



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 924 T2** 2006.08.17

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 338 648 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 924.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 000 701.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **28.04.1993**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.08.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/08** (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

891277 29.05.1992 US

(73) Patentinhaber:

University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, N.C., US; East Carolina University, Greenville, N.C., US

(74) Vertreter:

Diehl & Partner, 80333 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

Read, Marjorie S., Durham, US; Reddick, Robert L., Durham, US; Bode, Arthur P., Greenville, US

(54) Bezeichnung: **Im immobilisierten Zustand getrocknete pharmazeutisch verträgliche menschliche Blutplättchen**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf fixiertgetrocknete Blutplättchen, die zur Verabreichung an Humanpatienten geeignet sind, sowie auf Verfahren zum Behandeln von Wundgeweben durch topisches Aufbringen von fixiertgetrockneten Plättchen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Verwendung von Thrombozytenkonzentraten in der Transfusionsmedizin hat sich während der letzten dreißig Jahre gut eingeführt. Jedoch haben der rasche Verlust der Thrombozytenfunktion während der Lagerzeit und das Risiko einer bakteriellen Kontaminierung die Handhabung eines wirksamen Bestands von Thrombozytenkonzentraten in Blutbanken sehr kompliziert. In vielen Einrichtungen hat die begrenzte Lebensdauer von Thrombozytenkonzentraten deren Anwendung drastisch vermindert.

[0003] E. Klein et al., J. Pediatrics 49, 517–522 (1956), beschreiben die Herstellung und die Verabreichung von lyophilisiertem Thrombozytenmaterial an Kindern mit akuter Leukämie und aplastischer Anämie. An der Infusionsstelle wurden Schmerzen und Venenkrämpfe festgestellt. Die begrenzte Wirksamkeit dieser Materialien ist dort in der Tabelle 2 aufgezeigt. Nach mehr als 30 Jahren haben diese Materialien nicht zu einer nützlichen therapeutischen Behandlung geführt.

[0004] Um die Therapie mit einer Thrombozytentransfusion für Blutbanken besser handhabbar zu machen, gab es ein erhebliches Interesse daran, Mittel zum Vermindern oder Verzögern des Verlustes der Thrombozytenfunktion während der Lagerzeit aufzufinden. Ein Versuch wurde im Zusammenhang mit der Entwicklung von plasmafreien Lagermedien gesehen. Siehe hierzu S. Holme, US-Patent Nr. 4695460. Ein anderer Versuch war die Anwendung biochemischer Techniken zum Stabilisieren der Thrombozyten. Siehe hierzu beispielsweise A. Bode et al., US-Patent 4994367. Obwohl diese Techniken eine nützliche Verlängerung der Haltbarkeitsdauer mit sich bringen, ergeben sie keine Lebensdauer über längere Zeiträume. Schließlich wird von F. Chao, US-Patent Nr. 5185160, die Herstellung von Thrombozytenmembranmikrovesikeln aus, unter anderem, überlagerten Thrombozyten beschrieben.

[0005] Fixiert-getrocknete Blutplättchen für den Einsatz bei Diagnostikprüfungen werden in dem US-Patent Nr. 4287087 von Brinkhous et al. angegeben. Obwohl derartige fixiertgetrocknete Thrombozytenpräparate für diagnostische Zwecke über längere Zeiträume gelagert werden können, wurden sie bisher noch nicht in einer Form für eine pharmazeutische Verwendung bei Menschen bereitgestellt. Blutplättchen wurden auch von Bode et al. (Arthur P. Bode, Marjorie S. Read, Robert L. Reddick, Stein Holme und W. Andrew Heaton: "Evaluation of Dried Storage of Platelets and RBC for Transfusion: Lyophilization and other Dehydration Techniques" Second Annual Report from the Office of Naval Research: Navy Medical research and Development Command, Department of Navy (März 1991)) fixiert-getrocknet. In weiteren Veröffentlichungen der gleichen Autoren wird beschrieben, daß diese fixiert-getrockneten Thrombozyten bei der Rehydratisierung ihre hämostatischen Funktionen beibehalten (M.S. Read et al., FASEB Journal, Abstr. II, Band 4, No. 1, Abstr. No. 4436 (Februar 1990), und FASEB Journal, Abstr. I, Band 5, Nr. 4., Abstr. Nr. 3093 (März 1991)). Jedoch gab es keine Untersuchung bezüglich ihrer Verwendung zur Herstellung eines Medikaments für die intravenöse oder topische Anwendung.

[0006] Dementsprechend besteht weiterhin ein Bedürfnis nach neuen Mitteln zum Herstellen von Blutplättchenpräparaten mit verlängerter Lebensdauer, die zur Verabreichung an Humanpatienten geeignet sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in einer pharmazeutischen Formulierung, die fixiert-getrocknete Humanblutplättchen enthält, die nach der Rekonstitution (a) an thrombogenen Oberflächen haften, (b) an nicht-thrombogenen Oberflächen nicht haften, (c) beim Haften an einer thrombogenen Oberfläche einer Formänderung (Ausbreitung) unterliegen, (d) aneinander haften, um beim Haften an einer thrombogenen Oberfläche einen hämostatischen Pfropfen zu bilden, und (e) ihren Granulatinhalt freisetzen, z. B. nach dem Stimulieren und/oder Ausbreiten (beispielsweise nach dem Empfang einer physiologischen Stimulierung, die normalerweise einen metabolisch aktiven, lebenden oder frischen Thrombozyten veranlaßt, seinen Granulatinhalt freizusetzen, z. B. beim Kontaktieren eines Wundgewebes).

[0008] Die Blutplättchen, welche die oben angegebenen Eigenschaften aufweisen, werden durch ein Verfahren hergestellt, welches das Kontaktieren der Plättchen mit einem Fixiermittel beinhaltet, z. B. mit Formalde-

hyd, Paraformaldehyd, Glutaraldehyd oder Permanganat (beispielsweise durch Mischen der Plättchen mit einer Lösung hiervon) während einer Zeit, die zum Fixieren oder Stabilisieren der Plättchen ausreicht, jedoch nicht ausreicht, um einen Verlust der oben aufgezählten Eigenschaften herbeizuführen. Die Thrombozyten werden dann getrocknet und ergeben fixiert-getrocknete Blutplättchen mit den oben angegebenen Eigenschaften.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0009] [Fig. 1](#) zeigt die Thrombinbildung durch Thrombozyten der vorliegenden Erfindung im Vergleich zu fixiert-getrockneten Thrombozyten des Standes der Technik und nicht aktivierten Kontroll-Thrombozyten.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0010] Fixiert-getrocknete Blutplättchen der vorliegenden Erfindung können mit einer Verbindung fixiert werden, die aus Formaldehyd, Paraformaldehyd und Glutaraldehyd ausgewählt ist. Das Fixieren mit solchen Mitteln erfordert ein sorgfältiges Modifizieren der im US-Patent Nr. 4287087 angegebenen Verfahrensweise, um einen Verlust an Lebensfähigkeit bei den Thrombozyten zu vermeiden. Im allgemeinen werden gewaschene Thrombozyten durch Inkubieren, normalerweise bei Raumtemperatur, während bis zu 60 Minuten in einer Lösung von bis zu 1,8 % Paraformaldehyd fixiert. Wie unten im Einzelnen angegeben wird, muß auch dafür Sorge getragen werden, daß die Thrombozyten ausreichend fixiert werden. Andernfalls tritt während ihres Trocknens eine unerwünschte Lyse auf.

