

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515352

(P2014-515352A)

(43) 公表日 平成26年6月30日 (2014. 6. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 A	4 C 0 7 6
A O 1 N 1/02 (2006.01)	A O 1 N 1/02	4 C 0 8 1
A 6 1 L 33/00 (2006.01)	A 6 1 L 33/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 7
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 H 0 1 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-511561 (P2014-511561)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月17日 (2012. 5. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月24日 (2013. 12. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/038462
 (87) 国際公開番号 W02012/158983
 (87) 国際公開日 平成24年11月22日 (2012. 11. 22)
 (31) 優先権主張番号 61/613, 837
 (32) 優先日 平成24年3月21日 (2012. 3. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/474, 473
 (32) 優先日 平成24年5月17日 (2012. 5. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/503, 984
 (32) 優先日 平成23年7月1日 (2011. 7. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

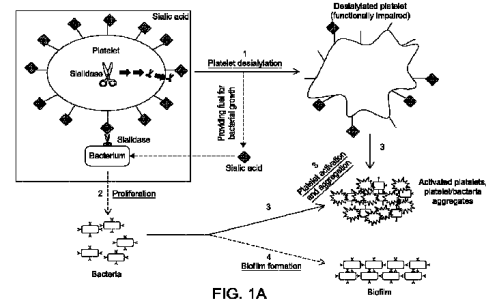
(71) 出願人 506041648
 ベリコ メディカル インコーポレイティ
 ッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ビ
 バリー カミングス センター 100
 スイート 436エイチ
 (71) 出願人 503146324
 ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス
 ピタル インコーポレイテッド
 The Brigham and Wom
 en's Hospital, Inc.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2115 ポストン フランシス ストリ
 ート 75

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シアリダーゼ阻害剤を用いた血小板の保存の改善法

(57) 【要約】

本発明は血小板添加液 (PAS) に関し、このPASは、一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で1つ以上のグリカン修飾剤と、塩、クエン酸塩源、炭素源、およびこれらの任意の組み合わせを含む1つ以上のPAS成分とを含む。本発明はまた、血小板を1つ以上のシアリダーゼ阻害剤と共に保存することによって、単離された血小板の *in vivo* 循環時間を延長する方法、組成物、およびキットにも関する。加えて、本発明は、シアリダーゼ活性を低下させて、1つ以上のドナーからの血小板産物調製物中の1つ以上の細菌の増殖を抑制する方法および組成物に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤と、

(b) 塩、クエン酸塩源、炭素源、およびこれらの任意の組み合わせを含む 1 つ以上の P A S 成分と、

を含む、血小板添加液 (P A S) 。

【請求項 2】

約 6 . 4 ~ 約 7 . 6 の範囲の p H に維持される、請求項 1 記載の P A S 。

【請求項 3】

リン酸塩源をさらに含む、請求項 1 記載の P A S 。

【請求項 4】

前記リン酸塩源が、一リン酸ナトリウム、二リン酸ナトリウム、三リン酸ナトリウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 記載の P A S 。

【請求項 5】

前記クエン酸塩源が、クエン酸一ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 記載の P A S 。

【請求項 6】

前記炭素源が、酢酸塩、グルコース、およびスクロースからなる群から選択される、請求項 1 記載の P A S 。

【請求項 7】

前記酢酸塩が、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 記載の P A S 。

【請求項 8】

前記塩が、ナトリウム源、塩化物源、カリウム源、マグネシウム源、カルシウム源、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 記載の P A S 。

【請求項 9】

前記ナトリウム源が、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 記載の P A S 。

【請求項 10】

前記塩化物源が、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 記載の P A S 。

【請求項 11】

前記カリウム源が、塩化カリウム、クエン酸カリウム、酢酸カリウム、リン酸カリウム、硫酸カリウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 記載の P A S 。

【請求項 12】

前記マグネシウム源が、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 記載の P A S 。

【請求項 13】

前記カルシウム源が、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、クエン酸カルシウム、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 記載の P A S 。

【請求項 14】

1 つ以上の P A S 成分が、

(a) 約 1 0 0 m M ~ 約 3 0 0 m M の範囲の量のナトリウム源と、

(b) 約 4 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の範囲の量の塩化物源と、

(c) 約 2 m M ~ 約 2 0 m M の範囲の量のクエン酸塩源と、

(d) 約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M の範囲の量の酢酸塩源と、

10

20

30

40

50

(e) 約 5 mM ~ 約 50 mM の範囲の量のリン酸塩源と、
 (f) 約 0.5 mM ~ 約 10 mM の範囲の量のカリウム源と、
 (g) 約 0.5 mM ~ 約 2.5 mM の範囲の量のマグネシウム源と、
 (h) 約 0.5 mM ~ 約 2.5 mM の範囲の量のカルシウム源と、
 を含む、請求項 1 記載の P A S。

【請求項 15】

以下を含む、血小板組成物：

(a) 単離された血小板、
 (b) 以下を含む P A S ：
 (i) 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤と
 、
 (ii) 塩、クエン酸塩源、炭素源、およびこれらの任意の組み合わせを含む 1 つ以上の P A S 成分、ならびに
 (c) 血漿、
 ここで、前記血小板組成物は、約 6.4 ~ 約 7.6 の範囲の pH に維持される。

【請求項 16】

前記血漿が、約 1 容量 % ~ 約 50 容量 % の範囲の量で存在する、請求項 15 記載の血小板組成物。

【請求項 17】

前記血小板添加液が、約 50 容量 % ~ 約 99 容量 % の範囲の量で存在する、請求項 15 記載の血小板組成物。 20

【請求項 18】

1 つ以上の P A S 成分が、
 (i) 約 100 mM ~ 約 300 mM の範囲の量のナトリウム源と、
 (ii) 約 40 mM ~ 約 110 mM の範囲の量の塩化物源と、
 (iii) 約 2 mM ~ 約 20 mM の範囲の量のクエン酸塩源と、
 (iv) 約 10 mM ~ 約 50 mM の範囲の量の酢酸塩源と、
 (v) 約 5 mM ~ 約 50 mM の範囲の量のリン酸塩源と、
 (vi) 約 0.5 mM ~ 約 10 mM の範囲の量的カリウム源と、
 (vii) 約 0.5 mM ~ 約 2.5 mM の範囲の量のマグネシウム源と、 30
 (viii) 約 0.5 mM ~ 約 2.5 mM の範囲の量のカルシウム源と、を含み、
 前記血小板組成物が、約 6.4 ~ 約 7.6 の範囲の pH に維持される、請求項 15 記載の血小板組成物。

【請求項 19】

以下を含む、バッグまたは容器：

(a) 血小板の保存に適したバッグまたは容器、ならびに
 (b) 以下を含む P A S ：
 (i) 一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤と、
 (ii) 塩、クエン酸塩源、炭素源、およびこれらの任意の組み合わせを含む 1 つ以上の P A S 成分。 40

【請求項 20】

単離された血小板をさらに含む、請求項 19 記載のバッグまたは容器。

【請求項 21】

前記 P A S が、約 6.4 ~ 約 7.6 の範囲の pH に維持される、請求項 19 記載のバッグまたは容器。

【請求項 22】

1 つ以上の P A S 成分が、

(i) 約 100 mM ~ 約 300 mM の範囲の量のナトリウム源と、
 (ii) 約 40 mM ~ 約 110 mM の範囲の量の塩化物源と、 50

(i i i) 約 2 m M ~ 約 2 0 m M の範囲の量のクエン酸塩源と、
(i v) 約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M の範囲の量の酢酸塩源と、
(v) 約 5 m M ~ 約 5 0 m M の範囲の量のリン酸塩源と、
(v i) 約 0 . 5 m M ~ 約 1 0 m M の範囲の量のカリウム源と、
(v i i) 約 0 . 5 m M ~ 約 2 . 5 m M の範囲の量のマグネシウム源と、
(v i i i) 約 0 . 5 m M ~ 約 2 . 5 m M の範囲の量のカルシウム源と、を含み、
前記血小板組成物が、約 6 . 4 ~ 約 7 . 6 の範囲の p H に維持される、請求項 1 9 記載
のバッグまたは容器。

【請求項 2 3】

単離された血小板をさらに含む、請求項 1 9 記載のバッグまたは容器。

10

【請求項 2 4】

血小板を保存する方法であって、単離された血小板を 1 つ以上のドナーから得、

(a) 以下を含む P A S に前記単離された血小板を接触させるステップを含む、方法：

(i) 一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン
修飾剤と、

(i i) 塩、クエン酸塩源、炭素源、およびこれらの任意の組み合わせを含む 1 つ以
上の P A S 成分。

【請求項 2 5】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2 , 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセ
チルノイラミン酸 (D A N A) または薬学的に許容され得るその塩；エチル (3 R , 4 R
, 5 S) - 5 - アミノ - 4 - アセトアミド - 3 - (ペンタン - 3 - イルオキシ) - シクロ
ヘキサ - 1 - エン - 1 - カルボン酸) ； (2 R , 3 R , 4 S) - 4 - グアニジノ - 3 - (
プロプ - 1 - エン - 2 - イルアミノ) - 2 - ((1 R , 2 R) - 1 , 2 , 3 - トリヒドロ
キシプロピル) - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラン - 6 - カルボン酸 ; (4 S , 5 R , 6
R) - 5 - アセトアミド - 4 - カルバミドアミド - 6 - [(1 R , 2 R) - 3 - ヒドロ
キシ - 2 - メトキシプロピル] - 5 , 6 - ジヒドロ - 4 H - ピラン - 2 - カルボン酸 ; お
よび (1 S , 2 S , 3 S , 4 R) - 3 - [(1 S) - 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブ
チル] - 4 - (ジアミノメチリデンアミノ) - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カ
ルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項 2 4 記
載の方法。

20

30

【請求項 2 6】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2 , 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミ
ン酸のナトリウム塩である、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記単離された血小板が、約 1 ~ 約 2 1 日の期間に亘って保存される、請求項 2 4 記載
の方法。

【請求項 2 8】

前記単離された血小板が、約 2 ~ 約 2 5 の温度で保存される、請求項 2 4 記載の方
法。

【請求項 2 9】

前記血小板組成物を室温未満の温度まで冷却するステップと、前記血小板組成物を一定
期間保存するステップと、次いで前記血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、
をさらに含む、請求項 2 4 記載の方法。

40

【請求項 3 0】

血小板集団を前記シアリダーゼ阻害剤で一定期間処置するステップをさらに含み、前記
一定期間が、約 1 分 ~ 約 8 時間の範囲である、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 1】

保存用の血小板を調製する方法であって、単離された血小板を 1 つ以上のドナーから得
、前記方法が、

前記単離された血小板を 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグ

50

リカン修飾剤に接触させるステップを含む、方法。

【請求項 3 2】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸 (DANA) または薬学的に許容され得るその塩；エチル (3 R, 4 R, 5 S) - 5 - アミノ - 4 - アセトアミド - 3 - (ペンタン - 3 - イルオキシ) - シクロヘキサ - 1 - エン - 1 - カルボン酸)；(2 R, 3 R, 4 S) - 4 - グアニジノ - 3 - (プロプ - 1 - エン - 2 - イルアミノ) - 2 - ((1 R, 2 R) - 1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル) - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラン - 6 - カルボン酸；(4 S, 5 R, 6 R) - 5 - アセトアミド - 4 - カルバミミドアミド - 6 - [(1 R, 2 R) - 3 - ヒドロキシ - 2 - メトキシプロピル] - 5, 6 - ジヒドロ - 4 H - ピラン - 2 - カルボン酸；および (1 S, 2 S, 3 S, 4 R) - 3 - [(1 S) - 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブチル] - 4 - (ジアミノメチリデンアミノ) - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項 3 1 記載の方法。

10

【請求項 3 3】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸または CMP - シアル酸前駆物質である、請求項 3 1 記載の方法。

20

【請求項 3 5】

前記 CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素をさらに含む、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記グリカン修飾剤が、UDP - ガラクトースである、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 7】

前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸および UDP - ガラクトースである、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

保存用の血小板を調製する方法であって、

30

(a) 血小板を 1 つ以上の個体から単離するステップと、

(b) 前記単離された血小板を、血小板表面グリカンのシアル酸残基の加水分解を減少させるのに十分な量のシアリダーゼ阻害剤に接触させるステップと、を含む、方法。

【請求項 3 9】

血小板受容体の減少の抑制が起こる、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記血小板受容体の減少の抑制が、GPIIb/IIIa の減少の抑制、GPV の減少の抑制、または両方の減少の抑制を含む、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

単離された血小板の *in vivo* 循環時間を延長する方法であって、

40

(a) 単離された血小板を 1 つ以上の個体から得るステップと、

(b) 前記血小板を、一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤で処置して、処置された血小板を得るステップと、

(c) 前記処置された血小板を、これを必要とする個体に輸血し、これにより輸血された血小板を得るステップと、を含み、

前記輸血された血小板の循環時間が、ステップ (a) に供されていない血小板と比較して長くなる、方法。

【請求項 4 2】

血小板組成物を室温で一定期間保存するステップをさらに含む、請求項 4 1 記載の方法。

50

【請求項 4 3】

血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップと、前記血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いで前記血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、をさらに含む、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 4】

シアリダーゼ阻害剤および血小板集団を含む血小板調製物であって、安定な血小板調製物が、

(a) 血小板集団をドナーから得、かつ

(b) 前記血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置する、

方法によって調製され

前記血小板調製物が、未処置の血小板と比較して、ヒトにおいて止血機能が有意に低下せず、または血小板のクリアランスが有意に増加せずに、保存の後にヒトに投与するのに適している、血小板調製物。

【請求項 4 5】

以下を含む、血小板調製物：

(i) ドナーから単離された血小板、

(i i) 一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤。

【請求項 4 6】

血小板集団を受容し収容できる、環境から実質的に遮断された無菌容器と、無菌の一定量のシアリダーゼ阻害剤とを含む、キット。

【請求項 4 7】

前記容器が血小板の冷蔵に適している、請求項 4 6 記載のキット。

【請求項 4 8】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸 (D A N A) または薬学的に許容され得るその塩；エチル (3 R , 4 R , 5 S) - 5 - アミノ - 4 - アセトアミド - 3 - (ペンタン - 3 - イルオキシ) - シクロヘキサ - 1 - エン - 1 - カルボン酸) ； (2 R , 3 R , 4 S) - 4 - グアニジノ - 3 - (プロブ - 1 - エン - 2 - イルアミノ) - 2 - ((1 R , 2 R) - 1 , 2 , 3 - トリヒドロキシプロピル) - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラン - 6 - カルボン酸 ; (4 S , 5 R , 6 R) - 5 - アセトアミド - 4 - カルバミミドアミド - 6 - [(1 R , 2 R) - 3 - ヒドロキシ - 2 - メトキシプロピル] - 5 , 6 - ジヒドロ - 4 H - ピラン - 2 - カルボン酸 ; および (1 S , 2 S , 3 S , 4 R) - 3 - [(1 S) - 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブチル] - 4 - (ジアミノメチリデンアミノ) - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項 4 6 記載のキット。

【請求項 4 9】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である、請求項 4 8 記載のキット。

【請求項 5 0】

有効量の少なくとも 1 つのグリカン修飾剤をさらに含む、請求項 4 6 記載のキット。

【請求項 5 1】

前記グリカン修飾剤が、C M P - シアル酸または C M P - シアル酸前駆物質である、請求項 5 0 記載のキット。

【請求項 5 2】

前記 C M P - シアル酸前駆物質を C M P - シアル酸に変換する酵素をさらに含む、請求項 1 6 記載のキット。

【請求項 5 3】

前記グリカン修飾剤が、U D P - ガラクトースである、請求項 5 0 記載のキット。

【請求項 5 4】

10

20

30

40

50

前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸およびUDP - ガラクトースである、請求項50記載のキット。

【請求項55】

以下を含む、無菌バッグまたは容器：

(a) 血液の保存に適した無菌バッグまたは容器と、

(b) 一定量の少なくとも1つのシアリダーゼ阻害剤および任意選択で1つ以上のグリカン修飾剤。

【請求項56】

シアリダーゼ活性を低下させて、1つ以上のドナーからの血小板産物調製物中の1つ以上の細菌の増殖を抑制する方法であって、

(a) 前記血小板産物調製物に一定量のシアリダーゼ阻害剤を接触させて、シアリダーゼ処置された血小板産物調製物を得るステップを含み、

ステップ(a)に供されていない血小板産物調製物と比較して、前記シアリダーゼ活性が低下し、前記1つ以上の細菌の増殖が抑制される、方法。

【請求項57】

前記抑制される細菌が、血小板産物調製物に見られる細菌を含む、請求項56記載の方法。

【請求項58】

前記抑制される細菌が、アスペルギルス (*Aspergillus*)、バチルス属 (*Bacillus* sp)、バクテロイデス・エガーシイ (*Bacteroides eggerthii*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、シトロバクター属 (*Citrobacter* sp)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、コリネバクテリア属 (*Corynebacterium* sp)、類ジフテリア菌 (*Diphtheroid*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エンテロバクター・アムニゲナス (*Enterobacter amnigenus*)、エンテロバクター・クロアカエ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロコッカス・アビウム (*Enterococcus avium*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、フゾバクテリア属 (*Fusobacterium* spp.)、グラヌリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp)、(肺炎桿菌 (*K. pneumonia*))、クレブシエラ・オキシトカ (*K. oxytoca*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus* sp)、リステリア属 (*Listeria* sp)、ミクロコッカス属 (*Micrococcus* sp)、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp)、クチニセマウス (*Pseudomys oralis*)、プロピオン酸菌属 (*Propionibacterium* sp)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp)、セラチア属 (*Serratia* sp)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp) (コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (*Coagulase-negative Staphylococcus*))、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus* sp) (ストレプトコッカス・ガロリティカス (*S. gallolyticus*))、ストレプトコッカス・ボビス (*S. bovis*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*)、緑色連鎖球菌 (*S. viridans*)、および腸炎エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) からなる群から選択される、請求項56記載の方法。

【請求項59】

前記シアリダーゼ阻害剤で処置された血小板産物調製物を細菌の増殖について評価するステップ、および前記評価をコントロールと比較するステップをさらに含む、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 6 0】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸 (DANA) または薬学的に許容され得るその塩；エチル (3R, 4R, 5S) - 5 - アミノ - 4 - アセトアミド - 3 - (ペンタン - 3 - イルオキシ) - シクロヘキサ - 1 - エン - 1 - カルボン酸)；(2R, 3R, 4S) - 4 - グアニジノ - 3 - (プロプ - 1 - エン - 2 - イルアミノ) - 2 - ((1R, 2R) - 1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル) - 3, 4 - ジヒドロ - 2H - ピラン - 6 - カルボン酸；(4S, 5R, 6R) - 5 - アセトアミド - 4 - カルバミドアミド - 6 - [(1R, 2R) - 3 - ヒドロキシ - 2 - メトキシプロピル] - 5, 6 - ジヒドロ - 4H - ピラン - 2 - カルボン酸；および(1S, 2S, 3S, 4R) - 3 - [(1S) - 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブチル] - 4 - (ジアミノメチリデンアミノ) - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項 5 6 記載の方法。

10

【請求項 6 1】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記血小板産物調製物を 1 つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップをさらに含み、前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸または CMP - シアル酸前駆物質である、請求項 5 6 記載の方法。

20

【請求項 6 3】

前記血小板産物調製物を、前記 CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素に接触させるステップをさらに含む、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

前記血小板産物調製物を 1 つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップをさらに含み、前記グリカン修飾剤が、UDP - ガラクトースである、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 6 5】

前記血小板産物調製物を 2 つのグリカン修飾剤に接触させるステップをさらに含み、前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸および UDP - ガラクトースである、請求項 5 6 記載の方法。

30

【請求項 6 6】

シアリダーゼ活性を低下させて、個体からの血小板調製物または血小板サンプルにおける細菌の増殖を抑制する方法であって、前記細菌が、アスペルギルス (*Aspergillus*)、バチルス属 (*Bacillus* sp)、バクテロイデス・エガーシイ (*Bacteroides eggertii*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、シトロバクター属 (*Citrobacter* sp)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、コリネバクテリア属 (*Corynebacterium* sp)、類ジフテリア菌 (*Diphtheroid*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エンテロバクター・アムニゲナス (*Enterobacter amnigenus*)、エンテロバクター・クロアカエ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロコッカス・アビウム (*Enterococcus avium*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、フゾバクテリア属 (*Fusobacterium* sp.)、グラヌリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp)、(肺炎桿菌 (*K. pneumonia*))、クレブシエ

40

50

ラ・オキシトカ (*K. oxytoca*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus* sp)、リステリア属 (*Listeria* sp)、ミクロコッカス属 (*Micrococcus* sp)、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp)、クチニセマウス (*Pseudomys oralis*)、プロピオン酸菌属 (*Propionibacterium* sp)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp)、セラチア属 (*Serratia* sp)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp) (コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (*Coagulase-negative Staphylococcus*))、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus* sp) (ストレプトコッカス・ガロリティカス (*S. gallolyticus*)、ストレプトコッカス・ボビス (*S. bovis*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*)、緑色連鎖球菌 (*S. viridans*))、および腸炎エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) からなる群から選択され、前記方法が、

(a) 少なくとも1つのシアリダーゼ阻害剤を前記調製物に接触させるステップを含み、

ステップ(a)に供されていない調製物と比較して、前記シアリダーゼ活性が低下し、1つ以上の細菌の増殖が抑制される、方法。

【請求項67】

保存中の血小板の細菌増殖を抑制する方法であって、単離された血小板を1つ以上のドナーから得、前記方法が、

(a) 前記単離された血小板を一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で1つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップと、

(b) 前記単離された血小板における細菌の増殖を1つ以上の時点で評価するステップと、を含み、

前記単離された血小板における細菌の増殖が抑制される、方法。

【請求項68】

前記血小板調製物を、血小板表面グリカンのシアル酸残基の加水分解を減少させるのに十分な量の前記シアリダーゼ阻害剤に接触させる、請求項67記載の方法。

【請求項69】

前記単離された血小板が、約1～約21日の期間に亘って保存される、請求項67記載の方法。

【請求項70】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸 (DANA) または薬学的に許容され得るその塩；エチル(3R,4R,5S)-5-アミノ-4-アセトアミド-3-(ペンタン-3-イルオキシ)-シクロヘキサ-1-エン-1-カルボン酸)；(2R,3R,4S)-4-グアニジノ-3-(プロプ-1-エン-2-イルアミノ)-2-((1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル)-3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-カルボン酸；(4S,5R,6R)-5-アセトアミド-4-カルバミドアミド-6-[(1R,2R)-3-ヒドロキシ-2-メトキシプロピル]-5,6-ジヒドロ-4H-ピラン-2-カルボン酸；および(1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-アセトアミド-2-エチル-ブチル]-4-(ジアミノメチリデンアミノ)-2-ヒドロキシ-シクロペンタン-1-カルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項67記載の方法。

【請求項71】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である、請求項70記載の方法。

【請求項 7 2】

前記グリカン修飾剤が、C M P - シアル酸または C M P - シアル酸前駆物質である、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 7 3】

前記 C M P - シアル酸前駆物質を C M P - シアル酸に変換する酵素をさらに含む、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記グリカン修飾剤が、U D P - ガラクトースである、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 7 5】

前記単離された血小板が、約 1 ~ 約 2 4 の温度で保存される、請求項 6 7 記載の方法。 10

【請求項 7 6】

血小板組成物を室温で一定期間保存するステップをさらに含む、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップと、前記血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いで前記血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、をさらに含む、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 8】

保存中にシアリダーゼ活性が低下して細菌の増殖が抑制される保存用の血小板を調製する方法であって、単離された血小板を 1 つ以上のドナーから得、前記方法が、 20

(a) 前記単離された血小板を 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップと、

(b) 前記単離された血小板における細菌の増殖を評価するステップと、を含み、

前記単離された血小板における細菌の増殖が、コントロールと比較して抑制される、方法。

【請求項 7 9】

血小板集団の保存時間を延長する方法であって、

(a) 血小板集団を 1 つ以上の個体から得るステップと、

(b) 血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤に接触させて、処置された血小板を得るステップと、を含む、方法。 30

【請求項 8 0】

前記血小板集団を時間枠内で前記シアリダーゼ阻害剤で処置するステップをさらに含み、前記時間枠が、約 1 分 ~ 約 8 時間の範囲である、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 1】

血小板組成物を室温で一定期間保存するステップをさらに含む、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 2】

血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップと、前記血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いで前記血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、をさらに含む、請求項 8 1 記載の方法。 40

【請求項 8 3】

シアリダーゼ活性を低下させて細菌の増殖を抑制することによって血小板集団の保存時間を延長する方法であって、

(a) 血小板集団を 1 つ以上の個体から得るステップと、

(b) 血小板を、有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置して、処置された血小板を得るステップと、を含み、

シアリダーゼ阻害剤に供されていない血小板と比較して、前記細菌の増殖が抑制される、方法。

【請求項 8 4】

単離された血小板を輸血する方法であって、

(a) 単離された血小板を1つ以上の個体から得るステップと、

(b) 前記血小板を、一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で1つ以上のグリカン修飾剤で処置して、細菌の増殖が抑制された処置された血小板を得るステップと、

(c) 前記処置された血小板を、これを必要とする個体に輸血するステップと、を含み、

ステップ(b)に供されていない血小板と比較して、前記細菌の増殖が抑制される、方法。

【請求項85】

10

保存された後にレシピエントに輸血された血小板の止血活性を維持する方法であって、前記血小板をドナーから得て単離し、単離された血小板を得、前記方法が、

(a) 単離された血小板を一定量のシアリダーゼ阻害剤に接触させて、処置された血小板を得るステップと、

(b) 前記処置された血小板を約1～14日間の期間保存するステップと、

(c) 前記処置されて保存された血小板を、これを必要とするレシピエントに輸血し、これにより輸血された血小板を得るステップと、を含み、

ステップ(a)に供されていない血小板と比較して、前記輸血された血小板は活性化して血餅を形成することができる、方法。

【請求項86】

20

シアリダーゼ阻害剤および血小板集団を含む血小板調製物であって、安定な血小板調製物が、

(a) 血小板集団をドナーから得、かつ

(b) 前記血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置する、方法によって調製され、

前記血小板調製物が、未処置の血小板と比較して、ヒトにおいて止血機能が有意に低下せず、または血小板のクリアランスが有意に増加せず、保存の後にヒトに投与するのに適しており、

前記血小板調製物が、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板調製物と比較して抑制された細菌の増殖を示す、血小板調製物。

30

【請求項87】

前記血小板の処置後に、

(a) 前記血小板調製物を室温で一定期間保存するさらなるステップをさらに含む、請求項86記載の血小板調製物。

【請求項88】

前記血小板の処置後に、

(a) 前記安定な血小板調製物を室温未満の温度に冷却するステップと、

(b) 前記血小板調製物を一定期間保存するステップと、

(c) 前記血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、

(d) 前記血小板組成物を細菌増殖について評価するステップと、をさらに含む、請求項86記載の血小板調製物。

40

【請求項89】

前記シアリダーゼ阻害剤が、フェツイン、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸(DANA)または薬学的に許容され得るその塩；エチル(3R,4R,5S)-5-アミノ-4-アセトアミド-3-(ペンタン-3-イルオキシ)-シクロヘキサ-1-エン-1-カルボン酸；(2R,3R,4S)-4-グアニジノ-3-(プロプ-1-エン-2-イルアミノ)-2-((1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル)-3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-カルボン酸；(4S,5R,6R)-5-アセトアミド-4-カルバミドアミド-6-[(1R,2R)-3-ヒドロキシ-2-メトキシプロピル]-5,6-ジヒドロ-4H-ピラン-2-カルボン酸；お

50

よび (1 S , 2 S , 3 S , 4 R) - 3 - [(1 S) - 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブチル] - 4 - (ジアミノメチリデンアミノ) - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カルボン酸、または薬学的に許容され得るその塩からなる群から選択される、請求項 8 6 記載の血小板調製物。

【請求項 9 0】

前記シアリダーゼ阻害剤が、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である、請求項 8 9 記載の血小板調製物。

【請求項 9 1】

有効量の少なくとも 1 つのグリカン修飾剤をさらに含む、請求項 8 9 記載の血小板調製物。

10

【請求項 9 2】

前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸または CMP - シアル酸前駆物質である、請求項 9 1 記載の血小板調製物。

【請求項 9 3】

前記 CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素をさらに含む、請求項 8 9 記載の血小板調製物。

【請求項 9 4】

前記グリカン修飾剤が、UDP - ガラクトースである、請求項 9 1 記載の血小板調製物。

【請求項 9 5】

前記グリカン修飾剤が、CMP - シアル酸および UDP - ガラクトースである、請求項 9 1 記載の血小板調製物。

20

【請求項 9 6】

(i) ドナーから単離された血小板と、

(i i) 一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択で 1 つ以上のグリカン修飾剤と

を含む、血小板調製物であって、

シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板調製物と比較して抑制された細菌の増殖を示す、血小板調製物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2012年5月17日出願の米国特許出願第13/474, 473号明細書の一部継続出願；2012年5月17日出願の米国特許出願第13/474, 627号明細書の一部継続出願；および2012年5月17日出願の米国特許出願第13/474, 679号明細書の一部継続出願であり、2012年3月21日出願の米国仮特許出願第61/613, 876号明細書；2012年3月21日出願の米国仮特許出願第61/613, 837号明細書；2011年7月1日出願の米国仮特許出願第61/503, 984号明細書；および2011年5月17日出願の米国仮特許出願第61/487, 077号明細書の優先権を主張するものである。

40

【0002】

上記出願の全教示が、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【0003】

政府支援

本発明は、米国心臓、肺、血液研究所 (National Heart , Lung , and Blood Institute) による認可番号 3RO1HL089224 - 03S1 によって全てまたは一部が支援された。

【背景技術】

【0004】

50

輸血用に収集された血小板は、非常に保存性が低い。血小板は、血管損傷部位に付着して血漿フィブリゲン塊の形成を促進することによって負傷した哺乳動物を失血から保護する無核の骨髓由来血液細胞である。骨髓機能不全によって循環血小板が激減したヒトは、致死的な突発性出血を患い、比較的軽度の血小板欠乏は、外傷または外科手術の後の出血性合併症の一因となる。

【0005】

循環血小板の総数が低下すると（例えば、約70,000/ μ L）、患者は、次第に皮下出血しやすくなる。血小板総数が20,000/ μ L未満の患者は、特に、骨髓の障害または機能不全によって血小板減少症が引き起こされると、粘膜表面から突発性出血を極めて引き起こしやすくなる。骨髓障害、例えば、再生不良貧血、急性および慢性白血病、転移性癌、ならびに癌治療、例えば、電離放射線または化学療法から生じる欠乏症に関連した血小板欠乏は全て、主な公衆衛生問題の原因である。主な外科手術、傷害、および敗血症に関連した血小板減少症の患者もまた、かなりの数の血小板輸血を必要とする。

10

【0006】

半世紀前の主な医療技術の進歩は、このような血小板欠乏を治す血小板輸血の開発であり、結果として、米国では、現在の輸血率で1年に約260万の血小板輸血が行われた。しかしながら、輸血用に収集された血小板は、室温またはそれ以下で保存されると*in vivo*止血活性が急速に低下するため、非常に保存性が低い。止血活性は、広義では、出血の停止を媒介する血小板集団の能力を指す。

20

【0007】

血小板は、他の輸血可能な組織とは異なり、冷却に耐性がなく、たとえ極めて短時間低温に曝されただけでも、レシピエントの循環から急速に消失する。重大なことに、血小板の生存期間を短縮する冷却の影響は、不可逆的であり、かつ冷却された血小板が輸血に適さなくなると考えられていた。血小板障害の第1の目に見える影響の1つは、円盤状の形態から球形への不可逆的な変換であり、カルシウム依存性ゲルソリン活性化およびホスホイノシチド媒介アクチン重合により血小板表面に棘状突起が出現する。血小板が20 未満の温度に曝露されると、血小板は、急速にこのように変形する。

【0008】

輸血前に血小板を室温に維持するためには、血小板の保存のための独自の高価かつ複雑な後方支援が必要である。血小板は、室温で代謝的に活性であるため、ガス交換により代謝性アシドーシスの毒性結果を防止するためにガス透過性容器内で常に攪拌する必要がある。室温保存条件は、高分子分解および血小板の止血機能の低下、すなわち「保存損傷」として知られる一連の障害をもたらす。加えて、室温での保存は、細菌の増殖を促進し、細菌感染のリスクが高くなり、従ってこのような保存期間が実質的に約5日間に限定される。この点に関して、血小板の細菌汚染は、血液成分使用の最も頻度の高い感染性合併症である。現在の率では、血小板の1,000単位~2,000単位に1つが、レシピエントに大きなリスクをもたらすのに十分に細菌で汚染されている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、室温以下での保存時にヒト血小板の*in vivo*止血活性を改善または延長する作用物質、溶液、および方法の開発がなお必要とされている。このようにして細菌の増殖を抑制するさらなる強い要望が存在する。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤と、塩（例えば、ナトリウム源、塩化物源、カリウム源、マグネシウム源、カルシウム源、およびこれらの組み合わせ）、クエン酸塩源（例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸、およびこれらの組み合わせ）、および/または炭素源（例えば、酢酸塩、グルコース、スクロース、およびこれらの

50

任意の組み合わせ)を含む1つ以上のPAS成分と、を含む血小板添加液(PAS)に関する。本発明のPASは、約6.4~約7.6の範囲のpHに維持される。一実施形態では、本発明のPASは、リン酸塩源(例えば、一リン酸ナトリウム、二リン酸ナトリウム、三リン酸ナトリウム、およびこれらの組み合わせ)をさらに含む。酢酸塩源は、例えば、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、またはこれらの組み合わせを含み得る。一態様では、ナトリウム源は、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、またはこれらの組み合わせとすることができる。同様に、塩化物源は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、またはこれらの組み合わせとすることができる。カリウム源は、一例では、塩化カリウム、クエン酸カリウム、酢酸カリウム、リン酸カリウム、硫酸カリウム、またはこれらの組み合わせとすることができる。マグネシウム源の例として、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、およびこれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態では、カルシウム源は、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、クエン酸カルシウム、またはこれらの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0011】

特定の実施形態では、本発明のPASは、一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤；約100mM~約300mMの範囲の量のナトリウム源；約40mM~約110mMの範囲の量の塩化物源；約2mM~約20mMの範囲の量のクエン酸塩源；約10mM~約50mMの範囲の量の酢酸塩源；約5mM~約50mMの範囲の量のリン酸塩源；約0.5mM~約10mMの範囲の量のカリウム源；約0.5mM~約2.5mMの範囲の量のマグネシウム源；および約0.5mM~約2.5mMの範囲の量のカルシウム源を含み；PASは、約6.4~約7.6(例えば、約7.1~約7.4、または約7.2)の範囲のpHに維持される。

【0012】

なお別の実施形態では、本発明は、単離された血小板、本発明のPAS、および血漿を含む血小板組成物に関連し、この血小板組成物は、約6.4~約7.6の範囲のpHに維持される。一態様では、血漿は、約1容量%~約50容量%(例えば、20%~40%の血漿、または約30%の血漿)の範囲の量で存在する。なお別の実施形態では、血小板添加液は、約50容量%~約99容量%の範囲の量で存在する。

【0013】

本発明は、本発明のPASを含む血小板の保存に適したバッグまたは容器にも関する。バッグまたは容器は、単離された血小板をさらに含むことができ、かつ/または約6.4~約7.6の範囲のpHに維持することができる。

【0014】

本発明は、血小板を保存する方法に関し、この方法では、単離された血小板を1つ以上のドナーから得る。この方法は、本明細書で説明されるように、単離された血小板をPASに接触させるステップを含む。シアリダーゼ阻害剤は、例えば、フェツイン、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸(DANA)または薬学的に許容され得るその塩；オセルタミビル(エチル(3R,4R,5S)-5-アミノ-4-アセトアミド-3-(ペンタン-3-イルオキシ)-シクロヘキサ-1-エン-1-カルボン酸)；ザナミビル((2R,3R,4S)-4-グアニジノ-3-(プロブ-1-エン-2-イルアミノ)-2-((1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル)-3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-カルボン酸)；ラニナミビル((4S,5R,6R)-5-アセトアミド-4-カルバミドアミド-6-[(1R,2R)-3-ヒドロキシ-2-メトキシプロピル]-5,6-ジヒドロ-4H-ピラン-2-カルボン酸)；およびペラミビル((1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-アセトアミド-2-エチル-ブチル]-4-(ジアミノメチリデンアミノ)-2-ヒドロキシ-シクロペンタン-1-カルボン酸)または薬学的に許容され得るその塩とすることができる。一実施形態では、シアリダーゼ阻害剤は、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸のナトリウム塩である。この方法は、単離された血小板を約1~約21日間の期間

