



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 306761

(13) B1

(51) Int Cl⁶ A 61 K 35/14, C 12 N 7/04, 7/06

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19914024	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	12.04.1990, PCT/US90/01989
(22) Inng. dag	14.10.1991	(85) Videreføringsdag	14.10.1991
(24) Løpedag	12.04.1990	(30) Prioritet	14.04.1989, US, 337916
(41) Alm. tilgj.	14.10.1991		
(45) Meddelt dato	20.12.1999		

(73) Patenthaver	PRP Inc, 45 Border Street, West Newton, MA 02165, US
(72) Oppfinner	Francis Chao, Newton, MA, US
(74) Fullmektig	J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et blodplateavledet produkt**

(56) Anførte publikasjoner US 4760131, US 4540573
Biological Abstract, vol. 82, no. 8, 1986, George et al, "Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate."

(57) Sammendrag Varmebehandlet, virus-inaktivert platemembran-mikropartikkel-fraksjon er tilveiebragt. Mikropartikkelen kan fremstilles fra foreldede plater. Mikropartikkelfraksjonen inneholder i alt vesentlig ikke alloantigener og GP IIb/IIIa komplekser og kan anvendes som et farmasøytisk preparat i transfusjoner.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et blodplateavledet produkt, med prokoagulerende aktivitet. Disse og andre trekk ved oppfinnelsen fremgår av patentkravene.

- 5 Oppfinnelsen vedrører mere spesielt fremstilling av et blodplatemembran mikropartikkelpreparat for anvendelse i transfusjoner for å kontrollere blødning.

Kroppen til et normalt voksent individ inneholder fra 4,0 til
10 5,5 liter blod som består av omtrent 60 % væske (plasma) og 40 % dannede elementer (røde blodlegemer, hvite blodlegemer og blodplater). Under normale fysiologiske forhold har blodplatene som hovedfunksjon å forhindre blødning. Blodplater dannes i benmargen fra forløperceller som kalles
15 megakaryocytter og har en levetid på fra 8 til 10 døgn i sirkulasjon. Som en følge av denne korte levetid, forekommer blodplatemangel raskt når benmargens evne til å produsere blodplater nedsettes, slik som hos cancerpasienter som gjennomgår kjemoterapi. Blodplatemangel kan også forekomme
20 som et resultat av forskjellige sykdommer, f.eks. når antistoffer dannes in vivo mot blodplateoverflate-glykoproteiner eller mot andre blodplateoverflateantigener. Slik reduksjon eller ødeleggelse av blodplater resulterer i en utilstrekkelig mengde sirkulerende blodplater (en tilstand
25 som omtales som trombocytopeni) og kan føre til ukontrollert blødning. Blodplatemangel kan også være et resultat av operative inngrep som f.eks. involverer sirkulasjon utenfor legemet og som er tilbøyelig til å ødelegge sirkulerende blodplater. Klinisk behandling av trombocytopeni har typisk
30 involvert transfusjon av friske, intakte blodplater.

Man mener hovedsakelig at kun metabolsk aktive, intakte blodplater kan virke in vivo for å stanse blødning. Følgelig har transfusjonsterapi vært avhengig av tilveiebringelsen av
35 friske, levedyktige blodplater med høy kvalitet. Blodplater for transfusjon fremstilles typisk fra: (a) blodenheter fra nytappet blod som kalles tilfeldig-donor blodplater eller (b) fra en enkelt donor ved aferese, kalt enkelt-donor blod-

plater. Disse transfusjonsprodukter er plasmasuspensjoner av friske, konsentrerte, intakte blodplater.

En vesentlig ulempe ved den nåværende praksis i forbindelse med blodplatetransfusjon er den korte holdbarhet for intakte blodplater på fra tre til fem døgn. En rekke blodplateenheter som samles ved sykehus, blodbanker og liknende kastes dessverre pga. at de er blitt for gamle. På grunn av deres korte holdbarhet er det svært vanskelig å opprettholde et stort lager av blodplateenheter. Dette problemet er særlig kritisk i forbindelse med desentraliserte operasjoner, som i det militære, sivilforsvaret og ved katastrofeenheter.

En rekke erstatninger for intakte, levedyktige blodplater er forsøkt for transfusjon både klinisk og i dyremodeller. I 1956 (1) ble det rapportert at det ble oppnådd hemostase etter klinisk tilførsel av frysetørkede blodplater, noe som foreslår at platenes morfologiske integritet ikke er essensiell for retensjonen av i det minste noen av in vivo funksjonene hos intakte blodplater. En viktig bivirkning i forbindelse med intravenøs tilførsel av frysetørket plate-material var at pasientene fikk store smerter på infusjonsstedet, noe som muligens skyldes vasospasme forårsaket av det høye serotonininnhold i det frysetørkede material. I motsetning til det ovennevnte resultat, ble det i 1959 (2) rapportert at preparater fra friske, ultralyd-nedbrutte hele plater ikke reduserte antall erythrocytter i lymfen hos hunder med trombocytopeni. Senere har McGill (3) rapportert at transfusjon av blodplatemembran-konsentrater forkortet blødningstiden i kaniner med trombocytopeni. Konsentratet inkluderte "ghost"-plater med størrelse som en normal blodplate og som inneholdt mitokondrier og rester av overflateforbindelsessystemet. McGill's konsentrat ble fremstilt ved: (1) sentrifugering av helblod fra kaniner til pelleter av friske blodplater, (2) nedfrysing av pelleten ved -65°C , (3) tining og deretter frysing og tining av pelleten to ganger og (4) vasking og resuspending av pelleten i platefritt plasma.

Ved fremstilling av de ovennevnte blodplatemembran-fraksjoner, ble temperaturer på omtrent 4°C eller mindre opprettholdt. Slike temperaturer er standard når man arbeider med biologiske materialer hvis aktivitet tapes i løpet av svært korte intervaller når de biologiske materialer utsettes for høyere temperaturer. Proteiner som enzymer kan f.eks. inaktiveres ved oppvarming til omtrent 60°C. Aktivitet kan til og med tapes ved 4°C. Det er f.eks. rapportert at delvis rensede blodplatefaktor 3 (PF-3) taper en stor del av koagulasjonsaktiviteten etter 5 døgns lagring ved 4°C (4). (PF-3 synes å være forbundet med et blodplatemembran-kompleks som gir en katalytisk overflate til å fremme trombindannelse). Slik tap av aktivitet er av stor viktighet når man ser på anvendelsen av en blodplatefraksjon som et farmasøytisk middel.

Ved fremstilling av en blodplatefraksjon for anvendelse i mennesker, er det selvfølgelig nødvendig å anvende sterile forhold. Som ved transfusjoner av fullblod, vil anvendelse av donerte blodplateenheter utsette mottakeren for risikoen med overføring av sykdommer som AIDS, hepatitt eller andre transfusjonsrelaterte sykdommer. En annen risiko er at etter flere transfusjoner, kan mottakeren/pasienten utvikle antistoffer mot de donerte blodplater (en tilstand kjent som alloimmunisering). Slike antistoffer kan gi rask nedbrytning av de overførte blodplater. Videre er bakteriell kontaminering av lagrede blodplater en betydelig risiko i forbindelse med transfusjoner.

Foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte for fremstilling av et blodplateavledet produkt med prokoagulerende aktivitet, som er kjennetegnet ved at et preparat som inneholder blodplater eller blodplatemembranfragmenter med prokoagulerende aktivitet varmebehandles ved minst 60°C for å inaktivere ethvert virus som er inneholdt i nevnte preparat, hvorefter produktet isoleres, idet ett eller flere av de følgende trinn eventuelt utføres:

- preparatet ultralydbehandles etter varmebehandlingen,
- preparatet frysetørkes etter ultralydbehandlingen,

- i alt vesentlig alt GP IIb/IIIa kompleks i preparatet fjernes, og
- det isolerte produkt frysetørkes.

5 Ved den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes det farmasøytiske og diagnostiske produkter som er avledet fra blodplatemembraner i henhold til nye metoder. Produktene inkluderer blodplatemembranfragmentpreparater med prokoagulerende aktivitet og som kan anvendes som transfusjons-

10 substituenten for hele blodplater for å kontrollere blødning, som kan anvendes topisk for å fremme heling av sår og som kan anvendes som et diagnostisk middel in vitro eller in vivo.

