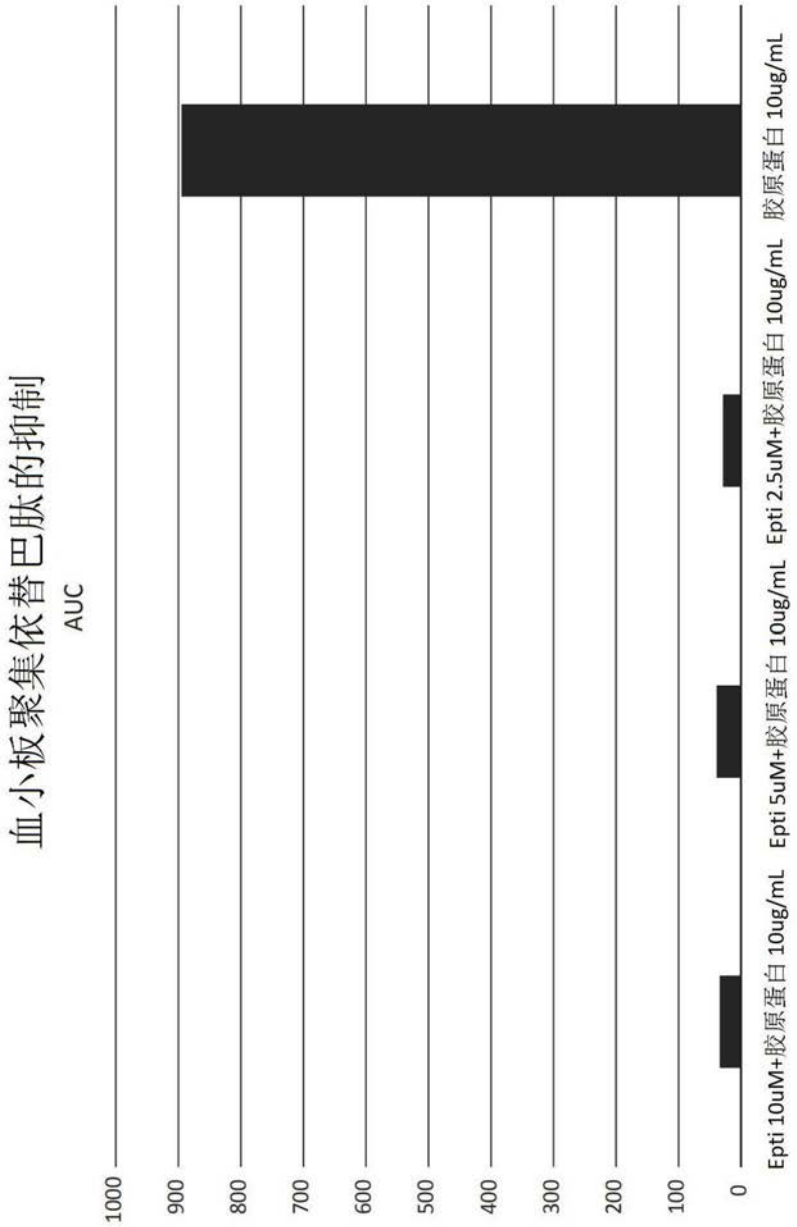

血小板聚集依替巴肽的抑制
AUC
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Epti 10uM+胶原蛋白 10ug/mL
Epti 5uM+胶原蛋白 10ug/mL
Epti 2.5uM+胶原蛋白 10ug/mL
胶原蛋白 10ug/mL

图8

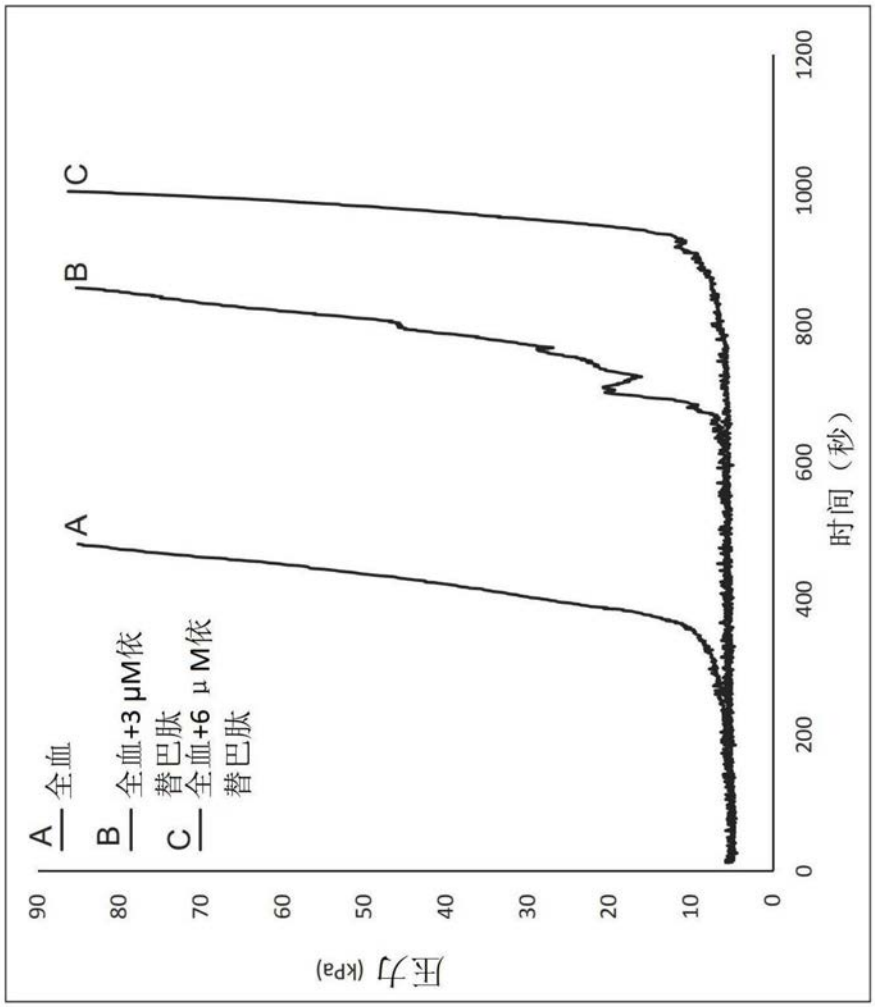

A 全血
B 全血+3 μM依
替巴肽
C 全血+6 μM依
替巴肽
压力 (kPa)
时间（秒）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
200
400
600
800
1000
1200