保存することを可能にする。単離された血小板は、約 1 ～ 約 24 の温度で保存される。この方法は、一実施形態では、血小板組成物を室温未満の温度まで冷却するステップと、この血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いでこの血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、を含む。一態様では、血小板集団をシアリダーゼ阻害剤で一定期間処置し、この期間は、約 1 分～約 8 時間の範囲である。

【0015】

本発明は、保存用の血小板を調製する方法に関し、この方法では、単離された血小板を 1 つ以上のドナーから得る。この方法は、本明細書で説明されるように、単離された血小板を 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップを含む。グリカン修飾剤は、例えば、CMP - シアル酸、CMP - シアル酸前駆物質、UDP - ガラクトース、またはこれらの組み合わせとすることができる。一態様では、CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素を血小板に添加することもできる。

10

【0016】

本発明は、保存用の血小板を調製する方法にも関する。この方法は、血小板を 1 つ以上の個体から単離するステップと、この単離された血小板を、血小板表面グリカンのシアル酸残基の加水分解を減少させるのに十分な量のシアリダーゼ阻害剤に接触させるステップと、を含む。一態様では、血小板受容体の減少（例えば、GPIb α の減少、GPVの減少、または両方の減少）の抑制が起こる。

20

【0017】

本発明には、単離された血小板の *in vivo* 循環時間を延長する方法が包含される。この方法は、単離された血小板を 1 つ以上の個体から得るステップと、この血小板を、一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤で処置し、これにより処置された血小板を得るステップと、この処置された血小板を、これを必要とする個体に輸血し、これにより輸血された血小板を得るステップと、を含む。輸血された血小板の循環時間は、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板と比較して長くなる。この方法は、一態様では、血小板組成物を室温で一定期間保存するステップを含む。別の態様では、この方法は、血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップと、この血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いでこの血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、を含む。

30

【0018】

本発明のなお別の実施形態は、シアリダーゼ阻害剤および血小板集団を有する血小板調製物を含み、安定な血小板調製物は、以下の方法によって調製され、この方法は、血小板集団をドナーから得るステップと、この血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置するステップと、を含む。このような血小板調製物は、未処置の血小板と比較して、ヒトにおいて止血機能が有意に低下しないまたは血小板のクリアランスが有意に増加しない保存の後にヒトに投与するのに適している。同様に、本発明の血小板調製物はまた、ドナーから単離された血小板と、一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤と、含む。

40

【0019】

本発明は、キットおよびシステムにも関する。本発明のキットは、血小板集団を受け取って収容できる、環境から実質的に遮断された無菌容器と、本明細書で説明される無菌の一定量のシアリダーゼ阻害剤と、任意選択の適切なパッケージング材料と、使用のための取扱説明書と、を含む。一例では、容器は、血小板の冷蔵に適している。キットは、一定量の少なくとも 1 つのグリカン修飾剤、例えば、CMP - シアル酸、CMP - シアル酸前駆物質、UDP - ガラクトース、またはこれらの組み合わせをさらに含み得る。同様に、本発明は、血小板の保存に適した無菌バッグまたは容器と、本明細書で説明される一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤と、任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤と、を有するシステムを含む。

50

【0020】

本発明は、シアリダーゼ活性を低下させて、1つ以上のドナーからの血小板産物調製物中の1つ以上の細菌の増殖を抑制する方法に関する。この方法は、血小板産物調製物に、本明細書で説明される一定量のシアリダーゼ阻害剤を接触させ、これによりシアリダーゼ処置された血小板産物調製物を得るステップを含み、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板産物調製物と比較して、シアリダーゼ活性が低下し、1つ以上の細菌の増殖が抑制される。抑制される細菌の種類は、血小板産物調製物中に一般に見られるものを含む。このような細菌の例として、アスペルギルス (*Aspergillus*)、バチルス属 (*Bacillus* sp)、バクテロイデス・エガーシイ (*Bacteroides eggerthii*)、カンジダアルビカンス (*Candida albicans*)、シトロバクター属 (*Citrobacter* sp)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、コリネバクテリア属 (*Corynebacterium* sp)、類ジフテリア菌 (*Diphtheroid*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エンテロバクター・アムニゲナス (*Enterobacter amnigenus*)、エンテロバクター・クロアカエ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロコッカス・アビウム (*Enterococcus avium*)、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、フゾバクテリア属 (*Fusobacterium* spp.)、グラヌリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp)、(肺炎桿菌 (*K. pneumonia*))、クレブシエラ・オキシトカ (*K. oxytoca*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus* sp)、リステリア属 (*Listeria* sp)、ミクロコッカス属 (*Micrococcus* sp)、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp)、クチニセマウス (*Pseudomys oralis*)、プロピオン酸菌属 (*Propionibacterium* sp)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp)、セラチア属 (*Serratia* sp)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* sp) (コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (*Coagulase-negative Staphylococcus*))、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus* sp) (ストレプトコッカス・ガロリティカス (*S. gallolyticus*))、ストレプトコッカス・ボビス (*S. bovis*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*)、緑色連鎖球菌 (*S. viridans*)、および腸炎エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) が挙げられる。この方法は、シアリダーゼ阻害剤で処置された血小板産物調製物を細菌の増殖について評価するステップ、およびこの評価をコントロールと比較するステップをさらに含む。1つ以上のグリカン修飾剤を、血小板に添加することができる。このようなグリカン修飾剤は、例えば、CMP - シアル酸、CMP - シアル酸前駆物質、UDP - ガラクトース、またはこれらの組み合わせを含む。一態様では、CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素を、血小板に添加することもできる。

【0021】

本発明は、保存中の血小板における細菌の増殖を抑制する方法を包含し、この方法では、単離された血小板を1つ以上のドナーから得る。この方法は、単離された血小板を、本明細書で説明される一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップと、単離された血小板における細菌の増殖を1つ以上の時点で評価するステップと、を含み、単離された血小板における細菌増殖が抑制される。一態様では、血小板調製物を、血小板表面グリカンのシアル酸残基の加水分解を減少

させるのに十分な量のシアリダーゼ阻害剤に接触させる。単離された血小板は、一実施形態では、約 1 ~ 約 2 1 日間の期間保存することができる。単離された血小板は、例えば、約 1 ~ 約 2 4 の温度で保存することができる。一実施形態では、この方法は、血小板組成物を室温で一定期間保存するステップを含む。別の実施形態では、この方法は、血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップと、この血小板組成物を一定期間保存するステップと、次いで、個体に輸血する前にこの血小板組成物を再加温して室温に戻すステップと、を含む。

【 0 0 2 2 】

本発明のなお別の実施形態は、保存中にシアリダーゼ活性が低下して細菌の増殖が抑制される保存用の血小板を調製する方法に関し、この方法では、単離された血小板を 1 つ以上のドナーから得る。この方法は、単離された血小板を 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤に接触させるステップと、この単離された血小板における細菌の増殖を評価するステップと、を含み、単離された血小板における細菌増殖が、コントロールと比較して抑制される。本発明は、血小板集団を 1 つ以上の個体から得るステップと、血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置し、これにより処置された血小板を得るステップと、によって血小板集団の保存時間を延長する方法をさらに含む。一態様では、血小板集団を時間枠内でシアリダーゼ阻害剤で処置し、この時間枠は、約 1 分 ~ 約 8 時間の範囲である。これらのステップは、シアリダーゼ活性を低下させて細菌の増殖を抑制することによって血小板集団の保存時間を延長する方法にも使用することができる。

【 0 0 2 3 】

単離された血小板を輸血する方法も本発明に包含される。この方法は、単離された血小板を 1 つ以上の個体から得るステップと、血小板を、一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤で処置し、これにより細菌の増殖が抑制された処置された血小板を得るステップと、処置された血小板を、これを必要とする個体に輸血するステップと、を含み、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板と比較して、細菌の増殖が抑制される。

【 0 0 2 4 】

本発明は、保存された後にレシピエントに輸血された血小板の止血活性を維持する方法に関する。この方法は、単離された血小板を一定量のシアリダーゼ阻害剤に接触させ、これにより処置された血小板を得るステップと、この処置された血小板を約 1 ~ 約 1 4 日間の期間保存するステップと、処置されて保存された血小板を、これを必要とするレシピエントに輸血し、これにより輸血された血小板を得るステップと、を含み、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板と比較して、輸血された血小板が活性化して血餅を形成することができる。

【 0 0 2 5 】

血小板調製物も本発明に包含される。このような血小板調製物は、シアリダーゼ阻害剤および血小板集団を含み、安定な血小板調製物は、本明細書で説明される方法によって調製される。加えて、本発明の血小板調製物は、ドナーから単離された血小板と、一定量の 1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤と、を含み、この血小板調製物が、シアリダーゼ阻害剤で処置されていない血小板調製物と比較して抑制された細菌の増殖を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 図 1 A ~ C は、細胞内シアリダーゼを含むシアル化血小板およびシアリダーゼを含む細菌を模式的に示している。(A) 細菌由来シアリダーゼおよび血小板由来シアリダーゼは共に、血小板表面からシアル酸を除去し、機能が障害された血小板が形成される (1)。放出されたシアル酸は、汚染細菌の増殖を助け (短い点線と 2)、これにより血小板が活性化し (3)、血小板 - 細菌凝集体 (3) および生物膜 (長い点線と 4) が形成される。(B) 脱シアル化血小板は、輸血時に食細胞によって認識されて循環から除去され

る。(C)シアリダーゼ阻害剤DANA(2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸のナトリウム塩)の添加により、血小板および細菌由来のシアリダーゼ活性が阻害され、血小板の脱シアル化が防止され、これにより血小板が、輸血後に食細胞に認識されなくなる。

【図2】図2は、4での保存中にヒト血小板がシアル酸を減らすことを示す棒グラフである。血小板濃縮物(A:ドナーAおよびB:ドナーB)が、外因性ヌクレオチド糖の非存在下(a)、CMP-シアル酸(CMP-SA)およびUDP-ガラクトース(UDP-Gal)の存在下(b)、またはUDP-Galのみの存在下(c)、4で5日間保存された。血小板のシアル酸含有量は、第0日目を100%と設定した。

【図3】図3は、冷蔵後にヒト血小板のシアリダーゼ表面活性が上昇することを示す折れ線グラフである。(A)は、透過処理されたまたは透過処理されていない新鮮な血小板の分析を示している。(B)は、新鮮な無傷の血小板(ドナーAおよびB)のpH5および6での分析を示している。(C)は、4で5日間保存した後の無傷の血小板(ドナーAおよびB)の対応する分析を示している。

【図4】図4は、ヒト血小板の表面におけるシアリダーゼNeu1ではなくNeu3の存在を実証する、固定された透過処理されていない休止している室温(RT)(左側のパネル)および冷温(右側のパネル)のヒト血小板の免疫蛍光顕微鏡写真を示している。血小板の冷蔵(48時間)は、シアリダーゼ(Neu1)表面の蛍光、すなわち露出を増加させる。抗Neu1抗体を上側のパネルに使用した。抗Neu3抗体を下側のパネルに使用した。

【図5】図5は、48時間の冷蔵後に再加温されたマウス血小板シアリダーゼ表面活性の上昇を示している。血小板由来シアリダーゼ活性を、室温で0~2.5時間に亘って蛍光(吸光強度(AI))で測定した。冷温(4、黒い丸)で保存された血小板を、新鮮な血小板(RT、薄い丸)と比較した。コントロールとして、シアリダーゼ活性(ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)(成分H))を同じ期間(insert)に亘って測定した。

【図6】図6は、フェツインが、血小板の保存中にシアリダーゼ表面活性について競合し、これにより血小板グリカンのシアル酸の加水分解が防止される。左側のバーの対は、フェツインの非存在下(コントロール)または存在下(フェツイン)での新鮮な血小板(0)のβ-ガラクトース露出を示している。右側のバーの対は、血小板を48時間冷蔵した後のフェツインの非存在下(コントロール)または存在下でのβ-ガラクトースを示している。シアル酸の減少、すなわちβ-ガラクトースの露出をRCA-I結合によって測定する。

【図7】図7は、シアリダーゼ阻害剤DANAが、in vivoでのマウス血小板の寿命を延ばすことを示している。下側の折れ線は、コントロール血小板の寿命を示している(コントロール)。上側の折れ線は、DANA添加時の血小板の寿命を示している(DANA)。

【図8】図8の(A)は、一次GPIbα構造およびO結合型およびN結合型グリカンの模式的な構造を示している。(B)は、末端Galβ1,4GlcNAc(ラクトサミノグリカン/LacNAc)、およびコア-1 O-グリカンの生合成修飾を示している。

【図9】図9は、全血小板溶解物のウエスタンブロット分析によりヒト血小板がシアリダーゼNeu1およびNeu3を含むことを示している。

【図10】図10は、ウエスタンブロットでの分析により、ヒト血小板が長期冷蔵時にNeu1を血漿中に放出することを示している。血小板およびその対応する血漿を、第0日目、ならびに1日間、2日間、および5日間の血小板の冷蔵後に分析した。

【図11】図11(A)は、血小板グリコシルトランスフェラーゼ(GT)の特徴を示している。ヒトの全血小板溶解物をSDS-PAGEにかけて、モノクローナル抗体:抗GalNAcトランスフェラーゼ(GalNAc-T1、GalNAc-T2、GalNAc-T3)、β4Gal-トランスフェラーゼ1(β4Gal-T1)、およびシアリルトランスフェラーゼST3Gal-1で免疫ブロットした。(B)血小板はGTを分泌す

10

20

30

40

50

る。休止血小板を、5分間、 37°C に維持した、または $25\mu\text{M}$ のTRAPを用いてトロンビン受容体PAR-1を介して活性化した。最大の放出は、1分後に観察された。カウント数/分(CPM)で表される酵素活性を、ペレット化血小板画分(P)で、またはその対応する浴培体(M)で測定した。媒体を $100,000\times g$ で90分間清澄させて、活性の測定の前に微粒子を除去した。

【図12】図12は、内因性血小板シアリルトランスフェラーゼが、シアル酸を血小板表面受容体に取り込ませることを示している。(A)活性ヒト血小板表面シアリルトランスフェラーゼが、FITC結合CMP-SA(FITC-SA)を休止血小板(点線)またはTRAP活性化血小板に取り込ませた。FITC単独(コントロール)を休止血小板(点線)またはTRAP活性化血小板(実線)に添加した。(B)は、FITC、GPIb α 、 α IIb、およびvWfに対する抗体を用いた、FITC(C)またはFITC-CMP-シアル酸(S)で処置した、または未処置(-)の休止血小板(Rest)またはTRAP活性化血小板(TRAP)からの溶解物の免疫プロットを示している。示されているプロットは、2つの実験を表している。アクチンは、添加コントロールとして知られている。

10

【図13】図13は、血小板が、室温(A)または低温(B)での保存中にGPIb α およびGPV受容体を減らすことを示している。マウスvWf受容体複合体成分(GPIb α 、GPIb β 、GPIX、GPV)、GPVI、および α IIb β 3の発現を、冷蔵の前および後の示した時点でフローサイトメトリーによって測定した。結果は、平均 $\pm$ SDとして示されている、 $n=5$ 。新たに単離された血小板における糖タンパク質の発現を100%として設定した。

20

【図14】図14は、メタロプロテアーゼ媒介GPIb α 脱落の抑制のみでは、マウス血小板の回復および生存は改善されない。(A)GPIb α および(B)GPVの表面発現をフローサイトメトリーによって評価した。野生型マウス多血小板血漿をDMSO(コントロール)または $100\mu\text{M}$ のメタロプロテイナーゼ阻害剤GM6001の存在下、4で0時間、24時間、および48時間保存した($n=6$)。(C)GPIb α および(D)GPVの表面発現を、TACE $^{+}/^{+}$ およびTACE $^{\Delta Z n}/^{\Delta Z n}$ マウス由来の新たに単離された多血小板血漿または24時間および48時間冷蔵した多血小板血漿に対するフローサイトメトリーによって決定した。結果を、平均 $\pm$ 標準偏差として表す。 $n=5$ 。(C、インセット)低温で3時間、24時間、および48時間保存されたTACE $^{+}/^{+}$ およびTACE $^{\Delta Z n}/^{\Delta Z n}$ 血小板由来の溶解物中のGPIb α の免疫プロット。(E)蛍光標識(5-クロロメチルフルオレセイン二酢酸、CMFDA)された新鮮なPRP(RT)または $100\mu\text{M}$ のGM6001の非存在下(48時間)または存在下(48時間+GM6001)で保存された多血小板血漿由来の血小板を野生型マウスに注射した(体重 10g 当たり 10^8 の血小板)。血液を示した時点で採取し、血小板を即座にフローサイトメトリーによって分析した。結果を、平均パーセントCMFDA標識血小板 $\pm$ 標準偏差として表す。輸血5分後のCMFDA陽性の新鮮な血小板のパーセントを100%と設定した。 $n=5$ 。 $*p<0.05$ 。冷蔵血小板を比較する。(F)蛍光標識(CMFD A)された新鮮な血小板(TACE $^{+}/^{+}$ RTおよびTACE $^{-}/^{-}$ RT)または保存された多血小板血漿由来の血小板(TACE $^{+}/^{+}$ 48時間およびTACE $^{-}/^{-}$ 48時間)を野生型マウスに静注した(体重 10g 当たり 10^8 の血小板)。血液を示した時点で採取し、血小板を即座にフローサイトメトリーによって分析した。結果を、平均パーセントCMFDA標識血小板 $\pm$ 標準偏差として表す。輸血5分後のCMFDA陽性の新鮮なTACE $^{+}/^{+}$ 血小板のパーセントを100%と設定した。 $n=5$ 。

30

40

【図15】図15は、シアリダーゼ処置TACE $^{\Delta Z n}/^{\Delta Z n}$ 血小板が循環から急激に除去されることを示している。(A)ECL FITC標識レクチンで検出される、糖タンパク質における β -ガラクトース露出のフローサイトメトリー分析。 $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼ(Neu)で処置されたまたは処置されなかったTACE $^{+}/^{+}$ (白いバー)またはTACE $^{\Delta Z n}/^{\Delta Z n}$ (黒いバー)血小板に結合するレクチン。未処置TACE $^{+}/^{+}$ 血小板に結合する平均蛍光強度の比が示されている。ヒストグラムは、3

50

つの別個の実験の平均±標準偏差を示している。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。(B) GPIb α 、GPV、および $\alpha_{IIb}\beta_3$ の表面発現をフローサイトメトリーによって評価した。TACE^{+/+}(不図示)およびTACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ 血小板をシアリダーゼ(5mU/mL)で処置した(黒いバー)または処置しなかった(白いバー)。結果を、TACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ 血小板におけるGPIb α の量に対して相対的に表す(コントロール±標準偏差に対する平均%)。n=3。(C)新鮮な室温の蛍光標識(CMFD A)TACE^{+/+}およびTACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ 血小板を $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼ(5mU/mL)で処置して(黒い記号)、または処置しないで(中抜き記号)、これらを、TACE^{+/+}マウスに静注した(体重10g当たり 10^8 の血小板)。血液を示した時点で採取し、血小板を即座にフローサイトメトリーによって分析した。結果を、平均パーセントCMFD A標識血小板±標準偏差として表す。輸血5分後のCMFD A陽性の未処置TACE^{+/+}血小板のパーセントを100%と設定した。各点は、4匹のマウスを表し、有意でなかった、 $***P < 0.0001$ 。シアリダーゼ処置TACE^{+/+}とTACE $\Delta Z_n/\Delta Z_n$ を比較した。

【図16】図16は、血小板のノイラミニダーゼ処置が、ECL蛍光レクチン結合での測定により β -ガラクトース露出(シアル酸の減少)を増大させることを示している。ECL I(白色のバー)またはs-WGA(斜線のバー)FITC-標識レクチンで検出した、血小板糖タンパク質における β -ガラクトースまたは β -GlcNAc露出のフローサイトメトリー分析。示された濃度におけるアルスロバクター・ウレアファシエンス(A. ureafaciens)由来の $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼ(Neu)の存在下および非存在下での新鮮なマウス血小板へのレクチンの結合、n=5。

【図17】図17は、漸増するノイラミニダーゼ濃度での血小板GPIb α およびGPV受容体の用量依存性の減少を示している。新たに単離されたマウス血小板におけるGPIb α およびGPVの表面発現をフローサイトメトリーによって評価した。示された濃度における $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼ(Neu)の存在下および非存在下での表面受容体の発現。時間0における受容体発現の平均蛍光を100%として設定した。n=4。

【図18】図18は、DANAが、ノイラミニダーゼ処置による β -ガラクトースの露出を阻害することを示している。5mUの $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼ(Neu)および競合シアリダーゼ阻害剤DANA(Neu+DANA)の存在下(Neu)および非存在下(コントロール)で上記のように検出された、マウス血小板糖タンパク質における β -ガラクトースまたは β -GlcNAc露出のフローサイトメトリー分析。n=4。

【図19】図19は、ノイラミニダーゼ処置によって誘導される血小板GPIb α 、GPV、GPIX、および $\alpha_{IIb}\beta_3$ 受容体の減少をDANAが抑制することを示している。表面受容体発現(GPIb α 、GPV、GPIX、および $\alpha_{IIb}\beta_3$)を、5mUの $\alpha 2-3, 6, 8, 9$ -シアリダーゼの存在下(灰色のバー)および非存在下(白色のバー)でのマウス血小板に対するフローサイトメトリーによって測定した。シアリダーゼおよびDANAで処置された血小板における受容体発現も示されている(黒いバー)。未処置血小板における受容体発現の平均蛍光を100%として設定した。n=4。

【図20】図20は、全血小板溶解物(インプット)、上清(上清)、および対応する血小板ペレット(ペレット)の非還元免疫プロットを示し、DANAが、ノイラミニダーゼ(NA)処置によって誘発される血小板GPIb α の減少を抑制することを示している。コントロールは、未処置サンプルを表している。

【図21】図21は、DANAの添加が、ノイラミニダーゼで処置されたマウス血小板のin vivoでの回復および生存を完全に助けることを示すグラフである。コントロールは、未処置の新鮮な室温の血小板の生存を示している。

【図22】図22は、室温での保存中の血小板GPIb α およびGPV受容体の減少がDANAの添加によって抑制されることを示すグラフである。

【図23】図23は、100 μ Mのメタロプロテイナーゼ(MP)阻害剤GM6001の存在下での β -ガラクトース露出に対するノイラミニダーゼ処置の効果を棒グラフで

ある。β - ガラクトース露出は、蛍光標識 R C A - 1 レクチン結合によって測定した。

【図 2 4】図 2 4 は、1 0 0 μ M のメタロプロテイナーゼ (M P) 阻害剤 G M 6 0 0 1 の存在下での血小板 G P I b α および G P V 受容体の表面発現に対するノイラミニダーゼ処置の効果を示す棒グラフである。M P 阻害剤 - ノイラミニダーゼにおける受容体の発現を 1 0 0 % と設定した。

【図 2 5】図 2 5 は、血小板 G P I b α および G P V 受容体の表面発現に対する組換え T A C E (A D A M 1 7) (T A C E) ならびに組換え T A C E および D A N A (T A C E + D A N A) の影響を示す棒グラフである。シアル酸の減少の抑制がメタロプロテイナーゼ T A C E による受容体の切断を防止することから、G P I b α および G P V のタンパク分解の前にシアル酸が糖タンパク質から加水分解されなければならないことを示している。受容体 G P I X および α I I b β 3 は、組換え T A C E で処置による影響を受けなかった (不図示) 。

【図 2 6】図 2 6 は、新鮮な血小板サンプル、ならびに示された時点の 4 および R T で保存されたサンプル中の遊離シアル酸 (F S A) の定量を示す棒グラフである。F S A 濃度は、各バーの上にも示されている。R T 保存血小板サンプルで検出された F S A が、4 で保存された同じ期間のサンプルと比較して格段に高いことに留意されたい。

【図 2 7】図 2 7 は、シアリダーゼ阻害剤、D A N A の存在下または非存在下で 4 または R T で保存された血小板サンプル (色検出の時間 = T O C D) 中の細菌を検出するために必要な時間を示す写真である。試験サンプル中の細菌濃度は、発色の開始時間に反比例する、すなわち色検出時間が短い = 細菌の濃度が高い ; 色検出時間が長い = 細菌の濃度が低い。第 9 日目のサンプルの分析について選択された写真が示されている (A ~ C) 。細菌を、実施例 6 で説明されているアッセイ技術を用いて検出した。(D) は、シアリダーゼ阻害剤 D A N A の存在下または非存在下で 4 または R T で保存された血小板サンプルでの細菌分析の定量を示す棒グラフである。T O C D (分) を血小板サンプルに対してプロットした。D A N A と共に R T で保存されたサンプルに必要な時間は、4 で保存されたサンプルに等しく、D A N A が、4 の保存と同じくらい効果的に細菌の増殖を抑制することを示唆していることに留意されたい。

【図 2 8】図 2 8 は、保存液中で、1 m M の D A N A の非存在下 (4 8 時間) または存在下 (4 8 時間 + D A N A) で 4 8 時間冷蔵されたマウス血小板の生存を示す折れ線グラフである。新鮮な単離された血小板 (R T) の生存は、比較のために示され、各生存グラフに対して n = 7 である。

【図 2 9】図 2 9 は、新鮮な血小板のサイズ (F S C) および密度 (S S C) によって判定される、新鮮な血小板 (新鮮な血小板) のサイズおよび密度 (A) 、ならびに安定化 R T 保存マウス血小板の完全性に対する D A N A 、シアリラクトース、およびグルコースの組み合わせ効果のフローサイトメトリー分析である。シアリラクトース、グルコース、および D A N A の非存在下 (- 保存剤) (B) および存在下 (+ 保存剤) (C) 、R T で 4 8 時間保存されたマウス血小板の分析。対応する血小板の数が、ドットプロットの下に示されている。保存剤の濃度も示されている。

【図 3 0】図 3 0 は、示された濃度の D A N A の非存在下 (0 m M の D A N A) または存在下、R T で 4 8 時間保存されたマウス血小板のフローサイトメトリードットプロット分析である。0 . 1 m M の D A N A は、ドットプロット分析 (上のパネル) での判定により、血小板のサイズおよび密度を効率的に維持したことに留意されたい。血小板のカウント数およびビーズ (基準) の対応するフローサイトメトリーヒストグラムも示されている (下のパネル) 。

【図 3 1】図 3 1 は、9 6 ウェル P V C プレートのウェル内の 1 m M の D A N A を含むまたは含まない異なる媒体中で 4 8 時間増殖されたセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) の細胞密度を示す棒グラフである (パネル A) 。図 3 1 のパネル B は、9 6 ウェル P V C プレートのウェル内の 1 m M の D A N A を含むまたは含まない異なる媒体中で 4 8 時間インキュベートされたセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) の生物膜形成を示している。またパネル B に示され

10

20

30

40

50

ているように、各ウェル内の生物膜が、クリスタルバイオレットで染色され、この色素が回収され、595 nmで測定された。595 nmでの吸光度 ($A_{595\text{ nm}}$) は、生物膜中の細菌細胞に比例する。

【図32】図32は、健康な対象から単離された新鮮な血小板における末端 β -ガラクトース含有量の差異を示す棒グラフである。略図に示されているようにグリカン構造に結合するレクチンである β -ガラクトース特異的レクチンECLを用いて、血小板表面の末端グルコースの露出をフローサイトメトリーによって測定した。

【図33】図33は、添加剤 (Inter Sol) の非存在下、1 mMのDANA (Inter Sol + DANA)、10 mMのグルコース (Inter Sol + グルコース)、および1 mMのDANAと10 mMのグルコース (Inter Sol + DANA + グルコース) の存在下、RTで48時間、30容量%の血漿および70容量%のPAS (INTER SOL (商標) 溶液とも呼ばれる) 中に保存されたマウス血小板のフローサイトメトリードットプロット分析および対応するフローサイトメトリー (A) である。血小板集団は、前方散乱および側方散乱特性での判定により休止して見えることに留意されたい。(B) は、DANA、グルコース、または両方を含むInter Sol 溶液でのゲートされた血小板集団で獲得された事象のパーセントを示す棒グラフである。

【図34】図34は、0.5 mMのDANAの非存在下 ((-) DANA) または存在下 ((+) DANA) で保存された血小板のそれぞれのフローサイトメトリードットプロット分析である (上のパネルA)。側方散乱 (SSC) に対する血小板カウント数の対応するヒストグラムも示されている (下のパネルB)。表は、DANAの非存在下または存在下で側方散乱 (SSC - H (MFI)) で測定された平均蛍光強度 (MFI) を表している。

【図35】図35のパネルAは、図34で説明されているDANAの非存在下または存在下、血漿中でのヒト血小板の保存後の表面P-セレクチン露出の代表的なフローサイトメトリーヒストグラム分析である。P-セレクチン露出を、P-セレクチンに対するモノクローナルFITC結合抗体 (CD62P - FITC) を用いて測定した。図35のパネルBは、M2 (図35のパネルAに示されている) および対応するMFIで示されているP-セレクチン陽性血小板の定量を示している。

【図36】図36は、0 mM、0.1 mM、および0.5 mMのDANAの存在下、30容量%の血漿および70容量%のPAS溶液 (PASa、7.15 mMの Na_2HPO_4 、2.24 mMの NaH_2PO_4 、10 mMのクエン酸ナトリウム、30 mMの酢酸ナトリウム、79.2 mMの NaCl 、5.0 mMの KCl 、および1.5 mMの MgCl_2 、pH 7.2) 中で、RTで7日間保存したヒト血小板のフローサイトメトリードットプロット分析である。血小板は、「G1」で示され、血小板微粒子は、「G2」で示されている。ゲート統計は、各ドットプロットで示されている。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明の好適な実施形態は次の通りである。

【0028】

血小板添加液 (PAS)

血小板をドナーから採取し、この血小板を、血小板添加液 (PAS) と呼ばれる液体に懸濁することができる。本質的に、PASは、アフエレーシス中に単離された血小板が付着する血漿の一部の代用となる。PASは、一般に、生理学的に適合性の水性電解質溶液である媒体である。以降に記載される様々な組み合わせおよび濃度でこのような溶液中に通常は存在することができる特定の物質に加えて、本発明のPAS溶液は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤、および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤 (glycan modifying agent) を含む。

【0029】

PAS溶液は、アレルギー性および発熱性輸血反応を低減し、ABO不適合血小板の輸血を促進し、病原体不活化技術の使用を可能にし、かつ他の目的 (例えば、分画) のため

10

20

30

40

50

に利用可能なより多くの血漿を作ると考えられているため、従来、P A S 溶液が使用されている。

【0030】

本発明の一実施形態は、シアリダーゼ阻害剤および任意選択のグリカン修飾剤を有する P A S 溶液を含む。より具体的には、本発明は、シアリダーゼ阻害剤および / またはグリカン変性組成物を有する P A S 組成物、ならびに 1 つ以上の P A S 成分 (例えば、塩、緩衝剤、栄養物、およびこれらの任意の組み合わせ) を含む。本発明の P A S は、様々な成分、例えば、1 つ以上の塩 (例えば、 NaCl 、 KCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、および MgSO_4)、1 つ以上の緩衝剤 (例えば、酢酸塩、重炭酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩)、および栄養物 (例えば、酢酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウム、グルコース、マルトース、またはマンニトール) を含み得る。

10

【0031】

本発明の用語「血小板添加液」または「P A S」は、少なくとも 1 つのシアリダーゼ阻害剤、1 つ以上の保存媒体成分、および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤を有する溶液または媒体を指す。「本発明の組成物」は、1 つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の 1 つ以上のグリカン修飾剤を含む。句「血小板組成物」または「血小板保存組成物」は、得られる保存組成物 (レシピエントに輸血する前の) を指し、この保存組成物は、本発明の P A S、血小板、および任意選択の任意の関連する血漿および / または抗凝固剤を含む。

20

【0032】

本発明の P A S の媒体は、生理学的に適合性の水性電解液を含む。このような溶液は、溶液中にイオン成分、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、塩化物、およびリン酸塩の供給源を含み得る。本発明の P A S はまた、例えば、クエン酸またはナトリウム塩の形態で添加することができるクエン酸塩源も含み得る。本発明の溶液は、例えば、炭素または栄養物の供給源、例えば、酢酸塩、グルコース、またはグルコン酸塩をさらに含み、かつ塩と共に存在することができる。一実施形態では、A T P 酸性の維持に役立つリン酸塩源を含めることができる。これらの成分は、約 5 m M ~ 約 4 5 0 m M (例えば、1 0 m M、2 0 m M、3 0 m M、4 0 m M、5 0 m M、6 0 m M、7 0 m M、8 0 m M、9 0 m M、1 0 0 m M、1 5 0 m M、2 0 0 m M、2 5 0 m M、3 0 0 m M、3 5 0 m M、4 0 0 m M、4 5 0 m M) の範囲の量で本発明の溶液中に存在し得る。この溶液は、約 6 . 4 ~ 約 7 . 6 (例えば、約 7 . 1 ~ 約 7 . 4) の範囲の p H、好ましくは約 7 . 2 の p H に維持される。

30

【0033】

一実施形態では、ナトリウム (N a) 源は、約 1 0 0 ~ 3 0 0 m M (例えば、約 1 5 0 m M ~ 約 2 5 0 m M) の量で本発明の P A S 中に存在し得る。特定の実施形態では、ナトリウム源は、約 1 9 0 m M で存在する。ナトリウムは、塩として、または緩衝剤として組み合わせ、または炭素源として存在し得る。例えば、ナトリウムは、塩化ナトリウム (NaCl)、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、またはこれらの組み合わせの形態で存在し得る。当分野で公知または後に見出されるナトリウム源を含む他の適切なナトリウム源も、本発明の P A S に使用することができる。

40

【0034】

塩化物 (Cl) 源も、約 4 0 m M ~ 約 1 1 0 m M (例えば、約 6 0 m M ~ 約 9 0 m M) の量で本発明の P A S 中に存在し得る。特定の態様では、塩化物源は、約 8 7 . 2 m M で存在する。塩化物は、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化マグネシウム (MgCl_2)、塩化カリウム (KCl)、またはこれらの組み合わせの形態で存在し得る。本発明の P A S に使用するのに適している限り、当分野で公知または後に見出される任意の塩化物源を、本発明に使用することができる。主に NaCl の形態の Na^+ と Cl^- は、血小板添加液の等張性に寄与する張性調節剤である。

【0035】

カリウム源は、一実施形態では、本発明の P A S 中に存在し得る。カリウム源は、約 0

50

．5 m M ～ 約 1 0 m M、例えば、約 3 m M ～ 約 8 m M の量で存在し得る。特定の実施形態では、カリウムは、約 5 m M の量で存在する。カリウム源は、塩化カリウム、クエン酸カリウム、酢酸カリウム、リン酸カリウム、硫酸カリウム、またはこれらの組み合わせを含む。当分野で公知または後に見出される他のカリウム源も、本発明に使用することができる。媒体中のカリウムイオンの存在は、ある態様では、細胞内のマグネシウムイオンの濃度の維持に役立ち得る。カリウムイオンはまた、クエン酸回路（T C A サイクル）における酸化的リン酸化のためにミトコンドリア膜を通過するピルビン酸塩の輸送にも関与し得る。加えて、 K^+ は、脂質およびタンパク質の電氣的導通に寄与することによって膜安定性において重要な役割を果たす。

【0036】

マグネシウムは、本発明の P A S に含めることができる別の塩である。マグネシウム源は、約 0 . 5 m M ～ 約 2 . 5 m M の量、特に約 1 m M ～ 2 m M の量で存在し得る。一実施形態では、マグネシウムは、約 1 . 5 m M で本発明の P A S 中に存在する。マグネシウム源は、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、およびこれらの組み合わせを含む。当分野で公知または後に見出されるマグネシウム源も、本発明に使用することができる。一実施形態では、マグネシウムイオンは、約 3 m E q / L (1 . 5 m M) となる血漿中濃度に近い濃度で本発明の P A S 中に存在し得る。 Mg^{2+} は、膜 A P T アーゼ活性を維持するのに必要であろう。一態様では、媒体中のマグネシウムイオンは、血小板中の最適な細胞内マグネシウム濃度を維持するはずであり、かつ血小板中の酸化的リン酸化を促進することができ、こうすることで媒体の p H の維持に役立つ。さらに、 Mg^{2+} は、脂質およびタンパク質の電氣的導通に寄与することによって膜安定性において重要な役割を果たす。

【0037】

カルシウムは、本発明の P A S 中に含めることができるなお別の塩である。カルシウム源は、約 0 . 5 m M ～ 約 2 . 5 m M (例えば、約 1 m M ～ 2 m M) の量で存在する。ある実施形態では、カルシウムは、約 1 . 5 m M で本発明の P A S 中に存在し得る。カルシウム源は、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、クエン酸カルシウム、またはこれらの組み合わせを含む。当分野で公知または後に見出される他のカルシウム源も使用することができる。