Blodplatemembranfragmentpreparatet inneholder ikke aktivt

15 virus. Blodplatemembranfragmentpreparatet varmebehandles for å redusere eller fjerne viruskontaminering så vel som bakteriell kontaminering. Skjønt preparatet varmebehandles, beholder det overraskende de prokoagulerende og hemostatiske egenskapene. Dessuten er det varmebehandlede membranfragment

20 mere stabilt enn forventet. Preparatet kan lagres i oppløsning ved 4°C i minst 8 uker uten signifikant tap av prokoagulerende aktivitet i minst 6 måneder (større en 90 % bibeholdt). Det bibeholder aktiviteten (større enn 90 %) selv etter frysetørking. I tillegg forandres ikke protein-

25 og fosfolipidinnholdet etter frysetørking og lagring i 6 måneder.

Preparatet er særlig ikke-immunogent og det er spesielt ikke-antigen med hensyn til klasse I HLA antigen-determinanter.

30 Således er preparatets velegnethet for en spesiell mottaker ikke begrenset av donorens genetiske egenskaper.

Blodplatemembranfragmentpreparatet som har prokoagulerende aktivitet og er i stand til å kontrollere blødning inneholder

35 stort sett ikke GP IIb/IIIa kompleks. Dette er overraskende sett på bakgrunn av den utstrakte mening om at GP IIb/IIIa komplekset er involvert i og nødvendig for hemostase.

Blodplatemembranfragmentpreparatet inneholder foretrukket i alt vesentlig ikke "ghost"-plater og inneholder relativt homogene mikropartikler. Minst 80 % av mikropartiklene har foretrukket en diameter som er mindre enn 600 nanometer, og 5 minst 95 % har en diameter som er mindre enn 1 μm . Mest foretrukket har mikrovesiklene en gjennomsnittlig diameter mellom 300 og 400 nanometer. Slike mikropartikler er omtrent 1/5 til 1/7 del av størrelsen av en typisk "ghost"-plate.

10 Det foretrukne preparat inneholder faktisk intet serotonin (mindre enn 0,02 % av det som er funnet i blodplatelysater), hvorved de karakteristiske respirasjonsproblemer og vaskulære problemer som er forbundet med noen av de tidligere kjente preparater som anvendes for transfusjon elimineres.

15 Preparatet har videre ingen påvisbar purin-nukleosid-fosforylaseaktivitet, en cytoplasma-enzymmarkør, og inneholder i alt vesentlig ikke faktorene V, VIII, IX og X. I en utførelsesform har mikropartikkelfraksjonen 3 vekt% karbohydrat, 30 vekt% fosfolipid, 58 vekt% protein og 9 vekt% 20 kolesterol og forholdet mellom protein og fosfolipid er $1,97 \pm 0,10$ (gjennomsnitt \pm st.avvik, $n=7$).

Blodplatemembranfragmentpreparatet kan overraskende fremstilles fra foreldede blodplater. Sykehus og liknende 25 lagrer typisk blodplater for transfusjon ved romtemperatur i tre til fem døgn. Deretter ansees blodplatene å være ubrukelige og kasseres som "foreldede blodplater". Man har funnet at de farmasøytiske og diagnostiske produkter som kan fremstilles ifølge oppfinnelsen kan fremstilles fra slike 30 foreldede blodplater. Oppfinnelsen har en fordel med at det tilveiebringes en blodplatemembranfraksjon for transfusjon som er fremstilt helt eller delvis fra foreldede blodplater, idet man dermed gjør bruk av store mengder blodplater som inntil nå er blitt kastet fordi de er ubrukelige.

35

I følge fremgangsmåten for fremstilling av de blodplateavledede produkter i henhold til oppfinnelsen behandles et preparat som inneholder blodplater eller blodplatemembranfragmenter med protrombinaseaktivitet under forhold som er

tilstrekkelig til å inaktivere de virus som er inneholdt i preparatet. Et slikt preparat kan også homogeniseres, fortrukket med ultralyd, til å danne blodplatemembranmikropartikler i alt vesentlig uten "ghost"- plater.

5 Preparatet kan også behandles for å fjerne stort sett alt GP IIb/IIIa, et overflateglykoproteinkompleks.

Foreldede blodplater eller blodplatemembranfragmenter derav kan anvendes som utgangsmateriale for det blodplateavledete produkt. De foreldede blodplater kan være oppnådd fra en 10 enkel kilde, eller de kan være en samling fra en rekke kilder. Fremgangsmåten inkluderer også behandling for å inaktivere virus, behandling for å danne mikropartikler og behandling for stort sett å eliminere GP IIa/IIIa komplekset.

15

Den mest foretrukne fremgangsmåte for fremstilling av produktene omfatter gjentatt frysing-tining og vasking av blodplatene til å gi stort sett "ghost"-plater og et lysat.

"Ghost"-platene separeres deretter fra lysatet og suspenderes 20 i en oppløsning til å danne en suspensjon. Deretter blir suspensjonen som inneholder "ghost"-platene oppvarmet til minst 60°C i minst 2 timer for å inaktivere viruskontaminanter. Varmebehandlingen fører også til dannelselse av et presipitat. Presipitatet fjernes imidlertid ikke på dette 25 tidspunkt fordi det inneholder en betydelig mengde av den ønskede aktivitet. Istedet blir suspensjonen inkluderende presipitatet først homogenisert, foretrukket ved ultralydbehandling, og deretter separeres presipitatet fra suspensjonen. Suspensjonen kan deretter lagres eller anvendes for 30 transfusjon.

Platemembranfragmentpreparatet kan anvendes i farmasøytiske effektive mengder for behandling av dyr eller mennesker for å forhindre blødning. Når det anvendes som et farmasøytisk 35 preparat for transfusjoner, kan det sterile preparat være suspendert i enhver fysiologisk forenelig oppløsning som saltvann eller plasma. Det kan anvendes alene eller sammen med andre midler, inkluderende hele blodplater. Preparatet er en ideell tilsetning i forbindelse med blodoverføring.

Preparatet kan også påføres topisk for å stoppe blødning og for å behandle sår. I denne forbindelse kan preparatet suspenderes i en farmasøytisk tålbær som en gel eller en salve eller det kan impregneres i en bærer som gasbind.

5 Preparatet kan også anvendes som en bærer for medikamenttilførsel, eller det kan merkes og anvendes diagnostisk, f.eks. som et middel for å vise lokaliseringen av et koagel.

Kort beskrivelse av tegningene.

10

FIG. 1 viser en standardkurve for trombinkoagulasjonstiden.

FIG. 2 er et diagram som viser virkningen av varmebehandling på PF-3 spesifikk aktivitet.

FIG. 3 er et diagram som viser platetall og blødningstid i kaniner med normale trombocytter og med trombocytopeni.

15

FIG. 4 er et diagram som viser virkningen av overførte blodplatemembran-mikropartikler på blødningstid i dyr med doksorubicin-hydroklorid-indusert trombocytopeni.

FIG. 5 er et diagram som viser virkningen av overførte blodplatemembran-mikropartikler på antistoff-indusert trombocytopeni i dyr, og

20

FIG. 6 er en kurve som viser den doseavhengige virkning av overførte blodplatemembran-mikropartikler på blødningstid og på busulfan-indusert, alvorlig trombocytopeni i dyr.

25

Produktene fremstilt i henhold til oppfinnelsen fremstilles fra hele blodplater eller fra membranderivater av hele blodplater. De hele blodplatene kan være nylig samlede blodplater eller de kan være foreldede blodplater. Med foreldede blodplater menes blodplater som er lagret ved en temperatur mellom 4°C og romtemperaturer i minst 3 døgn. Foreldede blodplater er dem som i henhold til vanlig praksis kastes da de ikke lenger er passende for anvendelse som et transfusjonsmateriale. Med blodplatederivater menes ikke-intakte blodplater som "ghost"-plater eller blodplatemembranfragmenter inkluderende blodplatemembran-mikrovesikler.

30

35

Produktene fremstilt i henhold til oppfinnelsen tilføres til individer i effektive mengder. Betegnelsen "individ" skal inkludere levende organismer med en hemostatisk evne som i det minste delvis er formidlet av blodplater, f.eks.