[0011] Eine alternative Technik besteht darin, die Thrombozyten durch Inkubieren der Plättchen in einer Permanganatlösung (z. B. Natriumpermanganat, Kaliumpermanganat) zu fixieren. Im allgemeinen können gewaschene Thrombozyten nach dieser Technik durch Inkubieren während 5 bis 20 Minuten in einer Lösung von 0,001 bis 1 g/dl KMnO_4 oder NaMnO_4 , vorzugsweise durch Inkubieren während 5 bis 15 Minuten in einer Lösung von 0,005 bis 0,5 g/dl KMnO_4 oder NaMnO_4 und am meisten bevorzugt durch Inkubieren während 8 bis 12 Minuten in einer Lösung von 0,005 bis 0,5 g/dl KMnO_4 oder NaMnO_4 hergestellt werden.

[0012] Blutplättchenpräparate zur Verwendung bei der Herstellung von pharmazeutischen Formulierungen sollten im wesentlichen frei sein von Fremdstoffen, insbesondere von lysierten Blutplättchen, die einen Patienten, dem das Präparat verabreicht wird, freien thrombogenen Stoffen aussetzen würden. Deshalb muß darauf geachtet werden, daß die Thrombozyten (ohne ihre Lebensfähigkeit zu zerstören, wie durch die oben genannten Eigenschaften angegeben ist) vor dem Trocknen ausreichend fixiert werden, weil sonst während der Trocknungsstufe eine unerwünschte Lyse eintritt. Beispielsweise zeigen Thrombozytenpräparate, die zur Verwendung bei der Herstellung von pharmazeutischen Formulierungen für den Menschen geeignet sind, bei der Rekonstitution von 10^9 Thrombozyten in einem Milliliter Lösung vorzugsweise weniger als 10×10^6 Mikroteilchen (die Bruchstücke bleiben als lysierte Thrombozyten zurück) pro Milliliter und vorzugsweise weniger als 150 Internationale Einheiten (IE) pro Liter Lactatdehydrogenase im Überstand nach dem erneuten Suspendieren und Pelletisieren (wobei 2200 IE pro Liter eine vollständige Lyse von 10^9 Zellen pro 1 Milliliter darstellen).

[0013] Das Trocknen der Thrombozyten nach dem Fixieren kann durch jede geeignete Maßnahme erfolgen, wird aber vorzugsweise durch Lyophilisierung durchgeführt. Es muß darauf geachtet werden, das Thrombozytenpräparat vor dem Trocknen zu stabilisieren, da andernfalls ein unerwünschtes Maß an Thrombozytenlyse eintreten kann. Das Stabilisieren kann durch Suspendieren der Thrombozyten in einer Lösung, die ein geeignetes Molekül (oder einen geeigneten "Stabilisator") enthält, das Wasser ersetzt, z. B. Albumin oder Trehalose, und anschließendes Trocknen der Lösung geschehen. Bei einer Ausführungsform werden 0,1 bis 20 Gew.% Albumin, vorzugsweise 1 bis 10 Gew.% Albumin, insbesondere 5 bis 10 Gew.% Albumin, eingesetzt. Zur Verabreichung an einen Patienten sollte das Albumin in dem Präparat von dergleichen Spezies wie der Patient sein (z. B. Humanalbumin). Alternativ kann das Präparat mit Albumin von einer anderen Spezies getrocknet, das Albumin bei der Rekonstitution von den Thrombozyten abgetrennt und Albumin von der gleichen Spezies dem rekonstituierten Präparat für die Verabreichung an den Patienten zurückgegeben werden. Es sollte aber darauf geachtet werden, daß das ganze nicht für die Spezies spezifische Albumin entfernt wird, da es bei den behandelten Patienten antigen wirken kann.

[0014] Pharmazeutische Formulierungen der vorliegenden Erfindung können einfach getrocknete (vorzugsweise lyophilisierte) Thrombozyten enthalten, die sich pyrogenfrei und steril in einer sterilen aseptischen Verpackung befinden. Wie oben angegeben, kann Albumin beigefügt sein. Pharmazeutische Formulierungen können auch ein Thrombozytenpräparat der vorliegenden Erfindung enthalten, das in einem pharmazeutisch verträglichen Träger rekonstituiert worden ist. Jeder wäßrige Träger, der die Thrombozyten rehydratisiert, so daß

sie die oben angegebenen Eigenschaften aufweisen und für eine intravenöse Injektion geeignet sind, können verwendet werden (z. B. eine sterile, pyrogenfreie, physiologische Kochsalz-Lösung). Zusätzliche Mittel, wie Puffer, Konservierungsstoffe und andere therapeutisch wirksame Mittel können in der rekonstituierten Formulierung enthalten sein. Siehe z. B. US-Patent Nr. 4994367 (deren Offenbarung hiermit durch Inbezugnahme einbezogen wird).

[0015] Rekonstituierte pharmazeutische Formulierungen der vorliegenden Erfindung werden Humanpatienten normalerweise durch eine intravenöse Injektion verabreicht. Patienten, die eine solche Behandlung benötigen, sind beispielsweise Patienten, die an einer Thrombozytopenie (z. B. einer Auswaschthrombozytopenie) leiden, Patienten, die an einer hämorrhagischen Thrombozytendysfunktion leiden, und Traumaopfer mit einer schweren Blutung. Die Menge der verabreichten pharmazeutischen Formulierung hängt vom Gewicht und dem Zustand des Patienten ab, liegt aber normalerweise im Bereich von 20 bis 350 ml im Volumen und von 1×10^9 bis 3×10^9 Thrombozyten pro Milliliter (vorzugsweise von 2×10^9 bis 3×10^9 Thrombozyten pro Milliliter). Die pharmazeutischen Formulierungen können in einem sterilen, pyrogenfreien Behälter verpackt sein, um diese Volumina und Dosen als eine Einheitsdosis bereitzustellen.