【0038】

クエン酸塩を使用して溶液を緩衝することができる。クエン酸塩源は、約 2 m M ～ 約 2 0 m M、例えば、5 m M ～ 約 1 5 m M の量で本発明の P A S 中に存在する。一態様では、本発明の P A S は、約 1 0 m M のクエン酸塩を含む。本発明に使用することができるクエン酸塩源の例として、クエン酸ナトリウム（例えば、クエン酸一ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸三ナトリウム）、クエン酸、クエン酸カリウム、クエン酸マグネシウム、およびこれらの組み合わせが挙げられる。本発明の P A S に使用するのに適している限り、当分野で公知または後に見出されるクエン酸塩源を含む他のクエン酸塩源も、本発明に使用することができる。クエン酸塩は、抗凝固剤、T C A サイクルの炭素源、および緩衝剤として本発明の P A S において複数の役割を果たす。

【0039】

酢酸塩は、本発明の P A S のなお別の成分である。酢酸塩は、単離された血小板の栄養物として使用される炭素源である。酢酸塩の供給源は、約 1 0 m M ～ 約 5 0 m M の量、例えば、約 2 5 m M ～ 約 4 5 m M の量で存在し得る。本発明の P A S は、約 3 0 m M の酢酸塩を含む。酢酸塩源は、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、またはこれらの組み合わせを含む。本発明の P A S に使用するのに適している限り、当分野で公知または後に見出される酢酸塩源を含む他の酢酸塩源も、本発明に使用することができる。酢酸塩は、炭素および緩衝剤としての役割を果たす。

【0040】

本発明の P A S では、栄養源を備えることができる。酢酸塩および他の炭水化物、例えば、グルコースまたはスクロース、およびクエン酸塩を単独または様々な組み合わせで使

10

20

30

40

50

用して、クエン酸回路におけるエネルギー生産用の中間代謝産物源にすることにより保存中の血小板のエネルギー源を提供することができる。炭素源の組み合わせも使用することができる。グルコースおよび/またはスクロースが使用される場合は、その濃度は、約 0.5 mM ~ 約 25 mM (例えば、約 2 mM ~ 約 22 mM) の量で存在し得る。

【0041】

他の栄養物を、本発明の P A S の酢酸塩の代わりに使用しても良いし、またはこの酢酸塩と共に含めても良い。例えば、オキサロ酢酸塩を、本発明の P A S 中に含めても良いし、または本発明の P A S が多血小板画分に添加された後の血小板懸濁液に添加しても良い。オキサロ酢酸塩は、アセチル C o - A と共に濃縮して T C A サイクル (クエン酸回路) の第 1 の反応を生じさせるミトコンドリア内に見られる 4 炭素分子である。オキサロ酢酸塩は、保存された血小板に直接、またはアミノ酸、例えば、アスパラギン酸の前駆物質の形態で供給することができる。一部の実施形態では、オキサロ酢酸塩は、約 10 mM ~ 約 45 mM で本発明の P A S 中に存在し得る。より具体的には、オキサロ酢酸塩は、約 20 mM ~ 約 40 mM、または約 24 mM ~ 約 36 mM、または約 28 mM ~ 約 33 mM で本発明の P A S 中に存在し得る。

10

【0042】

リン酸塩 (P O ₄) は、本発明の P A S に使用できる別の成分である。リン酸塩源は、約 5 mM ~ 約 50 mM (例えば、約 20 ~ 40 mM) の範囲の量で本発明の P A S 中に存在し得る。特定の実施形態では、リン酸塩源は約 28 mM で存在する。リン酸塩の形態は、一リン酸ナトリウム、二リン酸ナトリウム、三リン酸ナトリウム、またはこれらの組み合わせを含む。当分野で公知または後に見出される他のリン酸塩源も使用することができる。

20

【0043】

成分、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩は、1つ以上の塩、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、またはナトリウム塩と組み合わせて、あるいはこれらの塩の任意の部分的な組み合わせで添加して緩衝液のオスモル濃度を安定させることができる。

【0044】

一実施形態では、本発明の P A S は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤、および任意選択の 1つ以上のグリカン修飾剤、および表 1 に示される成分を含む。

30

【0045】

(表 1)

	範囲(mM)		特定の調合物の量 (mM)			
	低	高	PAS1	PAS2	PAS3	PAS4
ナトリウム[Na]	100.0	300.0	156.7	148.3	155.2	146.8
塩化物[Cl]	40.0	110.0	87.2	78.8	87.7	79.3
クエン酸塩	2.0	20.0	10.0	10.0	10.0	10.0
酢酸塩	10.0	50.0	30.0	30.0	30.0	30.0
リン酸塩[PO ₄]	5.0	50.0	9.4	9.4	9.4	9.4
カリウム[K]	0.5	10.0	5.0	5.0	5.0	5.0
マグネシウム[Mg]	0.5	2.5	1.5	1.5	1.5	1.5
カルシウム[Ca]	0.5	2.5	0.0	0.0	1.0	1.0
[グルコース]	5	25.0	0.0	16.8	0.0	16.8
[DANA]	0.1	10.0	1.0	1.0	1.0	1.0
計 (mM)	163.6	605.0	300.8	300.8	300.8	300.8

40

【0046】

本明細書で説明される本発明の P A S は、一実施形態では、アミノ酸によって緩衝する

50

こともできる。アミノ酸は、一次緩衝剤として使用しても良いし、または他の緩衝剤、例えば、リン酸塩と共に使用しても良い。一実施形態では、アミノ酸、ヒスチジンを使用して保存液を緩衝することができる。したがって、保存液は、約 1 mM ~ 約 7 mM または約 2 mM ~ 約 5 mM でアミノ酸を含み得る。

【0047】

上記に加えてまたは上記の代替として、本明細書に開示される P A S は、酸化リン酸化を促進する他の成分をさらに含み得る。抗酸化剤を、本発明の P A S または血小板組成物に添加することができる。抗酸化剤の例として、グルタチオンおよびセレンなどが挙げられる。一部の実施形態では、抗酸化剤は、約 0.5 μ M ~ 約 3 mM (例えば、約 1.0 μ M ~ 約 2 mM) の範囲の量で本発明の P A S 中に存在し得る。一部の実施形態では、グルタチオン、またはその前駆物質 N アセチルシステイン、および / またはセレンが単独で、または組み合わせられて、約 0.5 μ M ~ 約 3 mM (例えば、約 1.0 μ M ~ 約 2 mM) の量で本発明の P A S 中に存在し得る。

10

【0048】

酸化リン酸化をさらに促進するために、本発明の P A S は、膜を安定させるのに役立つ成分をさらに含み得る。例えば、1つのリン脂質または混合物または複数のリン脂質を、保存液に含めることができる。一部の実施形態では、リン脂質は、約 0.1 mg/mL ~ 約 7.5 mg/mL (例えば、約 0.25 mg/mL ~ 約 5 mg/mL) の範囲の量で本発明の P A S 中に存在し得る。より具体的には、L - α ホスファチジルコリンが、約 0.1 mg/mL ~ 約 7.5 mg/mL (例えば、約 0.25 mg/mL ~ 約 5 mg/mL) の量で本発明の P A S 中に存在し得る。

20

【0049】

本発明の P A S に含めることができる別の成分は、非必須アミノ酸である。例えば、約 0.5 mM ~ 約 14 mM (例えば、約 1.0 mM ~ 約 10 mM) の非必須アミノ酸が、P A S 中に存在し得る。一実施形態では、L - アラニンを、約 0.5 mM ~ 約 14 mM (例えば、約 1.0 mM ~ 約 10 mM) の範囲の量で含めることができる。

【0050】

不飽和遊離長鎖脂肪酸を、本発明の P A S 中にさらに含めることができる。本明細書で説明される P A S は、約 0.05 mM ~ 約 1.5 mM (例えば、約 0.1 mM ~ 約 1 mM) の範囲の量の不飽和長鎖脂肪酸を含み得る。一実施形態では、本発明の P A S は、約 0.05 mM ~ 約 1.5 mM、または約 0.1 mM ~ 約 1 mM のパルミチン酸を含み得る。

30

【0051】

米国薬局方 (USP) の注射用水 (WFI) を溶媒として使用して、本発明の P A S 用の緩衝液を作製することができる。

【0052】

句「血小板組成物」(例えば、本発明の P A S および単離された血小板)は、その全量が、約 1 容量% ~ 約 50 容量%の血漿を含む組成物を指す。血小板組成物は、一態様では、約 50 容量%未満 (例えば、約 45 容量%未満、約 40 容量%未満、約 35 容量%未満、約 30 容量%未満、約 25 容量%未満、約 20 容量%未満、約 15 容量%未満、約 10 容量%未満、約 9 容量%未満、約 8 容量%未満、約 7 容量%未満、約 6 容量%未満、約 5 容量%未満、約 4 容量%未満、約 3 容量%未満、約 2 容量%未満、約 1 容量%未満)の血漿を含む。逆に、本発明の血小板保存組成物は、本発明の P A S を約 50 容量% ~ 約 99 容量% (例えば、約 55 容量%、約 60 容量%、約 65 容量%、約 70 容量%、約 75 容量%、約 80 容量%、約 85 容量%、約 90 容量%、約 95 容量%) 含み、この P A S は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤、電解液、リン酸および / または緩衝化合物、炭素源、および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤を含む。ある実施形態では、血小板保存組成物は、本質的に血漿を含まず、大部分が本発明の P A S および血小板である。一実施形態では、血小板は、一般に、全血小板組成物の約 1 容量%を占める。

40

【0053】

一実施形態では、本発明の P A S が単離された血小板に添加されると、本発明の P A S

50

は、単離された血小板液の約70%を占め、血漿は、その約30%を占める。本発明のPASの容量パーセントは、その使用、例えば、慢性貧血患者または急性貧血患者への輸血によって異なり得る。循環血液量過多は、特に急性貧血が起きた外傷患者で問題である。したがって、循環血液量過多を最小限にする、または回避するためにPASの容量パーセントを変更することができる。

【0054】

本発明のPAS中の血小板組成物は、保存中の1つ以上の時点で評価することができる。血小板含有量、血小板の形態、代謝、細菌の増殖、血小板の活性化の程度、溶解の程度、またはこれらの組み合わせの評価を行うことができる。血小板、その機能、および細菌の増殖の評価を本明細書でさらに説明して、血小板の移植能力、*in vivo*での生存能力、および輸血後に止血を維持する能力を評価する。本発明のPASは、本発明のPAS中に保存されていない血小板と比較して、血小板の保存期間を長くすることができ、輸血後の循環を延長して止血を維持する。保存期間、循環時間、および止血についても本明細書でさらに説明する。

10

【0055】

血小板の代謝は、ATPならびにグルコース、乳酸塩、および乳酸脱水素酵素(LDH)の濃度を測定することによって評価することができる。ATPの測定は、当分野で公知のアッセイ、例えば、Bioluminescentアッセイキット(Sigma, Poole, Dorset, UK)を用いて行うことができる。グルコース、乳酸塩、およびLDHはまた、当分野で公知のアッセイ、例えば、Vitros DT60 11化学系(Shield, Kimbolton, Cambridgeshire, UK)を用いて行うことができる。血小板は、代謝中に炭素源、例えば、酢酸塩を使用して、ATP、主なエネルギー担体を維持する。本発明のPASは、pHを約6.4~約7.6、好ましくは約7.1~約7.4の範囲内に維持することができる。

20

【0056】

出願者は、輸血のレシピエントによる血小板の不可逆的イントレランスが非常に起こりやすく、結果として血小板の*in vivo*止血活性を低下させるいくつかの根本的な機序を特徴付けた。出願者の発見は、シアル酸、および血小板の生存におけるその役割に関係している。

【0057】

驚くべきことに、出願者は、血小板自体のシアリダーゼ酵素による血小板表面のグリカンのシアル酸残基の触媒的加水分解が、一般に、血小板の不可逆的なイントレランスの一因であることを見出した。出願者は、内因性シアリダーゼ酵素の表面活性が、血小板の保存中に実際に増加することも見出した。なおさらに驚くべき発見は、シアリダーゼ産生細菌が、血漿および血小板のシアリオグリコ複合糖(sialiolglycconjugate)を脱シアル化して、栄養物、例えば、細菌の成長および増殖を促すシアル酸を得ることである。図1Aを参照されたい。細菌の増殖は、生物膜の形成、血小板の活性化および凝集をもたらす。脱シアル化血小板は、細菌と血小板との相互作用を促進し、最終的に、レクチン媒介機構によって循環から排除される(図1B)。したがって、シアリダーゼ阻害剤の添加は、シアル酸が血小板表面から切断されるのを防止し、これにより血小板のクリアランスが防止され、血小板の生存が延長される。加えて、シアリダーゼ阻害剤は、血小板調製物における細菌の増殖を抑制する(図1C)。このシアリダーゼ阻害剤の二重機能は、長く生存する優れた血小板調製物を可能にし、治療時にレシピエントに輸血されたときに細菌関連敗血症の発症リスクを低減する。

30

40

【0058】

これらの直観ではわからない驚くべき結果を得て、出願者は、ドナーから採取されてから室温以下で保存されるまでの間にシアリダーゼ阻害剤で血小板を効果的に処置する方法を開発した。シアリダーゼ阻害剤で処置すると、本発明の血小板組成物は、未処置の血小板と比較すると、より長期に亘って*in vivo*止血活性を維持する。シアリダーゼ阻害剤で処置された本発明の血小板組成物は、未処置の血小板と比較して、室温以下で長期

50

保存することができる。本発明の方法による血小板の保存は、血小板の保存期間を延長し、かつ細菌の増殖が抑制された輸血後に生き残る血小板の供給量を増加するのに役立つ。

【0059】

上記のように、出願者の発見は、シアル酸および血小板の生存能力におけるその役割に関連している。血小板の外膜のシアル酸の加水分解は、ユニークかつ不可逆的な血小板イントレランスの一因であると考えられる。研究により、血小板が、経時中および循環中に膜糖タンパク質のシアル酸を失うこと、および *in vitro* で脱シアル化された血小板が急速に排除されることが報告された。シアル酸の消失により、下層の未成熟グリカン、例えば、 β -ガラクトースが露出される。アシアロ糖タンパク質 (ASGP) 受容体は、露出された β -ガラクトースを有するタンパク質、細胞、および粒子のエンドサイトーシスを媒介することが知られている。肝マクロファージおよび肝細胞を含む多くの細胞が、この (ASGP) 受容体を発現し、提示する。したがって、内因性シアリダーゼ酵素が、血小板表面のシアル酸残基を切断すると、最後から二番目の糖、例えば、 β -ガラクトースが、血小板表面に露出し、血小板が、ASGPの媒介により摂取されることが考えられる。

【0060】

血小板の表面受容体 (例えば、GPIbおよびGPV) の消失は、血小板の生存に関連しているが、本発明の以前には、表面シアル酸の血小板の表面受容体に対する役割が未知であった。さらに、血小板の生存に関する表面シアル酸の役割も不明確であった。出願者は、表面シアル酸と血小板受容体の消失との間の関係の特徴付けるために *in vitro* および *in vivo* での実験を行った。したがって、出願者の結果を、血小板の生存を延長するための本明細書で説明される本発明の方法に適用した。表面シアル酸と血小板受容体の消失との間のこの関係は、血小板の生存の決定における重要な因子であることが分かった。出願者は、表面シアル酸の消失の抑制により、*in vitro* で保存中の血小板表面受容体 GPIb および GPV の消失が防止され、*in vivo* での血小板の生存が助けられることを見出した。

【0061】

例えば、室温で6時間保存されたマウス血小板が表面シアル酸を失ったことが、本明細書に示されるフローサイトメトリーのデータにより証明された。例証を参照されたい。この消失は、表面受容体 GPIb および GPV の30~60%の消失と相関しているが、GPIX およびインテグリン α IIb β 3 とは相関していない。さらに、マウス血小板のノイラミニダーゼ (NA) 基質、フェツインでの処置は、GPIb および GPV の消失を10~20%にある程度減少させる。*in vitro* では、シアル酸は、 α 2-3, 6, 8-ノイラミニダーゼ (NA; コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)) または α 2-3, 6-NA (ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)) のマウス血小板への添加により血小板表面から切断された。シアル酸の除去は、表面 GPIb α および GPV の50~60%の除去と相関しているが、GPIX およびインテグリン α IIb β 3 とは相関していない。フェツイン、またはより具体的なシアリダーゼ阻害剤、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸 (DANA) のナトリウム塩の追加は、同様に本明細書に示されるフローサイトメトリーおよびウエスタンブロット分析の両方による判定では、この消失を完全に防止した。

【0062】

血小板のクリアランスは、冷却時に悪化する。ヒト血小板の冷却により、フォン・ウィレブランド因子 (vWf) 受容体複合体 α サブユニット (GPIb α) 複合体が血小板表面でクラスター化することが見出された。血小板表面における (GPIb α) 複合体のクラスター化は、*in vitro* および *in vivo* でのマクロファージ補体型の3つの受容体 (α M β 2、CR3) による認識をもたらす。CR3受容体は、GPIb α 複合体を形成した、血小板表面に末端 β -GlcNAc を備えたN結合型糖を認識し、その血小板を貪食し、その血小板を循環から排除し、同時に止血機能が消失する。ガラクトシル化による β -GlcNAc 部分のキャッピングは、短期間冷却された血小板のクリアラン

スを防止するが、この戦略は、長期冷却（例えば、5日間よりも長い血小板の冷却）後は無効となる。長期の冷却は、血小板 GPIb α の露出されたガラクトース残基の密度および濃度をさらに高めるため、肝細胞が、Ashwell-Morell受容体（ASGP受容体または肝レクチン）の結合により、血小板の除去にますます関与するようになる。マクロファージは、血小板の保存条件に関係なく、輸血された血小板の大部分を迅速に除去する。長期の血小板の冷却では、肝細胞性クリアランスにより、輸血後の血小板の回復および生存がさらに低下する。 β 2インテグリンおよびAshwell-Morell受容体の両方による冷却された血小板のクリアランスの抑制は、血小板を冷温保存するための潜在的に単純な方法を可能にし得る。

【0063】

上記したように、出願者は、シアリダーゼ酵素活性は、血漿に由来するのではなく、血小板に由来し、血小板の保存中に実質的に増大することを見出した。特に、出願者は、ヒト血小板が、シアリダーゼ Neu1および Neu3を含み、Neu1を室温で血漿に放出し、冷温保存時に Neu1をさらに放出することを見出し、放出された Neu1が、血小板表面のグリカンの表面シアル酸の除去に関与することが示唆される。

【0064】

本発明は、*in vivo*止血活性を延長し、かつ血小板のクリアランスを低減する血小板組成物および方法を提供し、この血小板組成物および方法では、血小板は、ドナーから得られ、シアリダーゼ阻害剤での処置により、内因性シアリダーゼ活性の影響が弱められ、そして細菌の増殖が抑制される。生存可能な血小板、例えば、哺乳動物血小板、特にヒト血小板の保存を延長する組成物および方法も提供される。本発明はまた、改善された血小板組成物を調製する方法も提供する。

【0065】

本発明は、ある態様では、循環特性が改善され、かつ実質的に正常な *in vivo*での止血活性を維持する血小板組成物を提供する。ある実施形態では、本発明は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤を含む新規な血小板組成物を提供する。既に述べたように、シアリダーゼ酵素は、宿主細胞受容体の末端シアル酸残基の加水分解を触媒する。したがって、シアリダーゼ阻害剤は、シアリダーゼ酵素活性を低下させ、血小板表面グリカンの末端シアル酸残基の加水分解を防止し、細菌の増殖を抑制し、かつ輸血用の血小板の *in vivo*での止血活性を延長するために本発明の多数の態様で使用される。

【0066】

本発明は、血小板機能を改善し、かつ/または血小板が室温以下で保存された後の血小板の *in vivo*での止血活性を実質的に正常に維持できる血小板組成物、ならびにこの血小板組成物を調製し、保存し、保護する関連方法を提供する。一定の根本的な機序が見出され、これらの機序が、血小板の不可逆的なイントレランスの起こりやすさ、または血小板輸血のレシピエントが経験する血小板の *in vivo*止血活性の消失の原因となる。シアリダーゼ酵素による血小板表面のグリカンのシアル酸残基の加水分解は、不可逆的な血小板イントレランスの原因である。「不可逆的なイントレランス」は、室温未満の温度に曝露された後に、血小板が、正常な血小板機能である生存を維持できない、または正常な血小板機能である生存に戻ることができないことを指す。「血小板生存能力」は、*in vivo*で生存する血小板の能力と定義される。

【0067】

本発明は、ドナーから単離されて室温以下で保存された血小板のシアリダーゼ酵素活性を抑制する血小板組成物および方法を提供する。したがって、ある態様では、本発明は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤を有する組成物を提供する。本発明は、他の態様では、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤を有する血小板組成物の循環時間を延長する方法を提供する。本発明は、血小板の保存期間が長くなるように血小板の保存温度が下げられた血小板組成物および方法、ならびに哺乳動物における血小板集団のクリアランスを低減する、または血小板集団の循環時間を延長する方法をさらに提供する。また、止血活性を維持して血小板を保護するための血小板組成物および方

10

20

30

40

50

法、ならびに血小板組成物および血小板組成物を含むその医薬組成物を調製する方法、およびこの医薬組成物を哺乳動物に投与して止血を媒介する方法も提供される。また、保存のために血小板調製物を処置するキットおよび血小板調製物を保存するための容器も提供される。

【0068】

血小板およびその単離方法

本明細書で使用される用語「単離された」は、その自然の環境から分離されたことを意味する。血小板集団に対して本明細書で使用されるように、単離されたは、哺乳動物の血液から血小板を除去することを指す。

【0069】

標準的な血液収集方法に基づいて、一般に、2種類のドナー血小板：無作為ドナー血小板および単一ドナー血小板が存在する。無作為ドナー血小板は、当業者によって実施されるいくつかの標準的な方法の任意の1つによって全献血から単離された血小板であり、2つ以上の無作為ドナー血小板が、その後、患者への輸血の前に治療量となる十分な量プールされる。単一無作為ドナー血小板は、小児患者用にプールしないで使用することができる。現在の標準的な方法は、軟膜、血小板ボタン (platelet button)、および多血小板血漿から無作為ドナー血小板を単離することを含む。単一ドナー血小板は、後の患者への輸血用の1回以上の治療量となる十分な量の、アフエーシス装置における遠心分離によって1つのドナーから得られる血小板である。単一ドナー血小板の収集に現在使用されるアフエーシス装置は、会社、例えば、Terumo BCT (Terumo Corporation), Fenwal Inc. および Haemonetics Corporation によって製造されている。現在の AAB (以前の American Association of Blood Banks) 基準は、血小板の治療量を約 3×10^{11} の血小板と定義している。

【0070】

本明細書に開示される方法を行うために、無作為ドナー血小板または単一ドナー血小板が、当分野で公知の標準的な技術によってドナーから単離される。単離された血小板調製物は、本明細書に記載されている1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤によって処置される。

【0071】

無作為ドナー血小板は、全献血から得られる。全血は、1つのドナーから得ることができ、所望の血液成分の種類によって決まる適切な方法によって調製される。本発明は、軟膜、血小板ボタン、血小板濃縮物、および多血小板血漿などの形態で血小板を単離することを含む。

【0072】

全血は、血漿、赤血球、血小板、白血球、および他の成分を含む多数の成分からなる。したがって、血小板に加えて、全血の他の成分 (例えば、赤血球、血漿など) を、1単位の血液がドナーから得られたときに単離し、調製することができる。全血は、一般に、静脈穿刺によってドナーから採取される。血液を溜める容器 (例えば、バッグまたは管) は、抗凝固剤、例えば、クエン酸またはクエン酸デキストロース系の成分、例えば、クエン酸リン酸デキストロース (CPD または CP2D)、クエン酸リン酸デキストロースアデニン1 (CPDA-1) を含み得る。

【0073】

ルーチンの血液採取中に、70 mL の抗凝固剤を含む 600 mL バッグを使用して、約 $500 \text{ mL} \pm 10\%$ の全血を採取する、または 63 mL の抗凝固剤を使用して $450 \text{ mL} \pm 10\%$ の全血を採取する。全血採取バッグは、単離された成分を入れる付随バッグが取り付けられている場合が多い。全血が採取されるときに、ドナー血液サンプルの管も、ABO および Rh 決定、感染症マーカーなどを含む特定の必要な検査を各献血に対して行うために収集される。

【0074】

血小板は、通常は、遠心分離によって全血および他の血液成分から分離される。遠心分離技術により、血液成分をその様々な密度によって分離することができる。したがって、全血の液体および細胞構成物質が、遠心分離の結果として、最も密度の高い赤血球（RBC）から最も密度の低い血漿までの範囲で別個の層に分離される。遠心分離の時間は、遠心分離機および遠心分離機によって加えられる重力によって異なる。遠心分離の時間は、当業者が決定することができる。会社、例えば、Sorvall and Beckman社の遠心分離機をこのプロセスに使用することができる。

【0075】

適切な遠心分離（例えば、ソフトスピン）により、バッグは、その遠位端部に多量のRBCを含み、その近位端部に多量の多血小板血漿（PRP）、血小板と血漿の混合物を含み、これらの2つの層の間に主に白血球から形成されたメニスカスが存在する。血漿圧搾機または抽出機（例えば、Fenwal, Inc. およびTerumo Corporationの製造）の使用により、PRPを付随バッグに抽出し、多量のRBCが元の全血収集バッグに残る。

10

【0076】

PRPを含む付随バッグを再び遠心分離（例えば、ハードスピン）して、血漿を血小板から分離する。再遠心分離時に、血小板は、その高い密度により、血小板ボタンと呼ばれる緩く凝集したクラスターを形成する。次いで、血漿圧搾機または抽出機を使用して、乏血小板血漿（PPP）を第2の付随バッグに抽出することができ、血小板ボタンおよび少量の血漿（合わせて血小板濃縮物として知られる）が第1の付随バッグに残る。血小板濃縮物は、約30～70mLの量からなり、PPPは、約180～320mLの液量からなる。分離された各血液成分、すなわちRBC、PPP、および血小板濃縮物は、「単位」として知られ、それぞれが別個に輸血される。

20

【0077】

一般に、血小板濃縮物のバッグは、最低でも $5 \cdot 5 \times 10^9$ の血小板を含む。血小板濃縮物の単位は、機械ロータで、20～24で保存される。本発明の組成物で処置されていない血小板は、保存期間が約5日間である。

【0078】

当業者によって一般的に行われるように、4～6単位の血小板濃縮物が、患者への輸血用の1回の治療量を得るためにプールされる。プールされる血小板濃縮物は、約 $3 \cdot 0 \times 10^{11}$ 以上の血小板を有する。このプロセスから得られた、プールされる血小板濃縮物およびプールされない血小板濃縮物は、本発明で利用できる、または本明細書で説明される本発明の組成物で処置できる「単離された血小板」の一形態を含む。特定の実施形態では、血小板濃縮物をプールするために使用されるバッグは、本明細書でさらに説明されるように、本明細書で説明される本発明の組成物（例えば、シアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤）を含み得る。あるいは、本発明の組成物は、プールの前、後、または最中に血小板濃縮物に添加することができる。

30

【0079】

無作為ドナー血小板は、欧州およびカナダで一般的に利用されている「軟膜」法によって単離することもできる。本明細書で説明されるように、全血を得て、ハードスピン遠心分離にかける。ハードスピンにより、バッグは、上部分画としての血漿、底部分画としての赤血球、ならびに血小板および白血球を含む中間層を有する。この中間層は、軟膜として知られている。

40

【0080】

軟膜調製血小板を生産するために、軟膜は、一般的には、全血が収集されるバッグの形態に応じて2つの方法の一方によって単離され、プールされる。第1の方法は、全血が収集されるバッグが、各端部に1つ以上の付随容器が取り付けられた上部ドレーンおよび底部ドレーンを有する「上部および底部ドレーン法」として知られている。抽出機（例えば、Fenwal社のOptipress（登録商標）抽出機）でバッグが押圧されて平らになり、血漿層が上部ドレーンから排出され、赤血球が底部ドレーンから排出される。抽

50

出機は、合計で約30～60mLの液量となる、主に血小板および白血球、そして少量の血漿およびRBCを含む軟膜がバッグ内に維持されるように設計されている。約4～6単位の軟膜が、患者への輸血用の治療量の血小板を調製するためにプールされる。プールにおいて、個々の軟膜単位が、しばしば「チェーン法」と呼ばれるチェーン形式で無菌的に接続される（例えば、バッグの底部ドレーンが次のバッグの上部ドレーンに接続され、これが繰り返される）。血小板添加液または血漿をこのチェーンに無菌的に接続し、これを使用して、軟膜が血小板添加液または血漿と共に底部プールバッグに移送されるときに個々の軟膜容器の洗浄を容易にすることができる。

【0081】

軟膜調製血小板を単離およびプールする第2の方法は、PRP調製血小板に使用されるのと同様の全血収集バッグを利用する。既に説明したように全血での軟膜の単離の後に、まず取り付けられた付随容器の1つに血漿を取り出すことによって軟膜が全血から分離され、そして「軟膜を搾り出す」とも呼ばれる、第2の取り付けられた付随容器に軟膜を移送し、RBCが元の容器に残る。約4～6単位の軟膜が、患者への輸血用の血小板の治療量を得るためにプールされる。プールにおいて、個々の軟膜単位が、無菌的に接続され、血小板添加液または血漿と共にプール容器内にプールされる。この方法では、プールバッグは、個々の単位が接続される複数のドック（例えば、「クモ」の足のような）を有する。次いで、各軟膜単位が、プール中の血小板の消失の低減に役立つ洗浄剤として血小板添加液または血漿を用いて、個々のバッグからプールバッグに移送される。このプール法は、「クモ法」とも呼ばれ、上部分離および底部分離によって調製された軟膜と共に使用する

10

20

【0082】

個々の単位をプールするために使用される方法にかかわらず、プールバッグが再び遠心分離にかけられる。この遠心分離は、長いソフトスピンであり、血小板および/または血漿/血小板添加液を含む画分がプールバッグの上部に形成され、残りの赤血球および白血球が底部画分の一部となる。血漿圧搾機または抽出機を用いて、血小板および/または血漿/血小板添加液の上部層が、別のバッグに移され、治療量の血小板となる。

【0083】

単一ドナー血小板は、後の患者への輸血用の1回以上の治療量となる十分な量の、自動アフエーシス装置での遠心分離によって1つのドナーから得られる血小板である。この方法によって単離される血小板は、治療量を1つのドナーから収集することができるため、一般に単一ドナー血小板として知られている。このような手順では、ドナーの血液は、静脈穿刺点から無菌遠心機を通り、そこで血小板および一定量の血漿が遠心分離されて単離され、ドナーの血液の残りの部分が、最初の静脈穿刺点または第2の静脈穿刺点からドナーに戻される。本明細書で説明される抗凝固組成物を、血小板に添加しても良いし、または血小板が収集されるバッグに入れても良い。様々な自動アフエーシス装置が、会社、例えば、Haemonetics Corporation (Braintree, MA)、Terumo BCT (Lakewood, CO)、Fenwal, Inc., Lake Zurich, IL、およびFresenius Kabi, Friedberg, Germanyから販売されている。

30

40

【0084】

アフエーシスによる血小板の収集では、一般に、2単位の血小板が得られ、各単位は、約200～300mLの血漿および約 3.5×10^{11} の血小板を含む。単一ドナー血小板は、20～24で約5日間保存することができる。

【0085】

アフエーシス収集キットは、多くの場合、殆どのアフエーシス装置が2単位の血小板を収集するため、2つの血小板収集バッグを含む。本明細書で説明される本発明の組成物は、アフエーシス装置の血小板収集バッグに含めても良いし、または無菌接続技術を用いて血小板の収集の前、最中、または後に添加しても良い。血小板収集バッグは、本発明の組成物を用いて製造することができ、別の成分、例えば、本明細書で説明されるまた

50

は当分野で公知の抗凝固組成物をさらに含む。

【0086】

血小板がアフエーシスによって収集されたら、血小板を、本明細書で説明されるように本発明のPASに懸濁することができる。

【0087】

本発明の組成物および方法は、治療濃度の血小板が得られる限り、当分野で公知または将来開発される任意の技術によって単離される血小板と共に使用することができる。

【0088】

本発明は、シアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤または本明細書で説明される「本発明の組成物」を含むバッグまたは容器を含む。血小板単離プロセスに基づいて、本発明の組成物を、様々な血小板収集バッグに含める、またはこのようなバッグを用いて製造することができる。血小板収集バッグは、ガス透過性としても良いし、またはプラスチック材料、例えば、PVC材料から形成しても良い。血小板収集バッグは、無作為ドナー収集プロセスまたは単ドナー収集プロセスに使用することができる。無作為ドナー収集プロセスに関しては、本発明の組成物は、血小板単位がプールされる収集バッグ内に入れることができ；したがって、本発明は、本発明の組成物を有するプール収集バッグを含む。

【0089】

同様に、単ドナー収集プロセスでは、本発明の組成物は、アフエーシス血小板収集バッグに含めることができる。このようなバッグは、本発明の組成物と共に、アフエーシスプロセスで使用される他の成分、例えば、抗凝固組成物を含む。

【0090】

従来の血小板バッグまたはパックは、ガスのパック内への輸送(O_2)またはパックからの輸送(CO_2)を最大限にするように設計され、この輸送を最大限にする十分な透過性材料から製造された材料から形成される。本発明は、本明細書にさらに説明されるように、室温以下の温度で血小板を保存することを可能にする。本明細書で説明される方法は、保存中に血小板によって産生される CO_2 の量を低下または減少させる。したがって、一実施形態では、本発明は、 CO_2 および/または O_2 が実質的に不透過性である血小板容器をさらに提供し、このような容器は、血小板の冷蔵に特に有用である。別の実施形態では、容器またはバッグは、ガス透過性容器を含む。

【0091】

上記のいずれかの収集プロセスにより、本発明の組成物を、別法として、無菌技術または無菌接続を用いて単離された血小板に添加することができる。この場合、本発明の組成物は、別個のバッグ、容器、シリンジ、管、または他の同様の血液収集媒体に入れて別売することができる。

【0092】

一実施形態では、本明細書でさらに説明される、シアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤を有する本発明の組成物を、微生物汚染を回避するために閉じた系、例えば、無菌の密封された血小板パック内の血小板に接触させる。典型的には、静脈穿刺管が、血小板の収集または輸送の際のパックの唯一の開口である。したがって、血小板の本発明の組成物での処置中に閉じた系を維持するために、このような組成物は、無菌接続管によって血小板パックに取り付けられた小さめの無菌容器に入れられる(例えば、参照により内容が本明細書に組み入れられる米国特許第4,412,835号明細書を参照)。接続管は、当業者には公知のように、可逆的にシールすることができる、または破壊しやすいシールを有することができる。血小板が単離されたら、本発明の組成物を含む容器のシールが開封され、この組成物が血小板バッグに導入される。一実施形態では、本発明の組成物は、この組成物の血小板に対する連続的な添加を可能にするために別個の再シール可能な接続管を有する別個の容器に入れられる。

【0093】

シアリダーゼ阻害剤

10

20

30

40

50

単離された血小板が得られたら、血小板は、本発明の組成物で処置され、この組成物は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上の保存促進組成物、例えば、グリカン修飾剤（例えば、単糖、例えば、アラビノース、フルクトース、フコース、ガラクトース、マンノース、リボース、グルコン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、ムラミン酸、シアル酸（N - アセチルノイラミン酸）、およびヌクレオチド糖、例えば、シチジンモノホスホ - N - アセチルノイラミン酸（CMP - シアル酸）、ウリジン二リン酸ガラクトース（UDP - ガラクトース）、およびUDP - ガラクトース前駆物質、例えば、UDP - グルコース）を含む。一部の好適な実施形態では、グリカン修飾剤は、UDP - ガラクトースおよび/またはCMP - シアル酸である。本発明の組成物は、これらの成分の1つ以上または組み合わせが含まれる「カクテル」を含む。句「組成物」または「本発明の組成物」は、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤を指す。

10

【0094】

本明細書で使用される、「ノイラミニダーゼ」とも呼ばれる「シアリダーゼ酵素」、「シアリダーゼ」は、ノイラミン酸のグリコシド結合を切断するグリコシドヒドロラーゼ酵素である。シアリダーゼ酵素は、血小板表面グリカンの末端シアル酸残基の加水分解を触媒する。図8を参照されたい。したがって、シアリダーゼ阻害剤は、本発明のいくつかの態様に使用される。シアリダーゼ阻害剤は、シアリダーゼ酵素活性を低下させ、血小板表面のグリカンの末端シアル酸残基の加水分解を防止し、血小板表面のグリカンの完全性を維持し、かつ/または輸血の前に保存される血小板の機能を維持する。