5 mennesker, hunder, katter, hester og liknende. En "effektiv mengde" er den mengde som egner seg til det spesielle terapeutiske eller diagnostiske formål for hvilket produktet er tilført. Når det gjelder transfusjon generelt, er en effektiv mengde den som vil virke til å gjenopprette den

10 hemostatiske funksjon til i alt vesentlig det samme nivå som ville oppnås dersom hele blodplater ble tilført. I det tilfellet hvor et individ lider av trombocytopeni, er en effektiv mengde den mengde som er i stand til å redusere blødningstiden i individet, foretrukket til et nivå som ikke

15 er farlig og mest foretrukket til nivåer som er overensstemmende med dem hos normale individer. En effektiv mengde kan bestemmes på individuell basis og vil i det minste delvis baseres på individets størrelse, hvor alvorlige de symptomer er som skal behandles og de resultater som ønskes.

20 En effektiv mengde kan således bestemmes av en fagkyndig på området ved anvendelse av slike faktorer og ved anvendelse av kun rutineforsøk.

Produktene fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan behandles

25 slik at de ikke inneholder aktivt virus. Uten aktivt virus betyr at produktet er blitt underkastet betingelser som er tilstrekkelig til å inaktivere eller ødelegge ethvert tilstedeværende virus, som f.eks. HBV, NANBHV, CMV eller HIV. Slike forhold inkluderer behandlinger som involverer anti-

30 stoffer, etanol, UV-lys, organisk løsningsmiddeldetergent og fenantrolin-chelaterende midler. (Se "Virus Inactivation in Plasma Products", Ed.J.-J. Morgenthaler, Current Studies in Hematology and Blood Transfusion, No. 56, Karger, N.Y. 1989).

Den foretrukne metode for inaktivering av virus inkluderer

35 varmebehandling i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å inaktivere eller ødelegge viruset.

Produktene fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan også behandles slik at deres immunogenisitet reduseres eller

elimineres når de overføres. Produktene i henhold til oppfinnelsen fremstilles fordelaktig fra en samling blodplater som ordinært vil kunne indusere en antistoffrespons når de overføres til de fleste individer. Alloimmunisering er stadig et vanskelig problem når det gjelder behandling av trombocytopeni-pasienter som krever gjentatte blodplatetransfusjoner. Blodplatene utviser HLA-A og HLA-B antigener som enten er en del av blodplatemembranene eller er absorbert fra plasma. Utviklingen av antistoffer mot HLA-A eller HLA-B (som er den primære årsak til blodplate-alloimmunisering) fører til rask nedbrytning av de tilførte blodplater, noe som nedsetter virkningen av blodplatetransfusjon på hemostase. Kontaminering med hvite blodlegemer (som er en klar kilde av HLA antigener) i blodplatekonsentrater kan også bidra til utviklingen av alloimmunisering.

De foretrukne produkter fremstilt i henhold til oppfinnelsen er ikke-immunogene, ikke-alloimmunogene og ikke-immunogene overfor HLA determinanter (særlig gruppe I HLA determinanter). Med ikke-immunogen menes det at et individ, etter flere transfusjoner, ikke utvikler en immunologisk respons som er tilstrekkelig til å interferere med den terapeutiske virkning av det tilførte produkt. Med ikke-alloimmunogen menes det at et individ, etter flere transfusjoner av material fremstilt fra alloimmunogene kilder, ikke utviser en påvisbar immunologisk respons mot alloantigener. Med påvisbar menes det at serumantistoff mot alloantigener ikke kan påvises ved anvendelse av vanlige teknikker som punktbestemmelser eller at den immunologiske respons overfor hvilket som helst antigen ikke er tilstrekkelig til å interferere med den terapeutiske virkning av det overførte produkt.

Den foretrukne fremgangsmåte i henhold til oppfinnelsen for fremstilling av det foretrukne produkt er som følger. Nylig samlet, lagret (en til fire døgn ved 20-25°C) eller foreldet (utover fire døgn ved 4°C) blodplatekonsentrater (50-60 ml/konsentrat) ble samlet i blodposer på 600 ml (Fenwall transfer pack unit, 4R2023, Fenwall Laboratories, Deerfield,

Illinois) via sterile plasmaoverføringssett (Fenwall 4C2243, Fenwall Laboratories, super). Hver pose inneholdt totalt 500-600 ml blodplatekonsentrater (heretter 600 ml enhet). Enhetene på 600 ml ble sentrifugert med 1000 opm i 11
5 minutter ved 22°C for å fjerne kontaminerende røde og hvite blodlegemer (PR7000, International Equipment Company, Needham Heights, Massachusetts). Supernatantene som inneholdt blodplatene ble deretter overført til nye blodposer på 600 ml og sentrifugert ved 3.000 opm i 25 minutter ved 22°C for å
10 separere blodplater fra plasma. Blodplatefattig plasma ble presset ut og hver av de oppnådde blodplatepelleter ble forsiktig resuspendert i 20 ml av en 0,9 % NaCl oppløsning (fysiologisk saltvann), fortynnet til et sluttvolum på 100 ml med ytterligere saltvann og deretter samlet i blodposer på
15 300 ml (tre 100 ml prøver pr. pose tilsvarende tre opprinnelige enheter på 600 ml). De resuspenderte blodplater ble igjen samlet til pelleter ved sentrifugering ved 3.000 opm i 20 minutter ved 22°C. Supernatanten ble fjernet og blodplatepelleten ble vasket to ganger med fysiologisk saltvann
20 ved gjentatt resuspensjon og sentrifugering.

De vaskede blodplater ble til slutt resuspendert i fysiologisk saltvann (25 ml pr. enhet på 600 ml) og revet opp ved gjentatt frysing (ved -80°C i minst 6 timer) og tining (ved
25 25°C i minst 1 time), tre ganger. Den frosne og tinede suspensjon ble fortynnet med fysiologisk saltvann (100 ml pr. enhet på 600 ml) og sentrifugert ved 3.000 opm i 30 minutter for å samle en blodplate-"ghost" pellet. Denne blodplate-"ghost" pellet ble resuspendert i fysiologisk saltvann (100
30 ml pr. enhet på 600 ml) og vasket to ganger med gjentatt resuspensjon og sentrifugering.

Andre metoder kan anvendes for å ødelegge platemembraner og isolere en blodplate-"ghost" fraksjon. Blodplater kan f.eks.
35 ekvilibrerer med glycerol hvorpå de nedbrytes hypotonisk ved rask fortynning av glycerolkonsentrasjonen utenfor cellen. Dette gir en osmotisk trykkgradient over blodplatenes yttermembran, som fører til at cellemembranen revner. I tillegg kan en rekke andre kjemiske midler (f.eks. NaCl) anvendes på

liknende måte for å indusere osmotisk sjokk og nedbrutte blodplater. I henhold til den foretrukne utførelsesform ble det anvendt gjentatt frysing og tining.

5 Den vaskede "ghost"-pellet ble resuspendert i fysiologisk saltvann (40-50 ml pr. enhet på 600 ml) og oppvarmet ved 60°C i 20 timer i et vannbad. Alternativt kan blodplate-"ghost" suspensjonen oppvarmes til 100°C i 5 minutter. Disse forhold er tilstrekkelig til å inaktivere eventuelle virusforuren-
10 ninger. Et kraftig presipitat ble utviklet under varmebehandlingen. Denne varmebehandlede blodplate-"ghost" suspensjonen ble deretter homogenisert i en ultralydanordning (ultralydprosessor Model W-385, Heat Systems, Inc., Farmingdale, New York) ved anvendelse av et destruksjonshorn på 12,7 mm i en
15 strømingsselle (Model 800B, Heat Systems). Ultralydsystemet ble først gjennomstrømmet med nitrogen før injisering av blodplate-"ghost" suspensjonen. Suspensjonen ble ultralydbehandlet med pulsing ved 20kHz i 5 minutter og 43 sekunder (2 sekunders syklus, 1,4 sekunder på, 0,6 sekunder av) med
20 utgangskontrollinnstilling på "4" til å gi dobbel amplitude på 48 μm . Det ultralydbehandlede preparat ble deretter sentrifugert ved 3.000 opm i 30 minutter ved 22°C for å separere det presipiterte material fra de dannede blodplatemembran-mikropartikler som forble i supernatanten.
25 Supernatanten ble fjernet og lagret i forseglede beholdere ved enten 4°C, -20°C eller -80°C under nitrogen, eller lagret som frysetørket material under nitrogen. Dersom annet ikke er indikert, ble mikropartikler som er lagret ved 4°C anvendt i de etterfølgende prosedyrer.