[0016] Hierin ist auch ein Verfahren zum Verbessern der Wundheilung bei einem Patienten, der eine solche Behandlung benötigt, beschrieben. Das Verfahren beinhaltet das topische Aufbringen von fixierten, getrockneten Blutplättchen auf die Wunde in einer Menge, die im Sinne der Wundheilung wirksam ist, wobei die genannten Plättchen einen von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktor an der jeweiligen Oberfläche bilden. Der Patient kann ein Mensch oder in der Veterinärmedizin ein Tier (z. B. ein Hund, eine Katze, ein Pferd, eine Kuh usw.) sein. Die Thrombozyten können von irgend einer geeigneten Spezies (d. h. vom Menschen, einer Kuh, einem Schwein usw.) stammen, kommen aber vorzugsweise von dergleichen Ursprungsspezies wie der behandelte Patient. Die Thrombozyten können durch irgend eine geeignete Maßnahme hergestellt werden, solange sie PDGF bilden, werden aber vorzugsweise nach solchen Methoden hergestellt, die hier beschrieben sind, so daß sie nach einer Stimulierung und/oder Ausbreitung einen von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktor freisetzen (z. B. nach der Aufnahme einer physiologischen Stimulierung, die normalerweise einen metabolisch aktiven, lebenden oder frischen Thrombozyten veranlassen würde, seinen Granulatinhalt freizusetzen, z. B. beim Kontaktieren eines Wundgewebes). Mit dem Verfahren kann jede Art von Wunde, z. B. Abschürfungen, Einschnitte, Durchstoßungen, Risse, Verbrennungen usw., behandelt werden. Die Wunde kann eine Wunde im Hautgewebe oder eine Wunde im Gewebe eines anderen Organs sein, z. B. Einschnitte in innere Organe, wie im Darm, in der Milz, in der Leber usw., wie sie in der Chirurgie auftreten. Die Thrombozyten können durch irgend eine geeignete Maßnahme auf die Wunde aufgebracht werden, z. B. durch Aufspritzen oder Aufsprühen der Thrombozyten auf die Wunde, oder sie können mit Hilfe eines chirurgischen Hilfsmittels aufgebracht werden, wie unten beschrieben wird. Wenn die Thrombozyten direkt auf die Wunde aufgespritzt werden, kann die Wunde dann gegebenenfalls mit einem klaren Polymerklebstoff besprüht oder dann mit irgend einer Binde oder einem Verband abgedeckt werden. Die Dosis der Thrombozyten soll mindestens 0,5 bis 1×10^9 Thrombozyten pro einen Quadratzentimeter der Oberfläche des chirurgischen Hilfsmittels oder der Wundoberfläche betragen. Die Obergrenze der Dosis ist nicht besonders kritisch, beträgt aber im allgemeinen 5 bis 10×10^9 Thrombozyten pro einen Quadratzentimeter der Oberfläche des chirurgischen Hilfsmittels oder der Wundoberfläche.

[0017] Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen mehr im Einzelnen erläutert. Diese Beispiele dienen nur Erläuterungszwecken und sind nicht als Beschränkung der Erfindung zu verstehen.

BEISPIEL 1

Herstellung von lyophilisierten Human-Thrombozyten (Protokoll 1)

[0018] Es werden Human-Thrombozyten aus Blut hergestellt, das in saure Citratdextrose (ACD) als Antikoagulans (0,085 m Trinatriumcitrat, 0,0702 m Citronensäure, 0,111 m Dextrose, pH 4,5) aufgezogen wurde, wobei ein Teil Antikoagulans auf 5,66 Teile Blut vorlagen. Die Thrombozyten wurden durch Differentialzentrifugierung isoliert und dreimal mit saurer Citrat-Kochsalz-Lösung (0,00544 m Trinatriumcitrat, 0,154 m NaCl, eingestellt mit 0,1 n HCl auf pH 6,5) gewaschen.

[0019] Nach dem Waschen wurden die Thrombozyten durch Inkubieren der gewaschenen Thrombozyten aus 100 ml Blut in 5,0 ml einer 1,8%igen Paraformaldehydlösung (hergestellt in Form von 9,0 ml einer 4%igen Paraformaldehydlösung plus 1,0 ml ACD plus 10,0 ml 0,135 m NaH_2PO_4) während 45 Minuten bei Raumtemperatur (die Fixierzeit kann auf 60 Minuten ausgedehnt werden) fixiert. Eine Alternative besteht darin, die gewaschenen Thrombozyten aus 100 ml Blut in einer 1,0%igen Paraformaldehydlösung während 45 Minuten bei

Raumtemperatur (die Fixierzeit kann auf 60 Minuten ausgedehnt werden) zu inkubieren.

[0020] Um nach dem Inkubieren in Paraformaldehyd den Paraformaldehyd abzutrennen, wird in jedes Röhrchen ein gleiches Volumen einer mit Imidazol gepufferten Kochsalz-Lösung (0,084 m Imidazol; 0,146 m NaCl, eingestellt mit 1,0 n HCl auf pH 6,8) gegeben, und die Thrombozyten werden durch Zentrifugieren bei 1500 g während 8 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wird abgekantiert, und die Thrombozyten werden durch erneutes Suspendieren der Thrombozytenpellets in 5 bis 10 ml einer mit Imidazol gepufferten Kochsalz-Lösung bei pH 7,35 gewaschen. Das Waschen wird noch zweimal wiederholt, um den Paraformaldehyd abzutrennen. Nach dem dritten Waschen werden die Thrombozyten in einer 5%igen Lösung von Serumalbumin (5 g Albumin pro 100 ml Citrat-Kochsalz-Lösung, 0,0054 m Natriumcitrat, 0,154 m NaCl, pH 6,5) erneut suspendiert. Die Thrombozyten werden unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops und eines Hämozytometers des Typs "American Optical Bright-Line Hemocytometer" gezählt. Die Thrombozytenkonzentration wird auf 800.000 pro Kubikmillimeter (mm^3) eingestellt.

[0021] Gleiche Teile (10 ml) von in der Konzentration eingestellten Thrombozyten in der Serumalbuminlösung werden in 20ml-Glasampullen eingebracht und bei -70°C eingefroren. Die Thrombozyten werden dann während 12 Stunden oder bis zur Bildung eines bröckeligen weißen Pulvers lyophilisiert. Das Thrombozytenprodukt kann auch in großen Mengen von 100 bis 500 ml in Schalen eingefroren und während 4 Stunden bei -40°C lyophilisiert werden, wonach die Temperatur für die Dauer der Trocknungszeit auf -25°C angehoben wird. Das lyophilisierte Produkt wird bis zur Verwendung bei -20 bis -70°C gelagert.

[0022] Die lyophilisierten Thrombozyten werden mit 0,084 m Imidazolpuffer (ohne Salzzugabe) rehydratisiert und mit 1,0 m NaOH auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. Nach der Zugabe des Imidazolpuffers läßt man die Lösung sich absetzen, wobei sie mehrere Minuten ungestört bleibt. Dann wird sie durch Rollen oder Drehen der Glasampulle vorsichtig gemischt, um eine gleichmäßige Suspension von rehydratisierten einzelnen Thrombozyten herzustellen.

BEISPIEL 2

Herstellung von lyophilisierten Human-Thrombozyten (Protokoll 2)

[0023] Von gesunden freiwilligen Spendern wurde Vollblut in handelsüblichen Blutsammelpackungen (Fenwal 4R6402, Baxter Health Care) erhalten, in denen die Standardergänzung eines Antikoagulans (CPDA-1) vorlag. Das Endvolumen jeder Einheit des gesammelten citrathaltigen Vollbluts beträgt 500 ml. Jeder Beutel Vollblut wird zentrifugiert, um ein Thrombozyten-reiches Plasma (PRP) zu erhalten, das aus dem Beutel abgesaugt und durch drei Stufen der Zentrifugierung/Resuspendierung in einer mit Phosphat gepufferten Kochsalz-Lösung (der gleichen Lösung, wie sie im Beispiel 1 oben beschrieben worden ist) gewaschen. Die gewaschenen Thrombozyten werden dann wieder zentrifugiert, und das Pellet während 45 Minuten bis 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer gepufferten Lösung, die 1,8 % Paraformaldehyd (wie im Beispiel 1 oben beschrieben) behandelt. Die Ausbeute der Thrombozyten nach dem Entfernen des Stabilisierungsreagenzes und weiterem Waschen der Thrombozyten zum Entfernen von Paraformaldehyd beträgt 60–80 % der Zählung in der Thrombozytensuspension vor der Stabilisierung. Wenn in dem Waschpuffer nach dem Stabilisieren kein Albumin vorliegt, fällt die Thrombozytenausbeute.