20

【0095】

シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ酵素は、広範囲の生物に見られる大きなファミリーである。ノイラミニダーゼ酵素は、ノイラミン酸のグリコシド結合を切断するグリコシドヒドロラーゼ酵素（EC 3.2.1.18）である。一般に知られているノイラミニダーゼは、ウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザ感染防止用の薬物標的である。他の相同体は、哺乳動物細胞に見られ、少なくとも4つの哺乳動物シアリダーゼ相同体が、ヒトゲノムに記述されている[例えば、Neu1（UniProtアクセス番号：Q5JQI0、Q99519）、Neu2（Q9Y3R4）、Neu3（Q9UQ49.1）、およびNeu4（A8K056、B3KR54、Q8WWR8）]。

30

【0096】

本明細書で使用される「シアリダーゼ阻害剤」または「ノイラミニダーゼ阻害剤」は、任意の化合物、小分子、ペプチド、タンパク質、アプタマー、リボザイム、RNAi、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどである。本明細書で使用される「阻害する」は、酵素の結合または活性を妨げることを意味する。阻害は、部分的でも全てでも良く、検出される酵素の活性が低下または調節される。

【0097】

例えば、本発明によるシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、タンパク質、例えば、ノイラミニダーゼタンパク質に対する抗体（モノクローナル、ポリクローナル、およびヒト化など）またはその結合断片とすることができる。抗体断片は、完全な形態以外の抗体の形態であり得、組み換えられた抗体断片に加えて、完全長抗体内に存在する部分または成分を含む。抗体断片は、限定されるものではないが、一本鎖Fv（scFv）、二重特異性抗体、Fv、および（Fab'）₂、三重特性抗体、Fc、Fab、CDR1、CDR2、CDR3、CDRの組み合わせ、可変領域、四重特異性抗体、二機能ハイブリッド抗体、フレームワーク領域、および定常領域などを含み得る（Maynard et al., (2000) Ann. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402を参照）。抗体は、購入する、特注する、または当分野で確立された方法によって目的の抗原に対して合成することができる（Janeway et al., (2001) Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing）。

40

50

【0098】

加えて、シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、ノイラミニダーゼ（例えば、細菌ノイラミニダーゼ）に結合する非抗体ペプチドまたはポリペプチドとすることができる。ペプチドまたはポリペプチドは、完全長の形態以外の目的のタンパク質分子の一部とすることができ、目的のタンパク質分子の完全長アミノ酸配列内に存在する小さめの構成物であるペプチドを含む。このようなペプチドは、購入する、または液相または固相合成法（Atherton et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach, IRL Press, Oxford, England）によって合成することができる。ペプチドまたはタンパク質関連シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、自然源から単離する、遺伝子組換えする、または化学的に調製することができる。これらの方法は、当分野で周知である。

10

【0099】

シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、ノイラミニダーゼに結合してその機能を破壊する小分子とすることもできる。小分子は、一般に低分子量の合成および天然の物質の多様な群である。小分子は、自然源（例えば、植物、菌類、および微生物など）から単離される、購入される、かつ/またはライブラリもしくは収集物として入手される、または合成される。候補シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤小分子は、組み合わせライブラリのコンピュータによるスクリーニングまたは高スループット（HTP）スクリーニングによって同定することができる。殆どの従来の医薬品、例えば、アスピリン、ペニシリン、および多くの化学療法薬は、小分子であり、購入することができる、化学合成することができる、または後述する無作為または組み合わせライブラリから得ることができる（Werner et al., (2006) Brief Funct. Genomic Proteomic 5(1): 32-6）。本発明の好適な実施形態では、小分子シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸（DANA）のナトリウム塩である。

20

【0100】

本発明によると、シアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤は、FDAに認可されたウイルスシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤、例えば、エチル（3R, 4R, 5S）- 5 - アミノ - 4 - アセトアミド - 3 - （ペンタン - 3 - イルオキシ） - シクロヘキサ - 1 - エン - 1 - カルボン酸（タミフル、Genentech, Cambridge, Massachusetts）としても知られるウイルスシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤オセルタミビル、（（2R, 3R, 4S）- 4 - グアニジノ - 3 - （プロブ - 1 - エン - 2 - イルアミノ） - 2 - （（1R, 2R）- 1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル） - 3, 4 - ジヒドロ - 2H - ピラン - 6 - カルボン酸）（リレンザ；Glaxo Smith Kline, Research Triangle Park, N.C.）としても知られるザナミビル；およびペラミビル（（1S, 2S, 3S, 4R）- 3 - [（1S）- 1 - アセトアミド - 2 - エチル - ブチル] - 4 - （ジアミノメチリデンアミノ） - 2 - ヒドロキシ - シクロペンタン - 1 - カルボン酸）（BioCryst, Birmingham, Ala.）、またはその変異体とすることもできる。例えば、ウイルスシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤、オセルタミビルは、Roche Laboratories（Nutley, N.J.）から購入できるエチルエステルプロドラッグである。FDAに認可されたウイルスシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤のアミノ酸配列は、誘導体化する、例えば、アミノ酸残基の挿入、欠失、または置換以外の修飾を有することもでき、従って元の産物の異形（変異体）となる。これらの修飾は、自然では共有結合であり得、例えば、脂質、他の有機部分、無機部分、およびポリマーとの化学結合を含む。ウイルスシアリダーゼ/ノイラミニダーゼ阻害剤の概要については、参照によりそれぞれの全容が本明細書に組み入れられる、"The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors." Nature Reviews: Drug Discover

30

40

50

y (2007) 6 (12): 967-74. Klumpp et al., (2006) Curr. Top. Med. Chem. 6 (5): 423-34; Zhang et al., (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6 (4): 429-48; Jefferson et al., (2006) Lancet 367 (9507): 303-13; Alymova et al., (2005) Curr Drug Targets Infect. Disord. 5 (4): 401-9; Moscona (2005) N. Engl. J. Med. 353 (13): 1363-73; De Clercq (2004) J. Clin. Virol. 30 (2): 115-33; Stiver (2003) CMAJ 168 (1): 49-56; Oxford et al., (2003) Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 1 (2): 337-42; Cheer et al., (2002) Am. J. Respir. Med. 1 (2): 147-52; Sidewell et al., (2002) Expert Opin. Investig. Drugs. 11 (6): 859-69; Doucette et al., (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2 (10): 1671-83; Young et al., (2001) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356 (1416): 1905-13; Lew et al., (2000) Curr. Med. Chem. 7 (6): 663-72; Taylor et al., (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 1996 6 (6): 830-7、および米国特許出願公開第2009/0175805号明細書、同第2006/0057658号明細書、同第2008/0199845号明細書、および同第2004/0062801号明細書を参照されたい。

【0101】

したがって、「シアリダーゼ阻害剤」は、限定されるものではないが、以下の1つ以上を含む：フェツイン、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸(DANA)または薬学的に許容され得るその塩；オセルタミビル(エチル(3R,4R,5S)-5-アミノ-4-アセトアミド-3-(ペンタン-3-イルオキシ)-シクロヘキサ-1-エン-1-カルボン酸)；ザナミビル((2R,3R,4S)-4-グアニジノ-3-(プロブ-1-エン-2-イルアミノ)-2-((1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル)-3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-カルボン酸)；ラニナミビル((4S,5R,6R)-5-アセトアミド-4-カルバミミドアミド-6-[(1R,2R)-3-ヒドロキシ-2-メトキシプロピル]-5,6-ジヒドロ-4H-ピラン-2-カルボン酸)；およびベラミビル((1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-アセトアミド-2-エチル-ブチル]-4-(ジアミノメチリデンアミノ)-2-ヒドロキシ-シクロペンタン-1-カルボン酸)または薬学的に許容され得るその塩。なおさらなる好適な実施形態では、シアリダーゼ阻害剤は、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸のナトリウム塩またはその組み合わせである。本発明に使用されるシアリダーゼ阻害剤は、当分野で公知または将来開発されるシアリダーゼ阻害剤を含む。

【0102】

本明細書で使用される「グリカン」または「グリカン残基」は、GPIb α 多糖で例示される、血小板の表面の多糖部分である。「末端」グリカン残基は、多糖鎖の末端における単糖/糖残基であり、典型的には血小板表面のポリペプチドに付着している。グリカン修飾剤は、血小板のグリカン残基を修飾する作用物質である。グリカン修飾剤は、グリカン残基で起こる切断を修復する。一実施形態では、グリカン修飾剤は、血小板の表面のGPIb α の多糖鎖の糖残基を変更する。

【0103】

シアリダーゼ阻害剤は、グリカン構造、特にグリカン末端の完全性を維持する役割を果たし、グリカン修飾剤は、単糖のグリカンへの付加によってグリカン修飾または修復する役割を果たす。したがって、シアリダーゼ阻害剤およびグリカン修飾剤は、異なる補完

的な機能を果たす。

【0104】

本明細書で説明される「グリカン修飾剤」は、単糖、例えば、アラビノース、フルクトース、フコース、ガラクトース、マンノース、リボース、グルコン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、ムラミン酸、シアル酸 (N - アセチルノイラミン酸)、およびヌクレオチド糖、例えば、シチジンモノホスホ - N - アセチルノイラミン酸 (CMP - シアル酸)、ウリジン二リン酸ガラクトース (UDP - ガラクトース)、および UDP - ガラクトース前駆物質、例えば、UDP - グルコースを含む。グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸または UDP - ガラクトースの前駆物質を含む。一部の好適な実施形態では、グリカン修飾剤は、UDP - ガラクトースまたは CMP - シアル酸である。

10

【0105】

UDP - ガラクトースは、ガラクトース - 1 - リン酸の代わりに UDP - グルコースからグルコース - 1 - リン酸の放出を触媒して UDP - ガラクトースを産生する酵素 UDP - グルコース - α - D - ガラクトース - 1 - リン酸ウリジルトランスフェラーゼによって形成される、ガラクトース代謝の中間体である。UDP - ガラクトースおよびシアル酸は、いくつかの業者、例えば、Sigma から入手可能である。加えて、UDP - ガラクトースの合成および生産方法は、当分野で公知であり、文献に記載されている (例えば、Liu et al., ChemBioChem 3, 348 - 355, 2002; Heidlas et al., J. Org. Chem. 57, 152 - 157; Butler et al., Nat. Biotechnol. 8, 281 - 284, 2000; Koizumi et al., Carbohydr. Res. 316, 179 - 183, 1999; Endo et al., Appl. Microbiol., Biotechnol. 53, 257 - 261, 2000 を参照)。UDP - ガラクトース前駆物質は、UDP - ガラクトースに変換 (例えば、酵素的にまたは生物化学的に) できる分子、化合物、または中間化合物である。UDP - ガラクトース前駆物質の1つの非限定例は、UDP - グルコースである。ある実施形態では、UDP - ガラクトース前駆物質を UDP - ガラクトースに変換する酵素が、反応混合物 (例えば、血小板容器内の) に添加される。

20

【0106】

ある実施形態では、グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸または CMP - シアル酸前駆物質である。さらなる実施形態では、CMP - シアル酸前駆物質を含む血小板組成物は、CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素をさらに含む。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸である。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、UDP - ガラクトースである。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸および UDP - ガラクトースである。

30

【0107】

ある実施形態では、シアリダーゼ阻害剤はタンパク質である。さらなる実施形態では、シアリダーゼ阻害剤は、ノイラミニダーゼタンパク質に対する抗体であり、この抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、ヒト化、またはその結合断片である。ある実施形態では、タンパク質または抗体であるシアリダーゼ阻害剤を含む方法は、有効量の少なくとも1つのグリカン修飾剤をさらに含む。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸または CMP - シアル酸前駆物質である。ある実施形態では、CMP - シアル酸前駆物質は、CMP - シアル酸前駆物質を CMP - シアル酸に変換する酵素をさらに含む。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、UDP - ガラクトースである。ある実施形態では、グリカン修飾剤は、CMP - シアル酸および UDP - ガラクトースである。

40

【0108】

血小板の処置

単離された血小板は、本発明の組成物によって処置される。簡単に、全プロセスを以下に説明する。単離されている期間内で、本発明の組成物が、単離された血小板に接触せられ、これにより処置された血小板組成物 (例えば、本明細書では「血小板組成物」と呼

50

ぶ) が得られる。血小板組成物は、室温または冷温で保存した後に加温することができる。血小板組成物を、血小板を必要とする個体に輸血し、本発明の組成物での処置により、輸血された血小板は、未処置の血小板と比較して、細菌の増殖の低下を示し、*in vivo*での循環を長く維持し、かつ止血を長く持続する。

【0109】

一実施形態では、血小板組成物は、本明細書で説明される1つ以上のシアリダーゼ阻害剤を含む。ある実施形態では、DANAが、シアリダーゼ阻害剤として使用される。本発明の組成物がカクテルとして使用される一実施形態では、シアリダーゼ阻害剤に加えて、グリカン修飾剤、例えば、UDP - ガラクトースおよび/またはCMP - シアル酸を添加することができる。

10

【0110】

血小板の単離後に、本明細書で説明されるように、または当分野で公知の他の方法を用いて、血小板が、本発明の組成物で処置される。本発明の組成物が、シアリダーゼ活性を低下させ、細菌の増殖を防止し、血小板の止血の持続を可能にし、かつ/または血小板の活性化する能力を維持して血餅の形成を可能にする量の単離された血小板に接触させられる。一実施形態では、シアリダーゼ阻害剤または1つ以上のグリカン修飾剤と組み合わせられたシアリダーゼ阻害剤の有効量は、血小板集団に導入されると、シアリダーゼ活性を低下させ、細菌の増殖を防止し、かつ/または血小板の哺乳動物への輸血後の哺乳動物における血小板の循環時間を延長する、または血小板集団のクリアランスを低減するように血小板の表面における十分な数のグリカン残基を維持または変更するシアリダーゼ阻害剤または1つ以上のグリカン修飾剤と組み合わせられたシアリダーゼ阻害剤の量である。

20

【0111】

例えば、単離された血小板に接触するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤の「有効量」は、約1マイクロモル~約2,000マイクロモル、最も好ましくは約200マイクロモル~約1.2ミリモル(例えば、約1~10マイクロモル、約1~約100マイクロモル、約100~約500マイクロモル、約500マイクロモル~約1.0ミリモル、約1.0~約1.5ミリモル、および約1.0~約2.0ミリモル)の範囲である。別の態様では、約10マイクロモル~約1000マイクロモル、約100マイクロモル~約150マイクロモル、または約200マイクロモル~約1200マイクロモルの範囲である。

30

【0112】

本発明のカクテルを使用すると、シアリダーゼ阻害剤または1つ以上のグリカン修飾剤と組み合わせられたシアリダーゼ阻害剤での血小板の修飾は、以下の通り行うことができる。血小板集団を、選択されたシアリダーゼ阻害剤または1つ以上のグリカン修飾剤と組み合わせられたシアリダーゼ阻害剤に接触させる。複数のシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤(例えば、2つ、3つ、または4つ以上)を、同時または連続的に使用することができる。時間内に連続的に使用されると、シアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン修飾剤は、所望の効果を付与する時間、十分に接近する。一部の実施形態では、0.1~500mU/mLのガラクトーストランスフェラーゼまたはシアリルトランスフェラーゼを、血小板集団に添加する。ガラクトースの変換は、レクチン、例えば、FITC - ECLまたはsWGA結合を使用して機能的に監視することができる。グリカン修飾反応のゴールは、sWGA結合を休止している室温のsWGA結合レベルに低下させることにある。ガラクトースの変換は、 ^{14}C - UDP - ガラクトースを用いて定量することができる。UDP - ガラクトースを ^{14}C - UDP - ガラクトースと混合して、適切なガラクトースの変換を得る。血小板を十分に洗浄し、取り込まれた放射活性を γ カウンタを用いて測定する。測定cpm(1分当たりのカウント数)により、取り込まれたガラクトースを計算することができる。同様のレクチン結合技術を、シアル酸の変換の監視に適用可能である。

40

【0113】

単離された血小板を、シアル酸の著しい加水分解が起こる前の時間内に血小板組成物で

50

処置することができる。この組成物の血小板への添加は、単離プロセス中、単離プロセスの直後、または別の期間内で行うことができる。

【0114】

単一ドナー血小板を、本明細書で説明されるように、アフエーシスによってドナーの循環から取り出すときに、本発明の組成物を無菌的に添加することができる。例えば、血液がアフエーシス装置によって遠心分離されて、血小板が他の血液成分から分離されたら、本発明の組成物を、血小板を含むバッグに添加することができる。別の実施形態では、遠心分離後に血小板が入れられる収集バッグは、本発明の組成物を既を含み得る。別の実施形態では、本発明の組成物は、血小板が収集されるバッグに血小板の収集と同時に添加することができる。血小板が本発明の組成物と接触したら、成分を混合または攪拌して（例えば、バッグを裏返し、そして元に戻す）、血小板が本発明の組成物に確実に接触するようにする。この例では、血小板の収集と血小板の本発明の組成物での処置との間に殆ど時間が経過しない。したがって、本発明の組成物と単離された血小板との接触は、血小板の献血中、または血小板単離の直後に行うことができる（例えば、血小板単離中の1分～約120分の間）。

10

【0115】

一実施形態では、本発明の組成物は、献血の「直後」、献血後の一定期間内、または献血と「同時」に単離された血小板に添加することができる。一実施形態では、本発明の組成物は、約1分～約6時間の範囲（例えば、約1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分、20分、21分、22分、23分、24分、25分、26分、27分、28分、29分、30分、31分、32分、33分、34分、35分、36分、37分、38分、39分、40分、41分、42分、43分、44分、45分、46分、47分、48分、49分、50分、51分、52分、53分、54分、55分、56分、57分、58分、59分、60分、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、4.5時間、5時間、5.5時間、6時間）で血小板に接触させる。

20

【0116】

無作為ドナー血小板が複数のドナーから単離される場合、本発明の組成物を、血小板が全血から単離された後に添加することができる。一実施形態では、本発明の組成物の血小板への添加は、ドナーからの血小板がプールされるときに行うことができる。一般的に約6単位の無作為ドナー血小板を入れるプールバッグに本発明の組成物を含めて、血小板がプールバッグに添加されたときに、単離された血小板が本組成物と接触するようにすることができる。あるいは、この組成物は、血小板がプールされる最中または後に、プールバッグに無菌接続してプールバッグに導入することができる。いずれの場合も、本発明の方法は、1時間～約8時間（例えば、1～約3時間）の間に単離された血小板に接触させるステップを含む。一実施形態では、本発明の組成物を単離された血小板に接触させるステップは、血小板が冷却される前に行うべきである。

30

【0117】

本発明のなおさらなる態様によると、血小板を収集して処理する装置が提供される。この装置は、血小板を収集する容器またはバッグを備え、この容器またはバッグは、本発明の組成物を含む。別の実施形態では、この装置は、単離された血小板を含む容器またはバッグおよび少なくとも1つの無菌容器またはバッグを含み、この無菌容器は、本発明の組成物を含む。血小板を含むバッグと本発明の組成物を含むバッグは、互いに無菌連通させることができる。

40

【0118】

血小板は、本発明の組成物と接触させた後、室温または冷温で保存することができる。ある態様では、血小板は、長期間の保存を可能にするように冷却される。しかしながら、本明細書でさらに説明するように、シアリダーゼ阻害剤は、細菌の増殖を抑制し、血小板の室温での保存を可能にする。

【0119】

50

ある実施形態では、本発明の血小板組成物は、血小板がドナーから得られた後に血小板集団に添加される有効量のシアリダーゼ阻害剤を含む。別の実施形態では、新規な血小板組成物は、血小板がドナーから得られた後に血小板集団に添加される有効量のシアリダーゼ阻害剤を含み、得られる血小板組成物は、*in vivo*止血活性および細菌の増殖の抑制を実質的に失うことなく、室温で一定期間保存される。別の好適な実施形態では、新規な血小板組成物は、血小板がドナーから得られた後に血小板集団に添加される有効量のシアリダーゼ阻害剤を含み；得られる血小板組成物を、室温未満の温度に冷却し；室温未満の温度で一定期間保存し、*in vivo*止血活性を実質的に失うことなく加温して室温に戻す。

【0120】

用語「冷却」、「冷温」、「室温未満の温度」、および「周囲温度未満の温度」は、互換的に使用され、28 ~ -100 の任意の温度を指す。本明細書で説明される本発明の任意の実施形態では、温度は、別法として、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0、-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、および-10の温度からなる群から選択される。一部の実施形態では、血小板調製物は、約15 未満、好ましくは10 未満、より好ましくは5 未満の温度で保存される。一部の他の実施形態では、血小板調製物は、室温で保存される。他の実施形態では、血小板は、例えば、0、-20、または-80 以下で凍結される。

【0121】

本明細書の本発明の態様および実施形態の全てで使用される用語「期間」は、血小板または血小板組成物が所与の温度で保存される期間を指す。用語「期間」は、数秒から、数分、数時間、数日、数週間の範囲とすることができる。好適な実施形態では、用語「期間」は、約3 ~ 約120時間、例えば、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、37時間、38時間、39時間、40時間、41時間、42時間、43時間、44時間、45時間、46時間、47時間、48時間、49時間、50時間、51時間、52時間、53時間、54時間、55時間、56時間、57時間、58時間、59時間、60時間、61時間、62時間、63時間、64時間、65時間、66時間、67時間、68時間、69時間、70時間、71時間、72時間、73時間、74時間、75時間、76時間、77時間、78時間、79時間、80時間、81時間、82時間、83時間、84時間、85時間、86時間、87時間、88時間、89時間、90時間、91時間、92時間、93時間、94時間、95時間、96時間、97時間、98時間、99時間、100時間、101時間、102時間、103時間、104時間、105時間、106時間、107時間、108時間、109時間、110時間、111時間、112時間、113時間、114時間、115時間、116時間、117時間、118時間、119時間、および120時間を含む時間を指す。ある実施形態では、処置された血小板が保存される期間は、約1 ~ 約30日間（例えば、約1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、28日間、29日間、および30日間）を含む。

【0122】

一実施形態では、処置された血小板は、約1 ~ 約14日間（例えば、約7日間）室温で保存することができる。7日後に、一態様では、血小板を本明細書で説明されるように冷蔵することができる。

【0123】

10

20

30

40

50

様々な他の実施形態では、処置された血小板は室温で保存される。1つ以上のシアリダーゼ阻害剤、任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤での処置は、血小板集団を維持/変更する、すなわち処置後の一定期間に亘って未処置血小板サンプルと比較すると、哺乳動物への輸血後の血小板集団の止血機能を維持または改善し、かつ室温で保存された血小板の保存損傷の発生を低減する。したがって、室温以下で保存される処置された血小板サンプルは、延長された保存期間、一実施形態では、少なくとも約2日間、少なくとも約3日間、少なくとも約4日間、少なくとも約5日間、少なくとも約6日間、少なくとも約7日間、少なくとも約8日間、少なくとも約9日間、少なくとも約10日間、少なくとも約11日間、少なくとも約12日間、少なくとも約13日間、少なくとも約14日間、少なくとも約21日間、または少なくとも約28日間後でも自家輸血または異種輸血に適している。

10

【0124】

本明細書の本発明の態様および実施形態の全てで使用される用語「徐々に加温する」は、漸進的加温（例えば、1時間または1日当たり0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）を指す。本明細書で説明されるように、本発明の任意の態様または実施形態は、処置された血小板調製物を室温よりも高い温度まで加温する、例えば、血小板調製物を37℃まで加温するステップをさらに含む。加温は、漸進的または段階的に温度上昇させて行うことができる。室温または冷温で保存される、処置された血小板集団は、血液産物の再加温に一般的である連続的な軽度の攪拌を行いながらゆっくりとした加熱によって加温することが好ましい。血液加温装置が、国際公開第2004/098675号パンフレットに開示され、この血液加温装置は、処置された血小板集団を冷蔵状態から再加温するのに適している。

20

【0125】

細菌の増殖および病原体誘発性血小板分解の抑制

本発明は、病原体のシアリダーゼを阻害することによって病原体誘発性血小板分解を低減し、かつ病原体の成長/増殖を抑制する新規な方法を提供する。シアリダーゼ阻害剤は、病原体の増殖を防止する抗菌性を示す。

【0126】

本明細書で使用される用語「病原体」は、(Dodd, R. Y. New Engl. J. Med. 327: 419-421 (1992); Soland, E. M., et al. J. Am. Med. Assoc. 274: 1368-1373 (1995) および Schreiber, G. B., et al. New Engl. J. Med. 334: 1685-1690 (1996)) に記載されている感染を引き起こす1つ以上の微生物などを指す。例示的な病原体は、限定されるものではないが、ウイルス、細菌、寄生虫、原生動物、または真菌を含む。ウイルスの例として、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルス、HIV、肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、呼吸発疹ウイルス、ブルータングウイルス、およびウシ下痢症ウイルスが挙げられる。ウイルスはまた、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、単純ヘルペスウイルスI型およびII型、ならびに血液中で自由に循環する他のウイルス、さらに細胞結合ウイルスも含む。真菌は、限定されるものではないが、例えば、アスペルギルス(Aspergillus)を含む。そして、典型的な寄生虫は、限定されるものではないが、アメーバ(Ameoba)、プラスモジウム(Plasmodium)、リーシュマニア(Leishmania)、マイコサスプロファンダス(Mycosus profundus)、トリパノソーマ(Trypanosoma)、スピロヘータ(Spirochete)、およびアルボウイルス(Arbovirus)を含む。

30

40

【0127】

血小板に共通に関連し、かつシアリダーゼ阻害剤によって増殖が抑制される細菌に関しては、限定されるものではないが、アスペルギルス(Aspergillus)、バチルス属(Bacillus sp)、バクテロイデス・エガーシイ(Bacteroides

50

s e g g e r t h i i)、カンジダアルビカンス (*C a n d i d a a l b i c a n s*)、シトロバクター属 (*C i t r o b a c t e r s p*)、ウェルシュ菌 (*C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s*)、コリネバクテリア属 (*C o r y n e b a c t e r i u m s p*)、類ジフテリア菌 (*D i p h t h e r o i d*)、エンテロバクター・エロゲネス (*E n t e r o b a c t e r a e r o g e n e s*)、エンテロバクター・アムニゲナス (*E n t e r o b a c t e r a m n i g e n u s*)、エンテロバクター・クロアカエ (*E n t e r o b a c t e r c l o a c a e*)、エンテロコッカス・アビウム (*E n t e r o c o c c u s a v i u m*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E n t e r o c o c c u s f a e c a l i s*)、大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*)、フゾバクテリウム属 (*F u s o b a c t e r i u m s p p .*)、グラヌリカタラ・アディアセンス (*G r a n u l i c a t e l l a a d i a c e n s*)、ヘリコバクターピロリ (*H e l i o b a c t e r p y l o r i*)、クレブシエラ属 (*K l e b s i e l l a s p*)、(肺炎桿菌 (*K . p n e u m o n i a*)、クレブシエラ・オキシトカ (*K . o x y t o c a*))、ラクトバシラス属 (*L a c t o b a c i l l u s s p*)、リステリア属 (*L i s t e r i a s p*)、マイクロコッカス属 (*M i c r o c o c c u s s p*)、ペプトストレプトコッカス (*P e p t o s t r e p t o c o c c u s*)、プロテウス・ブルガリス (*P r o t e u s v u l g a r i s*)、シュードモナス属 (*P s e u d o m o n a s s p*)、クチニセマウス (*P s e u d o m y s o r a l i s*)、プロピオン酸菌属 (*P r o p i o n i b a c t e r i u m s p*)、サルモネラ属 (*S a l m o n e l l a s p*)、セラチア属 (*S e r r a t i a s p*)、ブドウ球菌属 (*S t a p h y l o c o c c u s s p*) (コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (*C o a g u l a s e - n e g a t i v e S t a p h y l o c o c c u s*)、表皮ブドウ球菌 (*S t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i s*)、黄色ブドウ球菌 (*S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s*))、連鎖球菌属 (*S t r e p t o c o c c u s s p*) (ストレプトコッカス・ガロリティカス (*S . g a l l o l y t i c u s*)、ストレプトコッカス・ボビス (*S . b o v i s*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S . p y o g e n e s*)、緑色連鎖球菌 (*S . v i r i d a n s*))、セラチア・マルセッセンス (*S e r r a t i a m a r c e s c e n s*)、および腸炎エルシニア (*Y e r s i n i a e n t e r o c o l i t i c a*) を含む。

【0128】

本明細書で使用される用語「病原体誘発性血小板分解」は、あらゆる程度の血小板分解、止血活性の低下、または1つ以上の病原体によって引き起こされる血小板の除去率の上昇を指す。

【0129】

本明細書で使用される用語「有害作用」は、1つ以上の病原体によって引き起こされる血小板の生存能力に対する有害作用（例えば、血小板分解の進行、止血活性の低下、または血小板除去率の上昇）を指す。本明細書で使用される用語「有害作用」は、1つ以上の病原体によって引き起こされる患者に対する有害作用（例えば、感染自体の結果）、例えば、敗血症を指すこともある。

【0130】

本明細書で使用される用語「細菌汚染」は、上記の任意の細菌病原体による、または細菌由来シアリダーゼを産生することができる非病原性細菌による汚染を指す。「細菌の増殖の抑制」は、血小板調製物中の細菌の増殖を低減かつ／または抑制することを指す。

【0131】

本明細書で使用される用語「細菌由来シアリダーゼ」は、細菌によって産生されるシアリダーゼを指す。本明細書で使用される「細菌由来シアリダーゼ」の阻害は、細菌由来シアリダーゼの阻害に加えて、任意選択で、血漿由来シアリダーゼおよび／または患者由来シアリダーゼを阻害することができる。

【0132】

本発明は、他の態様では、血小板集団をドナーから得て、血小板を有効量の本発明の組

成物、例えば、シアリダーゼ阻害剤に接触させることによって、血小板調製物中の細菌の増殖を抑制する新規な方法を提供する。好適な実施形態では、本発明の方法は、*in vivo*止血活性を実質的に失うことなく、処置された血小板組成物を室温で一定期間保存するステップをさらに含む。あるいは、本明細書で説明されるように、処置された血小板を冷却して、得られる血小板組成物を室温よりも低い温度にし、*in vivo*止血活性を実質的に失うことなく、室温よりも低い温度で一定期間保存し、再加温して室温に戻すことができる。

【0133】

本明細書で説明されるように、血小板調製物中の病原体の増殖を減少させる本発明の方法の好適な実施形態は、本明細書で説明されるように、血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤に接触させ、かつ任意選択で、本明細書で説明されるように、有効量の少なくとも1つのグリカン修飾剤に接触させるステップを含む。

10

【0134】

シアリダーゼ阻害剤による細菌の増殖抑制・阻害により、血小板を、低い細菌汚染リスクでより長く、本明細書で説明される期間に亘って確実に保存することができる。

【0135】

血小板の細菌汚染は、血小板の輸血を受ける患者に敗血症を引き起こすため問題である。細菌汚染は、血液および/または血小板をドナーから得る際の非無菌操作、または献血後の血小板の扱い不良の結果であり得る。たとえ供与される血液または血小板を得る際の良い滅菌技術であっても、細菌は、血小板調製物中になお残存し得る。例えば、たとえ専門技術者が抗菌剤を使用して献血部位の皮膚を消毒したとしても、細菌が、皮膚の層内に入り込んでいることもある。したがって、針を皮膚に刺入すると、供与される血小板の細菌汚染が起こり得る。結果として、敗血症のリスクを低減するために、治療時（例えば、レシピエントに血小板を輸血されるとき）に細菌検査が行われる。

20

【0136】

加えて、細菌汚染は、血液容器/バッグの内面に生物膜の形成をもたらすことがある。生物膜形成は、細菌のバッグの内面への付着により起こり、その表面を支持体として用いて増殖する。細菌の増殖が進行すると、生物膜の形成も進行する。

【0137】

したがって、血小板調製物のシアリダーゼ阻害剤との接触により、予想外の細菌の増殖抑制・阻害、および血小板バッグの内面の生物膜形成の減少が起きる。本明細書で説明される方法を用いて、血小板調製物を、内因性血小板シアリダーゼだけではなく細菌シアリダーゼも阻害する有効量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤に接触させる。この血小板の処置により、細菌の成長/増殖が低減された血小板の長期保存が可能となり、これにより、レシピエントへの輸血後の*in vivo*での血小板の生存能力および止血が向上する。

30

【0138】

本発明の方法は、レシピエントに輸血される前に細菌の増殖が実際に抑制されているかを決定するために細菌の増殖を1つ以上の時点で検査することを含む。細菌検査は、1つの時点（例えば、治療の時点）で行うことができ、結果を基準と比較して、細菌の増殖が輸血される処置された血小板で起きたかを決定することができる。加えて、処置された血小板の細菌検査を2つ以上の時点で行って、特定のサンプルが細菌の増殖の抑制を示したかについて評価することができる。細菌の増殖の上昇または細菌の増殖の存在は、処置された血小板は汚染されており、輸血には使用できないことを示唆する。細菌の増殖がないことは、処置された血小板を輸血に使用できることを示唆する。本発明のシアリダーゼ阻害剤により、処置された血小板が輸血に適するようになる。

40

【0139】

処置された血小板調製物に細菌汚染があるかを決定する多数の検査が存在する。細菌には一般的であるが血小板に見られないポリペプチドまたはタンパク質の存在によって、培養技術、グラム染色法、スキャニング技術、細菌に保存されている核酸の存在、およびスキャンなどによって、細菌を検査することができる。

50

【0140】

血小板調製物の細菌汚染の決定に一般的に使用される検査は、Pan Generation Detection (PDG) (Verax Biomedical, Incorporated, Worcester Massachusetts) である。PDG検査は、血液成分中の多数の細菌を検出することができる。この広範囲の検出は、2つの広範なクラスの細菌の細胞壁に一般的である共有または保存された抗原、すなわちグラム陽性細菌のリボタイコ酸およびグラム陰性細菌のリボ多糖の存在に基づいている。この検査は、これらの保存されたグラム陽性抗原およびグラム陰性抗原を標的として、これらの標的に直接結合する結合剤を用いることによって生物学的サンプルを広範囲の細菌汚染について検査する。この検査では特定の細菌のレベルまたは存在は決定されないが、この検査は、血小板調製物中の多数の細菌の存在は決定する。

10

【0141】

培養方法を利用して、細菌汚染および/または細菌の増殖の存在または非存在を決定することができる。1つの市販の検査は、BacT/ALERT検査(bioMérieux, Inc., Durham, NC)と呼ばれている。細菌の検出は、細菌の増殖による二酸化炭素の発生量に基づいている。培養瓶の底部の二酸化炭素感受性液体エマルジョンセンサの色が変化し、これが、センサで反射される光の変化によって検出される。BacT/ALERT検査は、多数の細菌、真菌、および酵母の存在を検出する。

【0142】

細菌検出の別の方法では、血小板調製物サンプル中の酸素含有量を測定する。一例として、Pall BDS検査(Pall Corporation, Port Washington, NY)が挙げられる。この検出アプローチは、細菌の代理マーカーとしてサンプルパウチ内の空気の酸素含有量を測定する。酸素分析装置を使用して、血小板を有するパウチまたはバッグのヘッドスペースガス中の酸素の割合を測定する。収集された血小板サンプル中に細菌が存在する場合は、培養中のサンプル内の細菌の代謝活性および増殖によって消費される酸素の量が増加し、これにより、サンプルパウチ内の血漿および空気の酸素含有量が測定可能に減少する。

20

【0143】

血小板調製物中で細菌が増殖しているかを決定するより伝統的な方法は、グラム染色である。グラム染色は、微生物の識別を開始する目的で細菌種をクラス(グラム陰性およびグラム陽性)に分けることができる。この検査は、ペプチドグリカン、細菌の細胞壁のグリカンを検出する。

30

【0144】

処置された血小板調製物のサンプルを得て、培養して細菌が存在するか否かを決定することができる。培養培地にサンプルを播種またはプレーティングして、細菌の増殖に適した制御された条件下で培養する。細菌が増殖し、細菌を識別することができる。

【0145】

当分野で公知または将来開発される他の方法を使用して、本発明の処置された血小板調製物における細菌の増殖を判定することができる。

【0146】

本発明の方法では、血小板調製物を有効量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤に接触させることによって細菌の増殖および/または生物膜の形成を低減する。細菌の増殖は、基準または異なる時点で行われる別の評価と比較して減少する。本明細書で説明される方法は、細菌の増殖および/または生物膜の形成を少なくとも約5%(例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%)低減する。一実施形態では、本発明の方法は、細菌の増殖および/または生物膜の形成を、血小板調製物のシアリダーゼ阻害剤での処置の時点と比較して完全に抑制する。

40

【0147】

血小板の保存:

本発明は、血小板の保存期間を延長する方法を包含する。本明細書で説明されるシアリ

50

ダーゼ阻害剤を用いた保存では、シアリダーゼ活性を低下させて、細菌の増殖が抑制された状態で、血小板機能または止血活性が実質的に失われず、例えば、循環する能力が実質的に失われず、または血小板の除去率が上昇することなく血小板を保存することができる。