图9

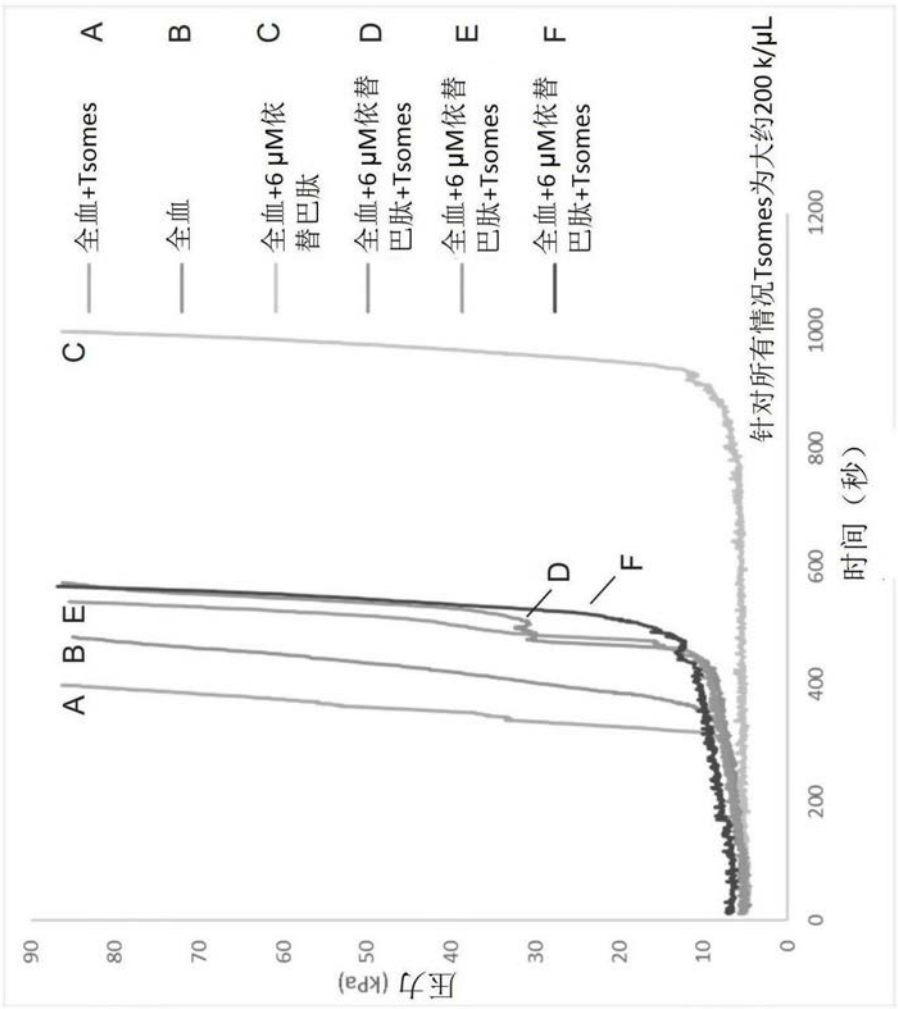

A 全血+Tsomes
B 全血
C 全血+6 μM依替巴肽
D 全血+6 μM依替巴肽+Tsomes
E 全血+6 μM依替巴肽+Tsomes
F 全血+6 μM依替巴肽+Tsomes
针对所有情况Tsomes为大约200 k/μL
压力 (kPa)
时间（秒）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
200
400
600
800
1000
1200

图10

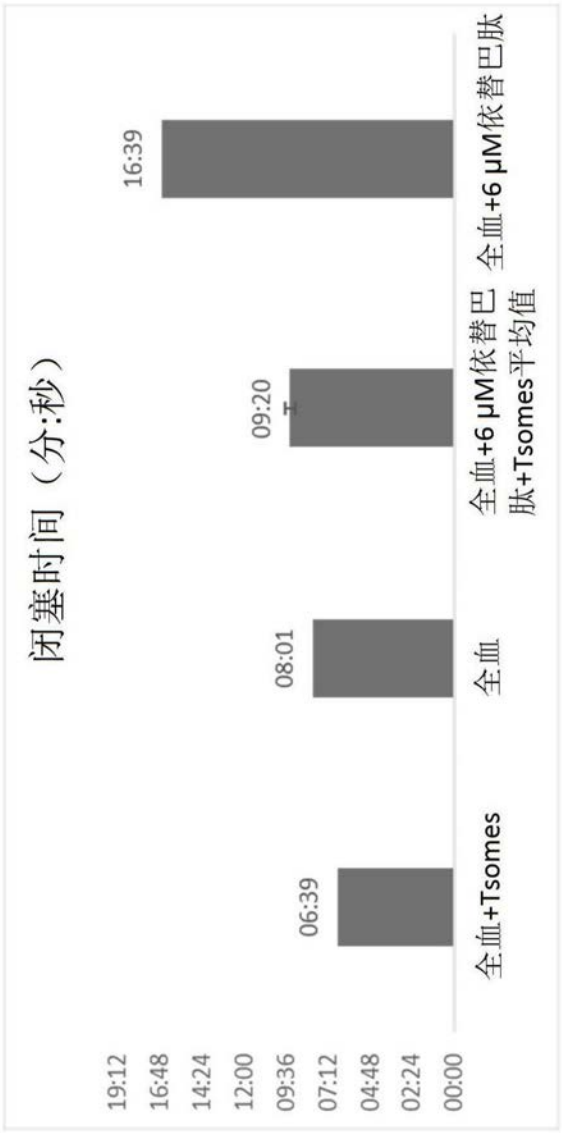

闭塞时间（分:秒）
19:12
16:48
14:24
12:00
09:36
07:12
04:48
02:24
00:00
06:39
08:01
09:20
16:39
全血+Tsomes
全血
全血+6 μM依替巴肽+Tsomes平均值
全血+6 μM依替巴肽

图11

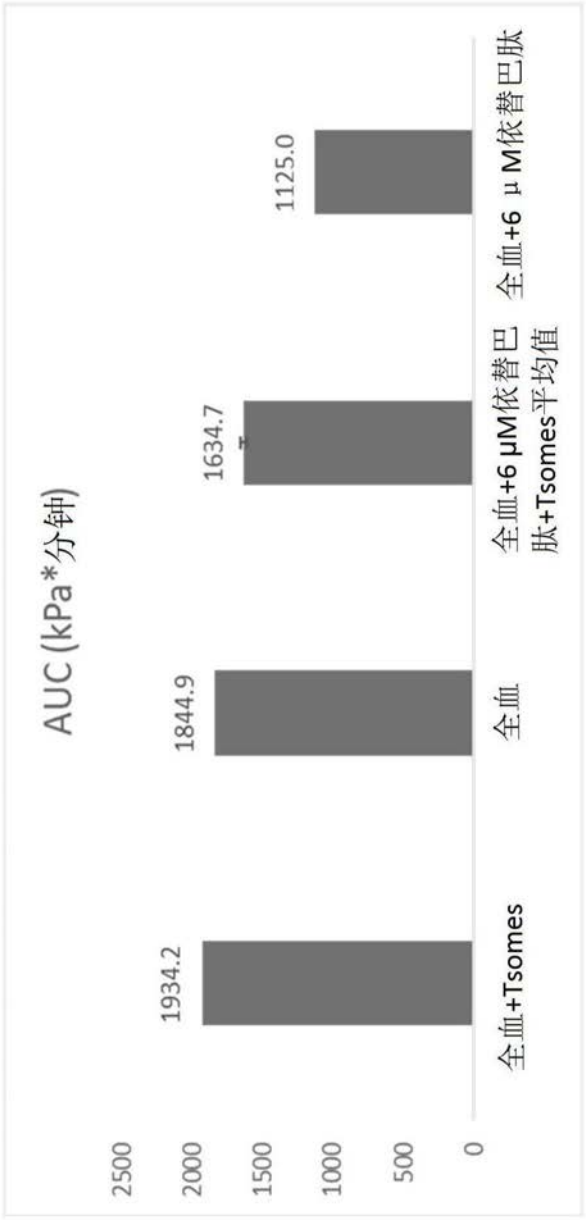

AUC (kPa*分钟)
2500
2000
1500
1000
500
0
1934.2
1844.9
1634.7
1125.0
全血+Tsomes
全血
全血+6 μM依替巴肽+Tsomes平均值
全血+6 μM依替巴肽

图12

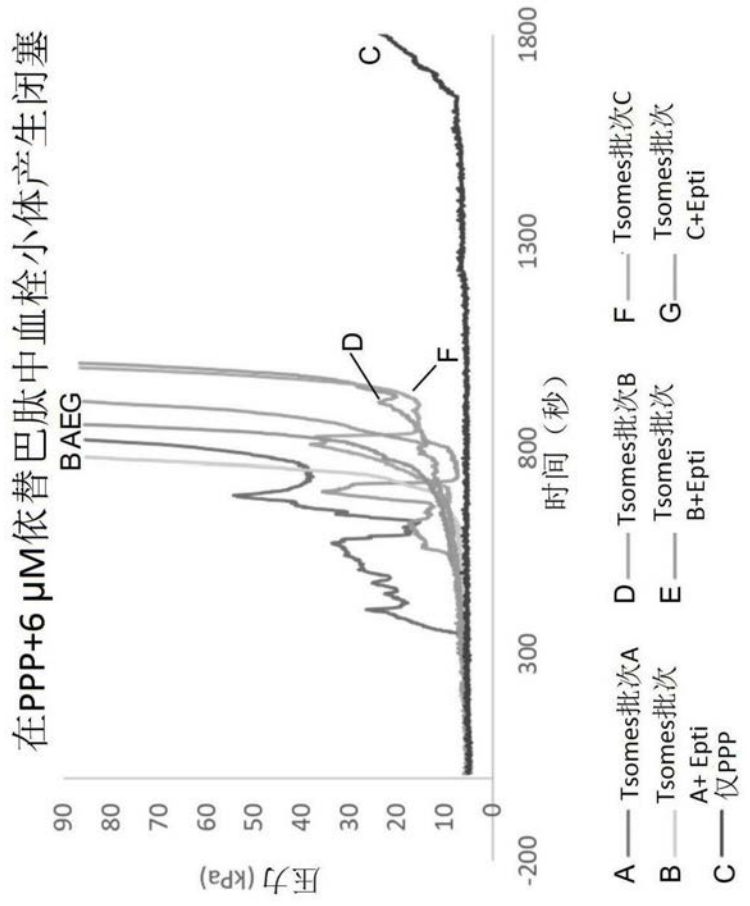

在PPP+6 μM依替巴肽中血栓小体产生闭塞
BAEG
压力(kPa)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-200
300
800
1300
1800
时间（秒）
C
D
F
A —— Tsomes批次A
B —— Tsomes批次 A+ Epti
C —— 仅PPP
D —— Tsomes批次B
E —— Tsomes批次 B+Epti
F —— Tsomes批次C
G —— Tsomes批次 C+Epti