30

Blodplate-mikropartikkelfraksjoner som er fremstilt som beskrevet over inneholdt ikke aktivt virus. Den inneholdt heller ikke i vesentlig grad blodplate-"ghosts", idet mer enn 80 % av mikropartiklene hadde en diameter på under 600
35 nanometer og mer enn 95 % hadde en diameter på mindre enn 1.000 nanometer. Den gjennomsnittlige diameter for mikropartiklene som var fremstilt fra blodplater som nylig var foreldet (innen 2 uker etter utgått dato) for 7 forskjellige preparater var mellom 300 og 400 nanometer. Det

gjennomsnittlige diameter for de 7 preparater var 341 nanometer.

Blodplate-mikropartikkelfraksjonen inneholdt også i alt
 5 vesentlig ikke serotonin, GP IIB/IIIA (et overflateglykoprotein), purinnukleosidfosforylase, koagulasjonsfaktorer V, VIII, IX og X, og trombospodin (en alfa-granulkomponent). På den annen side var GPIb (et annet overflateglykoprotein) tilstede og Beta-glukoronidase (en
 10 lyzosomal markør) var også påvisbar (omtrent 25 % som prosent av lysat). Fravær av GP IIB/IIIA var overraskende da det antas at GP IIB/IIIA er nødvendig for hemostase.

Sammensetningen av plate-mikropartikkelfraksjonen ble bestemt
 15 i to forskjellige forsøk for bestemte komponenter og er gitt i Tabell I:

Tabell 1

PROSENT AV KOMBINERT VEKT (W/W)				
FORSØK	KARBOHYDRAT	FOSFOLIPID	PROTEIN	KOLESTEROL
n = 4	3,3±0,14	30±0,9	57,8±0,9	9 (antatt)
n = 8	2,6±0,3	30,1±2,5	53,2±1,7	9,9±.9

25

Den prokoagulerende aktivitet for den foretrukne blodplate-mikropartikkelfraksjon fremstilt fra blodplater som nettopp var foreldet, ble bestemt for anvendelse av Russel's "viper venom" tid (5) som ble anvendt for å måle PF-3 aktivitet.
 30 Bestemmelsen ifølge Russel er en trombindannelsestest hvor sluttpunktet kan bestemmes ved hjelp av fibrinogen-sammenklebing. Den spesifikke aktivitet ble bestemt ved sammenligning med en trombin standardkurve og kan uttrykkes som enheter (U) av trombin dannet pr. mg blodplateprotein eller
 35 pr. mg blodplatefosfolipid. Den PF-3 spesifikke aktivitet pr. mg protein (U/mg) ble i et første forsøkssett bestemt til å være 148,1±13,4 (n=7). I et annet forsøkssett var den 175±8 (n=8). Den PF-3 spesifikke aktivitet pr. mg fosfolipid (U/mg) i det første forsøkssett var 291,3±40,0. I det andre

sett var den 310 ± 23 . Disse spesifikke aktiviteter går langt ut over dem for friske, intakte hele blodplater. Man tror at dette skyldes frigivelsen av pro-koagulerende membran-fragmenter som normalt ikke er tilgjengelige i intakte
5 blodplater.

Den spesifikke aktivitet var bibeholdt selv etter fryse-
tørking, selv om det var nødvendig å tilsette et beskyttende
material til preparatet for å bibeholde mer enn 60 % av den
10 spesifikke aktivitet (sukrose i 0,4 g/dl, >90 % aktivitet
bibeholdt).

Sammensetningen av fosfolipiddelen av preparatet ble bestemt
i to forskjellige forsøkssett og er vist i Tabell II:

15

Tabell II

		PROSENT AV KOMBINERT FOSFOLIPID (W/W)				
FORSØK		PI	PS	PE	PC	SP
20	n=4	5,8±1,0	10,1±0,9	22,5±1,5	45,8±4,0	15,4±0,7
	n=8	6,9±0,5	12,2±0,7	23,8±2,1	40,6±2,3	16,6±1,5

PI: fosfatidylinositol PS: fosfatidylserin
25 PE: fosfatidyletanolamin PC: fosfatidylcholin
SP: spingomyelin

Blodplate-mikropartikkelfraksjoner ble testet for deres pro-
koagulerende aktivitet og for deres evne til å regulere
30 blødning i dyr med trombocytopeni. Den prokoagulerende
aktivitet for en mikropartikkelfraksjon fremstilt fra
blodplater som nylig var foreldet, ble funnet til å være
sammenlignbar med en fraksjon fremstilt fra friske blod-
plater. Fraksjoner som er fremstilt fra friske blodplater og
35 nylig foreldete blodplater hadde en prokoagulerende aktivitet
som var sammenlignbar med aktiviteten for hele blodplater.
Transfusjon av denne fraksjon forkortet blødningstiden i alle
de mottakende dyr.

Virkingen av varmebehandling og virkingen av ultralyd-behandling på den prokoagulerende aktivitet ble også undersøkt. Mikropartikkelfraksjonene som er fremstilt fra nylig foreldete blodplater ble funnet til å være relativt stabile overfor varmebehandling. Det ble ytterligere funnet at den prokoagulerende aktivitet for denne blodplate-mikropartikkelfraksjon var sterkt redusert når homogenisering gikk foran varmebehandling. Disse andre egenskaper for mikropartikkelfraksjonene fremstilt i overensstemmelse med oppfinnelsen er omtalt mer detaljert i de etterfølgende eksempler.

Produktet som var fremstilt i henhold til den ovennevnte prosedyre, såvel som forskjellige mellomprodukter, ble testet i immunologiske punktforsøk for tilstedeværelse av GP IIb/IIIa. GP IIb/IIIa var tilstede i de intakte blodplatepreparater, blodplatelysatet, supernatanten fra blodplatelysatet og blodplatemembran-"ghost" fraksjonen. Det var ingen påvisbar GP IIb/IIIa i en oppvarmet blodplatemembran-"ghost" fraksjon eller i det endelige produkt.

Det endelige produkt og mellomprodukter ble også testet i immunologiske punktforsøk for tilstedeværelse av HLA antigener (Gruppe I). HLA antigener var tilstede i de vaskede, intakte blodplatepreparater, blodplatelysatet, supernatanten fra blodplatelysatet og blodplatemembran-"ghost" fraksjonen. HLA antigener kunne ikke påvises i en oppvarmet blodplatemembran-"ghost" fraksjon eller i sluttproduktet.

30

Sluttproduktet og forskjellige mellomprodukter ble ytterligere testet i immunologiske punktforsøk for tilstedeværelse av GPIb. Alle de testede prøver, som inkluderte dem som var varmebehandlet, viste tilstedeværelse av GPIb.

35

Ved et aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes således blodplater eller en blodplatemembranfraksjon som er varmebehandlet for å eliminere virusforurensninger. Idet slik varmebehandling er kjent for å generelt inaktivere virus-

forurensninger, har den aldri vært anvendt i forbindelse med et blodplatepreparat. Oppfinnelsen tilveiebringer derfor, for første gang, en virus-inaktivert blodplatefraksjon som kan anvendes for transfusjon.

5

Ved et annet aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes et transfusjonspreparat som er fremstilt fra foreldede blodplater. Oppfinnelsen muliggjør for første gang at store mengder foreldede blodplater, som vanligvis kastes, kan anvendes for transfusjon. Fordi der er en økende mulighet for virusforurensning av foreldede blodplater under lagring, vil dessuten varmebehandlingstrinnet i henhold til oppfinnelsen også bidra til at foreldede blodplater kan anvendes ved å sikre at de er virus-inaktivert.

15

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også varmeinaktivering kombineres med et homogeniseringstrinn for fremstilling av en blodplate-mikropartikkelfraksjon som i alt vesentlig ikke inneholder "ghost"-plater. Preparatet inneholder mikropartikler med homogen størrelse og inneholder i alt vesentlig ikke uønsket cytoplasmamaterial. I henhold til en foretrukket fremgangsmåte for oppfinnelsen, vil homogenisering (ultralydbehandling) etterfølge varmeinaktiveringstrinnet, noe som gir både dannelse av mikropartikler med homogen størrelse og som forhindrer at en vesentlig mengde av aktiviteten bindes opp i presipitatet som er dannet under varmeinaktiveringstrinnet.

