



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 16 034 T2 2005.12.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 244 353 B1**

(51) Int Cl.⁷: **A01N 1/02**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 16 034.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/35079**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 989 436.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/045502**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.12.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.06.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(30) Unionspriorität:

171278 P	21.12.1999	US
189285 P	14.03.2000	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Viacell, LLC, Ham Lake, Minn., US; Ericson, Daniel
G., Rochester, Minn., US**

(72) Erfinder:

**ERICSON, G., Daniel, Rochester, US; St. Cyr, John
A., Coon Rapids, US**

(74) Vertreter:

Dörries Frank-Molnia & Pohlman, 80538 München

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE LAGERUNG VON 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

Verwandte Anmeldungen

[0001] Diese Anmeldung zieht Nutzen gemäß 35 U.S.C. aus der vorläufigen US-Patentanmeldung 60/171,278, eingereicht am 21. Dezember 1999, und der vorläufigen US-Patentanmeldung 60/189,285, eingereicht am 14. März 2000.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Etwa 12,6 Millionen Einheiten (einschließlich von etwa 643.000 autologen Spenden) von natürlichem Blut werden in den Vereinigten Staaten jedes Jahr von annähernd acht Millionen freiwilligen Blutspendern gespendet. Diese Einheiten werden in etwa vier Millionen Patienten pro Jahr transfundiert. Typischerweise kann jede gespendete Bluteinheit, als natürliches Blut bezeichnet, in mehrere Komponenten zerlegt werden, wie z.B. rote Blutzellen, Plasma, Gerinnungsfaktoren, gamma-Globulin und Blutplättchen. Der Bedarf an Blut ist groß: an einem gegebenen Tag werden etwa 32.000 Einheiten roter Blutzellen benötigt. Unfallopfer, zu operierende Menschen und Patienten, die eine Behandlung gegen Leukämie, Krebs oder andere Krankheiten erhalten, wie z.B. Sichelzellen-Krankheit und Thalassämie (thalassemia), benötigen alle Blut.

[0003] Weil Patienten selten all die Komponenten des natürlichen Blutes benötigen, ist es gängige Praxis in Blutbanken, das Blut in Komponenten zu zerlegen und nur den Teil zu transfundieren, den der Patient für einen speziellen Zustand oder eine spezielle Krankheit benötigt. Diese Behandlung, die als "Therapie mit Blutkomponenten" bezeichnet wird, erlaubt es verschiedenen Patienten eine Bluteinheit zu nutzen.

[0004] Natürliches Blut ist ein lebendes Gewebe, das durch das Herz, durch Arterien, Venen und Kapillaren zirkuliert und Nährstoffe, Elektrolyte, Antikörper, Wärme und Sauerstoff zu den Geweben des Körpers transportiert. Natürliches Blut enthält rote Blutzellen, weiße Blutzellen und Blutplättchen suspendiert in einer proteinhaltigen Flüssigkeit, die als Blutplasma bezeichnet wird. Wenn Blut behandelt wird, um die Gerinnung zu verhindern, und in einem Behälter stehen gelassen wird, setzen sich die roten Blutzellen am Boden des Behälters ab; das Plasma bleibt oben, und die weißen Blutzellen bilden eine Schicht oberhalb der roten Blutzellen. Üblicherweise wird eine Zentrifuge verwendet, um diese Trennung zu beschleunigen. Das an Blutplättchen reiche Plasma wird dann entfernt und für die weitere Verarbeitung in einen sterilen Beutel gefüllt, um beispielsweise Blutplättchen, Gerinnungsfaktoren, Albumin, Immunglobulin und ähnliche Stoffe abzutrennen.

[0005] Rote Blutzellen enthalten Hämoglobin, ein komplexes, Eisen enthaltendes Protein, das Sauerstoff durch den Körper transportiert und dem Blut seine rote Farbe gibt. Der Prozentsatz des Blutvolumens, das aus roten Blutzellen besteht, wird der "Hämatocrit (hematocrit)" genannt. Der durchschnittliche Hämatocrit eines männlichen Erwachsenen beträgt 47 %. Es gibt etwa eine Milliarde rote Blutzellen in zwei oder drei Tropfen Blut, und für jeweils 600 rote Blutzellen gibt es etwa 40 Blutplättchen und eine weiße Blutzelle. Die roten Blutzellen werden kontinuierlich im Knochenmark produziert und kontinuierlich zerstört und nach durchschnittlich 120 Tagen Verbleib im Kreislaufsystem von der Milz entfernt. Rote Blutzellen werden aus dem natürlichen Blut gewonnen, indem man das Plasma abtrennt, und können den Hämatocrit des Patienten erhöhen, wobei ein Anstieg des Blutvolumens minimiert wird, was für solche Patienten besonders wichtig ist, die an einem mit Blutstau verbundenen Herzversagen (congestive heart failure) leiden. Zu den Patienten, die am meisten aus Transfusionen von roten Blutzellen Nutzen ziehen, zählen diejenigen mit chronischer Anämie aufgrund von Störungen, wie z.B. Nierenversagen, bösartigen Erkrankungen, Magenbluten und akutem Blutverlust, z.B. aufgrund eines Traumas oder einer Operation. Rote Blutzellen können behandelt und für eine ausgedehnte Lagerung bis zu zehn Jahren eingefroren werden.