图13

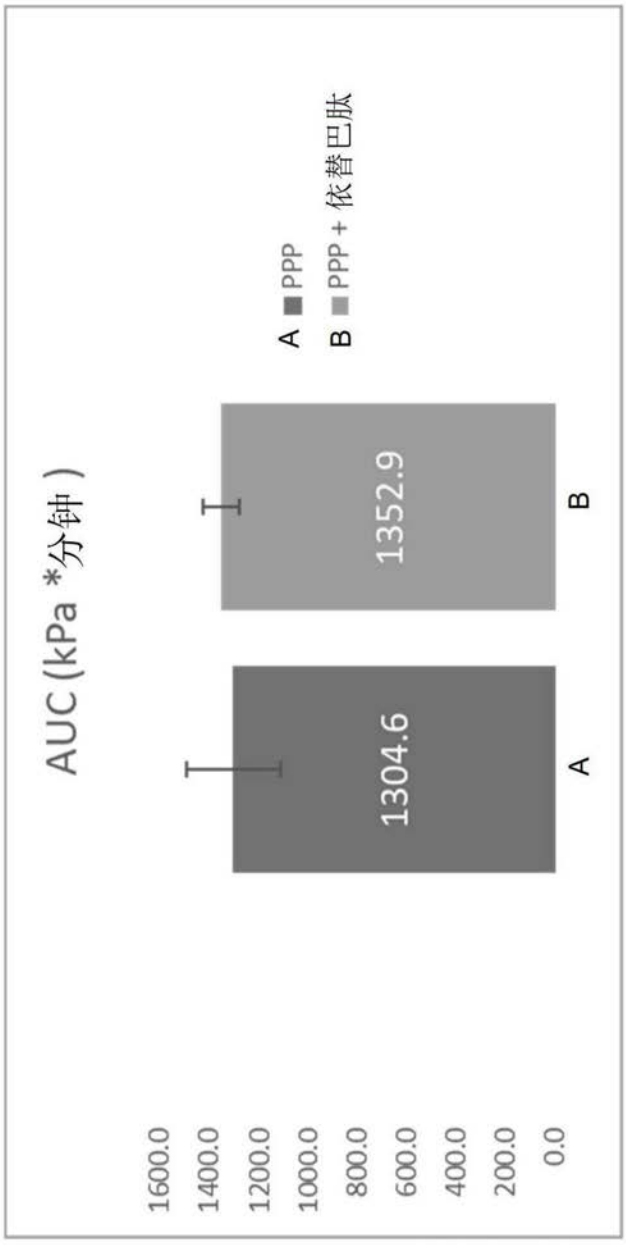

AUC (kPa *分钟)
1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
1304.6
1352.9
A
B
A PPP
B PPP + 依替巴肽

图14

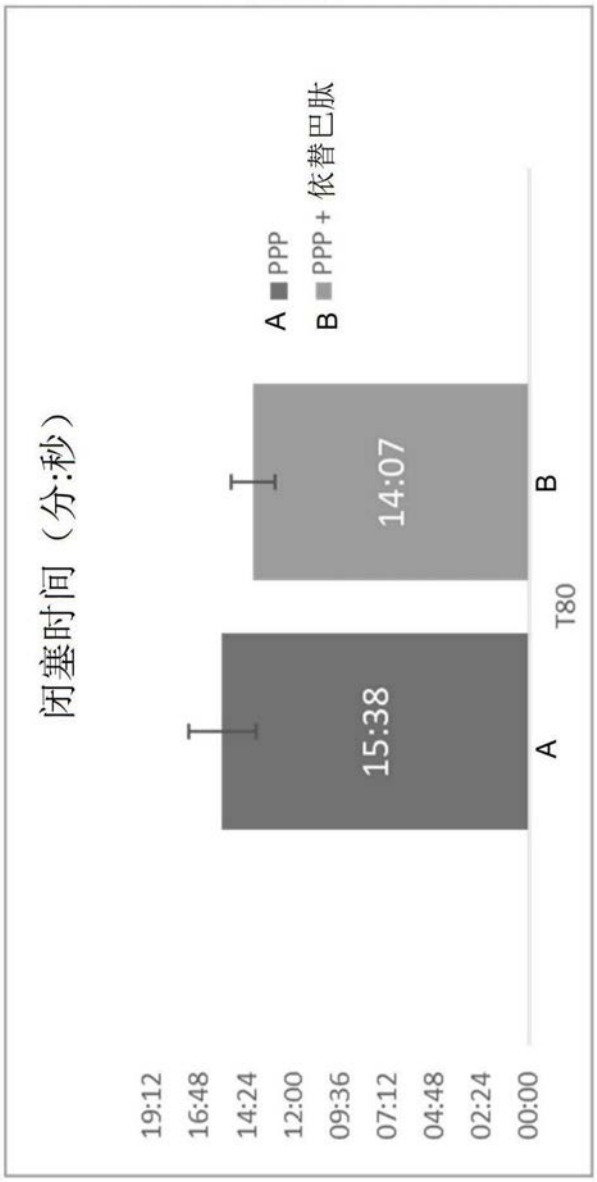

闭塞时间（分:秒）
19:12
16:48
14:24
12:00
09:36
07:12
04:48
02:24
00:00
A
B
T80
15:38
14:07
A PPP
B PPP + 依替巴肽