【0148】

血小板は、本明細書で説明されるように、当業者に公知の標準的な技術によって血液から収集する。この保存組成物は、少なくとも1つのシアリダーゼ阻害剤および任意選択の少なくとも1つのグリカン修飾剤を血小板の除去を低減するのに十分な量含む。一部の実施形態では、保存組成物は、血小板のグリカン部分の修飾を触媒する酵素をさらに含む。

【0149】

本発明は、ある態様では、血小板組成物を保存する新規な方法を提供し、この方法は、血小板集団をドナーから得るステップ、この血小板を有効量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択の1つ以上のグリカン修飾剤で処置するステップを含む。一実施形態では、血小板組成物を保存する新規な方法は、血小板集団をドナーから得るステップ；有効量のシアリダーゼ阻害剤をこの血小板集団に添加するステップ、および *in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく、得られた血小板組成物を室温で一定期間保存するステップを含む。別の実施形態では、血小板組成物を保存する新規な方法は、血小板集団をドナーから得るステップ；有効量のシアリダーゼ阻害剤をこの血小板集団に添加するステップ；得られた血小板組成物を室温未満の温度に冷却するステップ；この血小板組成物を室温未満の温度で一定期間保存するステップ、および *in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく、この血小板組成物を再加温して室温に戻すステップを含む。さらなる実施形態では、血小板組成物は、徐々に再加温する。ある実施形態では、血小板組成物は、保存後に哺乳動物に輸血されるときに実質的に正常の止血活性を維持している。さらなる実施形態では、保存後に哺乳動物に輸血されるときに血小板組成物は、未処置血小板の循環半減期よりも約5%以上長い循環半減期を有する。ある好適な実施形態では、血小板組成物は、保存後にヒトに輸血するのに適している。

【0150】

本発明によると、シアリダーゼ阻害剤で処置した後に、処置された血小板集団を、未処置の血小板の冷却時に受ける悪影響（冷温による血小板の活性化）なしに、室温または冷温で保存することができる。グリカン部分の保存および/または選択的な修飾は、除去を減少させ、これにより、現在可能な期間よりも長い期間の保存が可能となる。一態様では、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤を、概ね室温（約20 ~ 25）~ 37 で維持される血小板集団に添加する。本明細書で説明されるように、冷却とは、血小板集団の温度を約25 未満の温度に下げることである。一部の実施形態では、血小板は、約15 未満の温度まで冷却される。一部の好適な実施形態では、血小板は、約0 ~ 約4 の範囲の温度まで冷却される。冷却はまた、血小板組成物を凍結する、すなわち0 未満、-20、-50、および-80 以下の温度まで冷却することを含む。細胞の冷凍保存のプロセスは当分野で周知である。

【0151】

一部の実施形態では、血小板集団は、室温で少なくとも3日間保存される。例えば、処置された血小板集団は、室温で少なくとも4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、および28日間以上保存される。

【0152】

加えて、ある態様では、処置された血小板集団は、少なくとも3日間冷蔵することができる。処置された血小板集団は、例えば、少なくとも4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、および28日間以上冷蔵される。

【 0 1 5 3 】

血小板の哺乳動物（例えば、ヒト）への輸血

保存後、本発明は、一部の態様では、1つ以上のシアリダーゼ阻害剤を有する処置された血小板組成物を患者に輸血する方法を提供し、この血小板組成物は、本明細書で説明される方法に従って調製される。同様に、これらのステップを用いて、本発明は、哺乳動物において止血を媒介する新規な方法を提供する。

【 0 1 5 4 】

加えて、本発明は、血小板の循環時間を延長する、または血小板のクリアランスを減少させる方法に関する。血小板集団の循環時間は、その集団における血小板の半数が、哺乳動物への輸血後にその哺乳動物で循環しなくなる時間として定義される。

10

【 0 1 5 5 】

本明細書で使用される「クリアランス」は、哺乳動物の血液循環からの処置された血小板の除去（例えば、限定されるものではないが、マクロファージの食作用による）を意味する。より具体的には、血小板集団のクリアランスは、単位時間当たりの、単位量の血液または血清からの血小板集団の除去を指す。血小板集団のクリアランスの減少とは、血小板集団のクリアランスまたは血小板が除去される速度の抑制、遅延、または低減のことである。

【 0 1 5 6 】

血小板の輸血を必要とする患者は、例えば、貧血、血小板減少症、機能性血小板障害、活性化血小板に関連した出血、または出血の重大なリスク（例えば、予防薬の使用）のある患者を含む。次の医学的状態を有する患者は、血小板の輸血を必要とすることがある：白血病、骨髄異形成、再生不良貧血、充実性腫瘍、先天性または後天性血小板機能異常症、中枢神経系外傷。模型人口肺または心肺バイパスを受けている患者も、血小板の輸血を受ける。

20

【 0 1 5 7 】

本発明の一態様では、単離された血小板集団の循環時間を延長する方法では、単離された血小板集団を有効量の少なくとも1つのシアリダーゼ阻害剤に接触させて、この血小板集団のクリアランスを減少させる。本明細書で使用される血小板集団とは、1つ以上の血小板を有するサンプルのことである。

【 0 1 5 8 】

血小板のクリアランスの減少は、室温以下での血小板の保存後に起こる血小板のクリアランスの減少を含む。血小板のクリアランスの減少は、室温以下で得られる保存損傷の減少、または血小板の冷蔵で起こる「冷温による血小板の活性化」の減少から起こり得る。冷温による血小板の活性化は、当業者にとっての特定の意味を有する用語である。冷温による血小板の活性化は、血小板の形態の変化によって明白であり得、血小板の形態の変化の一部は、血小板の活性化の後に起こる変化に類似している。室温または冷温による血小板の活性化を示唆する構造の変化は、技術、例えば、光学顕微鏡検査または電子顕微鏡検査を用いて非常に容易に識別される。分子レベルでは、血小板の活性化は、アクチン束形成をもたらし、続いて細胞内カルシウムの濃度が上昇する。アクチン束形成は、例えば、電子顕微鏡検査を用いて検出される。細胞内カルシウム濃度の上昇は、例えば、蛍光細胞内カルシウムキレート剤を利用することによって決定される。アクチンフィラメントの切断を抑制する上記キレート剤の多くは、細胞内カルシウムの濃度の決定にも有用である（Tsien, R., 1980, 上掲）。したがって、様々な技術が、血小板が室温誘発活性化または冷温誘発活性化を受けたか否かの決定に利用可能である。

30

40

【 0 1 5 9 】

シアリダーゼ阻害剤の血小板への添加により、グリカンの末端のシアル酸残基の加水分解が防止され、血小板のグリカン部分の構造が維持され、処置された血小板のクリアランスが減少する。この効果は、例えば、チオグリコール酸注射刺激後に腹腔から単離された分化THP-1細胞またはマウスマクロファージを利用するin vitroシステムを用いて側定することができる。未処置血小板と比較した処置された血小板の除去速度を決

50

定することができる。除去速度を検査するために、処置された血小板をマクロファージに供給し、マクロファージによる血小板の摂取を監視する。未処置血小板と比較した処置された血小板の摂取の減少（１．２分の１以下）は、本明細書で説明される目的であるグリカン部分の修飾の成功を示唆する。

【０１６０】

また、シアリダーゼ阻害剤の血小板への添加により、細菌の増殖が抑制され、これにより、血小板のクリアランスが減少し、敗血症が防止される。細菌の増殖の評価は、本明細書で説明される。

【０１６１】

本発明のある実施形態では、血小板集団の循環時間は、少なくとも約１０％、２０％、２５％、３０％、または４０％増加する。なお一部の実施形態では、血小板集団の循環時間は、少なくとも約５０％～約１００％増加する。なおさらなる他の実施形態では、血小板集団の循環時間は、約１５０％以上増加する。

10

【０１６２】

血小板組成物：

本明細書で説明されるように、シアリダーゼ阻害剤に曝露されると、血小板は、処置され、本明細書では「血小板組成物」または「処置された血小板」と呼ばれる。本発明は、本明細書で説明される１つ以上のシアリダーゼ阻害剤を含む新規な血小板組成物を含む。別の実施形態では、新規な血小板組成物は、有効量の少なくとも１つのグリカン修飾剤をさらに含む。処置された血小板は、シアリダーゼ阻害剤で処置しないと普通なら切断される血小板の表面に複数の無傷のグリカン分子を有する。本発明の血小板組成物のグリカン分子は、シアル酸の切断が存在するグリカン分子を含み、このグリカン分子は、無傷のままである。シアル酸が切断された場合、グリカン修飾剤（例えば、CMP-シアル酸、またはUDP-ガラクトース、または両方）により、シアル酸の末端糖残基への付加、または末端糖残基のガラクトシル化、または末端糖残基のシアル化およびガラクトシル化の両方が可能となる。一部の実施形態では、修飾されたグリカン部分は、GPⅠb α 分子である。本発明はまた、保存媒体中の血小板組成物も含む。一部の実施形態では、保存媒体は、薬学的に許容され得る担体とすることができる。

20

【０１６３】

一部の実施形態では、このように修飾された末端グリカン分子はGPⅠb α 分子である。処置された血小板は、末端GPⅠb α 分子を有するグリカン構造を含み、続く処置により、末端ガラクトースまたはシアル酸がGPⅠb α 分子に付着する。別の態様では、本発明は、複数の処置された血小板を含む血小板組成物を提供する。一部の実施形態では、血小板組成物は、保存培地をさらに含む。一部の実施形態では、血小板組成物は、薬学的に許容され得る担体をさらに含む。

30

【０１６４】

一部の実施形態では、本明細書で説明される本発明の方法によって処置された血小板集団は、好ましくは哺乳動物への輸血後の、細菌の増殖の抑制および実質的に正常な止血活性を実証する。一部の実施形態では、本明細書で説明される本発明の方法によって処置された血小板集団は、同様に保存されるが未処置の血小板集団に対して、細菌の増殖の抑制および止血活性の改善を実証する。

40

【０１６５】

さらなる好適な実施形態では、上記説明された新規な血小板組成物は、安定な血小板調製物を提供する。ある実施形態では、本発明の安定な血小板調製物は、少なくとも２４～３６０時間保存することができ、血小板調製物は、未処置の血小板と比較して、ヒトにおいて、止血機能を有意に失うことがない、かつ血小板クリアランスが有意に増大することがない保存後のヒトへの投与／輸血に適している。ある好適な実施形態では、安定な血小板組成物は、冷蔵することができる。いくつかの他の好適な実施形態では、安定な血小板組成物は、未処置血小板と比較して、実質的に生物学的活性が低下することなく室温で保存することができる。

50

【0166】

本発明は、他の態様では、本明細書で説明される新規な血小板組成物を含み、かつ少なくとも1つの薬学的に許容され得る賦形剤をさらに含む組成物を提供する。本明細書で用いられる「薬学的に許容され得る賦形剤」は、望ましい特定の剤形に適した全ての溶媒、希釈剤、または他の液体担体、分散または懸濁補助剤、表面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、保存剤、抗酸化剤、固形結合剤、および潤滑剤などを含む。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980) は、医薬組成物の調製に使用される様々な賦形剤およびその調製のための公知の技術を開示している。例えば、任意の不希望の生物学的影響をもたらす、またはその他に医薬組成物の任意の他の化合物と有害に相互作用することにより、従来の賦形剤媒体が本発明の化合物に混合できない場合を除き、賦形剤の使用は、本発明の範囲内と考えられる。

10

【0167】

ある実施形態では、血小板組成物は、出血障害または貧血のヒト患者に輸血するのに適している。好適な実施形態では、血小板組成物は、ヒトに投与される前に、細菌の増殖が抑制された状態で少なくとも5日間保存することができ、血小板組成物は、未処置の血小板と比較して、止血機能を有意に失うことなく、かつ血小板クリアランスが有意に増加することなくヒトに輸血することができる。

20

【0168】

用語「薬学的に許容され得る」は、血小板の生物学的活性の有効性を妨げない非毒性材料を意味し、生物系、例えば、細胞、細胞培養、組織、または生物と適合性である。薬学的に許容され得る担体は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、および当分野で周知の他の材料、例えば、血小板組成物を pH 7.3 ~ 7.4、血液の生理的 pH に安定させる緩衝剤を含み、本発明に使用するのに適した薬学的に許容され得る組成物である。

【0169】

本発明は、哺乳動物への投与用の医薬組成物を調製する方法をさらに含む。好適な実施形態では、血小板を含む新規な医薬組成物は、血小板がドナーから得られた後に血小板集団に添加される有効量のシアリダーゼ阻害剤をさらに含み、得られた血小板組成物を、*in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく室温で一定期間保存する。別の好適な実施形態では、血小板を含む新規な医薬組成物は、血小板がドナーから得られた後に血小板集団に添加される有効量のシアリダーゼ阻害剤をさらに含み；得られた血小板組成物を、室温よりも低い温度に冷却し；室温よりも低い温度で一定期間保存し、*in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく再加温して室温に戻す。一部の実施形態では、血小板を含む新規な医薬組成物を調製する方法は、グリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素を中和する、除去する、または希釈するステップ、ならびに薬学的に許容され得る担体に処置された血小板調製物を入れるステップを含む。好適な一実施形態では、血小板調製物は、中和または希釈の前および最中に室温（約 22 °C）で保存される。別の好適な実施形態では、血小板調製物は、冷却して保存され、次いで中和または希釈の前に室温（約 22 °C）まで加温される。一部の実施形態では、血小板調製物は、グリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素に接触させる前に薬学的に許容され得る担体を含められるが、血小板調製物は、中和または希釈の後に必ずしも学的に許容され得る担体を含めなくても良い。

30

40

【0170】

本明細書で用いられる用語「中和する」または「中和」は、グリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素が、実質的に血小板のグリカン残基のグリカン修飾をできないようにする、または血小板溶液中のその濃度を、哺乳動物にとって有害でない、例えば、50 マイ

50

クロモル未満のグリカン修飾剤まで低下させるプロセスを指す。一部の実施形態では、冷却された血小板は、例えば、赤血球の懸濁液での希釈によって中和される。あるいは、処置された血小板をレシピエントに注入することができ、これは、赤血球懸濁液での希釈に等しい。この中和方法は、有利なことに、閉じた系を維持して血小板の損傷を最小限にする。好適な実施形態では、中和を必要としない。

【0171】

毒性を低減する代替の方法では、例えば、活性炭または固定された抗体を含むフィルタを輸血ラインに設けて、グリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素を除去する。

【0172】

グリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素の何れかまたは全てを、標準的な臨床的細胞洗浄技術に従って処置された血小板を洗浄することによって除去する、または実質的に希釈することができる。

【0173】

本発明は、哺乳動物における止血を媒介する方法をさらに提供する。この方法は、上記説明された処置された血小板を投与するステップを含む、または処置された血小板または医薬組成物の上記の注入は、当分野で公知の標準的な方法に従って行うことができる。一実施形態によると、ヒト患者に、処置された血小板の投与の前、後、または最中に赤血球が輸血される。赤血球の輸血は、投与された処置された血小板を希釈する役割を果たし、これによりグリカン部分の修飾を維持するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤および/または酵素が中和される。

【0174】

処置された血小板を用いた止血を媒介する投与計画は、対象の種類、年齢、体重、性別、および医学的状態、疾患の重症度、投与の経路および頻度を含む様々な因子に基づいて選択される。通常の技術を有する医師または臨床医は、止血を媒介するのに必要な有効量の処置された血小板を容易に決定して処方することができる。

【0175】

投与計画は、例えば、臨床的徴候および研究室の検査での処置に対する応答に従って決定することができる。このような臨床的徴候および研究室の検査の例は、当分野で周知であり、Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Ed., Fauci AS et al., eds., McGraw-Hill, New York, 2001に記載されている。

【0176】

例えば、血小板を1つ以上のシアリダーゼ阻害剤および任意選択のグリカン修飾剤で処置することによって血小板の室温誘発活性化または冷温誘発活性化を防止するための最適な濃度および条件を決定するために、血小板を室温で保存し、かつ/または血小板を冷温に曝露する前に、これらの物質を、量を漸増させて血小板に接触させる。シアリ酸の切断を防止するシアリダーゼ阻害剤および/またはグリカン部分の修飾を触媒するグリカン修飾剤の最適な濃度は、in vitro検査（例えば、ガラス、トロンビン、冷凍保存温度に応じた形態の変化の観察；ADP誘発性凝集）およびこれに続く止血機能（例えば、血小板減少症の動物における回復、生存、および出血時間の短縮、またはヒト対象における⁵¹Cr標識血小板の回復および生存）を示唆するin vivo検査によって決定される血小板機能は無傷で維持する最小有効濃度である。

【0177】

血小板組成物の調製方法：

本発明は、他の態様では、単離された血小板集団をドナーから得るステップ、およびこの血小板を有効量のシアリダーゼ阻害剤で、本明細書で説明される期間内で処置するステップを含む血小板組成物を調製する新規な方法を提供する。好適な実施形態では、血小板組成物を調製する新規な方法は、血小板集団をドナーから得るステップ；有効量のシアリ

10

20

30

40

50

ダーゼ阻害剤を血小板集団に添加するステップ、および *in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく、得られた血小板組成物を室温で一定期間保存するステップを含む。別の好適な実施形態では、血小板組成物を調製する新規な方法は、血小板集団をドナーから得るステップ；有効量のシアリダーゼ阻害剤を血小板集団に添加するステップ；得られた血小板組成物を室温よりも低い温度まで冷却するステップ；血小板組成物を室温よりも低い温度で一定期間保存するステップ、および *in vivo* 止血活性を実質的に失うことなく、血小板組成物を再加温して室温に戻すステップを含む。さらなる実施形態では、血小板組成物は、徐々に再加温する。ある実施形態では、血小板集団は、哺乳動物に輸血されるときに正常な止血活性を実質的に維持している。さらなる実施形態では、哺乳動物に輸血されるときに血小板集団は、未処置血小板の循環半減期よりも約 5 % 以上（例えば、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、または 150 %）長い循環半減期を有する。ある好適な実施形態では、処置された血小板集団は、ヒトに輸血されるのに適している。

【0178】

本明細書で説明される血小板組成物を調製する本発明の好適な実施形態は、本明細書で説明されるように、血小板集団を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置するステップを含む。

【0179】

本明細書で説明される血小板組成物を調製する本発明のさらなる好適な実施形態は、血小板集団を有効量のシアリダーゼ阻害剤で処置するステップ、および本明細書で説明されるように、血小板集団を有効量の少なくとも 1 つのグリカン修飾剤でさらに処置するステップを含む。

【0180】

一部の実施形態では、本明細書で説明される血小板の処置の方法と当分野で公知の血小板保護の 1 つ以上の他の方法との組み合わせを提供する。例えば、本発明で提供される血小板の修飾の方法は、例えば、限定されるものではないが、次の米国特許出願公開第 20090053198 A 1 号明細書、および米国特許第 7,030,110 号明細書；同第 7,029,654 号明細書；同第 7,005,253 号明細書；同第 6,900,231 号明細書；同第 6,866,992 号明細書；同第 6,730,783 号明細書；同第 6,706,765 号明細書；同第 6,706,021 号明細書；同第 6,693,115 号明細書；同第 6,638,931 号明細書；同第 6,635,637 号明細書；同第 6,566,379 号明細書；同第 6,521,663 号明細書；同第 6,518,310 号明細書；同第 6,514,978 号明細書；同第 6,497,823 号明細書；同第 6,476,016 号明細書；同第 6,472,399 号明細書；同第 6,420,397 号明細書；同第 6,417,161 号明細書；同第 6,350,764 号明細書；同第 6,344,486 号明細書；同第 6,344,466 号明細書；同第 6,326,492 号明細書；同第 6,277,556 号明細書；同第 6,245,763 号明細書；同第 6,235,778 号明細書；同第 6,221,669 号明細書；同第 6,204,263 号明細書；同第 6,037,356 号明細書；同第 5,919,614 号明細書；同第 5,763,156 号明細書；同第 5,753,428 号明細書；同第 5,660,825 号明細書；同第 5,622,867 号明細書；同第 5,582,821 号明細書；同第 5,571,686 号明細書；および同第 5,569,579 号明細書；同第 5,550,108 号明細書；同第 5,529,821 号明細書；同第 5,474,891 号明細書；同第 5,466,573 号明細書；同第 5,399,268 号明細書；同第 5,376,524 号明細書；同第 5,344,752 号明細書；同第 5,269,946 号明細書；同第 5,256,559 号明細書；同第 5,236,716 号明細書；同第 5,234,808 号明細書；および同第 5,198,357 号明細書で説明されている方法と組み合わせると有用である。

【0181】

キット

10

20

30

40

50

本発明はまた、適切なパッケージング材料およびキットの内容物を使用するために取扱説明書をさらに含む、血小板の収集、処理、および保存に使用されるキットも提供する。血液および血液産物の取り扱いおよび保存を含む標準的な医療行為に従って、キット中の全ての試薬および用品が無菌であることが好ましい。キットの内容物を滅菌する方法は、当分野で公知であり、例えば、エチレンオキサイドガス、およびγ線照射などである。ある実施形態では、キットは、静脈穿刺用品および/または血液収集用品、例えば注射針セット、血小板ドナーの皮膚を滅菌する溶液、および血液収集バッグもしくは容器を含み得る。好ましくは、容器は、「閉じられている」、すなわち周囲環境から実質的に遮断されている。このような閉じられた血液収集容器は、当分野で周知であり、その中に含まれる血小板調製物の微生物汚染を防止する手段を提供する。他の実施形態は、血液収集および血小板アフエーシス用の用品を含むキットを含む。キットは、一定量の1つ以上のシアリダーゼ阻害剤をさらに含み、容器内に収集および保存された多量の血小板を修飾するのに十分なグリカン修飾剤を含んでも含まなくても良い。他の実施形態では、キットは、容器内の多量の血液または血小板を処置するのに十分なシアリダーゼ阻害剤が容器内に含まれている血液保存容器を有する血液収集システムを含む。シアリダーゼ阻害剤単独の量またはシアリダーゼ阻害剤とグリカン修飾剤の量は、1つには容器の容量による。シアリダーゼ阻害剤単独またはシアリダーゼ阻害剤とグリカン修飾剤は、滅菌非化膿性溶液として提供するのが好ましいが、凍結乾燥粉末として提供することもできる。例えば、250 mlの容量の血液バッグが提供される。血液バッグには、250 mlの血液が添加されたときにシアリダーゼ阻害剤の最終濃度が約1200マイクロモルとなるような量のシアリダーゼ阻害剤が含まれる。他の実施形態は、例えば、限定されるものではないが、最終濃度が10マイクロモル~10ミリモル、好ましくは100マイクロモル~1.2ミリモルのシアリダーゼ阻害剤単独またはシアリダーゼ阻害剤とグリカン修飾剤となる量の様々な濃度のシアリダーゼ阻害剤単独またはシアリダーゼ阻害剤とグリカン修飾剤を含む。他の実施形態は、例えば、容器内に導入された血液産物にグリカンのシアリル化またはガラクトシル化をもたらす、シアリダーゼ阻害剤またはシアリダーゼ阻害剤とグリカン修飾剤の組合せを使用する。

【0182】

処置された血小板の血小板機能および評価

血小板の処置後、血小板機能を様々な*in vitro*法で評価することができる。処置された血小板の回復および生存をさらに評価することができ、これは、大抵は、健康なボランティアにおいて放射性標識血小板を用いて行われる。

【0183】

本明細書で説明される「止血活性」とは、出血の停止を媒介する（例えば、血餅を形成する）血小板集団の能力のことである。正常な止血活性とは、健康体（非血小板減少症または非血小板症哺乳動物）における*in vivo*未処置血小板の止血活性と機能的に等価または実質的に同様である、あるいは新鮮な分離された血小板組成物の*in vitro*止血活性と機能的に等価または実質的に同様である処置された血小板で見られる程度の止血活性のことである。

【0184】

血小板の処置後、血小板がその機能、例えば、活性化して血餅を形成する能力を維持しているかを判定するために血小板を評価することができる。血小板の止血活性を決定する様々なアッセイが利用可能である（Bennett, J. S. and Shattil, S. J., 1990, "Platelet function," *Hematology*, Williams, W. J., et al., Eds. McGraw Hill, pp 1233 - 12250）。一実施形態では、「止血」または「止血活性」の実証は、血小板減少症または血小板症（すなわち非機能的血小板）の動物またはヒトに輸血された血小板が循環して自然の出血または実験的に誘発された出血を停止するという実証も含み得る。血小板の止血活性を決定するために、研究室では、*in vitro*検査を使用する。凝集、分泌、血小板の形態、および代謝の変化のアッセイを含むこれらの検査は、活性化

に対する血小板機能の応答を測定する。これらの *in vitro* 検査は、*in vivo* 血小板止血機能を決定する。

【0185】

一実施形態では、本発明の組成物（例えば、シアリダーゼ阻害剤）で処置された血小板は、未処置であるが収集／単離直後の血小板と同様のレベルの血小板機能を示す。

【0186】

血小板が凝固する能力を測定する検査は凝集アッセイである。血小板凝集検査は、血小板凝集計を用いて血漿の混濁または濁度を測定する。凝固を促進するアゴニストが、凝集アッセイに使用される。アゴニストの例として、アデノシン二リン酸（ADP）、エピネフリン（アドレナリン）、トロンビン、コラーゲン、TXA₂、およびリストセチンが挙げられる。検査を行うためにサンプルにアゴニストが添加されるため、結果は、サンプルのドナーが抗凝固剤を摂取している場合に影響を受ける。アゴニストの血漿サンプルへの添加により、血小板が互いに凝集し、これにより液体が透明になる。次いで、凝集計で標本を透過する光を測定して、アゴニストに応答した血小板による凝固の程度を決定する。アゴニストが添加されると、血小板が凝集して光を吸収しにくくなるため、透過率が上昇し、これが、凝集計のフォトセルによって検出される。血小板凝集の正常時間は、研究室、温度、検査が行われるバイアルの形状、および様々なアゴニストに対する患者の応答によってやや異なる。凝集アッセイの正常な凝固時間およびアゴニストの量の設定は、当業者が決定することができる。アゴニストの例示的な量は、次の通りである：1 μ M ~ 10 μ M の ADP、1 ~ 4 μ g / mL のコラーゲン、0.5 mg / mL ~ 1.5, 5 mg / mL のリストセチン、5 ~ 10 μ M のアドレナリン、約 500 μ g / mL のアラキドン酸（TXA₂ の前駆物質）、および 50 ナノモル / L ~ 100 ナノモル / L のトロンビン。例えば、リストセチンが他のアゴニストとは異なる機序によって凝集を引き起こすため、リストセチンに対する応答と他の産物に対する応答との間の差異に留意されたい。アデノシン二リン酸（ADP）、アラキドン酸、コラーゲン、トロンビン、TXA₂、エピネフリン、および／またはリストセチンに応答して約 65 % 以上の血小板凝集を有する血小板は、正常な凝固機能を有する血小板と見なされる。したがって、本発明のシアリダーゼ阻害剤で処置され、凝集アッセイで約 65 % 以上（例えば、約 65 % ~ 約 100 %）の血小板凝集を示す血小板は、止血活性を有すると見なされる。

【0187】

別の検査は、凝集トロンボエラストグラフィを測定する。トロンボエラストグラフィは、例えば、TEG の商標名で Haemonetics Corporation（Braintree, MA）から入手可能である。トロンボエラストグラフィでは、血小板の少量のサンプル（典型的には、0.36 mL）がキュベット（cup）に入れられ、遅い静脈還流を模してゆっくりと 4 ° 45' 回転（サイクル時間 6 / 分）させられ、凝固が促進される。センサ軸がサンプル内に挿入されると、カップとセンサとの間に血餅が生成する。血餅形成の速度および強度が、様々な方法で測定されるが、これは、血漿凝固系の活性、血小板機能、線維素溶解、ならびに疾患、環境、および薬剤によって影響を受け得る他の因子によって異なる。一般に、血餅形成を表す 4 つの値：R 値（または反応時間）、K 値、角度、および MA（最大振幅）がこの検査によって決定される。R 値は、血餅の最初の証拠が検出されるまでの時間を表す。K 値は、R の終了から血餅が 20 mm に達するまでの時間であり、これは、血餅形成の速度を表す。この角度は、K に達したときに形成される曲線のタンジェントであり、K と同様の情報を提供する。MA は、血餅の強度を反映する。製造者によって決定される数式を使用して、これらの 4 つの各値の 1 つの式への相対的寄与を考慮する凝固指数（Coagulation Index）（CI）を決定することができる。本発明の処置された血小板は、血餅を形成することができ、止血を維持する。

【0188】

血小板マーカー／機能の免疫学的評価

組成物での処置の前および／または後、ならびに個体に輸血された後に活性化する血小

板の能力を含む血小板機能を評価することができる。血小板活性化マーカーの例として、P - セレクチン、P A C - 1、G P I I b、G P I I I a、G P I b、およびG P I I I aが挙げられる。可溶性マーカーおよび膜結合マーカーを評価して、血小板活性化の状態を決定し、処置された血小板調製物の止血を評価することができる。可溶性マーカーおよび膜結合マーカーを測定する方法は、いくつかの適切なアッセイを含む。適切なアッセイは、免疫学的方法、例えば、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法 (E L I S A)、化学発光アッセイ、および容積毛細管血球計算システム (v o l u m e t r i c c a p i l l a r y c y t o m e t r y s y s t e m) を包含する。現在公知または将来開発される任意の方法を、このようなマーカーの測定に使用することができる。

10

【 0 1 8 9 】

本発明の方法は、血小板マーカーまたはその一部と反応する抗体を利用する。好適な実施形態では、抗体は、膜結合血小板マーカーおよび/または可溶性血小板マーカーまたはその一部と特異的に結合する。抗体が結合すると、これらが結合したタンパク質またはマーカーの機能が阻害される。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得、用語抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、およびそれらの機能的断片を包含するものとする。用語ポリクローナルおよびモノクローナルは、抗体調製物の均一性の程度を指し、特定の生産方法に限定されるものではない。

【 0 1 9 0 】

いくつかの好適な実施形態では、免疫学的技術は、抗血小板マーカー抗体 (すなわち 1 つ以上の抗体) によって血小板マーカーのレベルを検出する。抗血小板マーカー抗体は、モノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体、およびこれらの混合物を含む。血小板を表面膜糖タンパク質に対する抗体で標識し、次いでフローサイトメトリーにより結合を分析することは、止血を評価するための迅速かつ高感度の技術である。例えば、G P I I b、G P I I I a、G P I b、およびG P I I I aはそれぞれ、抗体C D 4 1、C D 6 1、C D 4 2 b、およびC D 6 1を用いて評価することができる。膜結合または可溶性P - セレクチン (P - s e l e c t i n) のレベルの上昇は、血小板の活性化の程度を示唆し、モノクローナル抗体、S 1 2 またはW 4 0 を用いて検出することができる。このようなマーカーを検出するための抗体を購入しても良いし、または当分野で公知の方法を用いて適切な免疫原を産生させても良い。

20

30

【 0 1 9 1 】

現在公知または将来開発される任意の方法を、膜結合血小板マーカーの測定に使用することができる。本発明が利用する膜結合血小板マーカーのレベルを評価する 1 つの方法はフローサイトメトリーである。血小板または膜結合マーカーを測定するためのフローサイトメトリー法は当分野で周知である (教示の全てが参照により本明細書に組み入れられる、Shattil, Sanford J, et al. "Detection of Activated Platelets in Whole Blood using Activation-Dependant Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry," Blood, Vol. 70, No 1 (July), 1987: pp 307 - 315; Scharf, Rudiger E., et al., "Activation of Platelets in Blood Perfusing Angioplasty-damaged Coronary Arteries, Flow Cytometric Detection," Arteriosclerosis and Thrombosis, Vol 12, No 12 (December), 1992: pp 1475 - 1487)。例えば、血小板を含むサンプルを、血小板で発現される抗体とマーカーとの複合体の形成に適した条件下で、マーカーに対する特異性を有する抗体に接触させて、複合体の形成を検出または測定する (直接的または間接的に) ことができる。一例では、膜結合マーカーのレベルは、血小板を含む第 1 および第 2 のサンプルを得て、コントロールとして機能する前記第 1 のサンプルを、血小板活性アゴニスト、例えば、ホルボールミリスチン酸アセテート (P M A)

40

50

、A D P（アデノシンニリン酸）、トロンビン、コラーゲン、および／またはT R A P（トロンビン受容体活性化ペプチド）に、前記第1のサンプル中の血小板の活性化に適した条件下で、好ましくは前記血小板を最大限に活性化するのに有効な期間に亘って、かつ好ましくは、第2のサンプルを内因性血小板活性化レベルを維持するのに適した条件下で、接触させることによってフローサイトメトリーにより評価することができる。次いで、この方法では、サンプルを、好ましくは血小板で発現されるマーカーに結合するのに必要な量よりも多い量の蛍光標識を有する抗血小板マーカー抗体を含む組成物に、前記抗体と活性化された血小板との標識された複合体の形成に適した条件下で接触させる、またはこの組成物で染色する。次いで、前記サンプル中の複合体の形成を決定（検出または測定）し、検出された複合体の量が、前記第2のサンプル中の血小板活性化の程度を示唆する。一実施形態では、本発明の組成物で処置されて保存された、単離された血小板中の血小板活性化の程度は、ドナーから新たに収集された血小板の血小板活性化の程度と同程度である。

10

【0192】

膜結合血小板マーカーの測定にフローサイトメトリーを使用するのに加えて、ラジオイムノアッセイも利用することができる。ラジオイムノアッセイを用いると、内因性の血小板活性化を、予め選択された数の血小板を含む第1および第2のサンプルを得て；前記第1のサンプルを、血小板活性化アゴニスト、例えば、ホルボールミリスチン酸アセテート（P M A）、A D P（アデノシンニリン酸）、トロンビン、コラーゲン、および／またはT R A P（トロンビン受容体活性化ペプチド）と、前記第1のサンプル中の血小板の活性化に適した条件下で、好ましくは前記血小板を最大限に活性化するのに有効な期間に亘って、かつ好ましくは、第2のサンプルを内因性血小板活性化レベルを維持するのに適した条件下で、接触させることによって免疫結合アッセイにより評価することができる。次いで、サンプルを、評価されるマーカーに特異的な抗体組成物に接触させる。この抗体は、放射性標識；または放射性標識を有する第2の抗体の結合部位を有し得る。サンプル中での複合体の形成を検出し、前記第1のサンプル中で検出される複合体の量と比較した前記第2のサンプル中で検出される複合体の量は、前記第2のサンプル中での血小板活性化の程度を示唆する。

20

【0193】

可溶性血小板マーカーを検出するアッセイ

30

現在公知または将来開発される任意の方法を可溶性血小板マーカーに使用することができる。好適な実施形態では、可溶性血小板マーカーを、E L I S AアッセイまたはサンドイッチE L I S Aアッセイを用いて決定する。適切なサンプル中での可溶性血小板マーカーの検出では、サンプル（例えば、血液）を収集し、好ましくは、血小板を、例えば、血清または血漿の調製（例えば、乏血小板血漿の単離）によってサンプルから除去する（一部または全て）。サンプルは、好ましくは、例えば、血小板からの分泌またはタンパク分解による可溶性血小板マーカーの人工的な増加を低減するのに適した時間内で血小板を除去するように処理する。サンプルは、必要に応じてさらに処理することができる（例えば、アッセイ緩衝剤（例えば、E L I S A希釈剤）を用いた希釈によって）。加えて、技術者は、安定させてi n v i t r o血小板活性化を防止する試薬を添加することができる。このような安定剤の例として、アピラーゼおよびプロスタグランジンE₁（P G E₁）が挙げられる。

40

【0194】

適切なサンプル、例えば、血清、乏血小板血漿（P P P）におけるE L I S Aアッセイを用いた可溶性血小板マーカーの測定を判定するために、この方法では、適切なサンプルと、検出器としての抗血小板抗体、例えば、ビオチン化抗血小板M A bおよびH R P - ストレプトアビジン、またはH R P結合抗血小板M a bを含む組成物と、抗血小板マーカー捕捉抗体が結合された（直接または間接的に）固形支持体、例えば、マイクロタイタープレートとを組み合わせる。検出抗体は、前記抗血小板マーカー抗体と可溶性血小板マーカーとの複合体の形成に適した条件下で、捕捉抗体によって認識されるエピトープとは異なる

50

るエピトープに結合する。この方法では、サンプル中の複合体の形成を決定する。

【0195】

固形支持体、例えば、マイクロタイタープレート、ディップスティック、ビーズ、または他の適切な支持体を、抗血小板マーカー抗体を用いて直接的または間接的に被覆することができる。例えば、抗血小板マーカー抗体をマイクロタイターウェルに被覆しても良いし、またはビオチン化抗血小板マーカー M a b をストレプトアビジン被覆支持体に添加しても良い。様々な固定法または被覆法および多数の固形支持体を使用することができ、これらは、所望の形態に従って選択することができる。