Som beskrevet over kan mikropartikkelfraksjonen fremstilles i flere trinn. Først ble blodplatemembranen delvis revet i stykker til å danne en "ghost"-platefraksjon og et lysat som inneholder cytoplasmamaterialer. Når "ghost"-platene er separert fra dette cytoplasmamaterialet, homogeniseres platene til å danne en fraksjon som i alt vesentlig ikke inneholder "ghost"-plater og som inneholder mikropartikler med i alt vesentlig ensartet størrelse. Det skal imidlertid forstås at det innledende trinn med delvis nedbrytning kan elimineres. Platene kan således ultralydbehandles og de dannede mikropartikler kan isoleres fra lysatet.

Man mener at blodplatemembran-mikropartikkelfraksjonen er i alt vesentlig ikke-immunogen ved sammenligning med hele plater og den kan derfor fremstilles fra samlede plater oppnådd fra forskjellige donorer med tilsvarende blodgrupper.

5 Den utstrakte vasking som effektivt fjerner alle hvite blodlegemer kan også bidra til preparatets ikke-immunogenitet.

De foretrukne produkter fremstilt i henhold til oppfinnelsen har således prokoagulerende aktivitet, de inneholder ikke virus, de er ikke-alloimmunogene og stabile, slik at de kan frysetørkes og lagres i kommersielle mengder i passende beholdere.

Eksempel 1

15 PF-3 (platefaktor-3) prokoagulerende aktivitet ble målt ved hjelp av "viper venom time" forsøket etter Russel, som er et forsøk for trombindannelse. Slutt punktet for forsøket bestemmes visuelt ved sammenklebingen av fibrinogen tilstede i en samlet human plasmaprøve.

20

En stamløsning av CaCl_2 (0,025 M i imidazolbuffer, pH 7,3) ble holdt ved 37°C . Samlet humant plasma og blodplatemembran-mikropartikkelfraksjonene i oppløsning ($25 \mu\text{g/ml}$ i saltvann) ble lagret ved romtemperatur. Russel "viper venom" (RVV; $10 \mu\text{g/ml}$ i saltvann, Wellcome Diagnostics, Dartford, England) ble holdt på is.

Forsøket ble initiert ved blanding og inkubering av 0,1 ml av både samlet plasma og oppløsningen av blodplatemembran-mikropartikler i et borsilikat-glassrør (12x75 mm) ved 37°C i 5-10 minutter. RVV oppløsning (0,1 ml) ble deretter tilsatt og ytterligere inkubert i 30 sekunder ved 37°C hvorpå 0,1 ml CaCl_2 ble tilsatt. Tiden mellom tilsetningen av CaCl_2 oppløsningen og påvisningen av fibrin-sammenklebing ble bestemt. Trombinenheten som ble dannet ved forsøket ble beregnet ut fra en standardkurve for trombin-sammenklebings-
35 tid (FIG. 1) ved anvendelse av rensset bovint trombin (Sigma 850-1, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) og humant samleplasma.

Virkningen av varmebehandling og av ultralydbehandling på den prokoagulerende aktivitet (PF-3) ved anvendelse av Russel's "viper venom" tid (5) ble testet. Som vist i FIG. 2, resulterte varmebehandling etterfulgt av ultralydbehandling i en
5 platemembran-mikropartikkelfraksjon som bibeholdt en vesentlig mengde av sin prokoagulerende aktivitet. Når ultralydbehandling imidlertid ble gjennomført før varmebehandling (ikke vist), ble den prokoagulerende aktivitet for blodplatemembran-mikropartikkelfraksjonen endret drastisk, idet
10 den prokoagulerende aktivitet ble redusert med 50 %.

Eksempel 2

Blodplatemikropartiklene ble undersøkt for deres evne til å kontrollere blødning i dyr med antistoff-indusert trombocytopeni. Anti-kanin blodplate-antiserum ble anvendt for å
15 indusere trombocytopeni i kaniner. Blodplatetall og blødningstid ble først bestemt i 10 normale kaniner (kroppsvekt $3,53 \pm 0,41$ kg, blodplatetall $548.000 \pm 97.000/\mu\text{l}$, blødningstid 153 ± 47 sekunder, gjennomsnitt \pm st.avvik). Anti-kanin
20 blodplate-antiserum ble oppnådd fra en kommersiell kilde og ble deretter tilført intravenøst til 10 kaniner i en dose på 0,2-0,4 ml antiserum pr. kg kroppsvekt. To timer etter injisering av antiserum, fant man trombocytopeni i varierende grad i alle dyr. Dataene ble gruppert i henhold til graden
25 av "indusert trombocytopeni": GRUPPE 1, blodplatetall mindre enn $80.000/\mu\text{l}$, GRUPPE 2, blodplatetall mellom 100.000 - $200.000/\mu\text{l}$ og GRUPPE 3, blodplatetall over $200.000/\mu\text{l}$ (FIG. 3).

30 Forlengelse av blødningstiden ble også indusert i alle de 10 antiserum-behandlede kaniner (målt to timer etter injeksjon av antiserum). Markert forlengelse forekom kun i dyrene i gruppe 1 (alvorlig trombocytopeni, $<75.000/\mu\text{l}$) og en moderat forlengelse ble observert hos dyrene i både gruppe 2 og
35 gruppe 3 (FIG. 3).

Blodplate-mikropartikkelfraksjoner fremstilt fra nylig foreldede blodplater ble innført (2 mg protein/kg pr. kroppsvekt) i dyr i gruppe 1 med alvorlig trombocytopeni.

Under henvisning til FIG. 4, var blodplatetall oppnådd 2 timer etter injeksjon av antiserum 41.000, 73.000 og 56.000/ μ l for henholdsvis dyrene 1, 2 og 3. I det samme intervall var blødningstiden markert forlenget i alle de tre kaninene, særlig i kanin nr. 2, hvor voldsom blødning fra teststedet fortsatte selv 20 minutter etter dannelselse av snittet og krevde at det ble anvendt et lokalt trykk for å stoppe blødningen. Etter mottak av blodplatemikropartiklene, viste dyrene 1 og 3 progressiv forkortning av blødningstid, mens spontan stopp av blødninger forekom innen 20 minutter i kanin nr. 2, uten behov for et lokalt trykk. Således ble det vist en generell tilbøyelighet til nedsatt blødningstid etter transfusjon av blodplate-mikropartiklene fremstilt i henhold til oppfinnelsen i alle de mottakende dyr.

15

Eksempel 3

Blodplate-mikropartiklene ble testet for deres evne til å kontrollere blødning i dyr med Doxorubicin-hydroklorid-indusert trombocytopeni. Doxorubicin-hydroklorid (Adriamycin, 2 mg/kg kroppsvekt) ble tilført intravenøst til 9 kaniner for å indusere trombocytopeni. Basis-platetallet (før doxorubicin-injeksjon) var $488.000 \pm 94.000/\mu$ l. Basis-blødningstiden var 128 ± 21 sek. En uke etter doxorubicin-injeksjonen var blodplatetallet redusert til $130.000 \pm 31.000/\mu$ l ($p < 0,01$) med en 2,4 ganger økning i blødningstid (311 ± 89 sek, $n=9$) i forhold til trombocytopeni-kontrollene ($p < 0,01$).

Blodplate-mikropartikkeltraksjonene (2 mg membranprotein/kg kroppsvekt) som var fremstilt fra nylig foreldede plater eller saltoppløsningspreparater ble innført i kaninene med trombocytopeni som var indusert med doxorubicin. Det ble vist hemostatisk effektivitet i alle dyrene som mottok prokoagulerende membraner. Gjentatte målinger av blødningstid ved 15 minutter, 2 og 4 timer etter transfusjonen viste en signifikant nedsettelse av blødningstid i forhold til trombocytopeni-kontrollene ($< 0,01$) (FIG.5). I motsetning til dette ble det ikke notert signifikante forskjeller mellom

målinger som var oppnådd før og etter infusjon av saltvann til kaniner med trombocytopeni.