图15

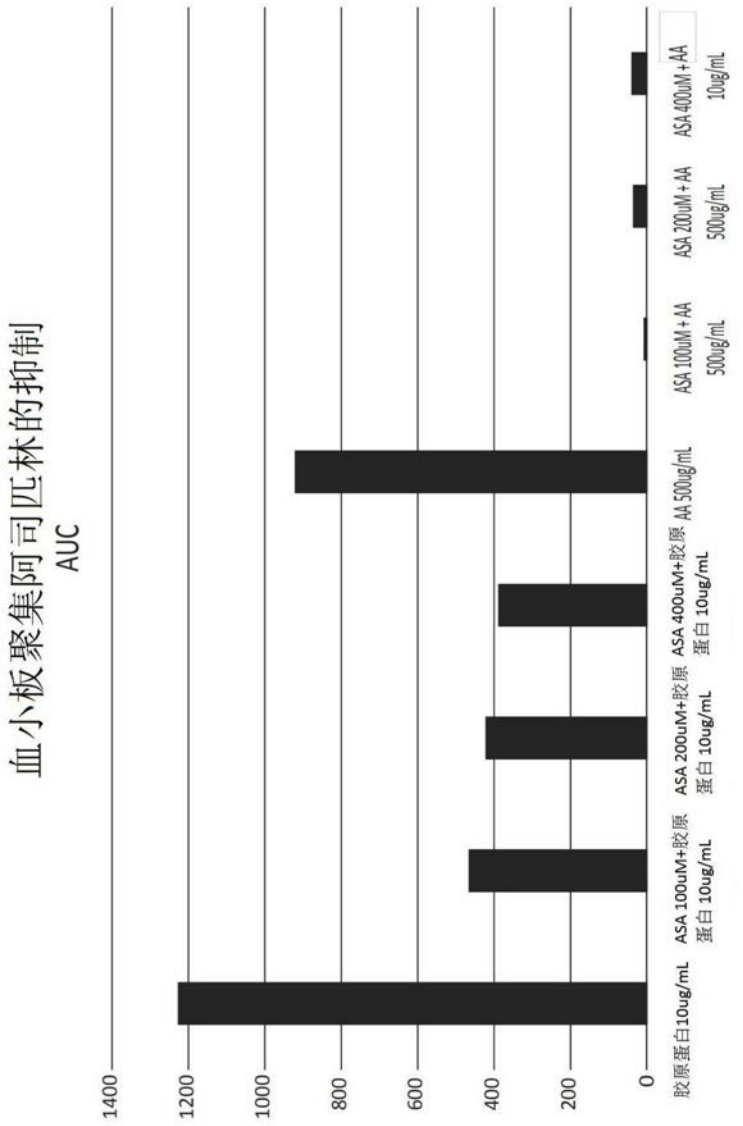

血小板聚集阿司匹林的抑制
AUC
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
胶原蛋白10ug/mL
ASA 100uM+胶原蛋白 10ug/mL
ASA 200uM+胶原蛋白 10ug/mL
ASA 400uM+胶原蛋白 10ug/mL
AA 500ug/mL
ASA 100uM+AA 500ug/mL
ASA 200uM+AA 500ug/mL
ASA 400uM+AA 10ug/mL

图16

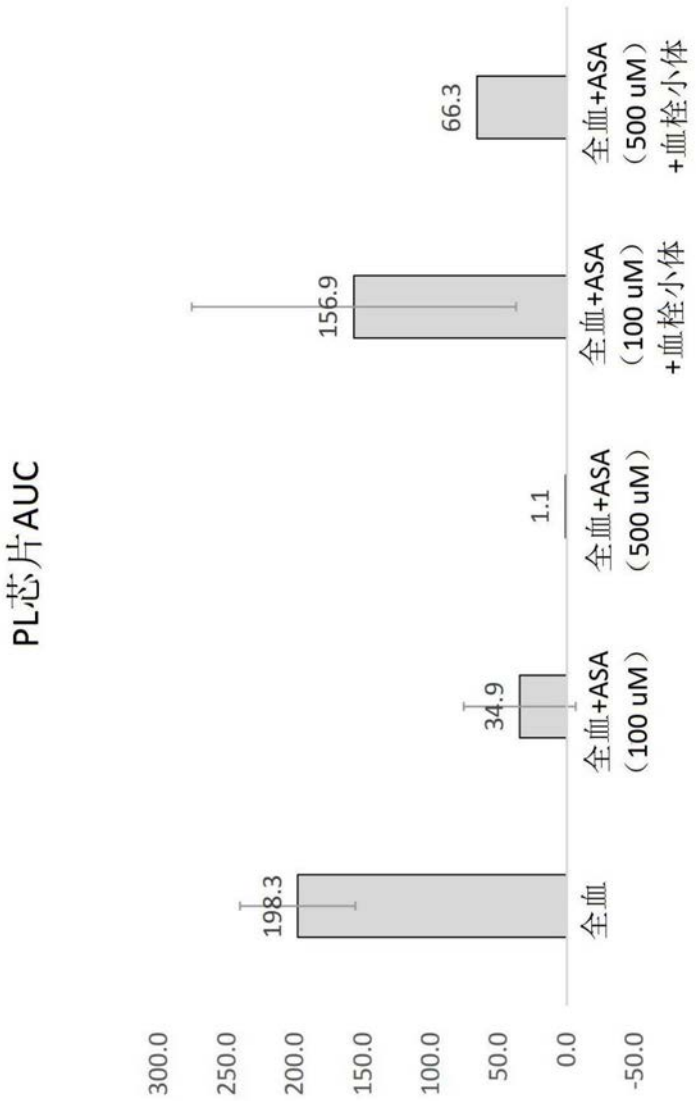

PL芯片AUC
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
-50.0
198.3
34.9
1.1
156.9
66.3
全血
全血+ASA（100 uM）
全血+ASA（500 uM）
全血+ASA（100 uM）+血栓小体
全血+ASA（500 uM）+血栓小体

图17

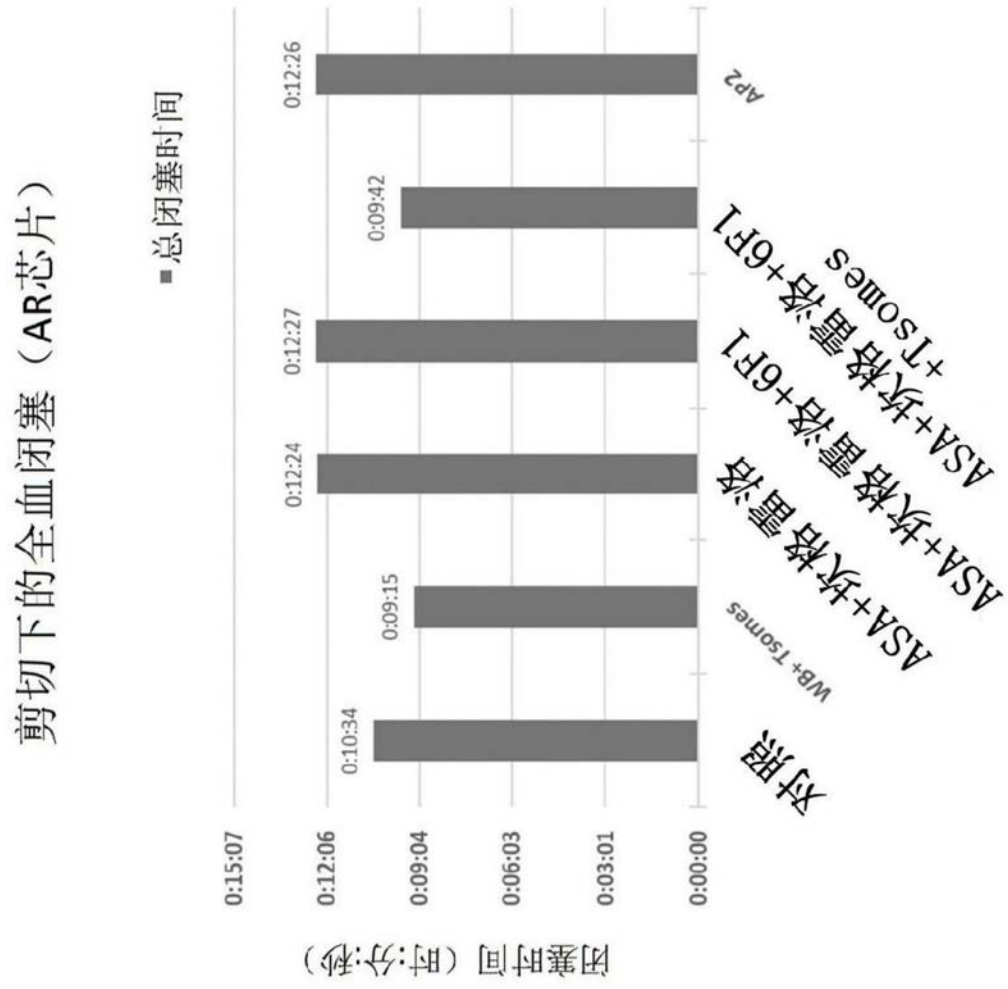

剪切下的全血闭塞（AR芯片）
总闭塞时间
0:12:26
0:09:42
0:12:27
0:12:24
0:09:15
0:10:34
AP2
ASA+苏格雷洛+6FI
ASA+苏格雷洛+6FI
ASA+苏格雷洛
对照
WB+Tsomes
0:15:07
0:12:06
0:09:04
0:06:03
0:03:01
0:00:00
闭塞时间（时:分:秒）