[0024] Die Zusammensetzung der endgültigen Thrombozyten-Resuspension vor dem Gefriertrocknen ist wichtig, um die entsprechenden Ausbeuten zu erhalten. Im allgemeinen ist eine wirksame Menge eines Stabilisators, wie Albumin oder Trehalose in einer gepufferten Kochsalz-Lösung, notwendig, um Ausbeuten der Thrombozyten von 85 bis 100 % durch die Stufen der Lyophilisierung/Rehydratisierung zu erhalten. Albumin sollte in einer Menge im Bereich von 0,1 bis 50 g/dl, vorzugsweise in einer Menge im Bereich von 1 bis 25 g/dl und insbesondere in einer Menge im Bereich von 5 bis 10 g/dl enthalten sein. Trehalose sollte in einer Menge im Bereich von 0,1 bis 10,0 m, vorzugsweise von 0,2 bis 5 m und insbesondere von 0,5 bis 1,0 m vorliegen. Es wurden verschiedene Arten von Rehydratisierungslösungen eingesetzt, ohne merkliche Unterschiede in den Parametern der Ergebnisse festzustellen: Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung pH = 7,3, dreifachgepufferte Kochsalz-Lösung pH = 7,4, imidazolgepufferte Kochsalz-Lösung oder physiologische, im Gleichgewicht befindliche Salzlösung UNISOL^R.

[0025] Typische Daten für rehydratisierte Thrombozytenpräparate, die so hergestellt worden sind, wie in diesem Beispiel beschrieben, werden nachfolgend in der Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1. Verhalten von rehydratisierten Thrombozyten in vitro

Aggregationsuntersuchungen	Prozent Thrombozyten, die unaggregiert bleiben
1,5 mg/ml Ristocetin	12-15 % (starkes Ansprechen)
10 μ mol ADP	42-85 % (schwaches Ansprechen)
8 μ g/ml Collagen	25-60 % (mittleres Ansprechen)
Durchflußzytometrie-Untersuchungen	Prozent Thrombozyten mit normaler Fluoreszenz
GPIb (AN-51, SZ-2, SZ-1, MoAbs)	90-97 % (Äquivalent zu frischen Thrombozyten)
GPIIbIIIa (10E5 MoAb)	98-99 % (Äquivalent zu frischen Thrombozyten)

[0026] Die Mikroteilchenzählung nach dem Rehydratisieren der Thrombozytenpräparate, die hergestellt worden sind, wie hier beschrieben, betrug $4,5$ bis $5,0 \times 10^6$ /ml. Das Ansprechen von Thrombozyten, die hergestellt worden waren, wie in diesem Beispiel beschrieben, auf den Test des hypotonischen Schocks betrug $0,030$ bis $0,036$ OD/min ($0,100$ bis $0,150$ für frische Thrombozyten). Bezüglich der freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) betrug die Menge an LDH in dem Überstand nach dem Resuspendieren von 10^9 Thrombozyten in 1 ml Lösung 50 bis 200 IU/l (> 150 oder 250 zeigt einen deutlichen zytoplasmischen Verlust).

BEISPIEL 3

Herstellung von lyophilisierten Human-Thrombozyten mit Permanganatstabilisierung

[0027] Von gesunden Spendern wurde Vollblut in handelsüblichen Blutsammelpackungen (Fenwal 4R6402, Baxter HealthCare) erhalten, in denen die Standardergänzung eines Antikoagulans (CPDA-1) vorlag. Das Endvolumen jeder Einheit des gesammelten citrathaltigen Vollbluts beträgt 500 ml. Jeder Beutel des Vollbluts wird zentrifugiert, um ein Thrombozyten-reiches Plasma (PRP) zu erhalten. Dies wurde aus dem Beutel abgesaugt und durch drei Stufen der Zentrifugierung/Resuspendierung in einer phosphatgepufferten Kochsalz-Lösung, wie im Beispiel 1 oben angegeben, gewaschen. Die gewaschenen Thrombozyten wurden in einem Zehntel des Volumens einer gepufferten Kochsalz-Lösung gewaschen und tropfenweise einer Permanganatlösung zugegeben, die eine phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung mit einer Endkonzentration an KMnO_4 oder NaMnO_4 von $0,01$ g/dl enthielt. Die Suspension der Thrombozyten wurde während 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Permanganatlösung inkubiert und dann zweimal wie oben mit $0,1$ bis $5,0$ g/dl Albumin in dem Puffer gewaschen, um das Permanganat abzutrennen. Der Verlust an Thrombozyten während der Permanganatbehandlung und des nachfolgenden Waschens betrug nur 10 bis 20 %.

[0028] Um nach der Lyophilisierung/Rehydratisierung die Ausbeuten von 70 bis 100 % beizubehalten, ist es nötig, in die endgültige Resuspensionslösung vor dem Lyophilisieren einen Stabilisator, wie Trehalose oder Albumin, vorzugsweise in den oben angegebenen Bereichen, einzubringen. Die Zusammensetzung der Rehydratisierungslösung ist nicht kritisch, sollte aber isotonisch und auf einen pH-Wert von $7,3$ bis $7,4$ (in gleicher Weise wie für Paraformaldehyd-fixierte Thrombozyten) gepuffert sein. Typische Daten aufgrund der Analyse von rehydratisierten, durch Permanganat fixierten Thrombozyten werden unten in der Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2. Verhalten von rehydratisierten Thrombozyten in vitro

Aggregationsuntersuchungen	Prozent Thrombozyten, die unaggregiert bleiben
1,5 mg/ml Ristocetin	15-32 % (starkes Ansprechen)
10 μ mol ADP	27-42 % (mittleres Ansprechen)
8 μ g/ml Collagen	27-50 % (mittleres Ansprechen)
Durchflußzytometrie-Untersuchungen	Prozent Thrombozyten mit normaler Fluoreszenz
GPIb (AN-51, SZ-2, SZ-1, MoAbs)	91-99 % (Äquivalent zu frischen Thrombozyten)
GPIIbIIIa (10E5 MoAb)	95-99 % (Äquivalent zu frischen Thrombozyten)

[0029] Die Mikroteilchenzählung nach dem Rehydratisieren der Thrombozytenpräparate, die durch das in diesem Beispiel betriebene Permanganatverfahren fixiert worden sind, betrug 2,6 bis $4,0 \times 10^6$ /ml. Das Ansprechen der durch dieses Verfahren hergestellten Thrombozyten auf den Test des hypotonischen Schocks betrug 0 bis 0,030 OD/min (0,100–0,150 für frische Thrombozyten). Die freigesetzte LDH betrug 50 bis 200 IU/l.

BEISPIEL 4 (VERGLEICHSBEISPIEL A)

Verwendung von Aktivierungsmarkern zum Charakterisieren von durch Paraformaldehyd stabilisierten Thrombozyten

[0030] Der Zweck dieses Beispiels besteht darin, aufzuzeigen, daß mit Paraformaldehyd fixierte Thrombozyten gemäß der vorliegenden Erfindung nach dem Kontakt mit einer thrombogenen Oberfläche ihren Granulatinhalt freisetzen, während dies bei bekannten Thrombozyten nicht der Fall ist. Die geprüften Thrombozytenpräparate wurden während 60 Minuten mit 1,0 % Paraformaldehyd (Paraform. 1) und während 60 Minuten mit 1,8 % Paraformaldehyd (Paraform. 2) stabilisiert. Diese wurden mit Thrombozyten verglichen, die hergestellt wurden, wie in dem Patent von Brinkhous et al. beschrieben ist, das heißt, mit solchen, die während 120 Minuten durch 2 % Paraformaldehyd fixiert worden sind (Brinkhous).