【0196】

特定の好適な実施形態では、サンプル（または標準）を、検出抗体および任意選択の検出を監視する1つ以上の試薬と同時に固形支持体と組み合わせる。

【0197】

既知の量の可溶性血小板マーカー標準を、適切なサンプルについての上記説明のように調製して処理することができる。この標準は、サンプル中の血小板マーカーのレベルと標準中の血小板マーカーのレベルとの比較によって検出されるマーカーの量の定量に役立つ。医師、技術者、装置、または有資格者は、検出された複合体の量を適切なコントロールと比較して、レベルが上昇したか否かを決定することができる。

【0198】

血小板マーカーの典型的なアッセイは、連続アッセイであり、このアッセイでは、プレートが第1の抗体で被覆され、血漿が添加され、プレートが洗浄され、第2の標識抗体が添加され、そしてプレートが洗浄されて結合した第2の抗体が定量される。しかしながら、結合動力学により、同時方式では、第2の抗体の解離速度が低下し、アッセイが高感度になることが明らかになった。したがって、固形支持体が捕捉抗体で被覆され、そして血漿および検出抗体が同時に添加される同時方式は、感度を改善することができて好ましい。

【0199】

技術者、医師、有資格者、または装置は、結果を、適切なコントロール、例えば、正常な個体における1つ以上の血小板マーカーの標準レベル、および同じドナーからのサンプル中の血小板マーカーのベースラインレベルと比較することができる。例えば、サンプルの代わりに既知の量の血小板マーカー標準を用いてアッセイを行って、標準曲線を設定することができる。血小板マーカー標準の既知の量と形成または検出された複合体の量とを相対的に比較することができる。

【0200】

保存損傷を評価して、血小板の状態および活性化して血餅を形成する能力を決定することができる。保存損傷は、室温以下での保存時の血小板に対する形態変化および分子変化を含む。血小板障害の第1の目に見える影響の1つは、円板形態が不可逆的に消失して球形になり、カルシウム依存性ゲルゾリン活性化およびホスホイノシチド媒介アクチン重合により表面に棘状突起が出現することである。血小板で誘発される特定の形態変化は、顕微鏡下で容易に観察することができる。形状の消失は、低温、特に血小板が20 未満の温度に曝されると加速する。形状のさらなる変化に加えて、細胞内カルシウムレベルおよびアクチン重合の程度が顕著に上昇する。さらに、保存された血小板は、本明細書で説明されるように免疫学的に評価することができるα顆粒およびリソソーム内容物を分泌し、かつ脱重合プロセスによる細胞膜の下側の微小管コイル (m i c r o t u b u l e c o i l) を認識する。したがって、室温以下で起こる保存損傷は、当分野で公知かつ本明細書で説明される方法によって容易に測定して、本発明の血小板組成物および関連方法の有効性を定量化することができる。標準では、本発明の血小板保存液の質とシアリダーゼ阻害剤を含んでいない血小板保存液の質とを比較する。したがって、本発明の組成物で処置された血小板は、形状および機能を維持し、これは、本発明の P A S に保存されていない血小板（例えば、既知の血小板保存液、例えば、I n t e r S o l (F e n w a l) および S S P + (M a c o P h a r m a) に保存された）と少なくとも同等以上である。

【実施例】

【0201】

実施例1：ヒト血小板：ヒト血小板の室温以下での長期保存では、シアル酸が減少し、シアリダーゼ（ノイラミニダーゼ）活性が上昇する

冷蔵下での長期保存中の血小板シアル酸の減少

血小板を、1.2 mMのヌクレオチド糖の存在下または非存在下で、4℃で保存して、全シアル酸を定量した。血小板を遠心分離し、完全に洗浄し、140 mMのNaCl、3 mMのKCl、0.5 mMのMgCl₂、5 mMのNaHCO₃、10 mMのグルコース、および10 mMのHEPES、pH 7.4に再懸濁した。再懸濁された血小板のアリコート、Pierce BCAタンパク質アッセイキットを用いてタンパク質定量用のRIPA緩衝液（Cell Signaling Technology）で溶解するか、またはQuantiChrom（商標）シアル酸アッセイキットを用いて製造者（Bio Assays Systems）の取扱説明書に従って処理して血小板シアル酸を定量した。アッセイキットは、シアル酸が、チオバルビツール酸と反応してピンク色の産物を形成するホルミルピルビン酸に酸化される改良型Warren法を使用する。549 nmでの吸光度は、シアル酸濃度に正比例し、試験サンプル中のシアル酸濃度は、製造者の取扱説明書に従ってシアル酸標準から得られる線形標準曲線から計算することができる。新鮮な血小板は、血小板タンパク質1 mg当たり約10 μgのシアル酸を含む。冷温で長期保存されると、100%に正規化される新鮮な血小板（第5日目__a）と比較して血小板シアル酸が大幅に減少する（第5日目__b、ドナーA、約35%；ドナーB、約25%）。しかしながら、シアル酸の減少は、保存された血小板中のCMP-シアル酸およびUDP-Gal（B__第5日目__b）、再シアル化に必要なドナーの糖の存在によってドナーBの血小板ではゆっくりであった（図2）。UDP-Gal単独は、効果がなかった（第5日目__c）。シアル酸の減少が少ないドナーBの血小板は、ドナーAの血小板よりも初期シアリダーゼ表面活性が低かった（以下を参照、図3B）。

【0202】

血小板保存中のシアリダーゼ活性

ヒト血小板は、表面露出シアリダーゼを発現する。シアリダーゼ活性は、保存中の血小板シアル酸の減少に関連すると考えられているため特に問題である。したがって、シアル酸含有量の直接的な分析に加えて、保存中の血小板シアリダーゼ活性および表面シアリダーゼ活性の全ての定量が、シアル酸減少の機序を理解する上で極めて重要である。さらに、シアリダーゼ活性は、行われようとする再シアル化のアプローチを妨げ得る。新鮮な保存された血小板中のシアリダーゼの性質の決定は重要である。基質として4-メチルウンベリフェリル-α-D-N-アセチルノイラミン酸（4-MU-NeuAc）を使用する血小板シアリダーゼ活性のための高信頼性かつ高感度の蛍光分析アッセイが本明細書に示されている。シアリダーゼによる基質の切断により、シアル酸およびメチルウンベリフェリル（MU）が放出され、Na₂CO₃での終了時に、後者を、λ_{ex}/λ_{em}=355/460 nmで測定した。シアリダーゼ活性は、非透過性血小板または透過処理血小板で測定した。図3Aは、無傷の新鮮な血小板が、有意な表面シアリダーゼ活性を有していないことを示している。対照的に、表面および細胞内の両方のシアリダーゼ活性を含む十分なシアリダーゼ活性を新鮮な透過処理血小板で測定した。さらなる分析により、新鮮な血小板の表面シアリダーゼ活性は、ドナーによって様々であるが（図3A、ドナーAおよびB）、冷蔵時の血小板シアリダーゼ活性の上昇は、ドナーAおよびBを含む全てのケースで観察されたことが示されている（図3C）。

【0203】

冷蔵時の血小板シアリダーゼ活性の上昇の検出および保存媒体（不図示）中のその非存在は、冷温が、シアリダーゼの表面露出を増大させ得ることを示唆する。この仮説を検証するために、血小板におけるシアリダーゼ露出を免疫蛍光法によって調べた。4つのヒトシアリダーゼNeu1、Neu2、Neu3、およびNeu4が同定された。Neu1は、リソソーム酵素であり；Neu2は、サイトゾルシアリダーゼであり；Neu3は、血

10

20

30

40

50

漿膜シアリダーゼであって、その活性がガングリオシド特異的であり；Neu 4は、新規なヒト管腔リソソーム酵素（human luminal lysosomal enzyme）である。Neu 1、Neu 2、Neu 3、およびNeu 4は、高度の類似性および高度に保存された残基のアミノ酸ブロックを共有する。しかしながら、これらのシアリダーゼは、細胞内局在化、in vitro 基質選択、および組織分布の点で互いに異なっている。Neu 1は、狭い基質特性を有すると考えられるリソソームシアリダーゼである。この酵素の天然基質は未知であり、従って活性は、人工基質、例えば、4-MU-NeuAcおよびニトロ-フェニル-NeuAcについてのみ報告されているが、ガングリオシダーゼ（gangliosidase）、フェツイン、またはシアリルラクトースについては報告されていない。Neu 2は、幅広い基質特異性を有するサイトゾル酵素である。Neu 3は、最初はガングリオシドシアリダーゼとして記述された血漿膜結合シアリダーゼである。Neu 3は、ガングリオシドを優先的に加水分解するが、糖タンパク質、4-MU-NeuAc、シアリルラクトースなども加水分解される。リソソームNeu 1および表面結合Neu 3（抗体は市販されている）が、現在の研究の中心であった。図4に示されているように、Neu 3は、新鮮な血小板の表面で容易に視覚化することができ、その発現は、冷却による影響を受けない。対照的に、Neu 1は、新鮮な血小板における弱い表面露出を実証しただけであり、これは、細胞内リソソーム顆粒におけるその細胞内局在化に一致している。しかしながら、48時間冷却すると、その表面露出が大幅に増加する。このデータは、Neu 1が、冷却中の血小板表面シアリダーゼ活性の上昇の少なくとも一因であることを実証している。

10

20

【0204】

要約すると、冷温での血小板保存は、血小板表面シアル酸の減少を促進し、血小板表面シアリダーゼの発現を増大させる。RT保存血小板についても同様の知見が得られた（不図示）。

【0205】

実施例2：マウス血小板：マウス血小板の冷蔵中にシアリダーゼ活性が上昇し、シアリダーゼ阻害剤DANAがマウス血小板のin vivoでの生存期間を延長する

48時間の冷蔵後にマウス血小板のシアリダーゼ活性が上昇する

単離された無傷の新鮮なマウス血小板、そして冷却後および加温後のこのマウス血小板のシアリダーゼ表面活性を、Amplex Redノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）アッセイキット（Molecular probes, Eugene, OR, USA）を用いて決定した。室温または冷温で48時間維持したマウス血小板（ 2×10^9 ）を単離し、用意した反応緩衝液（0.5 MのTris-HCl、pH 7.2、および1 mMのCaCl₂）に懸濁した。血小板由来シアリダーゼ活性を、室温で2.5時間に亘って測定した。図5は、シアリダーゼ活性が、新鮮な室温の血小板（RT）と比較して冷蔵（4℃）後の血小板で実質的に上昇していることを示している。重大なことに、シアリダーゼ活性は、血小板がシアリダーゼ活性アッセイの前に十分に洗浄されたため血漿由来ではない。コントロールとして、シアリダーゼ活性（ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）（成分H））を同じ期間（インセット）に亘って測定した。Neu 1の表面発現は、抗Neu 1特異的抗体を用いたフローサイトメトリーによる測定で、保存された血小板で3.5倍に上昇している（不図示）。

30

40

【0206】

血小板保存中の競合シアリダーゼ基質としてのフェツイン

フェツイン（1 mg/mL）を、冷蔵前のマウス多血小板血漿または室温の新鮮な血小板に添加し、β-ガラクトース露出を、FITC結合RCA-1-レクチン、露出されたβ-ガラクトースに特異的なレクチンを用いてフローサイトメトリーによって測定した。フェツインの添加により、血小板保存中のシアル酸の加水分解が大幅に抑制され、RCA-1結合が防止された。フェツイン添加は、RCA-1の新鮮な血小板への結合に影響を与えない（図6）。これらの結果は、シアリダーゼ活性が血小板冷蔵中に上昇することを示し、シアル酸の加水分解を媒介すると思われる。

50

【0207】

シアリダーゼ阻害剤 DANA は血小板の *in vivo* 生存期間を延長する

シアル酸の定量を、シアル酸定量キット (Sigma, St. Louis MI, USA) を用いて新たに単離された血小板および長期保存された血小板で行った。シアル酸定量キットは、 $\alpha 2 - 3, 6, 8, 9$ - ノイラミニダーゼを用いて複合糖質から放出させて分岐シアル酸を含むすべてのシアル酸結合を切断した後に、全 N - アセチルノイラミン酸 (シアル酸) を決定する。結果は、 2×10^9 の新たに単離されたマウス血小板 (約 2.5 mg のタンパク質) が約 3 μ モルのシアル酸を含むことを示している。長期保存後、血小板のシアル酸含有量が 50 % を超えて減少する (不図示)。

【0208】

以前は、シアル酸は、通常は β - ガラクトース残基を覆って血小板の生存を可能にすると考えられていた。これらの結果は、正常な血小板の生存が、マクロファージと無関係に肝細胞 ASGP 受容体によって調節されることを示している。表面シアル酸は、通常はシアリダーゼによって加水分解される。次いで、これらの研究は、*in vivo* シアリダーゼ活性の阻害が血小板の生存に対して影響を有するか否かに取り組んだ。マウス血小板は、マウスに特定のシアリダーゼ阻害剤、2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸 (DANA) のナトリウム塩を注射した後に長期生存した。*in vivo* での血小板のピオチン化の後に、コントロールとして 100 mM の DANA または PBS (リン酸緩衝生理食塩水) をマウスに注射した。シアリダーゼ活性の DANA での阻害により、コントロールマウス (コントロール) のピオチン化血小板の生存と比較してピオチン化血小板 (DANA) の生存が延長されている (図 7)。これらの結果は、*in vivo* でのノイラミニダーゼ活性の阻害が血小板の生存を延長させることを示唆している。しかしながら、この効果は、血小板特異的ではないであろう。示されているように、新鮮な血小板の回復および生存は、Asgr - 1 または Asgr - 2 欠損マウスで有意に改善され (Sorensen et al., Blood, 2009, Vol. 114, pgs 1645 - 1654)、肝細胞 Ashwell - Morell 受容体が、 β - ガラクトース露出のために血小板表面で普通に生存することを明らかにしている。総合すると、これらのデータは、恐らくシアリダーゼ活性により循環中に血小板のシアル酸が減少することを示し、老化血小板の新たなクリアランス機序を表している。

【0209】

実施例 3 : 血小板の循環寿命の定義におけるシアル化 / 脱シアル化の役割

ヒト血小板は Neu 1 および Neu 3 を産生し、Neu 1 を血漿中に放出する

この研究では、保存時に起こる血小板のクリアランスの上昇の原因である 2 つの新たな機序に取り組む。第 1 の血小板クリアランス機序は、血漿の非存在下での冷却によって迅速に誘発され、GP1b α の N 結合型グリカンの GlcNAc 残基が露出して肝食細胞の $\alpha M \beta 2$ 受容体のレクチンドメインによって認識されたときに媒介される。第 2 のクリアランス機序は、冷温の血漿中での長期血小板保存によって誘発され、遅発性であり、GP1b α が脱シアル化されて肝臓の肝細胞およびマクロファージの両方の ASGP 受容体によって認識されたときに起こる。最近のデータは、正常な血小板の循環寿命の調節における内因性シアリダーゼおよびグリコシルトランスフェラーゼ (GT) の予想外の役割を明らかにしている。加えて、本明細書で実証されるように、血小板は、その表面に GT およびシアリダーゼを発現し、これらの両方を分泌する。これら 2 つの機構経路の収束は、血小板が、その表面の糖タンパク質のグリカンを更新することによって血中の生存を自己調節する特有の能力を有し、かつ血小板の寿命が、糖鎖の付加または除去機構のそれぞれによる正の方向または負の方向に調節され得ることを示唆している。したがって、血小板の循環またはクリアランスを促進するグリカン構造は、シアリダーゼまたは GT 活性による治療処置に完全に適している (図 8 を参照)。

【0210】

ヒト血小板の溶解物に対して、SDS - PAGE ならびに Neu 1 および Neu 3 に特異的な抗体 (Dr. N. Stamatou, Univ. of Maryland) によって

10

20

30

40

50

提供される)を用いた免疫プロットを行った。図9は、ヒト血小板がNeu1およびNeu3の両方を含むことを示している。図10は、ヒト血小板が、24時間の冷蔵後にNeu1を血漿中に放出することを示し、放出されたNeu1が、血小板GP1b α の表面シアル酸の除去を媒介し得ることを強く示唆している。図10および図4から分かるように、血小板表面に関連したシアリダーゼ活性は、冷却時に上昇する。

【0211】

ヒト血小板は、活性時にグリコシルトランスフェラーゼを発現してこれらを血漿中に放出する

グリコシルトランスフェラーゼ(GT)は、血小板で発現され、分泌区画内にパッケージングされる。血小板は、GP1b α のN結合型グリカンの露出されたN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基に結合された β 1-4へのGalの結合を触媒する表面結合 β 4gal-T(β 4Gal-T1)を有し、短期間冷却されたマウス血小板の循環を改善する(Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. Science. 2003 Sep 12; 301(5639): 1531-4)。このグリコシル化機構の性質は、本明細書に示されるデータから次第に明らかになる。例えば、どの酵素が発現されているかを決定するために、血小板を抗体でパネル化した。ヒト血小板溶解物を、SDS-PAGEおよびGTを認識する抗体に対する免疫プロットによって示した。交差反応タンパク質が、3つのGalNAc-Ts、Gal-T、およびSial-Tに対して存在する(図11A)。

【0212】

GTの内部貯蔵は、活性時に血小板がGTをその表面に移動させることを示唆している。休止血小板または活性化血小板に結合した各GTアイソフォームの量を決定すると、対応する媒体に放出された量と同じであった。休止血小板は、37に維持するか、または25 μ MのTRAPで5分間処置した。1分後に最大の放出が観察された。800 $\times$ gのペレット血小板(P)に残存する酵素活性が媒体(M)に放出された。媒体は、活性の測定の前に100,000 $\times$ gで90分間清澄した。図11Bは、全GT活性の約93%が、遠心分離によって収集される休止血小板(P)に結合しているが、この活性のごく一部が、浴媒体(bathing medium)(M)に放出されることを示している。しかしながら、血小板の25 μ Mのトロンビン受容体活性化ペプチド(TRAP)での5分間の処置後に、細胞結合活性の程度が低下し、GalNAc-T活性、Gal-T活性、およびSial-T活性の全ての約50%が媒体中に放出される。超遠心分離は、分泌された活性が血小板微粒子中に存在する可能性を除いて、酵素活性を上清から除去しなかった。したがって、GTは、分泌区画内の血小板内にパッケージングされる。この内部GT区画の性質についても検討した。固定された透過処理血小板の特定の選択されたGTに対する抗体の免疫蛍光標識、または十分に特徴付けられたゴルジ基質タンパク質GM130により、1血小板当たり2~5の顆粒構造の内部染色が明らかになった(不図示)。したがって、血小板は、大量のGTおよびシアリダーゼを含み、血小板の循環する能力は、最大限にシアル化された状態のGP1b α を有することによって決まる。

【0213】

内因性活性血小板シアリルトランスフェラーゼはシアル酸をGP1b α に組み入れる

内因性再シアル化を、静注されたマウス血小板の蛍光-CMP-シアル酸(FITC-SA)の運命を追跡することによって調べた。静注後、血小板を単離して、蛍光の取り込みをフローサイトメトリー(図12)によって、ならびにSDS-PAGEおよび免疫プロット分析により蛍光タグがマウス(不図示)およびヒトGP1b α (図12)に取り込まれた程度を決定することによって分析した。図12に示されているように、¹⁴C CMP-シアル酸を用いても同様の結果が得られた。FITC標識CMP-SA(FITC-SA)またはFITC単独(FITC)を野生型マウスに注射した。1時間後、マウスから採血し、FITCの血小板への取り込みをフローサイトメトリーによって決定した。単

離されたヒト血小板をF I T C (F)、F I T C - S Aと共にインキュベートする、または未処置 (-) のままとした。休止血小板 (R e s t) およびT R A P 活性化血小板 (T R A P) に対して、抗F I T C (F I T C) 抗体、抗G P I b α 抗体、抗 α I I b 抗体、または抗フォン・ヴィレブランド因子 (v W f) 抗体を用いた免疫プロットを行った。アクチンは、添加コントロールとして知られている。

【 0 2 1 4 】

メタロプロテアーゼT A C E (A D A M 1 7) によるG P I b α およびG P V のタンパク分解では、脱シアル化後に血小板クリアランスを開始する必要がある

室温での血小板の保存中または冷蔵での血小板の保存中に、G P I b α およびG P V の減少が観察された。他の血小板受容体とは対照的に、例えば、G P I X、G P I b β 、G P V I、または β 3 は、血小板の保存後に、保存温度とは無関係に変化しなかった (図 1 3)。T A C E は、メタロプロテアーゼ阻害剤G M 6 0 0 1 を用いたT A C E の阻害またはT A C E 欠損血小板によって示されるように、血小板の冷蔵中のG P I b α およびG P V のタンパク分解を媒介する (図 1 4)。驚くべきことに、血小板の冷蔵中の受容体減少の維持は、冷蔵された血小板のクリアランスを防止しない (図 1 4)。シアル酸のT A C E 欠損血小板からの除去により、血小板の循環寿命が短くなる (図 1 5 C)。これは、G P I b α およびG P V のタンパク分解が、脱シアル化後に血小板のクリアランスを開始する必要があることを実証している。血小板をT A C E 活性欠損マウスから単離して、3 7 で1 5 分間シアリダーゼで処置 (+ N e u) する、または未処置 (- N e u) とした。蛍光 (C M F D A) 標識血小板 (2×10^8) を野生型マウスに注射し、その循環時間を決定した。重要なことに、表面v W f 受容体発現における差異は、フローサイトメトリーによる測定では、シアリダーゼ (N e u) 処置血小板および未処置T A C E $^{-/-}$ 血小板で観察されなかった (図 1 5 B)。対照的に、シアリダーゼ処置後、 β - ガラクトース露出が、R C A I およびE C L レクチンを用いた決定で約 5 倍に増加した (図 1 5 A)。

【 0 2 1 5 】

実施例 4 : 表面シアル酸は、血小板保存中のG P I b α およびG P V の減少を防止し、かつ i n v i v o でのマウス血小板の生存を助ける

血小板の処理および保存は、表面受容体の減少が一因である血小板損傷 (例えば、形状の変化、活性化、放出反応、およびアポトーシス) に関連している。表面シアル酸は、循環血液細胞および糖タンパク質の生存にとって重要な決定因子であると見なされている。しかしながら、血小板受容体の減少および血小板生存におけるその役割は明確ではない。この研究では、表面シアル酸と血小板受容体の減少との間の関係を i n v i t r o および i n v i v o で調べた。

【 0 2 1 6 】

シアル酸のv W f 受容体からの除去はG P I b α およびG P V の脱落を刺激する

マウス血小板の漸増濃度の広域アルスロバクター・ウレアファシエンス (A . u r e a f a c i e n s) の α 2 - 3 , 6 , 8 - シアリダーゼとのインキュベーションは、フローサイトメトリーでのレクチン結合アッセイによる検出により、表面 β - ガラクトースの露出が増大したが、 β - G l c N A c の露出は増大しなかった (図 1 6)。図 1 7 は、表面G P I b α およびG P V の漸減と共に、シアル酸含有量の減少を示している ($p < 0.05$)。G P I b α 受容体の発現の後に、複数の抗G P I b α 抗体が、脱シアル化がG P I b α に結合する抗体を改変する可能性を排除した。5 m U のシアリダーゼでの処置後に、末端 β - ガラクトースの約 6 倍の増加を検出したが、 β - G l c N A c では増加が検出されなかった。B - ガラクトースの露出は、競合シアリダーゼ阻害剤D A N A によって完全に抑制された (図 1 8)。シアリダーゼ処置は、表面G P I X 受容体またはインテグリン α I I b β 3 の発現に影響を及ぼさなかった ($p > 0.05$) (図 1 9)。重大なことに、競合シアリダーゼ阻害剤D A N A の添加により、全てのG P I b α およびG P V の脱落が防止され (図 1 9)、これは、シアル酸の減少が、メタロプロテアーゼ媒介脱落のためにG P I b α およびG P V を刺激するという仮説に一致している。図 2 0 は、全血小板溶

解物、血小板上清、ならびにノイラミニダーゼおよびDANAが添加されたまたは添加されていない対応する血小板ペレットの免疫プロット分析を用いることにより図19に示されているフローサイトメトリーのデータを裏付けている。この考えを支持するものとして、図21は、シアリダーゼで処置された新鮮な血小板が、DANAの保存緩衝液への添加によって防止されるプロセスで循環から迅速に除去されることを示している。重要なことに、DANAの添加により、室温で保存されたマウス血小板(図22)の受容体発現および血小板の生存(不図示)が維持された。

【0217】

TACE媒介 GPIb α および GPV の脱落に脱シアル化が必要である

脱シアル化 GPIb α および GPV が、シアル化形態よりも優れた TACE 基質であることを確認するために、DANA の存在下または非存在下で血小板を組換え TACE (rTACE) で処置した。rTACE で処置された血小板は、その GPIb α の 47% $\pm$ 6 および GPV の 18% $\pm$ 12 を放出したが ($p < 0.05$) (図25)、その GPIX および $\alpha_{IIb}\beta_3$ はごく少量しか放出しなかった ($p > 0.05$) (不図示)。rTACE 活性(不図示)ではなく rTACE による受容体の脱落は、DANA によって完全に防止された(図25)。MMP 阻害剤 GM6001 のシアリダーゼ処置血小板への添加は、 β -ガラクトースの露出、例えば、シアル酸の減少を防止しなかったが(図23)、rTACE による受容体の脱落は防止した(図24) ($p < 0.05$)。シアリダーゼによって誘発される β -ガラクトースの露出は、GM6001 および rTACE の存在下で7倍に増加し(図23)、GM6001 が、シアリダーゼ活性に対して全く影響を与えないが、rTACE および内因性メタロプロテアーゼ機能を完全に阻害することを示している。したがって、このデータは、GPIb α および GPV の脱シアル化が、冷温での TACE 媒介受容体の脱落の要件である可能性が高いことを示し、GPIb α の TACE 切断が前のシアリダーゼ活性によって決まるという考えを支持する。

【0218】

実施例5：血小板濃縮物における細菌汚染/増殖が、保存媒体中の過剰な遊離シアル酸の形成をもたらす

病院および血液センターでは、血小板は室温で保存される。輸血後の細菌の増殖および医原性感染のリスクを低減するために、血小板の保存期間は、米国では5日間に制限されている。血小板は、細菌の増殖および輸血に関連した感染のリスクの少ない冷蔵下で赤血球(RBC)と同様に保存することができない。冷蔵された血小板は、*in vitro*での機能の改善にもかかわらず、レシピエントの循環から迅速に除去される。血小板の冷蔵は、血小板糖タンパク質 Ib α (GPIb α) 複合体を不可逆的にクラスター化し、これにより、注入されるとレクチン媒介経路によって血小板のクリアランスが迅速に行われる。

【0219】

輸血のための血小板の室温での保存は、細菌汚染された(非無菌)血小板の細菌の増殖を促進する。多くの細菌は、血小板と相互作用することができ、細菌表面タンパク質と血小板受容体との直接的な相互作用によって、または血漿タンパク質が細菌表面に結合し、次いで血小板受容体に結合する間接的な相互作用によって血小板の凝集を誘発する。図1A~図1Cを参照されたい。細菌は、様々な生物活性物質をその局所環境に分泌する。分泌されたタンパク質は、細菌性病因に特に重要である。このようなタンパク質は、宿主細胞毒性から侵入者の利益となる宿主細胞のかすかな変化に及ぶ様々な生物学的機能を有する。細菌汚染された血小板産物では、細菌由来産物は、血小板の活性化を引き起こす、または血小板に損傷をもたらすことができる。多くの細菌分泌ヒドロラーゼ、例えば、プロテアーゼおよびグリコシダーゼ(すなわち分泌酵素)は、細菌毒性の一因である、または栄養物として細菌の増殖を促進する役割を果たすと考えられている。血小板産物では、汚染細菌によって分泌される酵素は、血小板グリカン切断し、かつ/または血小板受容体の脱落を促進することができる。血小板は、シアル酸で終端しているグリカンで重度に装飾されているため、シアリダーゼ活性(シアル酸加水分解)を特に受けやすい。シアル酸

残基のシアリダーゼ媒介消失により、輸血時の肝臓の肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGR) による脱シアル化血小板のクリアランスが起こる。血小板産物におけるシアリダーゼ産生細菌の存在は、特に血小板にとって有害である。加えて、シアル酸消失後、アシアロ糖タンパク質が、別の細菌グリコシダーゼの基質となることがある。次の内在するグリカンの放出により、細菌の増殖を促進し、かつ細菌と血小板との相互作用のためのリガンドを産生する栄養物が生成する。

【0220】

血小板産物における細菌汚染が、輸血に関連した敗血症および細菌と血小板との相互作用による血小板の活性化をもたらし得ることが周知であるが、血小板産物におけるシアリダーゼ産生細菌の存在および血小板の質に対するその潜在的な影響は、認識も研究もされていない。血小板産物におけるシアリダーゼ産生細菌の存在は、血小板上および血漿中のシアリル糖タンパク質を脱シアル化して、保存媒体中の遊離シアル酸濃度を上昇させると考えられる。

【0221】

材料および方法：血小板濃縮物の1つのバッグ (Research Blood Components, Boston, MA) を無菌状態で2つの50 mLのファルコンチューブに分けた。プロスタグランジンE1 (PGE1, Sigma-Aldrich) を1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるまで添加し、サンプルを200 $\times g$ で20分間遠心分離して汚染された赤血球を沈降させた。上清 (精製された血小板濃縮物、PC) を汚染されているRBCから取り出して、新たな50 mLのファルコンチューブにプールした。次いで、精製PCを分けて、4 および室温 (RT) のそれぞれで保存される同一の産物を用意した。全てのステップを無菌状態で行った。保存の第0日目、第8日目、および第13日目に、各保存条件のアリコートを取り出し、サンプリング時に、細菌の増殖によって引き起こされる色の変化を目視で確認した。サンプルを、1000 $\times g$ で10分間遠心分離した。得られた上清 (乏血小板血漿、PPP) を、10,000 $\times g$ 、4 で10分間さらに遠心分離した。第2のスピンの上清 (血小板を含まない血漿、PPP) を、製造者の取扱説明書に従ってQuantichromシアル酸アッセイキット (BioAssay Systems, Hayward, CA) を用いて遊離シアル酸について分析した。

【0222】

結果：色の変化が、室温で保存されたPCサンプルで第8日目および第13日目に容易に視認でき、これらの条件下で「自然に」 (スパイクとは対照的) 発生する細菌の増殖を示唆している。4 で保存されたサンプルでは色の変化は見られなかった。

【0223】

新鮮なPRPおよびPPP、および保存サンプルから取り出されたPPPにおける遊離シアル酸 (FSA) を測定し、結果が図26に示されている。ヒト血漿は、高濃度の全シアル酸 (1 ~ 2 mM) を含むが、新鮮なPCまたはPPP中のFSAの量は、僅か約4 μM であり、全シアル酸の0.5%未満しか占めない。FSAレベルは、4 で8日間の保存中には変化しなかったが、4 の保存の第2週中 (第13日目) に1.4倍に増加した (点線)。このデータは、細菌の増殖が遅延する条件下で、内因性血小板シアリダーゼによる血小板シアル酸の減少が最小であることを示している。対照的に、RTでの保存中に、FSAは、第8日目に約3倍に増加し、第13日目に約9倍に増加した。RT保存サンプル中のFSAの急激な増加は、内因性血小板シアリダーゼの作用によるだけではない。汚染細菌によって放出される外因性シアリダーゼの結果である可能性が高い。このデータは、汚染細菌がシアリダーゼ産生細菌であることも示している。

【0224】

結論：シアリダーゼ産生細菌は、血小板産物に存在する可能性がある。細菌シアリダーゼは、血小板を脱シアル化してその生物学的能を低下させ得る。

【0225】

実施例6：血小板産物中の細菌の増殖をシアリダーゼ阻害剤によって抑制することができる

10

20

30

40

50

シアリダーゼは、シアリダーゼ産生細菌の病原性および栄養において重要な役割を果たす。シアル酸は、多くの脊椎動物細胞の表面のグリカン分子内の末端位置を占有し、そこで、多様な細胞プロセス、例えば、細胞内接着および細胞シグナル伝達において機能を果たす。病原性細菌は、少なくとも2つの異なる経路でこの分子を有利に使用するように進化した：(1)病原性細菌は、自身をシアル酸で覆って、宿主の先天性免疫応答の成分に対して耐性を得ることができる、(2)または病原性細菌は、シアル酸を栄養物として使用することができる。シアル酸自体は、このような細菌によって新たに合成される、または宿主から直接除去される。血小板産物中の混入物としてのシアリダーゼ産生細菌の存在の我々の発見は、シアリダーゼ阻害剤でシアリダーゼ活性を阻害することによって血小板産物中での細菌の増殖を抑制する新規なアプローチを示唆するものである。

10

【0226】

シアリダーゼ阻害剤は、製薬産業では新たなものではない。インフルエンザウィルス薬タミフルおよびリレンザは、インフルエンザウィルスシアリダーゼを阻害し、これは、感染細胞からのウィルスの拡散に必要である。しかしながら、これらは、血小板産物では使用されていない。

【0227】

従来、血小板は、100%血漿中に懸濁される。血漿(むしろ全血)は、*in vivo*での血小板の天然媒体であるが、血漿酵素、例えば、プロテアーゼが血小板膜を損傷させ得るため、血漿は保存中の血小板に対して悪影響をもたらすことがある。血小板機能も維持することができる、または血漿よりも優れた保存液が、1つには他の目的に利用可能な血漿を調製するため、特に、輸血に関連した有害反応、例えば、TRALIを軽減するために望ましい。したがって、残存血漿が少なく十分な血小板保存能力を有する血小板添加液に大きな注目が集まった。

20

【0228】

血小板添加液(PAS)は、1980年代に最初に開発され、今日まで改善が続けられている。血漿の代用としてのPASの使用は、血小板濃縮物の質および患者にとっての両面で多数の利点を有する。最初の細菌濃度が0.5~1.6 CFU/mLである、血漿とINTER SOL(商標)(30 mMのリン酸ナトリウム、10 mMのクエン酸ナトリウム、30 mMの酢酸ナトリウム、および70 mMの塩化ナトリウム、pH 7.4)との比が35%:65%で保存された血小板中のモデル細菌の増殖動力学を研究した。PAS保存環境内での細菌の対数増殖期のより迅速な開始により、24時間における血小板単位と比較して、PAS単位で最大 10^4 倍の細菌濃度になった。これは、PAS保存血小板では早期に細菌を検出することが有利であることを示唆し得る。

30

【0229】

プランクトン細菌の形成を増加させて、細菌検出の感度を改善するために、PAS(Inter Sol)と血漿(80:20)の混合物で血小板保存試験を行った。多数の細菌検出方法が利用可能である。製造者の取扱説明書に従って再構成され、100 μ Lのアリコートとして-80で保存された、カイコ血漿(SLP)および3,4-ジヒドロフェニルアラニン(DOPA)を含むSLP試薬セット(297-51501, Wako Chemicals USA)を使用した。サンプルをSLP試薬と混合すると、サンプル中のグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の細胞壁由来のペプチドグリカンが、プロフェノールオキシダーゼ(proPO)カスケードと呼ばれる複数のセリンプロテアーゼの活性化を含む一連の反応を開始させる。カスケード反応で産生されるフェノールオキシダーゼ(PO)が、SLP試薬中の基質、3,4-ジヒドロフェニルアラニン(DOPA)を酸化させてメライン(melain)(ダークブルー)を形成する。試験サンプル中の細菌濃度は、発色するまでの時間に反比例する：短時間=高濃度の細菌；長時間=低濃度の細菌。

40

【0230】

材料および方法：血小板濃縮物の1つのバッグを2つの50 mLのファルコンチューブに分けて、PGE1を添加した。900 $\times$ gで10分間の遠心分離の後、上清(PPP)

50

の 80% (全量に対して) を除去して、代わりに等量の血小板添加液を入れた。血小板を完全に再懸濁した。血小板懸濁液をプールして、4つのアリコートに分けて 15 mL のファルコンチューブに入れた。PBS 中の DANA (1 mM) は 2 つのチューブに添加したが、他方のチューブには、PBS のみを添加した。DANA を含むサンプルと DANA を含まないサンプルを一对として 4 で保存した。第 2 の対を RT (22 ~ 24) に維持した。1.0 mL のアリコートを第 0 日目および第 9 日目に取り出し、即座にペレットにした (5 分間、15,800 × g)。上清を廃棄し、血小板および細菌を含むペレットを、使用するまで -80 で保存した。全ての実験ステップは、無菌状態で行った。