[0006] Die Lagerung dieser Komponenten variiert. Verbesserungen bei den Flüssigkeiten zur Zellkonservierung haben in den letzten fünfzehn Jahren die Lagerzeit von gefrorenem natürlichem Blut oder von roten Blutzellen von 21 auf 42 Tage gesteigert. Plasma kann gefroren und viel länger aufbewahrt werden. Die isolierten Proteine, wie z.B. Gerinnungsfaktoren, können gefriergetrocknet werden und haben dann eine unbestimmte Lagerzeit.

[0007] Blutplättchen oder Thrombozyten sind sehr kleine zelluläre Komponenten des Blutes, die programmiert sind, unter verschiedenen Umständen aggregieren. Blutplättchen werden im Knochenmark produziert und überleben im Kreislaufsystem durchschnittlich neun oder zehn Tage, bevor sie durch die Milz aus dem Körper entfernt werden. Blutplättchen sind lebenswichtig, weil sie massive Blutverluste zu verhindern helfen, die von Traumata oder der Undichtigkeit von Blutgefäßen, die während normaler täglicher Tätigkeit auftritt, herrüh-

ren.

[0008] Transfusionen von Blutplättchen sind ein wesentlicher Teil der Unterstützung für Patienten, die ein Risiko zum Bluten haben. Die für eine Transfusion verwendeten Blutplättchen können aus zwei Quellen kommen: Konzentrate von Blutplättchen, die aus Einheiten von natürlichem Blut gewonnen wurden und die man Blutplättchen-Konzentrate von Zufallsspendern (random donor platelet concentrates) nennt, oder apheretische Blutplättchen (apheresis platelets), die von einem einzelnen Spender durch eine Phorese (plateletpheresis) gewonnen wurden, ein Verfahren, bei dem man kontinuierlich Blutplättchen eines einzelnen Spenders abtrennt und gleichzeitig das Blut minus die Blutplättchen zurück in den Spender infudiert. Eine Einheit von Blutplättchen ist definiert als die Konzentration von Blutplättchen, die aus einer einzelnen Einheit von natürlichem Blut abgetrennt und in einer kleinen Menge Plasma suspendiert wurde. Die akzeptierte Einheit enthält nicht weniger als $5,5 \times 10^{10}$ Blutplättchen, suspendiert in 40 bis 70 ml Plasma. Die empfohlene Dosis von Blutplättchen ist eine Einheit pro 10 kg Körpergewicht. Dieses Dosierungsschema kann für Säuglinge, Kinder oder Erwachsene angewandt werden, um einen erwarteten Anstieg in der Zahl der Blutplättchen von 5.000 bis 10.000 pro Mikroliter pro Einheit von transfundierten Blutplättchen zu erzielen. Je kleiner der Patient, umso größer die relative Dosis. So kann ein Säugling oder ein kleines Kind einen Anstieg auf 25.000 bis 50.000 pro Einheit von Blutplättchen erfordern.

[0009] Wie auch immer die Art und Weise der Gewinnung oder der Verwendung ist, die Lagerung von Blutplättchen stellt Probleme, die sich bei der Lagerung von natürlichem Blut oder anderen Komponenten nicht stellen. Es wurde zuvor dargelegt, daß natürliches Blut, rote und weiße Zellen bei 4°C über Wochen gelagert werden können. Blutplättchen, die programmiert sind zu aggregieren und als Teil ihrer Funktion dazu in der Lage sein müssen zu aggregieren, aggregieren bei Lagerung in der Kälte zusammen und wenn man sie sich absetzen läßt. Daher ist die Standardmethode für die Lagerung von Blutplättchen bei Raumtemperatur, etwa 20 bis 24°C, mit sanfter Rührung. Selbst unter diesen Bedingungen verlieren die Blutplättchen ihre Funktion nach fünf Tagen.