图18

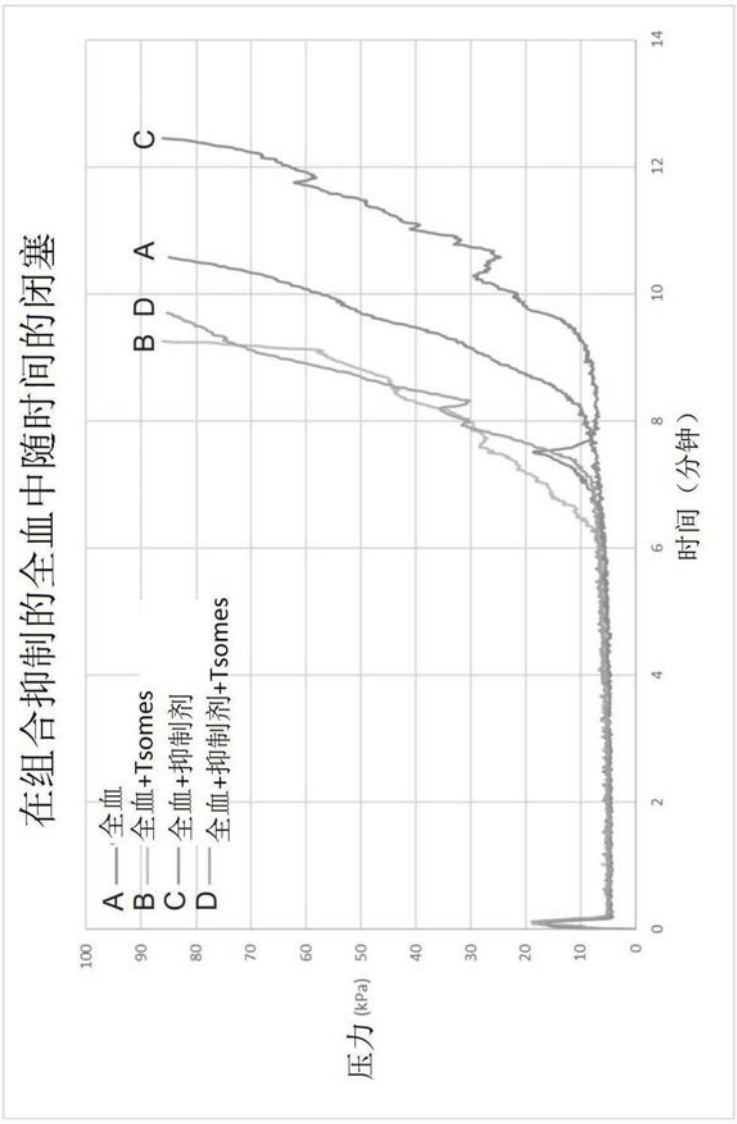

在组合抑制的全血中随时间的闭塞
A —全血
B —全血+Tsomes
C —全血+抑制剂
D —全血+抑制剂+Tsomes
压力 (kPa)
时间（分钟）
A
B D
C

图19

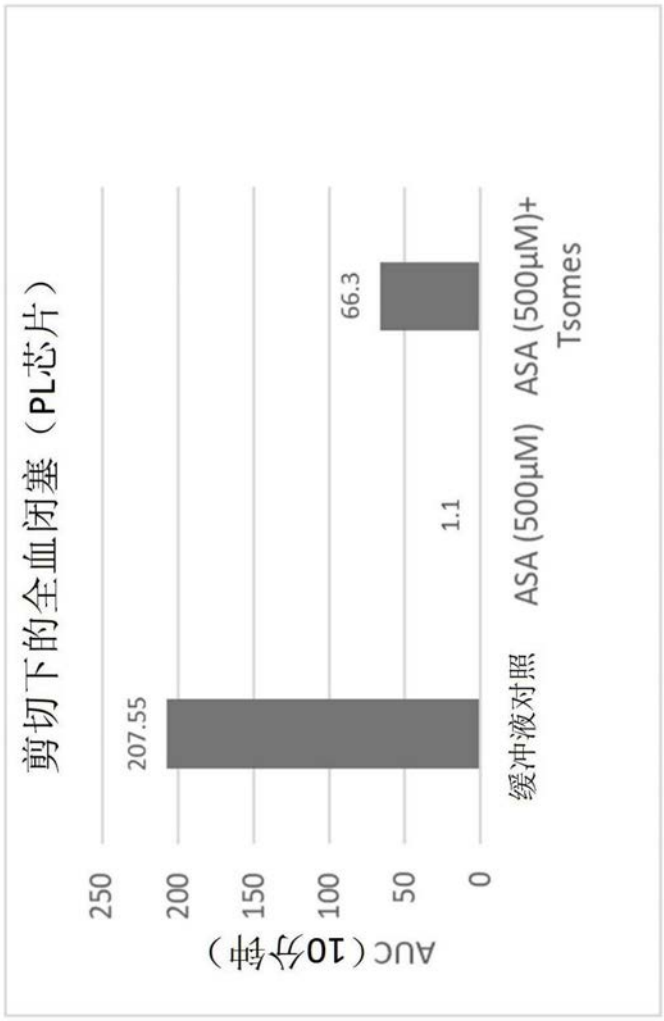

剪切下的全血闭塞（PL芯片）
AUC（10分钟）
250
200
150
100
50
0
207.55
1.1
66.3
缓冲液对照
ASA (500μM)
ASA (500μM)+ Tsomes

图20

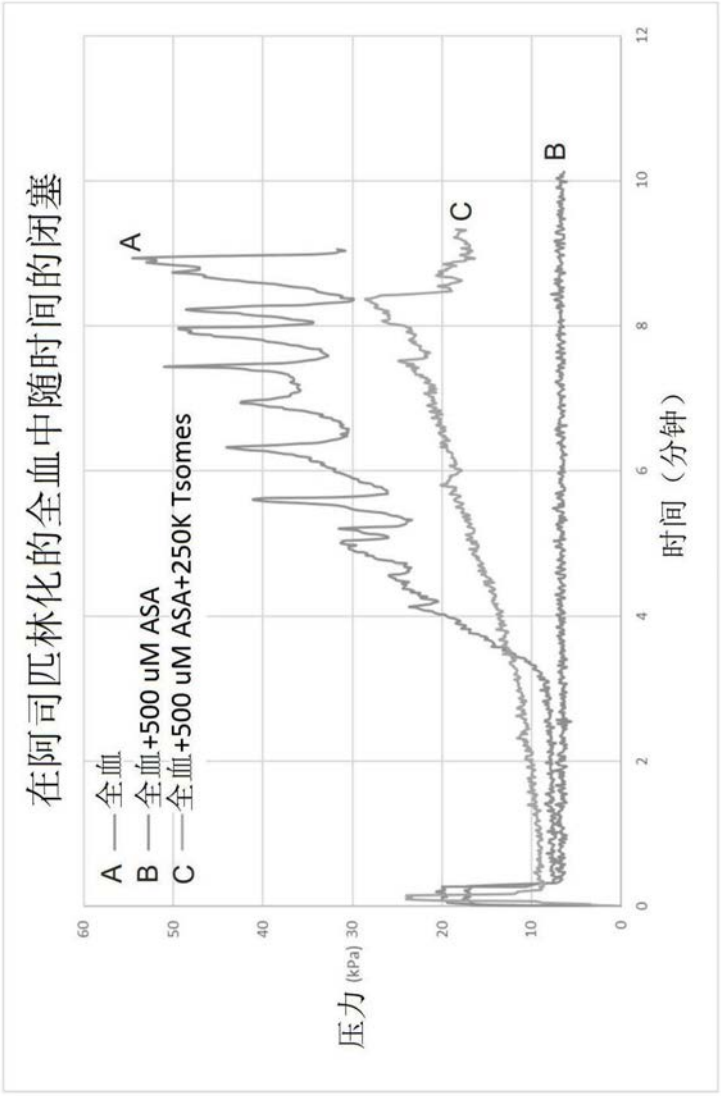

在阿司匹林化的全血中随时间的闭塞
A —全血
B —全血+500 uM ASA
C —全血+500 uM ASA+250K Tsomes
压力 (kPa)
时间（分钟）
A
B
C
0
10
20
30
40
50
60
0
2
4
6
8
10
12