[0031] Die Marker CD62 und GP53, welche in den in der Tabelle 3 beschriebenen Tests eingesetzt wurden, sind im Handel erhältliche Antikörper, gekauft von Becton-Dickinson, Inc., und werden benutzt, um auf der Oberfläche des Thrombozyten die Anwesenheit von Antigenen aufzuzeigen, die von Thrombozytengranulaten freigesetzt worden sind. Die Anwesenheit von aus Granulat freigesetzten Antigenen auf einer Thrombozytenoberfläche wird als Beweis der Thrombozytenaktivierung angesehen. Antikörper gegen diese Antigene werden als Aktivierungsmarker bezeichnet. Antikörper gegen einen von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF) werden benutzt, um einen Thrombozytenmembran-gebundenen PDGF zu erfassen. Der PDGF-Antikörper wurde von Genzyme (Cambridge, MA) gekauft. Die in den Baumgartner-Hafttests benutzten Gefäße wurden von einem normalen Hund erhalten.

[0032] Es wurden Versuche durchgeführt, um die Aktivierbarkeit von getrennten lyophilisierten Thrombozytenpräparaten durch deren Einbringen in frisches Vollblut aufzuzeigen, das durch Differentialzentrifugierung von nativen Thrombozyten befreit worden ist, für einen Vergleich mit frischem, unsubstituierten Vollblut zur Verwendung in ringförmigen Perfusionskammern. Von normalen Humanspendern wurde Blut in ein citrathaltiges Antikoagulans (CPDA-1) gesammelt. Es wurden zwei 1cm-Streifen von Arteriengefäßen eines Hundes auf einen verjüngten Stab gestülpt und in eine Umlaufschleife eingesetzt, die durch eine peristaltische Pumpe mit 130 ml/Minute betrieben wurde. Die Schleife wurde zuerst von einem Puffer und dann von dem Blut (mit entweder frischen oder lyophilisierten Thrombozyten) während 5 Minuten bei Raumtemperatur durchströmt, gefolgt von einem 2-minütigen Durchfluß von 2 % Paraformaldehyd, um anhaftende Thrombozyten an das Gefäß dauerhaft zu fixieren. Die Thrombozyten an der Gefäßoberfläche wurden durch eine Zugabe eines fluoreszierenden monoklonalen Antikörpers auf GPIIbIIIa erfaßt. Das Haften wurde durch Fluoreszenz-Epimikroskopie

erfaßt, und zwar als eine Abschätzung des Prozentsatzes der Gefäßoberfläche, die von fluoreszierenden Zellen bedeckt war. Auch wurde von dem verbleibenden Blut (mit nichthaftenden Thrombozyten) eine Probe entnommen, um Thrombozyten-reiches Plasma (PRP) herzustellen. Das PRP wurde ferner mit 2 % Paraformaldehyd während 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert, bevor eine Inkubation mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen CD62 oder GP53 oder PDGF erfolgte. Die Anwesenheit dieser Markern auf der Thrombozytenoberfläche in der Probe wurde durch eine standardmäßige Durchflußzytometrie mit einem Durchflußzytometer des Typs Becton Dickinson FACSCAN^R erfaßt. Die Quantifizierung der Ergebnisse wurde als Prozentsatz der Thrombozyten mit einer Fluoreszenz, die stärker war als der Hintergrund, ausgedrückt, und zwar aufgezeichnet mit einem nicht-spezifischen Kontrollantikörper (nicht-immune Maus IgG_{2a}). Die Ergebnisse wurden mit Blutproben verglichen, welche unmittelbar vor oder nach Beginn des Durchspülens der Gefäßstreifen entnommen worden waren. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in der Tabelle 3 dargestellt.

TABELLE 3. Vergleich der mit Paraformaldehyd stabilisierten Thrombozyten mit Aktivierungsmarkern

Marker	Prozent positive Thrombozyten	
	vor der Zirkulation	nach der Zirkulation
1,0 % Paraformaldehyd/60 Minuten (Paraform. 1)		
CD62	12	16
GP53	18	22
PDGF	20	24
1,8 % Paraformaldehyd/60 Minuten (Paraform. 2)		
CD62	6, 3	12, 7
GP53	14, 19	21, 30
PDGF	12, 18	18, 40
2,0 % Paraformaldehyd/120 Minuten (Brinkhous)		
CD62	11	6
GP53	1	1
PDGF	27	30

[0033] Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Konzentration und die Zeit der Stabilisierung zu Thrombozyten mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften führen. Thrombozyten des Typs Paraform. 1 und Paraform. 2 zeigten eine zunehmende Anzahl an Aktivierungsmarkern, die an Thrombozyten im Blut vorlagen, das über die subendotheliale Oberfläche der Gefäßwand zirkulierte. Der Typ Paraform. 2 zeigt hier eine Verdopplung der Aktivierungsmarker nach dem Einwirken auf eine Aktivierungsfläche. Im Gegensatz dazu zeigte das Brinkhous-Präparat im wesentlichen keine Aktivierung nach der Zirkulierung mit dem CD62-Marker und eine minimale Veränderung bei PDGF.

BEISPIEL 5 (VERGLEICHSBEISPIEL B)

Verwendung von Aktivierungsmarkern zum Charakterisieren von Thrombozyten, die mit Kaliumpermanganat hergestellt worden sind

[0034] Der Zweck dieses Beispiels besteht darin, zu zeigen, daß mit Permanganat fixierte Thrombozyten gemäß der vorliegenden Erfindung nach dem Kontakt mit einer thrombogenen Oberfläche ihren Granulatinhalt freisetzen, während dies bei Thrombozyten des Stands der Technik nicht der Fall ist. Dieses Beispiel wurde im wesentlichen in der gleichen Weise wie das Beispiel 4 oben durchgeführt, mit der Ausnahme des Einsatzes von mit Permanganat fixierten Thrombozyten, wie sie im Beispiel 3 oben beschrieben worden sind. Es wurden drei verschiedene mit Permanganat fixierte Thrombozytenpräparate verwendet: Thrombozyten, die mit 0,02 m Permanganat stabilisiert und in Gegenwart von Trehalose lyophilisiert worden sind (Perm. 1); Thrombozyten, die mit 0,02 m Permanganat stabilisiert und im Gegenwart von Humanserumalbumin lyophilisiert worden sind

(Perm. 2); und Thrombozyten, die mit 0,01 m Permanganat stabilisiert und in Gegenwart von Humanserumalbumin lyophilisiert worden sind (Perm. 3). Für Vergleichszwecke wurden auch Thrombozyten mit 2 % Paraformaldehyd während 120 Minuten fixiert und in Gegenwart von Rinderserumalbumin getrocknet. Die Daten werden in der Tabelle 4 unten angegeben.

[0035] Aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, daß im Gegensatz zu den mittels Permanganat fixierten Thrombozyten der vorliegenden Erfindung das Brinkhous-Thrombozytenpräparat nach der Einwirkung auf ein thrombogenes Gefäß im wesentlichen keine Aktivierung zeigt.