Eksempel 4

5 Effektiviteten av blodplate-mikropartiklene fremstilt i henhold til oppfinnelsen for kontroll av blødning ble ytterligere bekreftet ved hjelp av den doseavhengige respons når mikropartiklene ble tilført til kaniner med alvorlig trombocytopeni. To injeksjoner med busulfan (totalt 35 mg/kg
10 kroppsvekt) ble tilført subkutant til kaniner for å gi alvorlig trombocytopeni (platetall mindre enn 25.000 pr. μ l). Tre forskjellige doser med blodplate-mikropartikler (0,5 mg/kg kroppsvekt, 1,0 mg/kg kroppsvekt, og 2,0 mg/kg kroppsvekt) og et kontrollpreparat av en saltløsning ble
15 innført i kaninene med alvorlig trombocytopeni. Basisblodplatetall som ble bestemt for alle dyrene på transfusjonsdagen var i størrelsesorden omtrent 15.000/ μ l.

Under henvisning til FIG. 6, var den hemostatiske effektivitet for blodplate-mikropartiklene direkte relatert til den
20 innførte dose. Transfusjon av saltoppløsning til kaninene med alvorlig trombocytopeni endret ikke blødningstiden. På den annen side ble den forlengede blødningstid hos kaninene med alvorlig trombocytopeni forkortet på en doseavhengig måte
25 når blodplate-mikropartikler ble tilført.

De forutgående transfusjonsstudier i kaniner med trombocytopeni viste den hemostatiske effektivitet av blodplatemembranfragmentpreparatet fremstilt i henhold til oppfinnelsen.
30 sen.

Referanser

1) Klein, E., Farber, S., Djersasi, I., Toch, R., Freeman, G., Arnold, P., "The Preparation and Clinical Administration of Lyophilized Platelet Material to Children with Acute
35 Leukemia and Aplastic Anemia", J. Pediatrics, 49:517, 1956.

2) Hjort, R., Perman, V., and Cronkite, E., "Fresh, Disintegrated Platelets and Radiation Thrombocytopenia:

Correction of Prothrombin Consumption without Correction of Bleeding".

- 3) McGill, M., Fugman, D., Vittorio, N., and Darrow, C.,
5 "Platelet Membrane Vesicles Reduced Microvascular Bleeding
Times in Thrombocytopenic Rabbits", J. Lab. Clin. Med.,
109:127-133, 1987.
- 4) Wu, V-Y., McCoy, L.E., "Platelet Factor 3: Quantitation
10 and Characterization", Thromb. Res., 11:581-593, 1977.
- 5) Spaet, T.H., Cintron, J., "Studies on Platelet Factor-3
Availability", Brit. J. Haematol, 11:269, 1965.

15

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et blodplateavledet
produkt med prokoagulerende aktivitet,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at et preparat som inne-
holder blodplater eller blodplatemembranfragmenter med pro-
koagulerende aktivitet varmebehandles ved minst 60°C for å
inaktivere ethvert virus som er inneholdt i nevnte preparat,
hvoretter produktet isoleres, idet ett eller flere av de
25 følgende trinn eventuelt utføres:
- preparatet ultralydbehandles etter varmebehandlingen,
 - preparatet frysetørkes etter ultralydbehandlingen,
 - i alt vesentlig alt GP IIb/IIIa kompleks i preparatet
fjernes, og
 - 30 - det isolerte produkt frysetørkes.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter homogenisering av nevnte preparat til å danne
35 blodplatemembranmikropartikler som i alt vesentlig ikke
inneholder "ghost"-plater.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 eller 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes foreldede blodplater eller blodplatemembranfragmenter derav som et utgangsmaterial.

5 4. Fremgangsmåte som angitt i krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes samlede, foreldede blodplater eller blodplatemembranfragmenter derav som et utgangsmaterial.

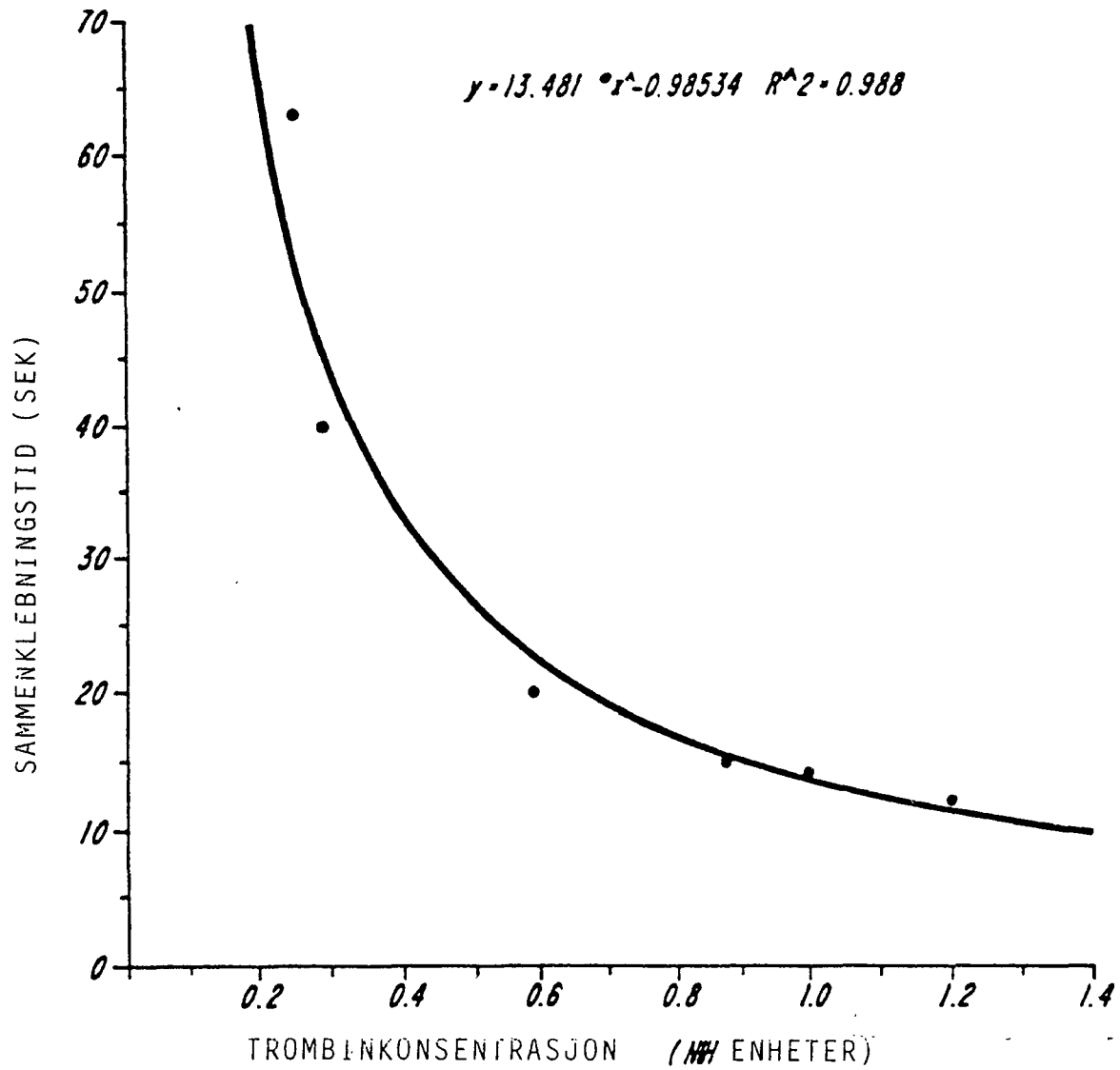
10 5. Fremgangsmåte som angitt i krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter behandling av nevnte foreldede blodplater eller blodplatemembranfragmenter derav under forhold som er tilstrekkelig til å danne et ikke-alloimmunogent preparat.

15

6. Fremgangsmåte som angitt i et eller flere av kravene 1 - 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at et preparat som inneholder blodplater eller blodplatemembranfragmenter derav 20 varmebehandles, det varmebehandlede preparat ultralydbehandles til å danne mikropartikler, og ethvert presipitat som er dannet som et resultat av varmebehandlingen separeres fra mikropartikkelfraksjonen.