图21

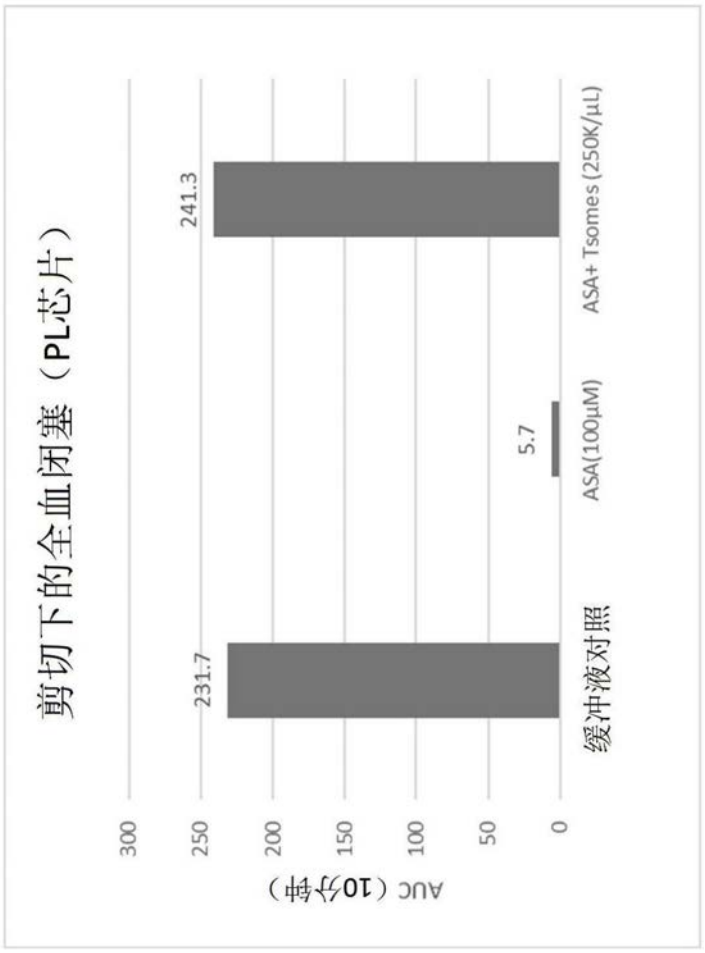

剪切下的全血闭塞（PL芯片）
AUC（10分钟）
300
250
200
150
100
50
0
231.7
5.7
241.3
缓冲液对照
ASA(100μM)
ASA+ Tsomes (250K/μL)

图22

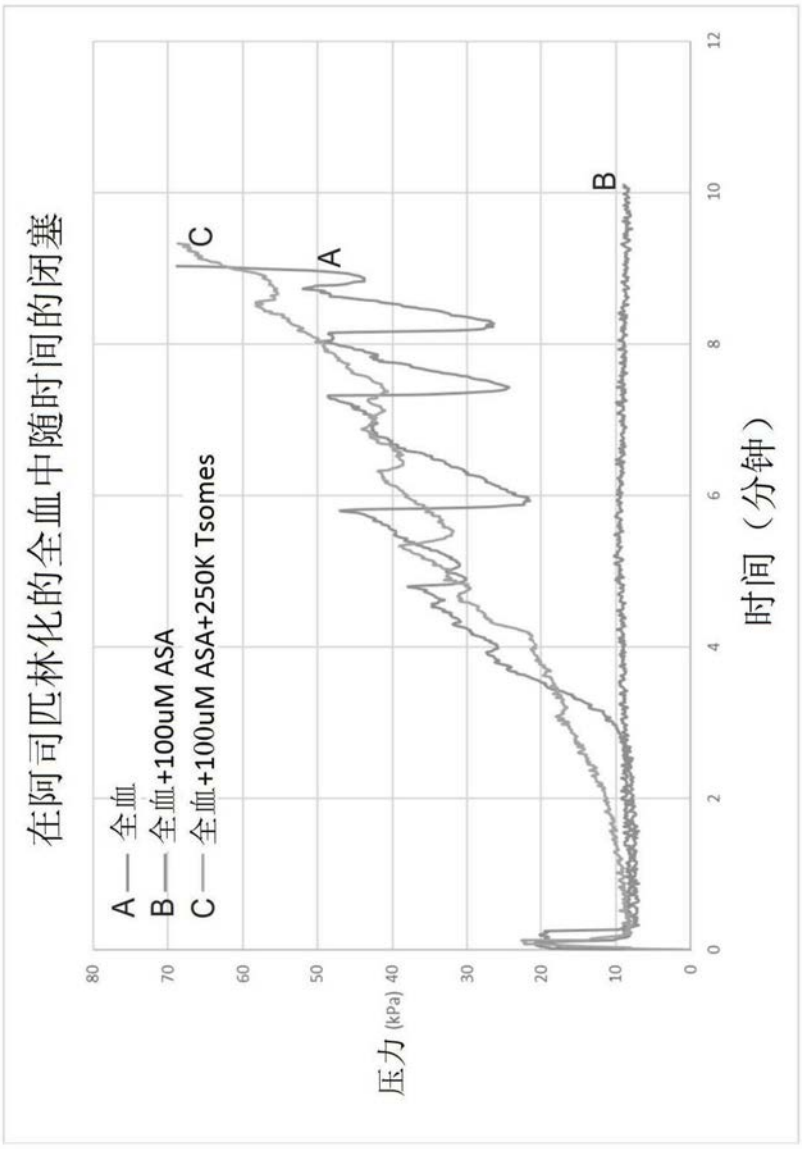

在阿司匹林化的全血中随时间的闭塞
A— 全血
B— 全血+100uM ASA
C— 全血+100uM ASA+250K Tsomes
压力 (kPa)
时间（分钟）
A
B
C
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
2
4
6
8
10
12

图23

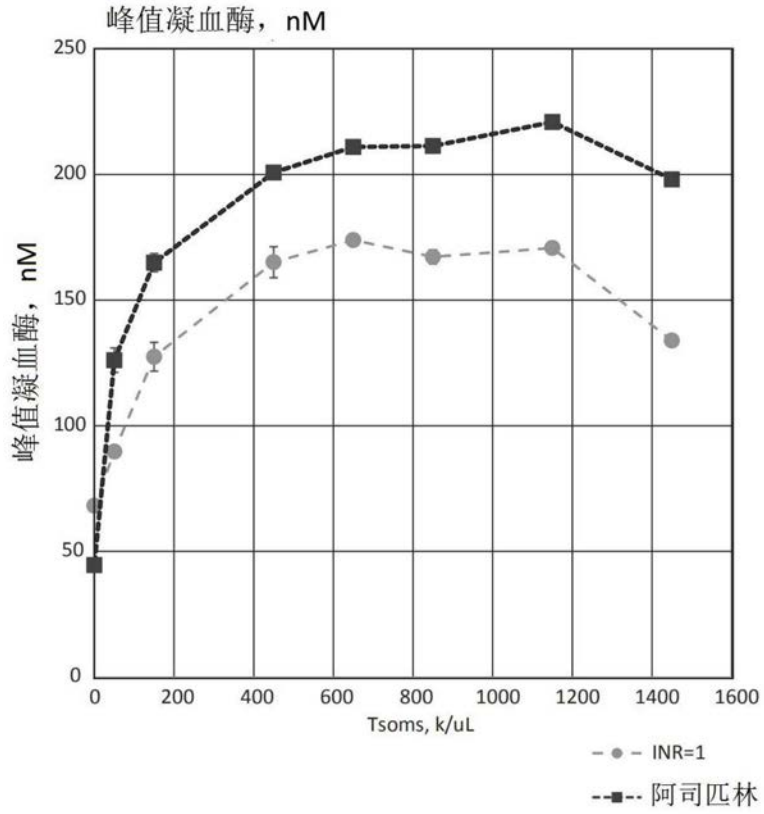

峰值凝血酶，nM
250
200
150
100
50
0
峰值凝血酶，nM
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Tsoms, k/uL
INR=1
阿司匹林