TABELLE 4. Vergleich von mit Permanganat stabilisierten Thrombozyten mit Aktivierungsmarkern

Thrombozyten	CD62-Marker (% positive Thrombozyten)	
	vor der Zirkulation	nach der Zirkulation
Perm. 1	39	86
Perm. 2	31	60
Perm. 3	ND	37
Brinkhous	11	6

BEISPIEL 6 (VERGLEICHSBEISPIEL C)

Haftung von rehydratisierten Thrombozyten am Gefäßsubendothelium

[0036] Die Fähigkeit von frischen und rehydratisierten Thrombozyten, an einem freiliegenden subendothelialen Gefäß zu haften, wurde in einer ringförmigen Durchflußkammer überprüft. Das Brinkhous-Thrombozytenpräparat und die gemäß den obigen Beispielen 4 und 5 hergestellten Thrombozyten wurden verglichen. Die Thrombozyten wurden aus mit ACD-Antikoagulans behandeltem Vollblut entfernt und durch verschiedene Präparate von getrockneten und rehydratisierten Thrombozyten ersetzt. Das Vollblut und das rehydratisierte Thrombozyten enthaltende Blut wurde dann durch die Kammern gepumpt, die verschiedene umgestülpte Gefäße enthielten. Der Durchfluß und das Schergefälle waren für alle Präparate konstant. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 unten angegeben.

TABELLE 5. Haftung von rehydratisierten Thrombozyten am Gefäßsubendothelium

Thrombozytentyp	Prozent Bedeckung
frisch	53 - 76
Perm. 2	26 - 53
Paraform. 2	23 - 43
Brinkhous	44 - 80

[0037] Obwohl zwischen den Versuchen eine große Schwankung bestand, ist offensichtlich, daß die Brinkhous-Thrombozyten "klebriger" waren als die anderen Präparate. Alle Präparate haften am Gefäßsubendothelium, jedoch wird von den erfindungsgemäß hergestellten Thrombozyten eine kleinere Fläche der freiliegenden Gefäßwand bedeckt. Natürlich ist das Haften der Thrombozyten gemäß dem Stand der Technik, die metabolisch "tot" sind, eine passive Eigenschaft, der eine entsprechende metabolische Reaktion nicht folgen würde.

BEISPIEL 7 (VERGLEICHSBEISPIEL D)

Test der Erholung vom hypotonischen Schock

[0038] Der Test der Erholung vom hypotonischen Schock wird benutzt, um die Fähigkeit der Thrombozyten festzustellen, Wasser zu entfernen und sich vom Anquellen zu erholen, das von einer erhöhten Wasseraufnah-

me durch die Thrombozyten verursacht worden ist. Um das Ausmaß der Erholung vom Aufquellen zu messen, wurden Thrombozytensuspensionen von $3 \times 10^8/\text{ml}$ in citrathaltigem Plasma mit 1/2 Volumen deionisiertem Wasser in einem Chronolog-Aggregometer bei 37°C behandelt. Das Lichtdurchlässigkeitssignal (%T) nimmt unmittelbar mit der Aufnahme von Wasser durch die Thrombozyten zu, und zwar aufgrund des hypotonischen Schocks (%T_{max}), gefolgt von einer Rückkehr von %T bis nahe an der Grundlinie (%T_{Basis}, korrigiert um die Verdünnung), wenn das Wasser aktiv durch intakte Thrombozyten ausgestoßen wird. Das Ausmaß der Erholung nach 10 Minuten wurde wie folgt quantifiziert:

$$\frac{(\%T_{\max}) - (\%T_{\text{aktuell}})}{(\%T_{\max}) - (\%T_{\text{Basis}})} \times 100$$

[0039] Die Geschwindigkeit der Erholung vom hypotonischen Schock war eine gesonderte Messung, die wie oben durchgeführt wurde, mit der Ausnahme, daß dies bei 22°C in einem ungerührten Payton-Aggregometer erfolgte. Die Geschwindigkeit der Erholung wurde als die Geschwindigkeit der Änderung von %T von 1 Minute bis 3 Minuten nach der Zugabe von deionisiertem Wasser berechnet. Die in der Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse werden als Prozentsatz der Geschwindigkeit der Änderung von %T, erhalten mit frischen Thrombozyten-Kontrollproben, ausgedrückt. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Erholung der Thrombozyten in den Tests des hypotonischen Schocks hängen in hohem Maße von der Unversertheit der Membran und der restlichen metabolischen Aktivität ab. Die Brinkhous-Thrombozytenpräparate zeigten keine Reaktion, während bei den Thrombozytenpräparaten der vorliegenden Erfindung die Erholung 40 bis 100 % betrug.

TABELLE 6. Erholung vom hypotonischen Schock bei verschiedenen stabilisierten Thrombozytenpräparaten

Thrombozytenpräparat	Erholung	
	Geschwindigkeit	Ausmaß
Perm. 1	0-10	40
Perm. 2	0-8	—
Paraform. 2	26-43	100
Brinkhous	0	0

BEISPIEL 8 (VERGLEICHSBEISPIEL E)

[0040] Thrombinbildung durch Thrombozytenpräparate Der Zweck dieses Beispiels besteht darin, zu erläutern, daß kleine Veränderungen in der Konzentration des Fixermittels und in der Fixierzeit zu unterschiedlichen Reaktionen von Thrombozyten auf Reizmittel führen.

[0041] Für die Thrombinerzeugung (die von der Thrombozytenkonzentration abhängt) und den Halt des Prothrombinasekomplexes an der Oberfläche der Thrombozyten wurden vier Thrombozytenpräparate getestet. Die Ergebnisse sind in der [Fig. 1](#) dargestellt. Die Thrombozytenanzahl $\times 1000$ ist auf der horizontalen Achse und die Thrombinbildung in Einheiten ist auf der senkrechten Achse angegeben. Die Präparate waren: (i) Thrombozyten des Typs Paraform. 1 (Dreiecke in der [Fig. 1](#)); (ii) Thrombozyten des Typs Paraform. 2 (Quadrate); (iii) Brinkhous-Thrombozyten (Rauten); und (iv) frische gewaschene Thrombozyten als Kontrolle (Kreise). Die Thrombozyten des Typs Paraform. 2 zeigten die maximale Geschwindigkeit der Thrombinbildung, gefolgt von den Thrombozyten des Typs Paraform. 1 und nachfolgend von den Brinkhous-Thrombozyten. Die Kontroll-Thrombozyten zeigten die niedrigste Geschwindigkeit der Thrombinbildung.

BEISPIEL 9

Expression eines von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktors (PDGF) auf der Oberfläche von fixiert-getrockneten Thrombozyten

[0042] Der Zweck dieses Beispiels lag darin, Thrombozyten, die durch verschiedene Maßnahmen fixiert und getrocknet worden sind, auf die Expression von PDGF an der Oberfläche zu prüfen. Die Antikörper und die Thrombozytenpräparate sind derart, wie sie in den obigen Beispielen 5 und 6 beschrieben wurden. Die Daten werden in der Tabelle 7 unten angegeben.