【0231】

異なる時点で採取された 1 mL のアリコートから回収した、血小板および細菌の両方を含むペレットを 100 μL の 0.1 M の NaOH に再懸濁し、70 で 10 分間加熱した。短時間の冷却後、溶液を 135 μL の 80 mM の MES で中和した。反応混合物を遠心分離 (15,800 × g で 5 分間) によって清澄した。上清の 10 μL のアリコートを、製造者の取扱説明書に従って SL P キットの構成要素から再構成した等量の SL P 試薬と混合した。サンプルを作業台に置き、発色を監視した。色の検出時間 (TOCD) を記録した。

【0232】

結果：この結果は、図 27 に示されている。第 9 日目のサンプルの分析中に撮影された、選択された写真が図 27 のパネル A ~ C に示されている。薄いが見認できる発色を、DANA を含まない RT で保存されたサンプルで 15 分後に観察され、このサンプルにおける最高の細菌濃度を示唆している。TOCD は、DANA の存在下で約 34 分延長された (#3、図 27 のパネル B)。予想通り、細菌の増殖が低温保存で大幅に抑制され、4 で保存されたサンプルの TOCD (図 27 のパネル C) (< 45 分) は、DANA の存在下または非存在下で RT 保存されたサンプルの TOCD と比較して延長された。4 のその TOCD は、DANA の存在下でさらに延長された (約 50 分、図 27 のパネル C)。定量データが、図 27 のパネル D に示されている。

【0233】

結論：シアリダーゼ阻害剤 DANA は、血小板保存中の細菌の増殖を効果的に抑制することができる。細菌の性質は未知であるが、細菌は、シアリダーゼ産生細菌である可能性が高い。加えて、汚染細菌は、4 では完全には休眠していないことが観察された。

【0234】

実施例 7：DANA は、保存されたマウス血小板中の細菌の増殖を抑制し、マウス血小板の *in vivo* での生存および回復を改善する

マウス血小板は、ヒト血小板 (8 ~ 10 日間) よりもかなり短い約 4 ~ 5 日間の寿命を有する。マウス血小板はまた、室温または 4 で保存されるとヒト血小板よりも安定性がずっと低い。マウス血小板の *in vitro* での急激な悪化の機序は、十分には理解されていないが、マウス血小板の保存は、ヒト血小板の採取とは異なり、無菌血小板採取プロトコルがないため、細菌汚染による影響を受ける可能性がある。現在でも、潜在的な細菌汚染が、マウス血小板の急激な悪化の原因であるか否かは不明である。

【0235】

材料および方法：3.75 mg/g のアベルチン (Fluka Chemie, Steinheim, Germany) を用いて麻酔したマウスから、後眼窩眼出血 (retro-orbital eye bleeding) によってマウス血液を 0.1 倍量の Aster Jandl 抗凝固剤に導入し、RT で、300 × g で 8 分間遠心分離して多血小板血漿 (PRP) を得た。1200 × g で 5 分間の遠心分離によって血小板を血漿から分離し、140 mM の NaCl、5 mM の KCl、12 mM のクエン酸三ナトリウム、10 mM のグルコース、および 12.5 mM のスクロース、1 μg/mL の PGE1、pH 6.0 (血小板洗浄液) の中で遠心分離により 2 回洗浄した。洗浄した血小板を、140 mM の NaCl、3 mM の KCl、0.5 mM の MgCl₂、5 mM の NaHCO₃、10 mM のグルコース、および 10 mM の HEPES、pH 7.4 (血小板再懸濁緩衝液)

の中で $1 \times 10^9 / \text{mL}$ の濃度で再懸濁し、 $5 \mu\text{M}$ の 5 - クロロメチルフルオレセイン二酢酸 (CMFDA) を用いて 37 で 15 分間標識した。取り込まれなかった色素を遠心分離によって除去し、血小板を血漿中に懸濁した。DANA、シアリルラクトース、およびグルコース (栄養物として) を、対応する PBS ストック溶液から、 0.5 mM 、 0.5 mM 、および 8 mM のそれぞれの最終濃度となるように添加した。コントロールには PBS のみを添加した。血小板懸濁液を 4 または RT で 48 時間保存した。48 時間後、保存した血小板を、 $200 \mu\text{L}$ 中 3×10^8 の血小板の後眼窩注入によって輸血した。輸血後、5 分、2 時間、および 24 時間の時点で後眼窩眼出血によって血液を採取した。PRP 中の CMTDA 陽性血小板の割合をフローサイトメトリーによって決定した。

【0236】

結果：細菌汚染の証拠を得るために全てのサンプルを目視検査した。DANA の非存在下、室温で保存された血小板で、重度の血漿色の退色が観察され、細菌の増殖を示唆している。他の全ての条件下では、目に見える変化はなかった。血小板保存剤の存在下、RT で 48 時間保存されたマウス血小板の回復および生存は、保存剤なしで保存された血小板と比較して大幅に改善されている (図 28)。マウス血小板は、RT で保存すると急激に悪化し、これは、図 29 に明確に示されている。重要なことに、DANA の存在下では、血小板が約 5 倍多い保存媒体中のシアリルラクトースおよびグルコースは、コントロールサンプルと比較して回復していた (図 29)。

【0237】

結論：シアリダーゼ阻害剤 DANA は、保存中の悪化からマウス血小板を効果的に保護し、輸血された血小板の回復および生存を大幅に改善することができる。

【0238】

実施例 8：様々な濃度の DANA の存在下でのマウス血小板の保護

DANA は、ウイルス、細菌、および哺乳動物のシアリダーゼに対する強力な広域シアリダーゼ阻害剤であり、低い μM 範囲の K_i を有する。DANA は、我々のすべての試験で 1 mM で日常的に使用されている。DANA の濃度は、保存されたマウス血小板の細菌による悪化に対するその有効性を維持したまま急激に下げることができると予想される。

【0239】

材料および方法：マウス血小板を実施例 3 で説明されているように単離し、血小板再懸濁緩衝液に再懸濁し、4 つのアリコートに分けた。共に PBS 中の 100 mM のストック溶液から、グルコースを 8 mM となるように全てのサンプルに添加し、DANA を 0 mM 、 0.1 mM 、 1.0 mM 、および 10 mM のそれぞれの最終濃度となるように添加した。サンプルを 37 で 30 分間インキュベートし、遠心分離し、上清を除去した。血小板を血漿中に再懸濁した。DANA およびグルコースを、それらの初期濃度に戻した。血小板懸濁液を RT で保存した。48 時間後、各保存条件下の血小板を、フローサイトメトリーによってカウントした。

【0240】

結果：マウス血小板は、RT で保存されると急激に悪化し、これは、図 30A に明確に示されている。しかしながら、保存媒体中に僅か 0.1 mM の DANA が存在すると、約 5 倍の血小板が回復した (図 30B)。

【0241】

結論：シアリダーゼ阻害剤 DANA は、マウス血小板を悪化から効果的に保護し、輸血された血小板の回復および生存を大幅に改善することができる。

【0242】

実施例 9：シアリダーゼ阻害剤 DANA によるセラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) の増殖および生物膜形成の抑制

血液産物の細菌汚染は、現在、最も重大な輸血関連感染リスクである。血小板濃縮物 (PC) は、その保存条件 (撹拌しながら 22°C 、中性 pH、およびグルコース高含有) によって汚染される可能性が最も高い産物であり、特に細菌が増殖しやすい。グラム陽性細菌は、汚染された PC から最もよく回収されるが、グラム陰性細菌は、重度の疾病および

10

20

30

40

50

死亡により頻繁に関連している。グラム陰性セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) は、重要なヒト日和見病原体であり、汚染 PC を含む様々な有害輸血反応 (ATR) に関与している。不利な環境条件下で生存し、消毒に耐え、そして微生物の表面結合群集 (生物膜) を形成するこの種の能力は、臨床環境でその排除に対して抵抗する。近年、近縁種セラチア・リクファシエンス (*Serratia liquefaciens*) が、血小板保存条件下で生物膜を形成し、これが、コロニー計数法による検出の減少に関連していることが示された。

【0243】

血小板産物中で増殖するために、汚染細菌は、シアル酸を得る、かつ/または利用する機構を有する可能性が高い。セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) は、汚染された血小板濃縮物に関連した有害な輸血反応に関与するグラム陰性細菌である。セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) は、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、キチナーゼ、および溶血素を含む様々な超強毒産物を産生するが; 分泌型 (secretable) シアリダーゼの存在は、これまで記載されていない。セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) による分泌産物の強毒性に基づく、シアリダーゼが存在する可能性が非常に高い。したがって、この菌株は、細菌の増殖を抑制するシアリダーゼ阻害戦略を試験するために選択した。セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 株 (ATCC # 43862) は、血小板産物中の細菌の検出および増殖を含む研究に既に使用されている。

10

20

【0244】

材料および方法: 細菌の菌株および増殖の条件。セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 株 (ATCC # 43862) は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。細胞を、37、250 rpm で、ブレインハートインフュージョンブイヨン (ATCC 培地 3) で増殖させた。凍結ストックを一晩培養物から調製し、15 容量% のグリセロールを含むブレインハートインフュージョンブイヨンで -80 で保存した。

【0245】

生物膜形成: 種培養を調製するために、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) の凍結ストックを 3 mL のブレインハートインフュージョンブイヨンに綿棒で接種し、250 rpm で撹拌しながら 37 で 6 時間インキュベートした。細胞密度を、二波長分光計で、600 nm で決定し、滅菌 PBS で 0.5 McFarland 標準液 (1.5×10^8 細胞/mL) に希釈した。10 μ L の希釈培養物を、96 ウェル PVC プレート (Corning Biosciences) のウェル内の 1 mM の DANA が添加された、または添加されていない 140 μ L の PAS 中の 30 % の血漿、PAS 中の 30 容量% の PC、または 100 % の血漿に接種した。各培地に対して、6 連で行った。10 μ L の PBS をコントロールウェルに接種した。次いで、マイクロタイタープレートを滅菌多孔質膜 (VWR) で密閉し、プラットフォーム振盪機に載せた。培養物を穏やかに振盪しながら (約 100 rpm) 48 時間インキュベートした。OD 595 nm でのプランクトン細胞密度を決定するために、培養物を穏やかに混合して、ポリスチレンプレートに移した。最初のマイクロタイタープレートのウェルを 200 μ L の PBS で 3 回洗浄し、空気で乾燥させ、0.1 % (重量/容量) のクリスタルバイオレットの水溶液で 15 分間染色し、水ですすぎ、そして空気で 1 時間乾燥させた。生物膜によって保持されたクリスタルバイオレットを 200 μ L のジメチルスルホキシド (DMSO) または 30 % の酢酸で希釈し、595 nm で測定した。

30

40

【0246】

結果: 撹拌および通気が不十分、かつ低温のマイクロタイタープレート上での準最適増殖条件下で、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) が純血漿中で十分に増殖させた (図 31A)。細胞増殖が、PAS 中 30 % の血漿または 30 % の PC で劇的に遅延した。注目すべきことに、増殖培地に 1 mM の DANA を含める

50

と、全ての条件下で細菌の増殖が抑制された。細菌の増殖で観察された傾向と平行して、生物膜の形成が、プランクトン細胞密度に密接に関連し、増殖培地中のDANAの存在によって負の影響を受けた(図31B)。血漿中で増殖した細菌の生物膜形成のA595nmの測定は、シグナルのオーバーフローによって正確に解釈することができず、PAS系培地よりも純血漿でより強力な生物膜が形成されることを示唆している。

【0247】

結論：シアリダーゼ阻害剤DANAは、96ウェルPVCプレートで分析すると、セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)の増殖および生物膜形成を抑制することができる。データはまた、セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)が、シアル酸を得る、かつ/またはシアル酸を利用して増殖し、かつ/または生物膜を形成する、これまでに報告されていない機構を含むことも示している。

10

【0248】

実施例10：健康なボランティアにおける血小板表面グリカンのバリエーション

血小板は、全ての主要な血液成分のうちで保存期間が最も短く、保存が最も困難である；これらの制約が、血小板輸血の実施を複雑にしている。Dr. Slichterおよび同僚ら(Puget Sound Blood Center, Seattle, WA)は、健康な対象における輸血された新鮮な放射性標識自己血小板の回復および生存における有意差を見出した。血小板の回復および生存における個体差の原因は、未だ不明である。冷蔵され輸血された血小板の表面からのシアル酸の減少が、肝臓のアシアロタンパク質受容体(Ashwell Morell受容体)による血小板のクリアランスを促進することを実証した。血小板表面のシアル酸の減少は、保存中の血小板の表面シアリダーゼ活性の上昇に相関している。ここで、個々のドナーからの新鮮な血小板が、輸血後の血小板の回復および生存に影響を与え得る表面グリカン露出において差異を有するか否かを調べた。

20

【0249】

材料および方法：静脈血を、静脈穿刺によってボランティアから0.1倍量のAster Jandlクエン酸系抗凝固剤に導入した。Institutional Review Board of Brigham and Women's Hospitalから採血の許可を得て、インフォームドコンセントがヘルシンキ宣言に従って承認された。多血小板血漿(PPP)を、125×gでの20分間の遠心分離によって調製し、血小板を、小型セファロース2Bカラムに通すゲルろ過によって血漿タンパク質から分離した。単離された血小板を、10μg/mLのβ-ガラクトース特異的FITC結合エリスリナ・クリスタルガリ(E. cristagalli)レクチン(ELC)と共に室温で20分間インキュベートした。サンプルを200μLのPBSで希釈し、FACSCaliburフローサイトメトリー(Beckton Dickinson)でのフローサイトメトリーによって即座に分析した。ゲートされた血小板集団の平均蛍光強度を決定した。

30

【0250】

結果：新たに単離された血小板の表面糖タンパク質における末端ガラクトースの存在(すなわちSAのないグリカン)は、予想通り、健康な対象(5つの個体のうち3つの個体が低レベルの露出されたガラクトースを有していた(15.3±4.1、MFI))においてかなり異なっている。しかしながら、2つの対象は、かなり高レベル(2~7.5倍)のガラクトース露出を示した。これらの結果は、第2のガラクトース特異的レクチンRCA-Iを用いて、2つの異なる時点での同じ対象の反復測定によって裏付けられた。同様に、血小板濃縮物を用いた予備研究で、血小板表面シアリダーゼ活性における著しいばらつきを実証し(図32)、このばらつきは、血小板保存中および場合によってはin vivoでの血小板循環中のシアル酸の減少速度に相関していた。我々の結果は、健康な個体からの新鮮な血小板が、表面シアリダーゼ活性およびシアル酸含有量において異なることを示している。

40

【0251】

50

これらの結果は、表面シアル酸が、輸血された新鮮な血小板の回復および生存に影響を与える因子であり得ることを示唆している。

【 0 2 5 2 】

実施例 1 1 : シアリダーゼ阻害剤を含む血小板添加液を調製する一般的な手順

本発明の P A S を以下の通り調製することができる。バッグの総量は 5 0 0 m L である。

【 0 2 5 3 】

血小板添加液を調製するために、U S P グレードの以下の成分を得た：

- (1) 電解質、例えば、N a 、C l 、K 、C a 、および M g
- (2) 好氣的代謝を維持するためのエネルギー源、例えば、グルコースまたはクエン酸
- (3) 緩衝剤、例えば、リン酸塩
- (4) 注射用水 (W F I)
- (5) シアリダーゼ阻害剤。

表 2 は、1 0 0 0 m L の血小板添加液を調製するために必要なエネルギー源、緩衝剤、および電解質を含む成分の濃度および量 (グラム) を示している。1 0 0 0 m L の量になるように水を添加し、溶液を p H 7 . 2 を維持するように緩衝した。

【 0 2 5 4 】

シアリダーゼ阻害剤、例えば、D A N A を、滅菌 0 . 1 ~ 1 0 0 0 m M のストック水溶液から所望の濃度になるように添加することができる。

【 0 2 5 5 】

(表 2)

	PAS 1		PAS 2		PAS 3		PAS 4	
成分	mM	g/1000 mL	mM	g/1000 mL	mM	g/1000 mL	mM	g/1000 mL
リン酸二ナトリウム、無水 (Na ₂ HPO ₄), USP	7.15	1.015	7.15	1.015	7.15	1.015	7.15	1.015
リン酸一ナトリウム、一水和物 (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O), USP	2.24	0.310	2.24	0.310	2.24	0.310	2.24	0.310
クエン酸ナトリウム、二水和物 (C ₆ H ₅ NaO ₇ •2H ₂ O), USP	10.00	2.940	10.00	2.940	10.00	2.940	10.00	2.940
酢酸ナトリウム、三水和物 (CH ₃ COONa), USP	29.98	4.080	29.98	4.080	29.98	4.080	29.98	4.080
塩化ナトリウム (NaCl), USP	79.20	4.629	70.80	4.138	77.70	4.541	69.30	4.050
塩化カリウム (KCl), USP	5.00	0.373	5.00	0.373	5.00	0.373	5.00	0.373
塩化マグネシウム、六水和物 (MgCl ₂ •6H ₂ O), USP	1.50	0.305	1.50	0.305	1.50	0.305	1.50	0.305
塩化カルシウム、二水和物 (CaCl ₂ •2H ₂ O), USP	0.00	0.000	0.00	0.000	1.00	0.147	1.00	0.147
グルコース (C ₆ H ₁₂ O ₆), USP	0.00	0.000	16.80	3.028	0.00	0.000	16.80	3.028
DANA、ナトリウム塩 (固形またはストック水溶液)	1.00	0.313	1.00	0.313	1.00	0.313	1.00	0.313
注射用水、USP で 1000mL								

【 0 2 5 6 】

実施例 1 2 : シアリダーゼ阻害剤を含む P A S 中でのマウス血小板の保護

マウス血小板は、ヒト血小板 (8 ~ 1 0 日間) よりもかなり短い約 4 ~ 5 日間の寿命を有する。マウス血小板はまた、室温または 4 で保存されるとヒト血小板よりも安定性がずっと低い。しかしながら、マウス血小板のこれらの欠点を利用して、血小板保護についての血小板添加液の有効性を評価することができる。

【 0 2 5 7 】

材料および方法：3.75 mg/gのアベルチン（Fluka Chemie, Steinheim, Germany）を用いて麻酔したマウスから、後眼窩眼出血によってマウス血液を0.1倍量のAster Jandl抗凝固剤に導入し、RTで、200×gで8分間遠心分離した。多血小板血漿、軟膜、および一部のRBCを含む上清を取り出し、300×gで6分間遠心分離して多血小板血漿（PRP）を得た。4つのPRPの150 μLのアリコートをし、4本の1.5 mLのエピENDORFチューブに移し、1000×gで5分間遠心分離した。約70%の上清（105 μL）を各チューブから取り出し、代わりに等量のInterSolを入れた。DANAおよび/またはグルコース（栄養物として）がそれぞれ、PBS中の100 mMのストック溶液から、1.0 mMおよび10 mMの最終濃度になるように添加した。一方または両方の添加剤を含まないチューブの量を、PBSで等しくした。血小板懸濁液を振盪機で、RTで48時間保存し、フローサイトメトリーで分析した。

10

【0258】

結果：予想通り、マウス血小板は、RTで保存するとInterSolで急激に悪化した（図33のパネルAa）。わずか57%の血小板がゲートされた（図33のBa）。注目すべきことに、1 mMのシアリダーゼ阻害剤DANAを用いて保存されると、80%を超える当初の血小板事象が、血小板ゲート内でカウントされた（図33のパネルAbおよびBb）。10 mMのグルコースの添加により、保存後にさらに多い血小板カウント数が回復した（図33のパネルAcおよびBc）。DANAとグルコースの両方の組み合わせは、全ての血小板を保護した（93%がゲートされた、図33のパネルAdおよびBd）。DANA単独またはグルコースとの組み合わせは、休止血小板集団の前方散乱および側方散乱特性（この集団は、「それほど細長くない」、すなわち血小板凝集体の形成が少ない）による判断で、グルコース単独よりも多い休止血小板集団となった（図33のパネルAbおよびAd、図33のパネルAcと比較）。このデータは、休止状態での血小板の保護および血小板保存後の血小板数の維持においてDANAがグルコースよりも有効であることを示唆している。

20

【0259】

結論：総合すると、データは、血小板保存中のDANAの存在が、血漿が少なくとも30%の血小板添加INTER SOL（商標）溶液に保存された血小板の質を改善することを示唆している。

30

【0260】

実施例13：シアリダーゼ阻害剤DANAの存在下、血漿中で保存されるヒト血小板の*in vitro*での質の改善

「健康な」血小板の状態は、その形状およびサイズによってある程度定義される。血小板の形状の変化および凝集は、血小板活性化の顕著な特徴である。活性化されると、血小板は、形状が変化し、その顆粒成分を分泌する。血小板の保存では、血小板の活性化、すなわち血小板の形状の変化および顆粒の放出が伴う。ヒト血小板はまた、保存中に表面シアリダーゼの発現を増加させ、表面シアル酸が減少する。恐らく、シアリダーゼは、顆粒内に保存され、保存中に血小板表面に放出される。実施例12の結果は、マウス血小板も、保存中にシアル酸が減少することがあり、このプロセスを、保存中のシアリダーゼ阻害剤DANAの存在によって効果的に阻害することが可能であり、血小板の輸血後の回復および生存が大幅に改善されることを示唆している。このデータは、保存媒体にシアリダーゼ阻害剤を含めることによって、保存されるヒト血小板の質を改善できることをさらに示唆している。

40

【0261】

休止血小板は、円板状であり、レーザービームに対するその相対的な向きによってフローサイトメトリーで異なる側方散乱（SSC）シグナルを生成する。休止血小板集団は、広い（「丸い」）分布のSSC/FSCシグナルを有する。刺激時に、血小板は、偽足を形成して球形になり（形状の変化）、これによりレーザービームに対するその相対的な向きにかかわらず特徴的なSSCシグナルを生成する。したがって、活性化血小板集団は、

50

F C S / S S C プロットでより「凝縮した」ように見える。

【 0 2 6 2 】

これらの考察に基づいて、血漿中で保存中に D A N A がヒト血小板の活性化（すなわち形状の変化および顆粒の放出）に影響を与えるか否かについて調べた。

【 0 2 6 3 】

材料および方法：静脈血を、静脈穿刺によってボランティアから 0.1 倍量の A s t e r - J a n d l クエン酸系抗凝固剤に導入した。I n s t i t u t i o n a l R e v i e w B o a r d o f B r i g h a m a n d W o m e n ' s H o s p i t a l から採血の許可を得て、インフォームドコンセントがヘルシンキ宣言に従って承認された。多血小板血漿（P R P）を、125 × g での 20 分間の遠心分離によって調製し、血小板を、P G E 1（1 μ g / m L）の添加後に 850 × g で 5 分間の遠心分離によって P R P から分離した。上清（乏血小板血漿、P P P）を取り出した。血小板ペレットを、最初の P R P の 1 / 2 倍量の P P P に再懸濁してアリコートに分けた。D A N A を、P B S 中の 100 m M のストックから、1.0 m M となるように半数のアリコートに添加し、コントロールには P B S のみを添加した。サンプルを、ガス透過性膜で覆われた 96 ウェルマイクロタイタープレートに入れ、振盪機に載せて室温で撹拌した。血小板のサイズおよび密度を、F A C S C a l i b u r フローサイトメトリー（B D）での前方散乱（F S C）および側方散乱（S S C）によって測定した。血小板を、その前方散乱および側方散乱特性によってゲートした。血小板の脱顆粒、すなわち α 顆粒放出の分析では、保存された血小板を、0.1 μ g / m L の F T I C マウス抗ヒト C D 62 P（B D P h a r m i n g e n）抗体と共に 50 μ L の P B S 中で、R T で 30 分間インキュベートすることによって P - セレクチンの表面発現について分析した。次いで、混合物を 200 μ L の P B S で希釈し、フローサイトメトリーによって即座に分析した。P - セレクチン（F I T C） - 陽性細胞の割合を、ゲートされた血小板集団において決定した。

10

20

30

【 0 2 6 4 】

結果：血漿中、R T で 72 時間の保存後、ヒト血小板は、新鮮な R T 血小板（不図示）と比較すると、側方散乱および前方散乱特性（図 3 4 のパネル A の左側）の減少を示した。側方散乱および前方散乱特性の減少は、血小板活性化の特徴である。対照的に、血小板保存中の 0.5 m M の D A N A の添加は、血小板形状の目に見える改善をもたらす（図 3 4 のパネル B の右側）。血小板のカウント数 / S S C のヒストグラムの比較により、D A N A と共に保存された血小板が、増加した平均蛍光強度（M F I）を有することが分かり（図 3 4 のパネル B の左側、プロファイルが右側に僅かに移動していることに留意されたい）、D A N A の存在下で保存された血小板が、高い粒状性または内部複雑性を有し、それほど活性化されていないことを示唆している。同様に、血小板のカウント数 / F S C のヒストグラムの比較により、D A N A と共に保存された血小板が、高い側方散乱平均蛍光強度を有することが分かる（図 3 4 のパネル B の右側、プロファイルが右側に僅かに移動していることに留意されたい）。これらの結果は、D A N A の存在下で保存された血小板は、大きめであり、円板状の休止形状を維持していることを示している。

40

【 0 2 6 5 】

これらの結果は、F T I C マウス抗ヒト C D 62 P（P - セレクチン）抗体と共に保存された血小板の P - セレクチン露出を分析することによって裏付けられた（図 3 5）。D A N A を含めて保存することで、P - セレクチンの露出が有意に防止され、α - 顆粒の放出が抑制される。

【 0 2 6 6 】

総合すると、データは、血小板保存中の D A N A の存在が、100 % の血漿中に保存される血小板の質を改善することを示唆している。

【 0 2 6 7 】

実施例 14：シアリダーゼ阻害剤 D A N A を含む P A S 中に保存されるヒト血小板の i n v i t r o での質の改善

実施例 12 で説明されているデータは、シアリダーゼ阻害剤 D A N A が、I N T E R S

50

OL 溶液と呼ばれる、血漿が 30 % の血小板添加液中に保存されたマウス血小板の質を効果的に維持できることを実証した。実施例 13 で説明されているデータは、DANA が、100 % の血漿中でヒト血小板の質を維持するのにも有効であることを明確に示した。この実施例では、研究が、DANA の存在下または非存在下で 30 : 70 の比の血漿 / PAS 中に保存されるヒト血小板まで拡大された。

【0268】

材料および方法：ヒト血小板を実施例 13 で説明されているように得た。血小板ペレットを、最初の PRP の 1 / 5 倍量の PPP に再懸濁し、96 ウェルのマイクロタイタープレートに等分した (60 μ L / ウェル)。7.15 mM の Na_2HPO_4 、2.24 mM の NaH_2PO_4 、10 mM のクエン酸ナトリウム、30 mM の酢酸ナトリウム、79.2 mM の NaCl 、5.0 mM の KCl 、および 1.5 mM の MgCl_2 を含む PAS (PASa とする) を 140 μ L / ウェルで対応するウェルに添加し、DANA を、PBS 中の 10 mM または 100 mM のストックから 0 mM、0.1 mM、および 0.5 mM となるように適切なウェルに添加した。ウェル内のサンプルの量を、PBS で等しくした。次いで、プレートをガス透過性膜で覆い、振盪機に載せた。血小板のサイズおよび密度を、第 7 日目に FACS Calibur フローサイトメトリー (BD) の前方散乱 (FSC) および側方散乱 (SSC) によって測定し、第 9 日目に pH をチェックした。

10

【0269】

結果：全ての保存サンプルが 9 日後に pH 6.8 に維持され、この PAS 調合物が、少なくとも 9 日間血小板を保存するのに十分な緩衝能力を有することが実証された。対照的に、100 % の血漿中での同様の保存条件下では、保存された血小板サンプルの pH は、pH 6.5 未満に低下した。30 % の血漿と 70 % の PAS の溶液で保存したときには、RT で保存の 7 日後にヒト血小板の著しい悪化に気付いた。図 36 のパネル A に示されているように、獲得した全事象の僅か 55 % が、新鮮な血小板 (G1) 用に定義されたゲート内にゲートされ、獲得した全事象の 40 % 超が、G2 で定義された血小板微粒子 (血小板微粒子は、血小板悪化の情報と見なされる) であった。対照的に、血小板が、0.1 mM の DANA の存在下で保存されたときには、獲得した全事象の 70 % 超が、血小板としてゲートされた (図 36 のパネル B の G1)。したがって、41.5 % (図 36 のパネル A の G2) から 23.95 % (図 36 のパネル B の G2) への微粒子形成の劇的な低下が観察された。保存媒体中の DANA 濃度を 0.5 mM に上昇させると、血小板のカウント数 (81.6 % がゲートされた、図 36 のパネル C の G1) がさらに増加し、微粒子の形成が減少した (13.52 %、G2)。特に注目すべきは、血小板集団が、DANA を保存液に添加したときに、その側方散乱および前方散乱特性による判断で「休止している」ように見えることである。

20

30

【0270】

結論：実施例 12 および 13 で説明されている結果に一致して、DANA は、30 % の血漿を含む血小板添加液でヒト血小板の質を効果的に維持する、すなわち血小板の活性化および微粒子形成を低減することができ、シアリダーゼ阻害剤、例えば、DANA を、血小板保存用の PAS 調合物の重要な成分として使用できることを示している。

【0271】

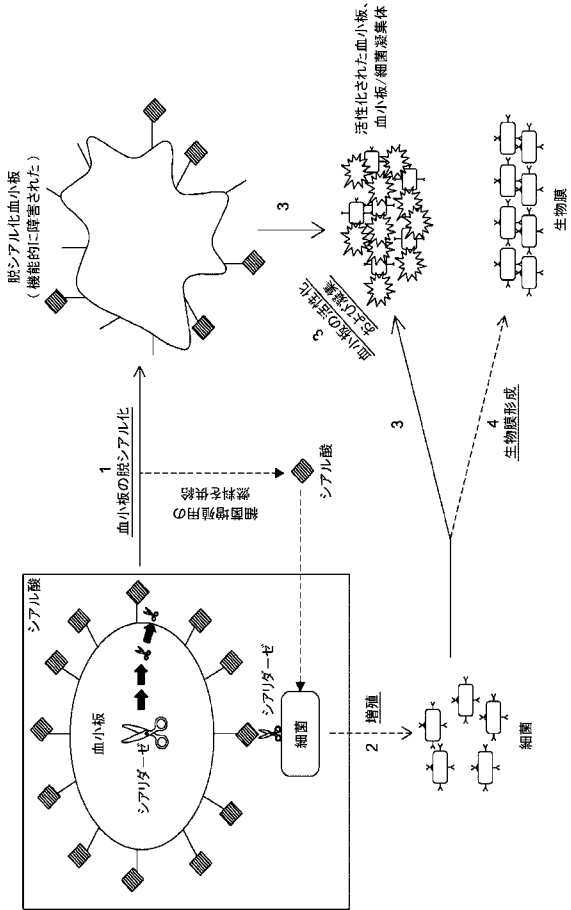
本明細書で言及された全ての参照文献、特許、および / または特許出願の適切な教示は、参照によりそれらの全容が本明細書に組み入れられるものとする。

40

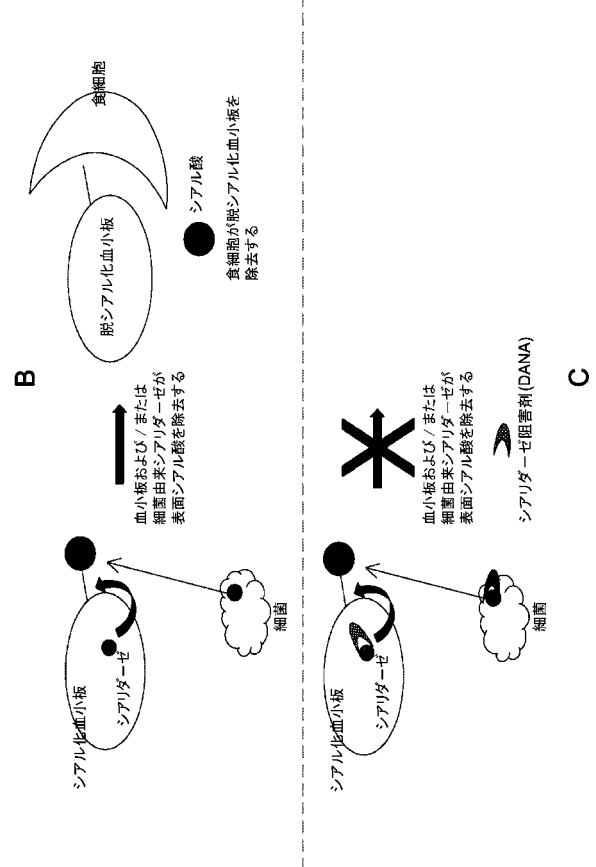
【0272】

本発明は、特にその好適な実施形態を示し、これに関して説明してきたが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、形態および細部の様々な変更が可能であることを理解できよう。