图24

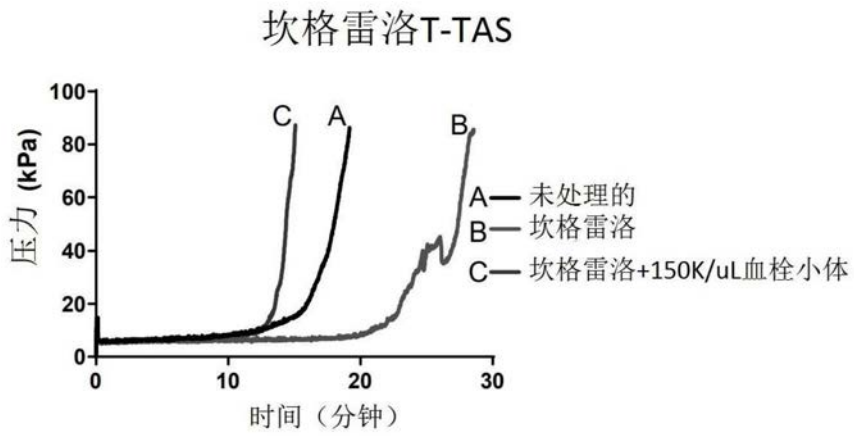

坎格雷洛T-TAS
100
80
60
40
20
0
压力 (kPa)
C
A
B
0
10
20
30
时间（分钟）
A— 未处理的
B— 坎格雷洛
C— 坎格雷洛+150K/uL血栓小体