TABELLE 7. Expression von PDGF an der Thrombozytenoberfläche

Präparat	Prozent der bezüglich PDGF positiven Thrombozyten	
	vor der Zirkulation	nach der Zirkulation
Frischblut	45	67
Perm. 2	ND	64
Paraform. 1	37	34
Paraform. 2	28	40
Brinkhous	27	30

[0043] Diese Daten zeigen, daß sowohl die Brinkhous-Thrombozyten als auch die Thrombozyten der vorliegenden Erfindung an ihrer Oberfläche PDGF exprimieren und daß Thrombozyten des Typs Perm. 2 und Paraform. 2 an der Oberfläche mehr PDGF exprimieren als Brinkhous-Thrombozyten vor oder nach der Stimulierung.

BEISPIEL 10

[0044] Topische Verabreichung von fixiert-getrockneten Thrombozyten, die PDGF exprimieren, um die Wundheilung beim Schwein zu erleichtern. Dieses Beispiel beschreibt die Anwendung von Thrombozyten, die an ihrer Oberfläche PDGF exprimieren, um die Wundheilung bei Schweinen zu erleichtern.

[0045] Die bei diesem Versuch benutzten Thrombozyten vom Schwein wurden im wesentlichen in der Weise hergestellt, wie im obigen Beispiel 1 beschrieben ist, mit der nachfolgenden Modifizierung. Um den Paraformaldehyd abzutrennen, wird das gleiche Volumen einer mit Imidazol gepufferten Kochsalz-Lösung (IBS), pH 7,35, zugefügt. Die Thrombozyten werden durch Zentrifugieren bei 1.500 g während 8 Minuten bei Raumtemperatur pelletisiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 bis 10 ml IBS, pH 6,8, resuspendiert. Das Waschen wird zweimal wiederholt. Das Verfahren ist dann das gleiche wie das im Beispiel 1 beschriebene, mit der Ausnahme, daß die Konzentration der Schweine-Thrombozyten $8 \times 10^4/\mu\text{l}$ beträgt. Es wurde Schweinealbumin als Stabilisator für das Trocknen hinzugefügt, und zwar in einer Menge, die ähnlich jener war, die im Beispiel 2 angegeben ist.

[0046] Der Thrombozytenverband wurde unter Verwendung des chirurgischen Verbands BIOBRANE II^R auf Abschnitten von 1 Quadratcentimeter (Don B. Howland, Inc. Sugarland, Texas) in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm hergestellt. 1 cm² des Verbands wurde mit $3,2 \times 10^9$ Schweinethrombozyten gesättigt, und zwar durch Aufpipettieren von 1 ml einer Lösung, welche die genannte Menge an Thrombozyten enthielt, auf den Verband sowie anschließendes vorsichtiges Überführen des Verbands mit den Thrombozyten in eine Lyophilisierungskammer. Das Material wurde bei -40 °C getrocknet, bis ein bröckeliges weißes Pulver erkennbar war.

[0047] Es wurden zwei erwachsene Schweine untersucht. Die Schweine wurden anästhetisiert, und es wurden unter Verwendung einer dermatologischen 3-Millimeter-Stanze (mm) kontrollierte Stanzwunden hervorgeufen. Am Tag 0 wurden in der rasierten sterilisierten Fläche entlang des Rückens der anästhetisierten Schweine Wunden erzeugt, die 3 mm tief und 3 mm breit waren. Die Wunde durchdrang die Epidermis, die Dermis und das Fettgewebe. Es wurden drei Reihen von jeweils 6 Wunden erzeugt. Die Reihe 1 wurde mit getrockneten Thrombozyten behandelt. Die Reihe 2 wurde mit Verbandsmull behandelt, der mit getrockneten Thrombozyten imprägniert war. Die Reihe 3 wurde unbehandelt gelassen. Am Tag 1 wurde die Wunde 1 jeder Reihe entfernt. Am Tag 2 wurde die Wunde 2 jeder Reihe entfernt. An jedem der nächsten vier Tage wurde jede nachfolgende Wunde jeder Reihe zur Untersuchung entfernt. Das entfernte Gewebe wurde mit Formaldehyd fixiert und mittels histologischen Standardtechniken behandelt, gefärbt und mikroskopisch auf das Vorliegen einer Wundheilung überprüft. Jeder Abschnitt wurde auf die Anwesenheit von Thrombozyten, die fibroplastische Proliferation entlang den Seiten und am Grund der Wunde sowie das epitheliale Neuwachstum und das Vorliegen einer Entzündungsreaktion überprüft. Die in jede Stelle eingebrachte Thrombozytenmenge wurde nicht genau bestimmt. Die Wunden in der Reihe 1 wurden mit getrockneten Thrombozyten gefüllt. Jede Stanzwunde wurde bis zu ihrem Aufnahmevermögen mit getrockneten Thrombozyten gefüllt. Die Wunden in der Reihe 2

wurden durch Aufbringen von 1 cm² Mull, der getrocknete Thrombozyten enthielt, auf jede Wunde behandelt.

[0048] Qualitativ zeigten alle behandelten Abschnitte eine fortgeschrittene Heilung, verglichen mit den unbehandelten Wunden.

BEISPIEL 11

Intravenöse Verabreichung von fixiert-getrockneten Thrombozyten

Normale und an der von-Willebrand-Erkrankung leidende Hunde

[0049] Um in vivo die hämostatische Wirksamkeit von rehydratisierten Thrombozyten zu messen, wurde zwei normalen Hunden und einem Hund mit einem Mangel an von-Willebrand Faktor (von-Willebrand-Erkrankung, vWD) Infusionen mit rehydratisierten, fixiert-getrockneten normalen Hundethrombozyten verabreicht. Die Hundethrombozyten wurden fixiert, getrocknet und auf im wesentlichen die gleiche Weise rekonstituiert wie die Humanthrombozyten gemäß der Beschreibung in den obigen Beispielen 1 und 2, mit der Ausnahme, daß die Thrombozyten während 1 Stunde in einer 0,67%igen Paraformaldehydlösung fixiert wurden. Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt die physikalischen Daten bezüglich der Infusion und die Eigenschaften der Hunde.

TABELLE 8. Infusion von rehydratisierten Thrombozyten (RP) bei normalen (N) und an der von-Willebrand-Krankheit (vWD) leidenden Hunden

Physikalische Daten	Phänotyp		
	N	N	vWD
Gewicht (Kg)	20	15,9	9,1
Thrombozytenanzahl (x10 ⁶)	255	225	285
Gesamte zirkulierende Thrombozyten (x10 ⁹)	448	315	228
RP-Infusion (ml)	10	9,2	8,5
Gesamt-RP (x10 ⁹)	82,5	138	117
Gesamt-RP (% ursprüngliche Thrombozyten)	18,4	43	51
% vWF (am Anfang)	100	100	0
% vWF (nach kryo.)	-	-	50
BT (min:s) am Anfang	2:28	1:55	>15
BT (min:s) nach kryo.	-	-	7:52
BT (min:s) nach kryo., nach RP	2:52	1:55	6:40