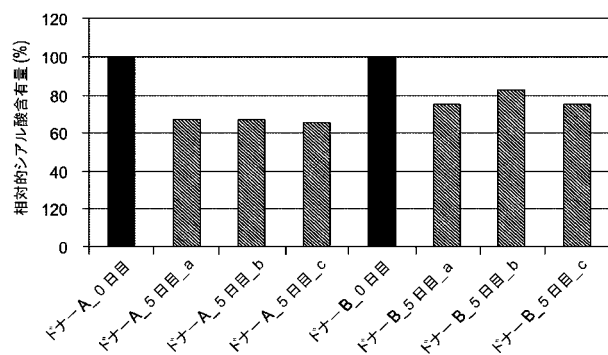
【図 1 A】



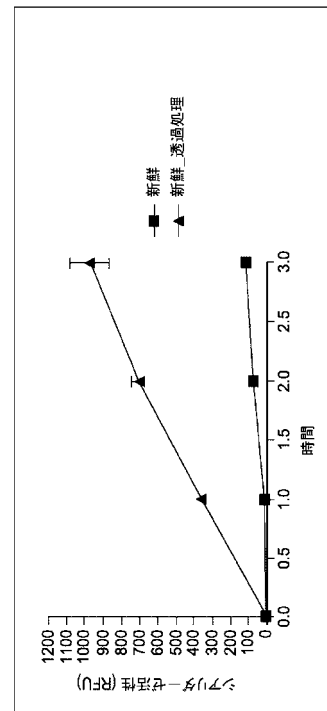
【図 1 B - C】



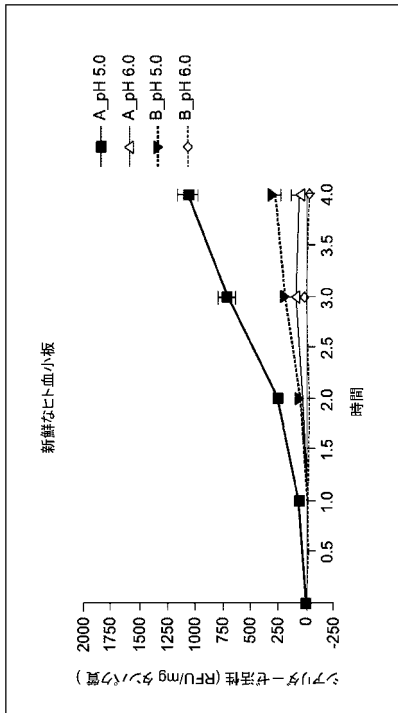
【図 2】



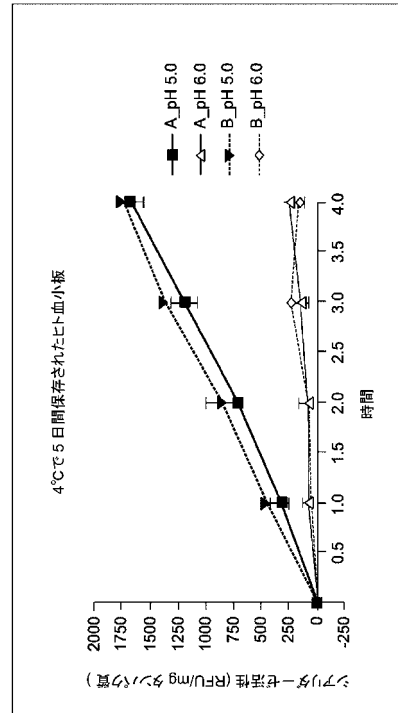
【図 3 A】



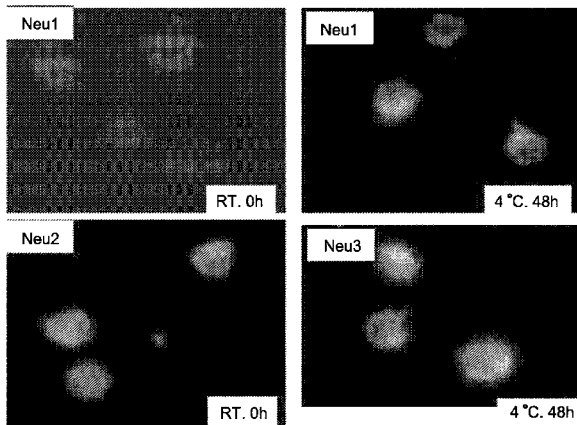
【図 3 B】



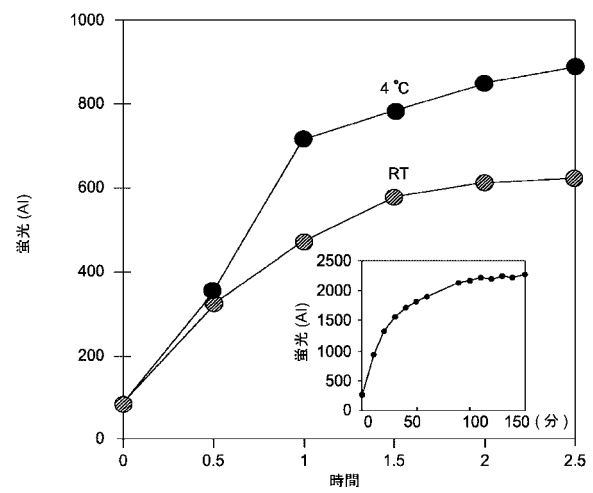
【図 3 C】



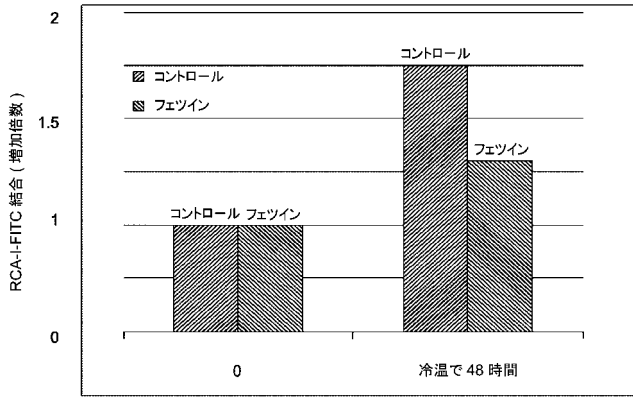
【図 4】



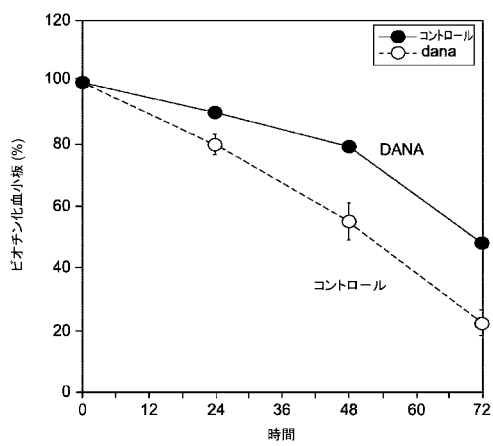
【図 5】



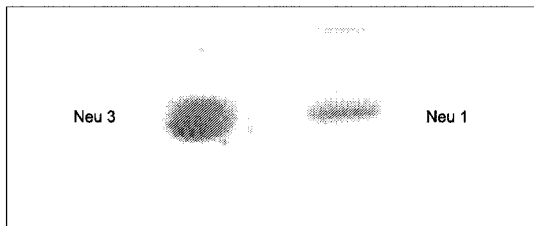
【図 6】



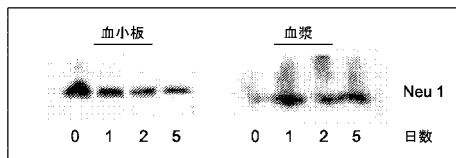
【図 7】



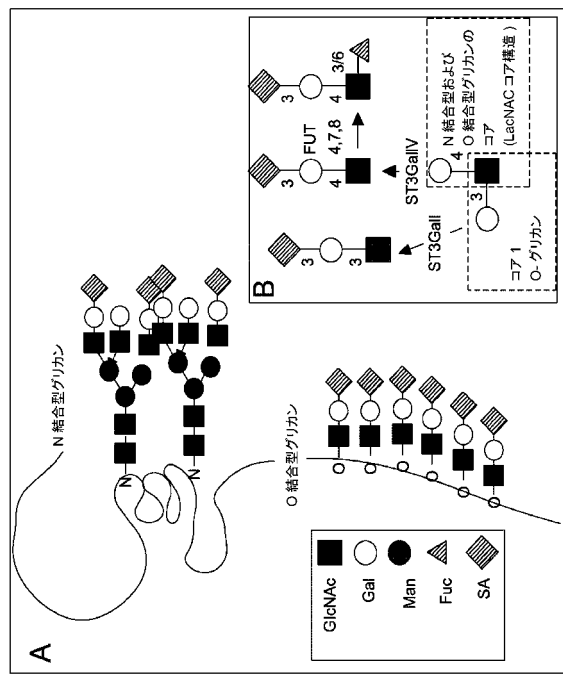
【図 9】



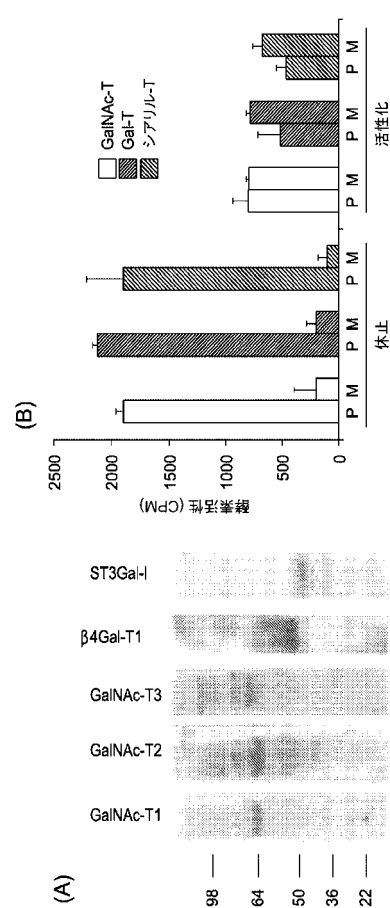
【図 10】



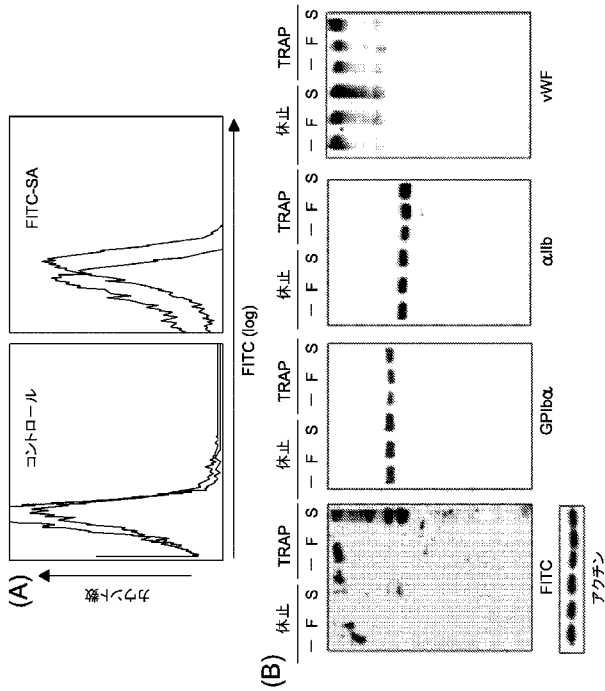
【図 8】



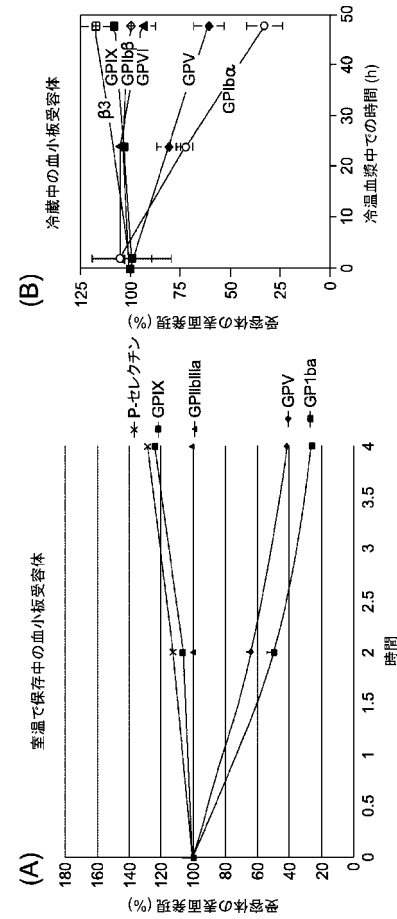
【図 11】



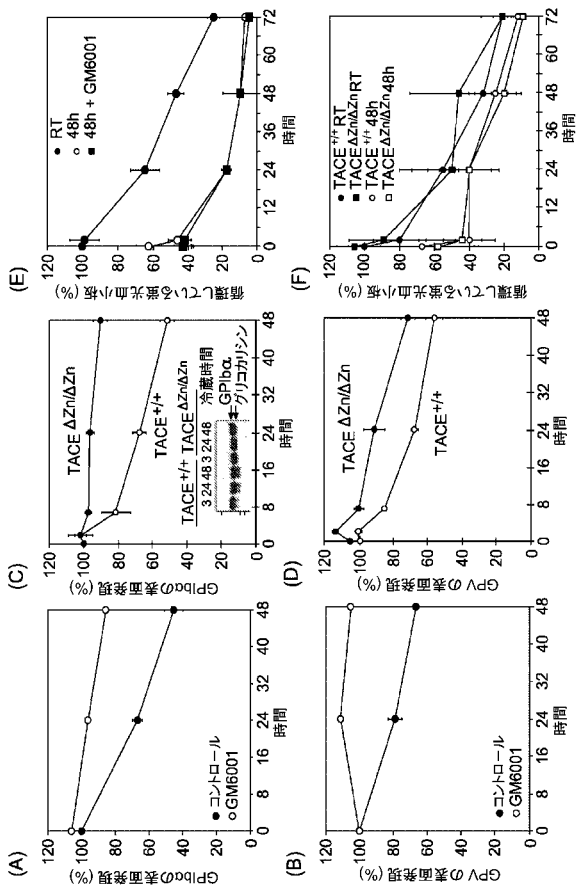
【図 1 2】



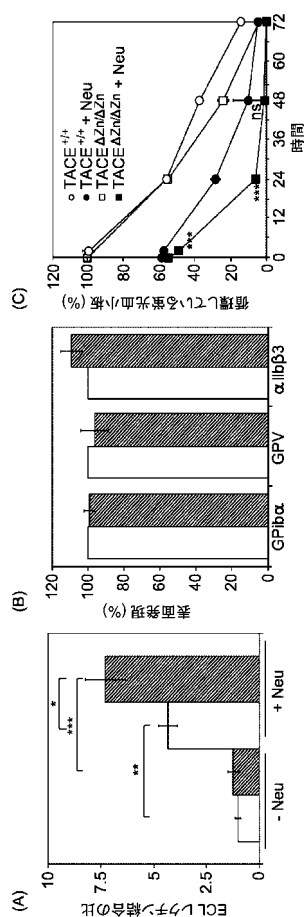
【図 1 3】

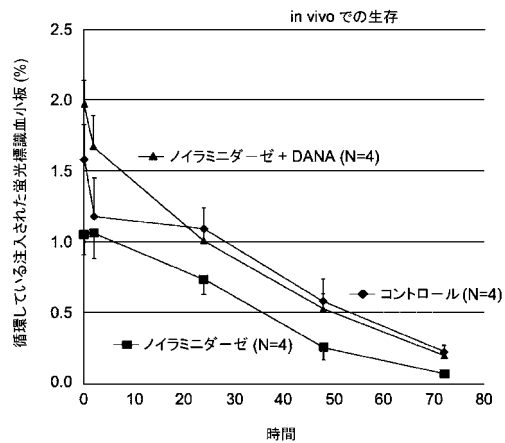
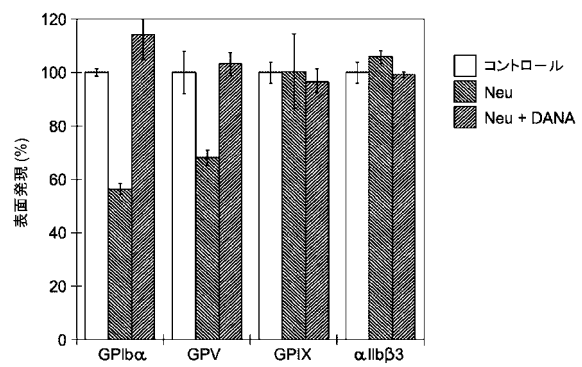
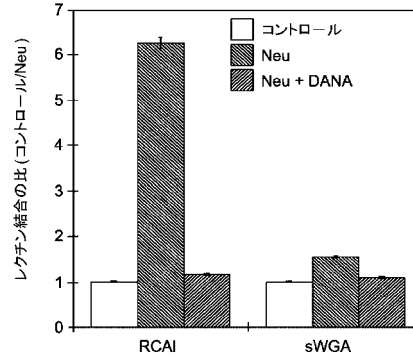
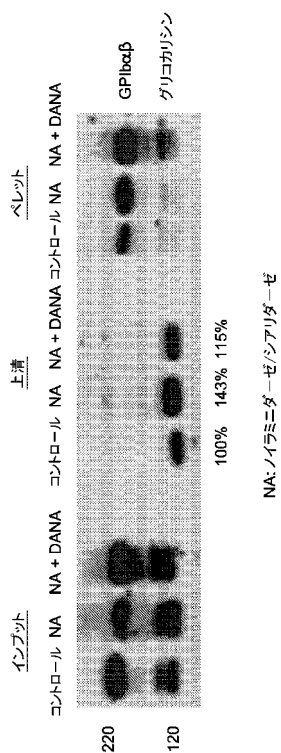
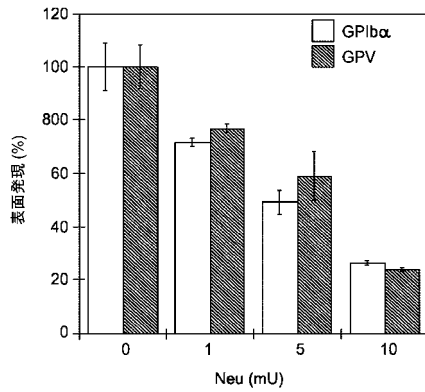
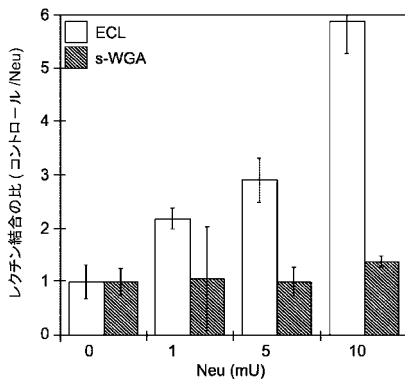


【図 1 4】

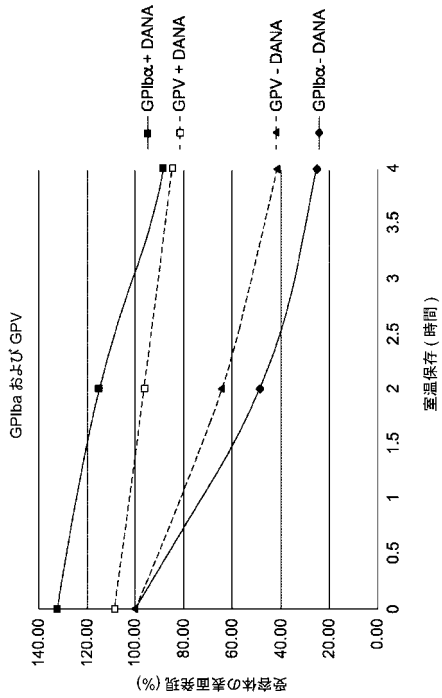


【図 1 5】

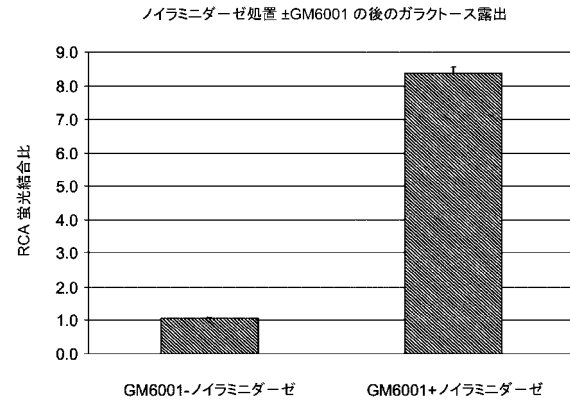




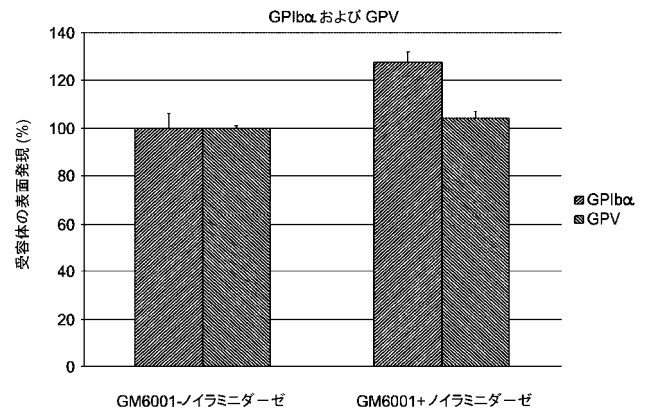
【図 2 2】



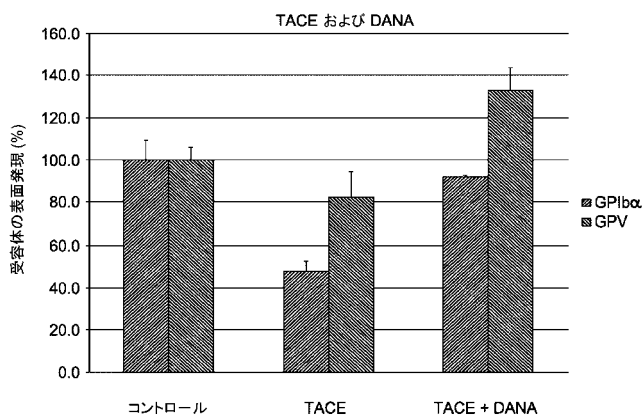
【図 2 3】



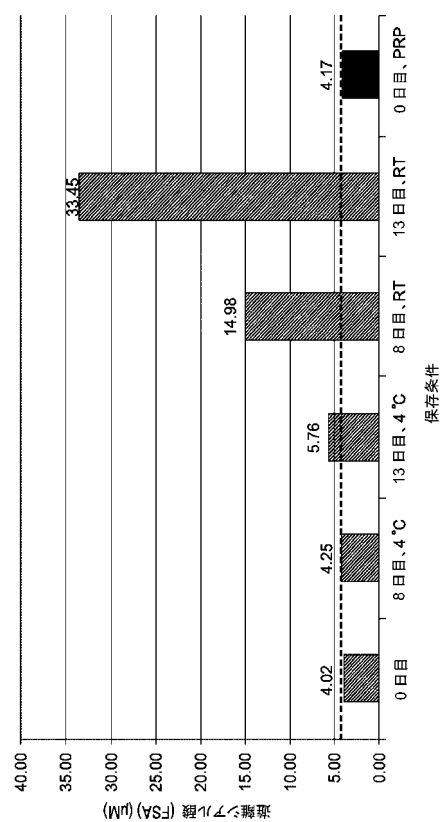
【図 2 4】



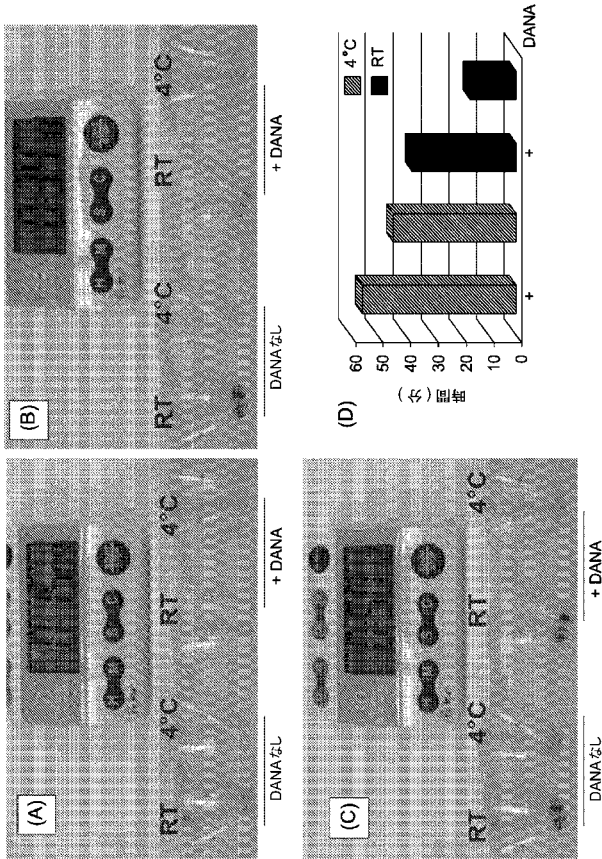
【図 2 5】



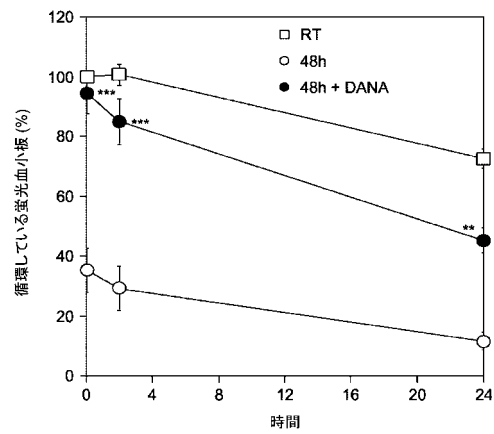
【図 2 6】



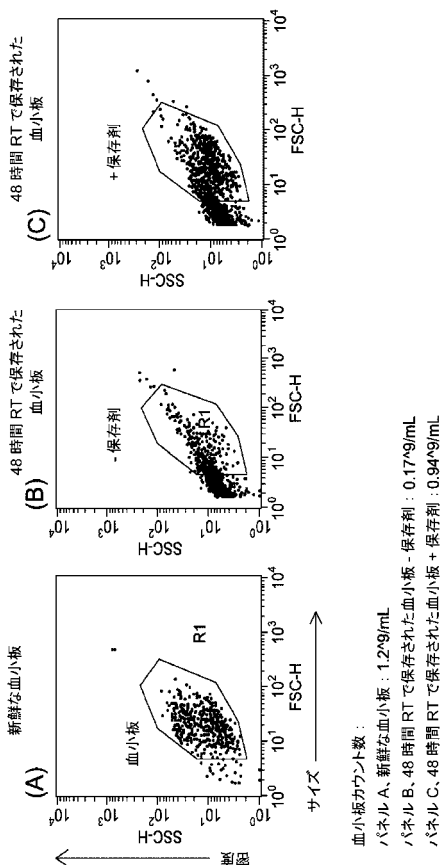
【 図 2 7 】



【圖 28】



【 図 2 9 】



血小板カウント数：

パネル A、新鮮な血小板： $1.2 \times 10^9/\text{mL}$

パネルB、48時間RTで保存された血小板 - 保存剤：0.17[^]g/mL

パネルC、48時間RTで保存された血小板 + 保存剤 : $0.94 \times 10^9/\text{mL}$

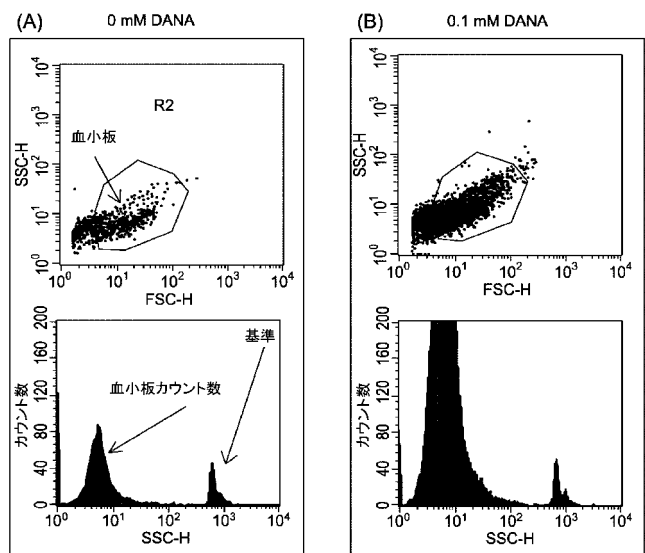
保存劑：

0.5 mM DANA

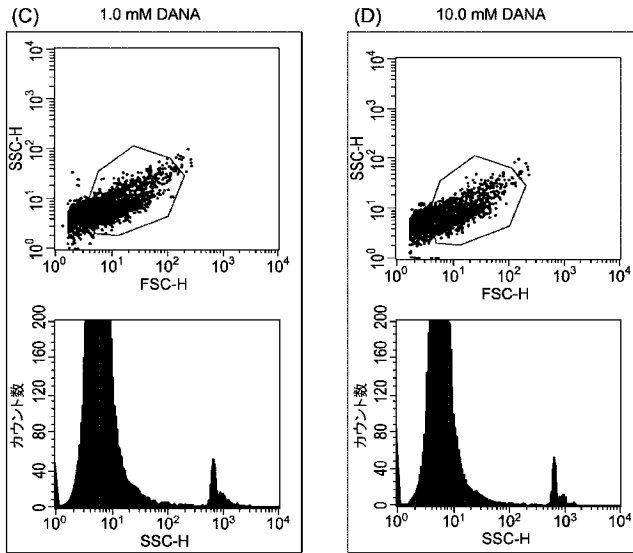
0.5mM シアリラクトース

8mM グルコース

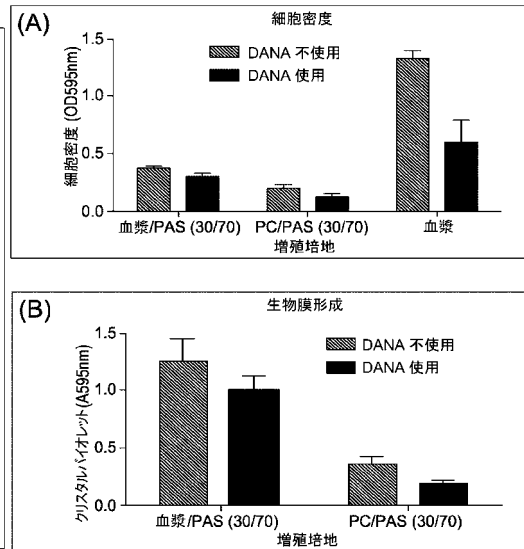
【 図 3 0 A - B 】



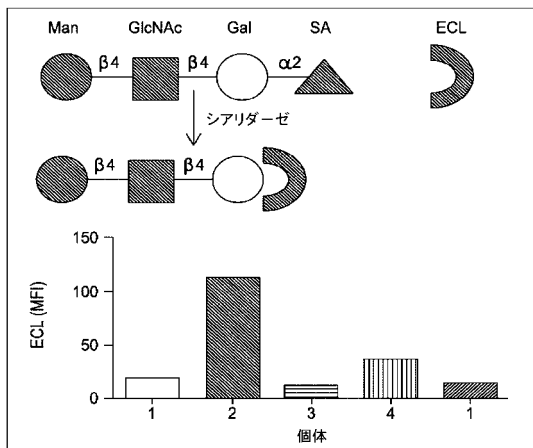
【図 30 C - D】



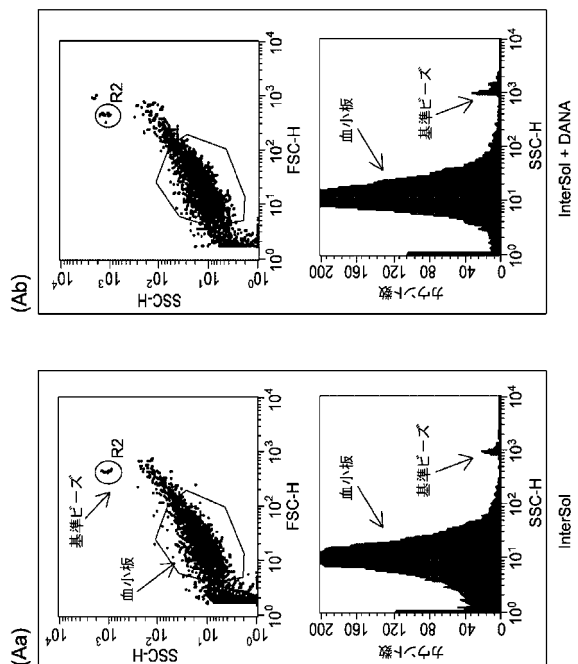
【図 3 1】



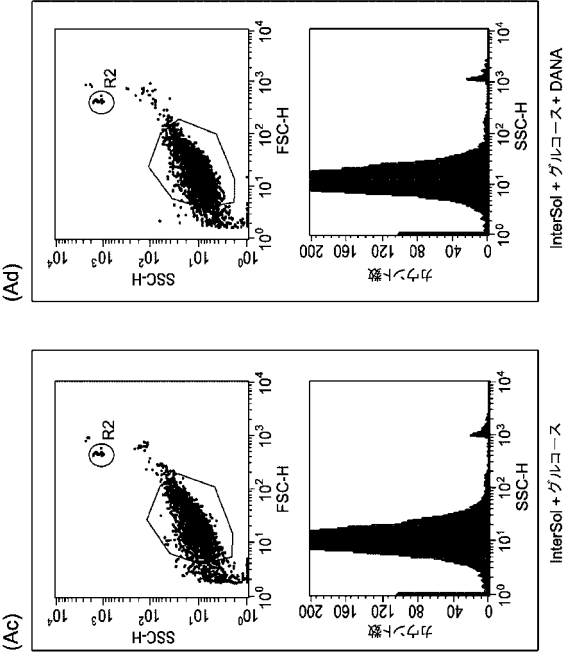
【図 3 2】



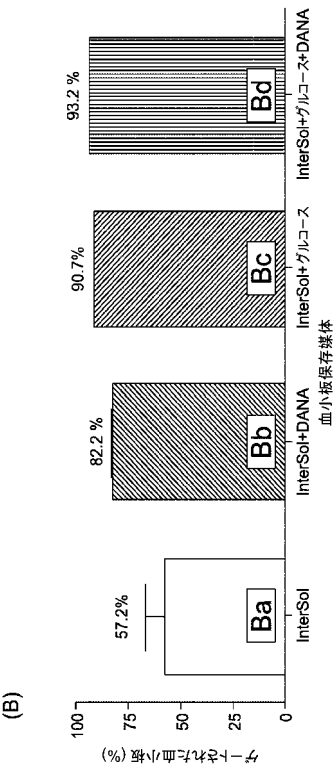
【図 3 3 A a - b】



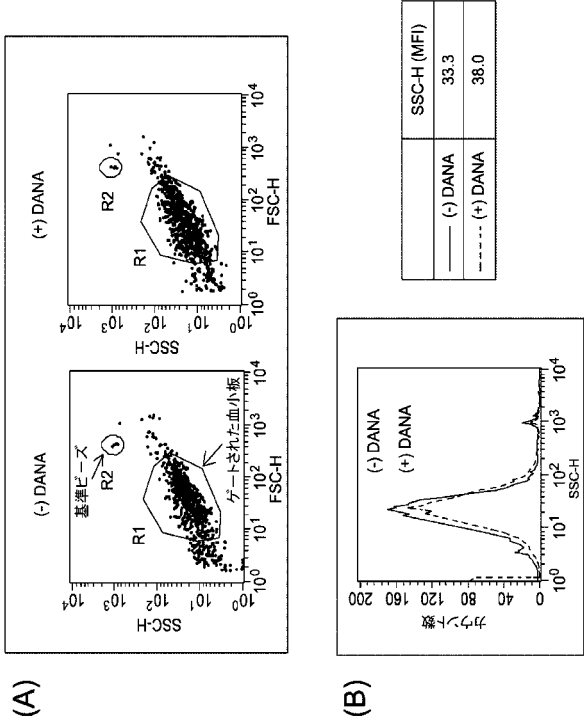
【図 3 3 A c - d】



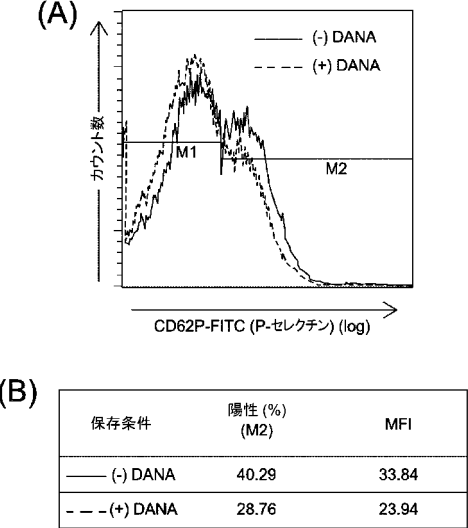
【図 3 3 B】



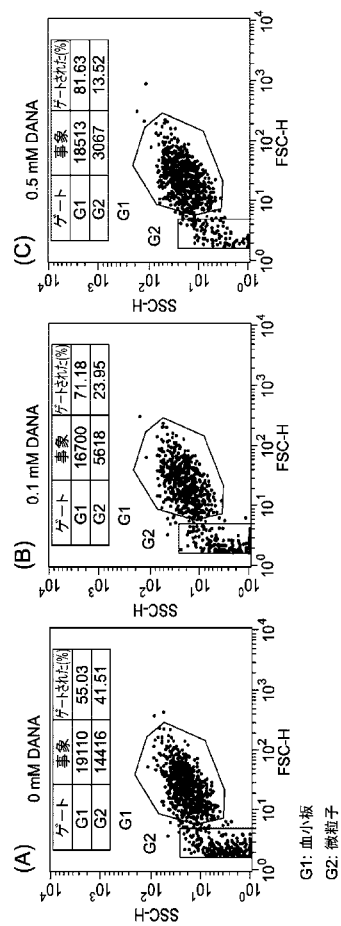
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 36】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/038462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01N1/00 A61K35/14 A01N1/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GERARD JANSEN ET AL: "Surface Sialic Acid Prevents Loss of GPIb{alpha} during Platelet Storage and Rescues In Vivo Survival of Murine Platelets", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 11, 1 January 2007 (2007-01-01), XP009173318, ISSN: 0006-4971	44,45, 56,57, 79,80, 83, 86-90,96
Y	the whole document	1-96
Y	US 5 459 030 A (LIN LILY [US] ET AL) 17 October 1995 (1995-10-17) column 21, line 34 - line 67; table 2 column 22, line 1 - line 16; claims 24,32-43	1-96

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 2013

Date of mailing of the international search report

23/10/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Butkowskyj-Walkiw, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/038462

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/044790 A2 (ZYMEQUEST INC [US]; ROSIELLO KEITH [US]; HENRIK CLAUSEN [DK]; WANDALL) 27 April 2006 (2006-04-27) claims; examples -----	1-96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/038462

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5459030	A	17-10-1995	AU 4220696 A	02-05-1996
			AU 7243194 A	20-12-1994
			US 5459030 A	17-10-1995
			WO 9427433 A1	08-12-1994

WO 2006044790	A2	27-04-2006	AT 495667 T	15-02-2011
			AU 2005295467 A1	27-04-2006
			CA 2626363 A1	27-04-2006
			EP 1812014 A2	01-08-2007
			ES 2363700 T3	12-08-2011
			JP 5123663 B2	23-01-2013
			JP 2008516980 A	22-05-2008
			US 2009155763 A1	18-06-2009
			US 2013059287 A1	07-03-2013
			WO 2006044790 A2	27-04-2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 31/7012 (2006.01)	A 6 1 K 31/7012	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

- (31)優先権主張番号 13/474,627
 (32)優先日 平成24年5月17日(2012.5.17)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/613,876
 (32)優先日 平成24年3月21日(2012.3.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 13/474,679
 (32)優先日 平成24年5月17日(2012.5.17)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/487,077
 (32)優先日 平成23年5月17日(2011.5.17)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

- (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一
 (74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リュー キヨン ピーター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン マーヴィン レーン 50

(72)発明者 ホフマイスター カリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チェストナット ヒル プイエフダブリュ パークウェイ
381

(72)発明者 サックスティン ロバート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サドベリー フォックス ラン ロード 26

Fターム(参考) 4C076 AA12 BB12 CC14 DD23 DD25 DD26 DD41 DD43 DD67 FF39

FF63

4C081 AC12 BA11 BA14 BC02

4C086 AA01 AA02 EA01 MA03 MA05 MA16 NA01 NA03 ZA36 ZC20

ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB38 DA10 MA05 NA01 NA03 ZA36

4H011 BB08 BB19 CA01 CB07 CD02 CD06 DH15

【要約の続き】