图25A

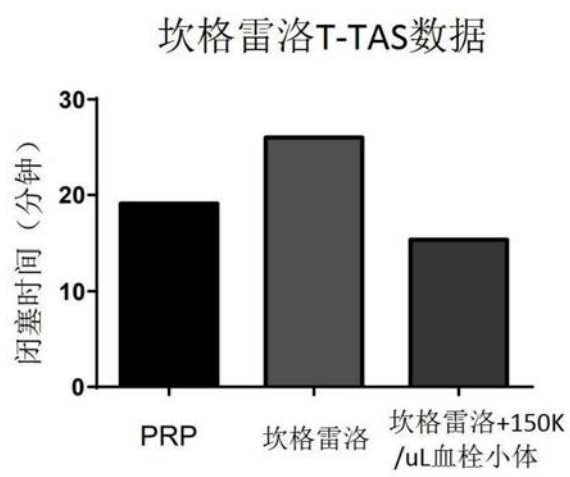


图25B

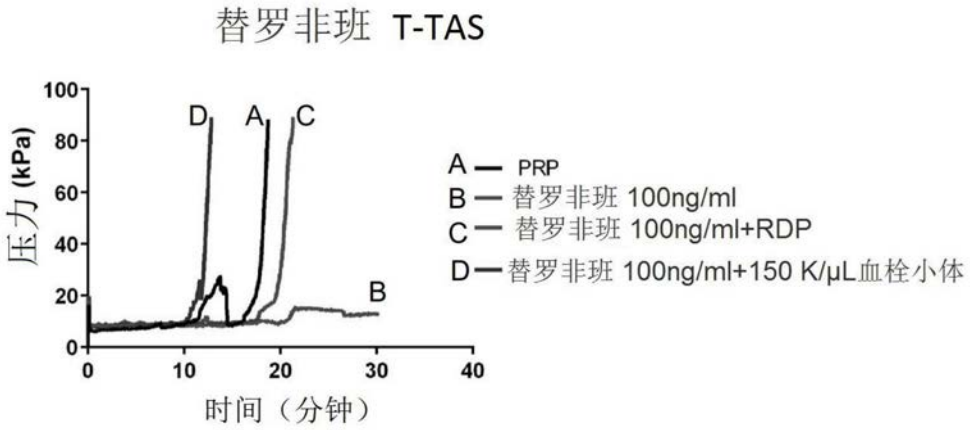


图26A

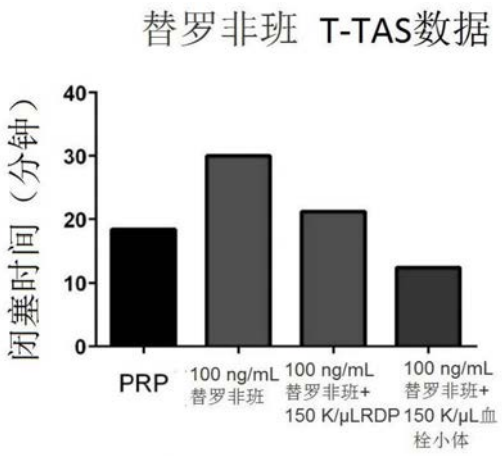


图26B

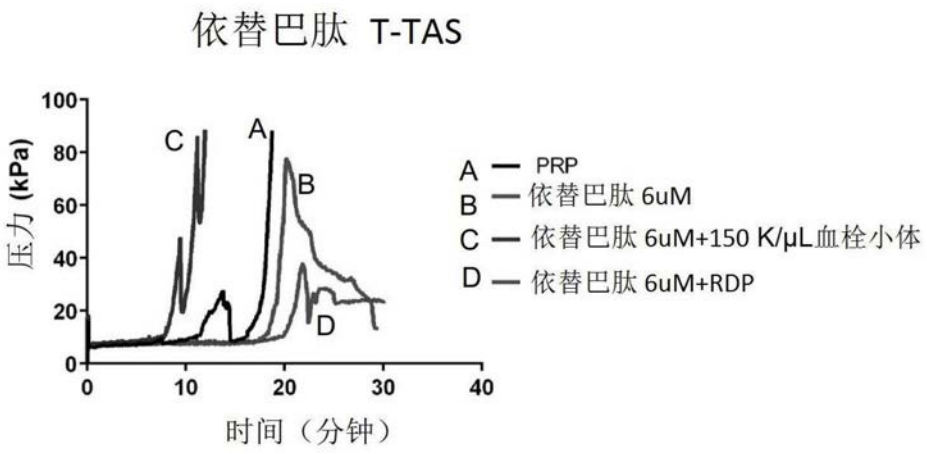


图27A

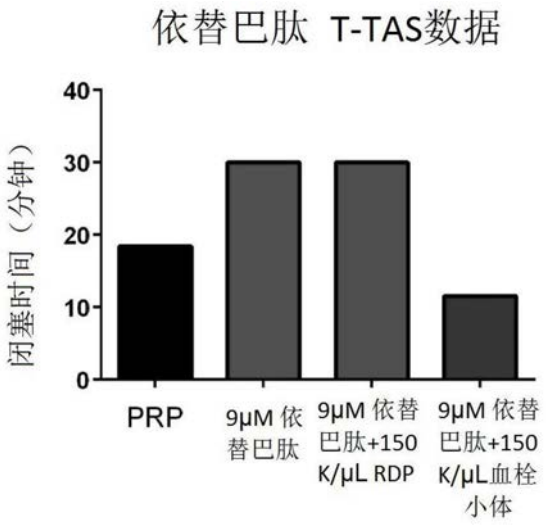


图27B

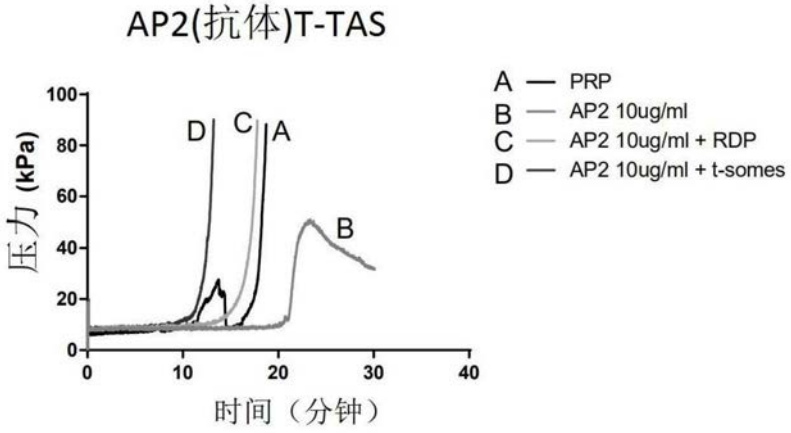


图28A

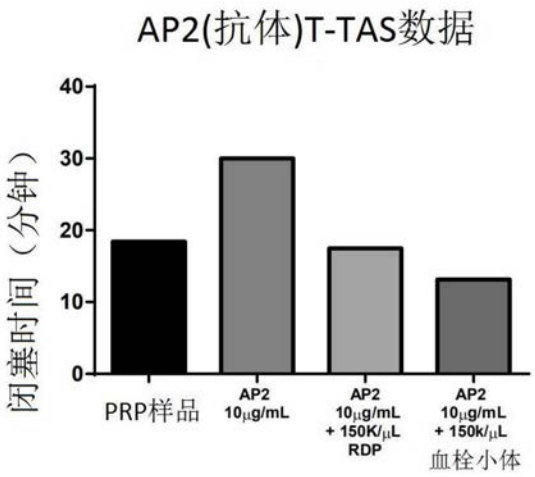


图28B

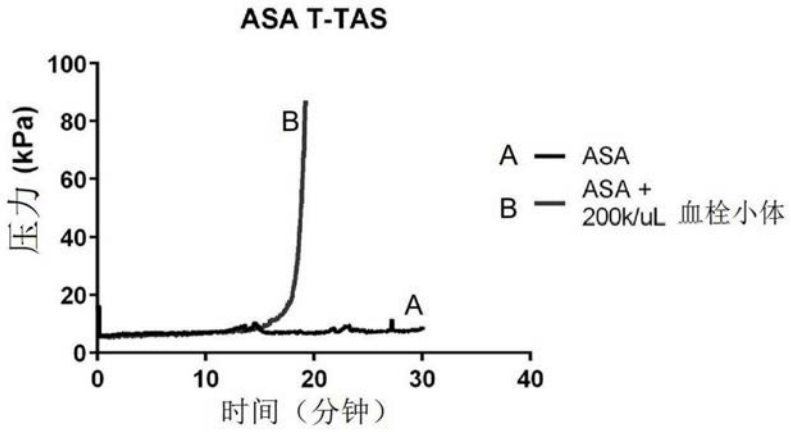


图29A

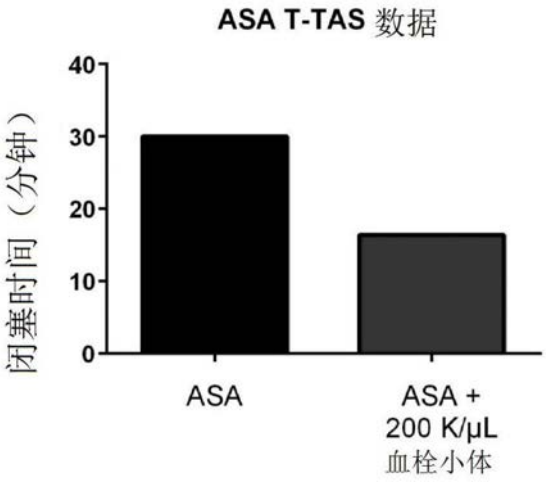


图29B

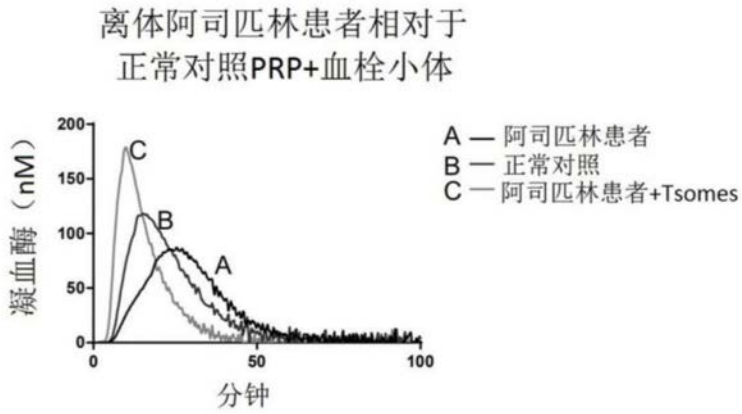


图30A

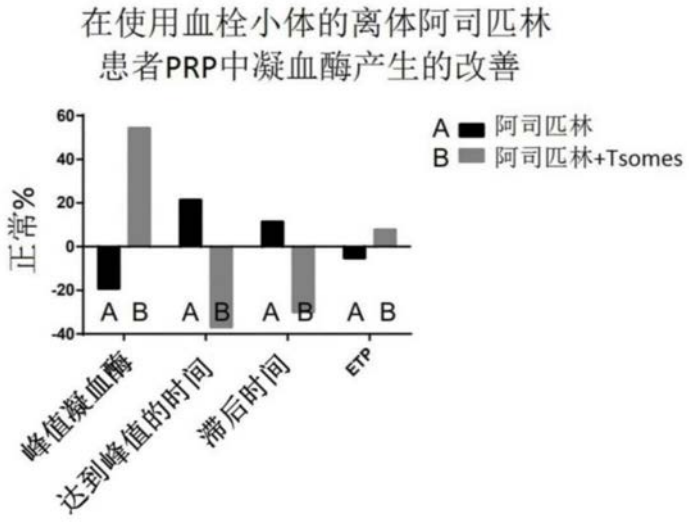


图30B

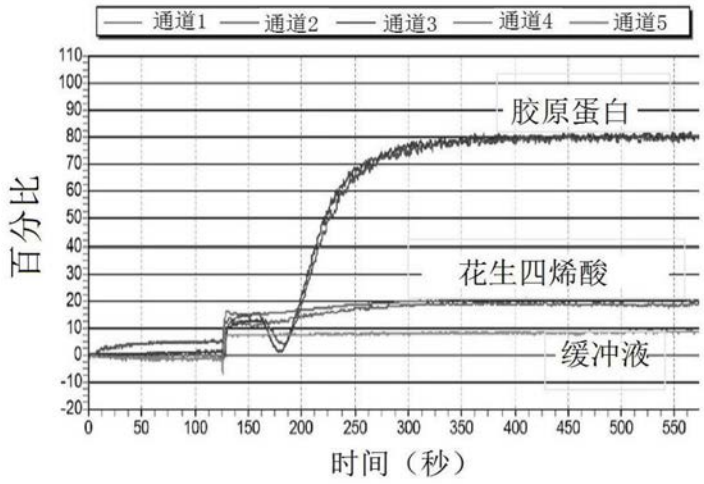


图31A

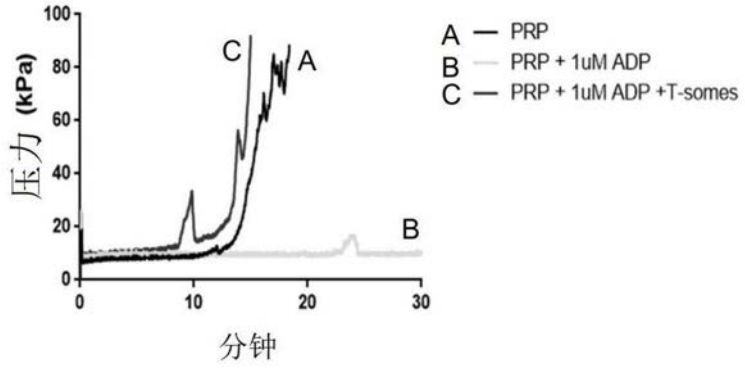

100
80
60
40
20
0
压力 (kPa)
0
10
20
30
分钟
C
A
B
A — PRP
B PRP + 1uM ADP
C — PRP + 1uM ADP +T-somes

图31B

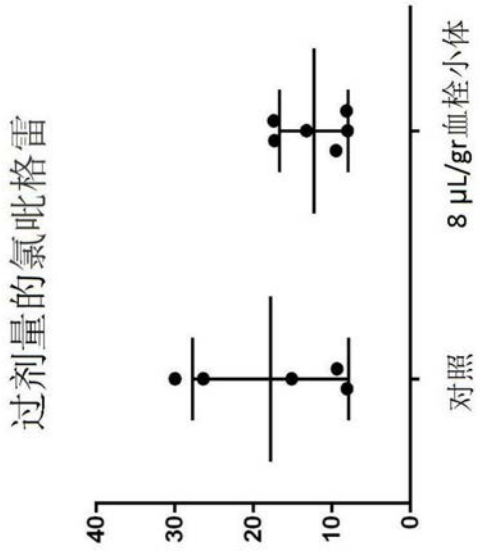

过剂量的氯吡格雷
40
30
20
10
0
对照
8 μL/gr血栓小体

图32