1/4

STANDARDKURVE FOR TROMBIN-SAMMENKLEBNINGSTID

**FIG. 1**

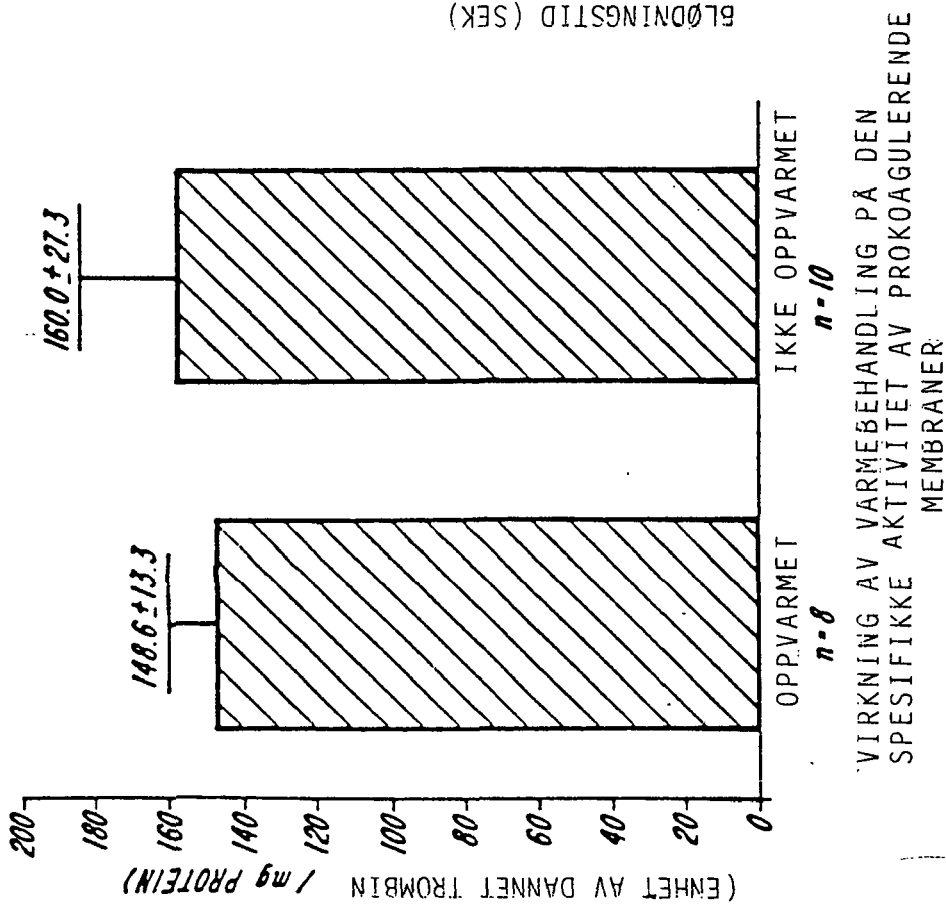
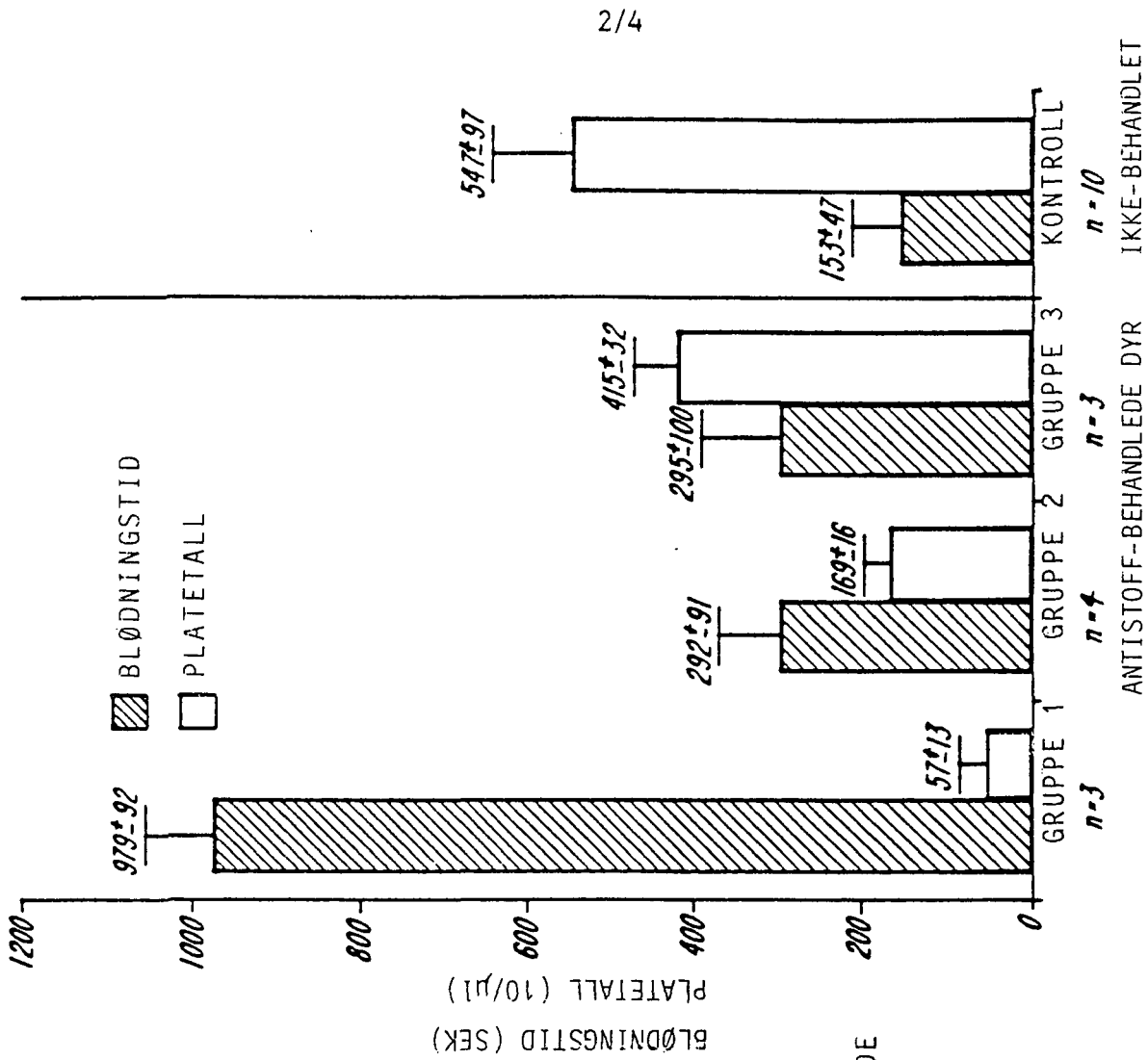
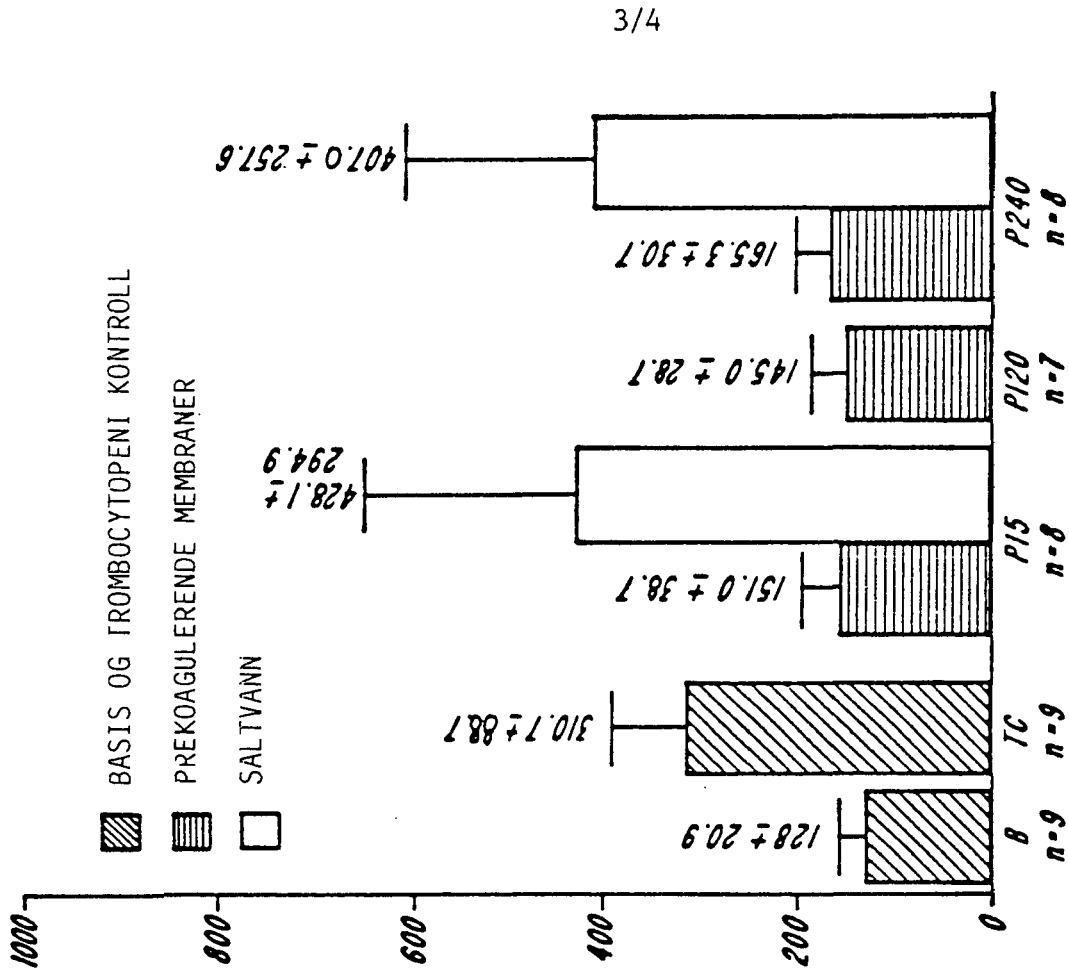