[0050] Nach der obigen Infusion der Thrombozyten in die Hunde wurden während des Versuchs etwa vier Stunden lang Blutproben wie folgt entnommen. Einem anästhetisierten Hund wurde eine Infusion mit rehydratisierten Thrombozyten verabreicht. Es wurde jeweils die Arteria carotis freigelegt. In die femorale Arterie wurde eine Kanüle zum Messen des Blutdrucks und eine zweite Kanüle in die femorale Vene zur Probenentnahme und zur Verabreichung von Flüssigkeiten eingesetzt. Entsprechend bekannten Techniken wurde an einer Arteria carotis eine Quetschverletzung mit einer zusätzlichen Stenose erzeugt (siehe Nichols et al., Circulation Research 59, 15-26 (1988)). Die Hunde werden hinsichtlich der Änderung des Blutdrucks, der Herzfrequenz, der Atmung usw. beobachtet, um jede nachteilige Reaktion auf die Infusionen der fixiert-getrockneten Thrombozyten zu erfassen. Die rehydratisierten Thrombozyten werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und durch Infusion verabreicht. Blutproben werden entnommen, um auf die Anwesenheit von markierten rehydratisierten Thrombozyten in dem peripheren Kreislauf, in dem gebildeten Thrombus, in Bereichen der gebrochenen Gefäßwand (Subendothelium) und in anhaftender Form an einer normalen Gefäßwand zu überprüfen. Am

Rand der Ohren des Hundes wurden Einschnitte angebracht sowie Abschnitte zur mikroskopischen Untersuchung auf anhaftende rehydratisierte Thrombozyten präpariert. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

TABELLE 9. Wirkung der Infusion von rehydratisierten Thrombozyten (RP) bei normalen (N) und an der von-Willebrand-Krankheit (vWD) leidenden Hunden

Test	Phänotyp		
	N	N	vWD
Transfusionsreaktion	keine	keine	keine
RP im peripheren Kreislauf	ja	ja	ja
RP vorhanden in gebildeten Thrombi	ja	ja	ja
RP-Haftung am Subendothelium	ja	ja	ja
RP-Haftung am normaler Gefäßwand	nein	nein	nein
RP-Haftung an geschnittener Oberfläche	ja	ja	ja

[0051] Die vorstehenden Beispiele dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung und stellen keine Einschränkung derselben dar. Die Erfindung wird durch die folgenden Ansprüche definiert.

Patentansprüche

1. Verwendung fixiergetrockneter humaner Blutplättchen, die nach Rekonstitution in einem wässrigen, pharmazeutisch verträglichen Träger.

(i) an thrombogenen Oberflächen haften;

(ii) nicht an nicht-thrombogenen Oberflächen haften;

(iii) nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche einer Formänderung (Ausbreitung) unterliegen;

(iv) zur Bildung eines hämostatischen Pfropfs nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche aneinander haften; und

(v) ihren Granulagehalt freisetzen;

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Thrombozytopenie oder einer hämorrhagischen Thrombozytendysfunktion.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die fixiergetrockneten humanen Blutplättchen nach der Rekonstitution in einem wässrigen, pharmazeutisch verträglichen Träger im Vergleich zu normalen humanen Blutplättchen zusätzlich erhöhte Thrombinmengen bilden.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin das Arzneimittel zur intravenösen Verabreichung bestimmt ist.

4. Verwendung von fixiergetrockneten Blutplättchen, die den Plättchenwachstumsfaktor auf der Oberfläche davon exprimieren, zur Herstellung eines Arzneimittels, das zur topischen Applikation zur Förderung der Wundheilung bestimmt ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, worin die fixiergetrockneten Blutplättchen den Plättchenwachstumsfaktor nach Stimulation freisetzen.

6. Verwendung nach Anspruch 4, worin die fixiergetrockneten Blutplättchen im Wesentlichen aus humanen Blutplättchen bestehen, die nach Rekonstitution:

an thrombogenen Oberflächen haften;

nicht an nicht-thrombogenen Oberflächen haften;

nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche einer Formänderung (Ausbreitung) unterliegen;

zur Bildung eines hämostatischen Pfropfs nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche aneinander haften; und

ihren Granulagehalt freisetzen.

7. Pharmazeutische Formulierung, umfassend eine die Wundheilung oder Blutgerinnung fördernde wirksame Menge fixiergetrockneter Blutplättchen, die in einem wässrigen, pharmazeutisch verträglichen Träger rekonstituiert ist, wobei die fixiergetrockneten Blutplättchen im Wesentlichen aus humanen Blutplättchen bestehen, die nach Rekonstitution.

an thrombogenen Oberflächen haften,

nicht an nicht-thrombogenen Oberflächen haften;

nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche einer Formänderung unterliegen;

zur Bildung eines hämostatischen Pfropfs nach dem Anhaften an eine thrombogene Oberfläche aneinander haften; und

ihren Granulagehalt freisetzen.

8. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 7, worin die fixiergetrockneten Blutplättchen nach der Rekonstitution in einem wässrigen, pharmazeutisch verträglichen Träger im Vergleich zu normalen humanen Blutplättchen zusätzlich erhöhte Thrombinmengen bilden.

9. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 7 oder 8, die weiter Albumin umfasst.

10. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 7 oder 8, die weiter humanes Albumin umfasst.

11. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Plättchen mit einer Verbindung fixiert sind, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Formaldehyd, Paraformaldehyd und Glutaraldehyd.

12. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Plättchen mit Permanganat fixiert sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

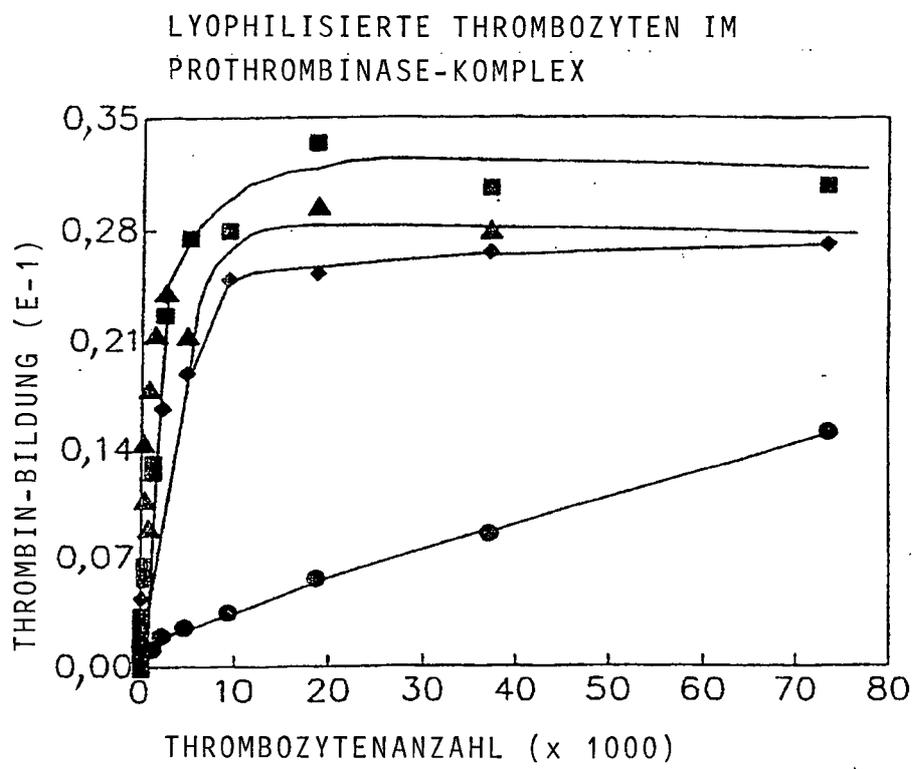


FIG. 1.