FIG. 2



PLATETALL OG BLØDNINGSTID MÅLT FOR KANINER
MED NORMALE TROMBOCYTTER OG MED TROMBOCYTOPENI

FIG. 3



3/4

FIG. 5

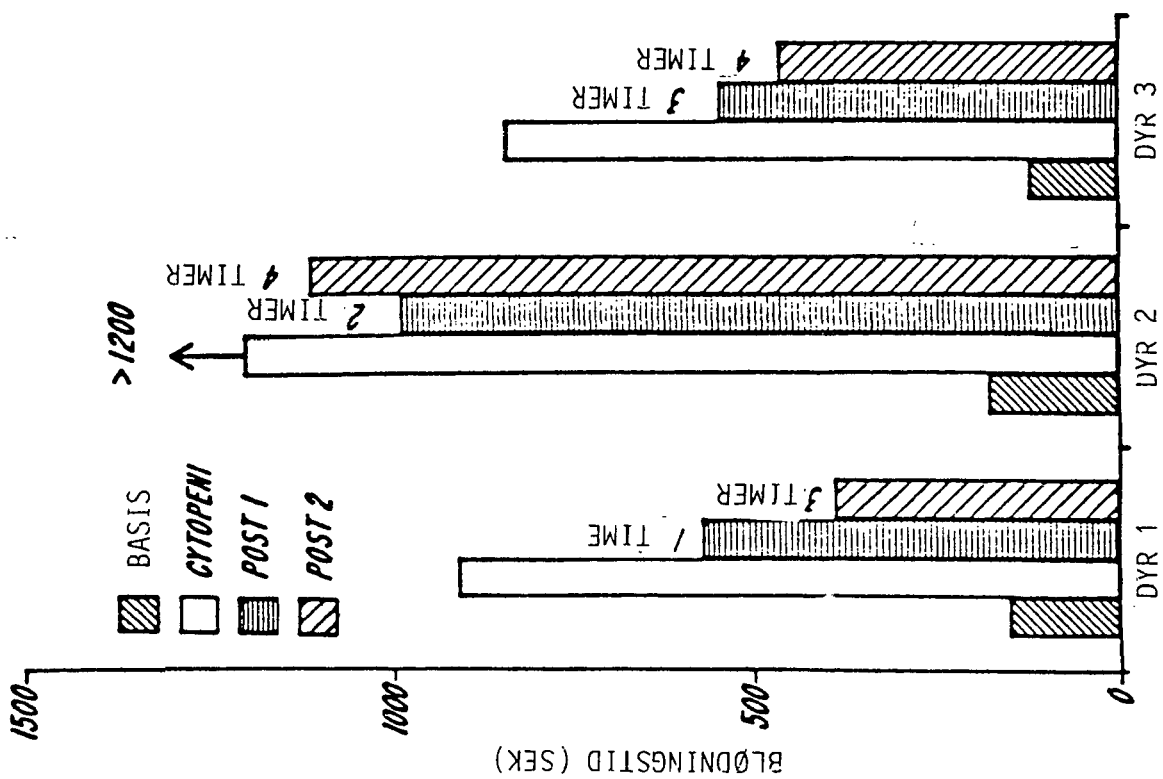
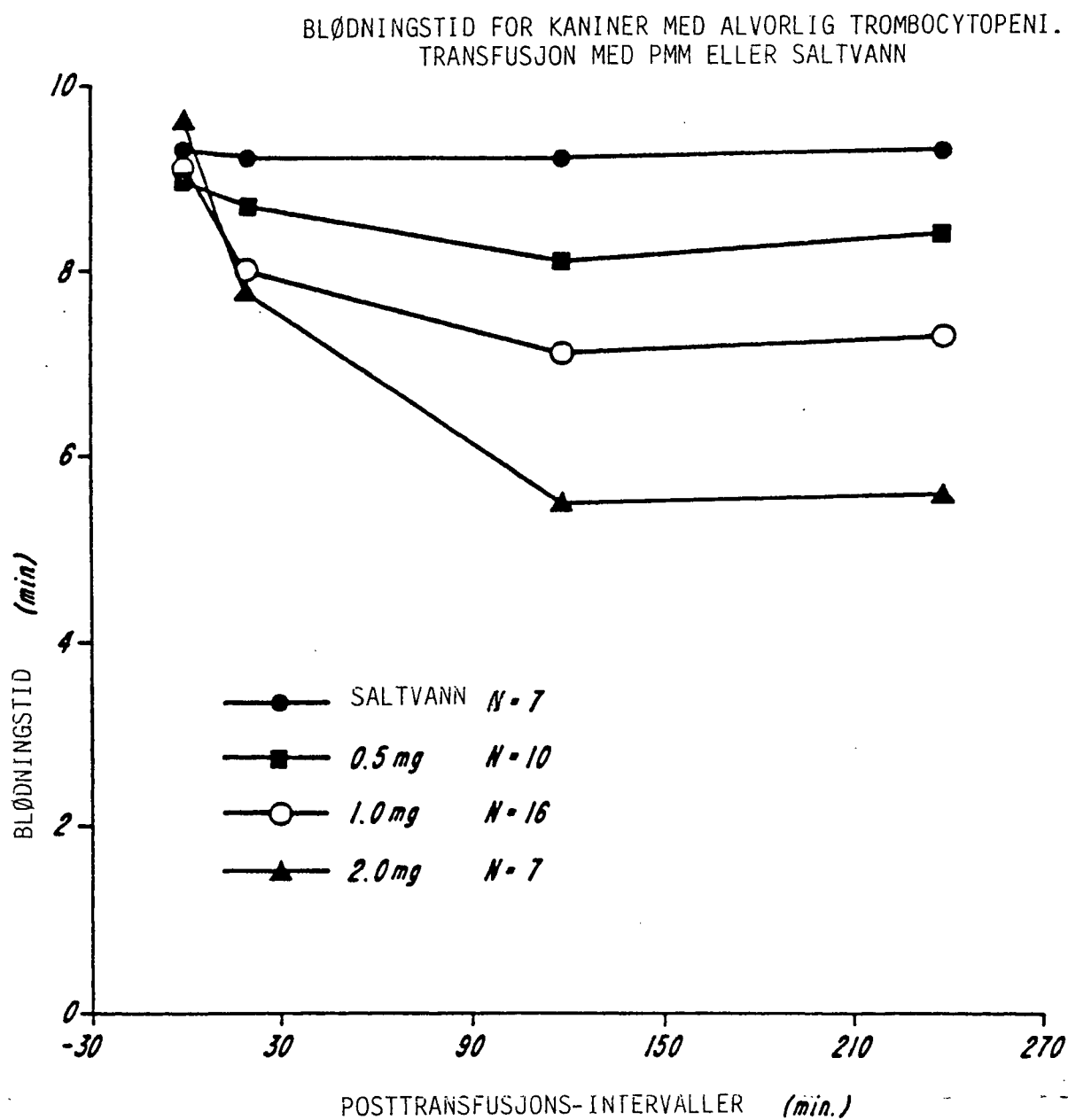


FIG. 4

**FIG. 6**