[0010] Ein weiteres Problem ist die Verunreinigung mit Bakterien. Während das Blut unter den strengsten aseptischen Techniken abgezogen wird, kann unweigerlich eine winzige Anzahl von Bakterien in den Sammelbeutel gelangen. Zusätzlich können weiße Blutzellen eingefangene Bakterien enthalten. Wenn diese Zellen aufbrechen sollten, können Bakterien frei werden. Es wurde berichtet, daß zu diesen Organismen Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Bacillus sp., Micrococcus sp., Streptococcus sp., Klebsiella sp. und Salmonella sp zählen. Der Goldstandard für den Nachweis einer Verunreinigung ist eine negative Petri-Kultur nach zwei Wochen. Es ist berichtet worden, daß eine Verunreinigung von natürlichem Blut für Transfusionszwecke in 48,5 von 100.000 Fällen vorkommt. Die Situation für Blutplättchen ist schlechter: die Verunreinigung von Blutplättchen durch Bakterien ist zehnmal größer als die von Blut. Es wird angenommen, daß dieses höhere Vorkommen auf die Tatsache zurückgeht, daß Blutplättchen bei Raumtemperatur gelagert werden, was das Wachstum der Bakterien begünstigt. Die FDA der Vereinigten Staaten berichtet von 37 Todesfällen seit 1996 infolge von verunreinigten Blutplättchen, während die Zahl der Todesfälle in Frankreich etwa vier pro Jahr beträgt.

[0011] Es besteht ein Bedürfnis, Zusammensetzungen zur Verfügung zu stellen, die die Überlebenszeit der Blutplättchen steigern und die Verunreinigung durch Bakterien vermindern.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Blutplättchen, die unter den bisher bekannten Bedingungen gelagert werden, erfahren eine spontane Aktivierung, so daß nach fünf Tagen nur noch etwa 5 % der Blutplättchen funktional sind. Diese Erfindung stellt Pentosen zur Verfügung, die gelagerten Blutplättchen in Konzentrationen zugefügt werden sollen, die im Bereich von 50 nM bis 15 µM liegen, vorteilhafter von 100 nM bis 5 µM. So behandelte Blutplättchen behalten ihre normale Funktion so lange wie fünf Tage bei und zeigen noch eine signifikante Funktion nach zehn Tagen Lagerung. Ein unerwarteter und zusätzlicher Vorteil des Zusatzes einer Pentose ist die Inhibierung des Wachstums von Bakterien.

Die Funktion der Blutplättchen wird gemessen

- (1) an der internen Expression von Protein an der Zellmembran als Antwort auf die Herausforderung durch einen die Aktivierung induzierenden Antagonisten;
- (2) durch die Fähigkeit, bei Herausforderung durch einen Antagonisten zu aggregieren; und
- (3) durch Sekretion von Adenosintriphosphat.

[0013] Die interne Proteinexpression kann durch die Konjugation eines Moleküls mit einem fluoreszierenden Farbstoff gemessen werden, mit nachfolgender Sortierung in einem Gerät für die Sortierung von fluoreszierenden Zellen. Im allgemeinen ist es vorteilhaft, zwei monoklonale Antikörper zu verwenden, von denen der eine an ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Molekül bindet, und einen zweiten, der an ein Molekül auf der Zelloberfläche bindet, das nur nach Aktivierung exprimiert wird. Jeder monoklonale Antikörper wird an einen verschiedenen Farbstoff gebunden, der durch Spektrofluorometrie unterschieden werden kann. Bei der bevorzugten Ausführungsform ist das normalerweise auf der Zelloberfläche exprimierte Molekül GPIIb/IIIa; das Molekül, das auf der Zelloberfläche nach Aktivierung exprimiert wird, ist P-Selectin. Es ist gut in der Technik bekannt, monoklonale Antikörper gegen Proteine herzustellen. Das US-Patent Nr. 5,470,738, erteilt in 1995 an Freilich et al., ist ein Beispiel für ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen GPIIIa. Ein anderer gegen Blutplättchen gerichteter monoklonaler Antikörper ist derjenige gegen GPIV, wie im US-Patent Nr. 5,231,025, erteilt in 1993 an Gralisch, offenbart. Es ist jedoch am einfachsten, Antikörper im Handel von solchen Firmen wie Becton-Dickinson (Philadelphia) zu kaufen.

[0014] Eine Grundmessung (basal measurement) der spontanen Aktivierung wird durchgeführt, und die Zellen werden dann mit einem Antagonisten herausgefordert. Der Unterschied zwischen Zellen, die zur Aktivierung herausgefordert wurden, minus die Grundmessung ist ein Maß für die Zellfunktion. Bei der bevorzugten Ausführungsform ist der Antagonist 10 nM Thrombin.

[0015] Ein anderer Parameter für die Funktion der Blutplättchen ist ihre Fähigkeit zu aggregieren, wenn sie durch einen Agonisten herausgefordert werden. Die Suspension der Blutplättchen ist dicht und milchig weiß. Die Aggregation und das nachfolgende Absetzen der Aggregate kann visuell abgeschätzt oder mit einem Densitometer gemessen werden.

[0016] Ein weiteres Maß für die Funktion der Blutplättchen ist die Sekretion von ATP. Blutplättchen, die gut funktionieren können, sind in der Lage, ATP zu sekretieren, während Zellen, die bereits aktiviert sind oder ihre Funktion auf andere Weise verloren haben, ATP nicht sekretieren können.

[0017] Für die Zwecke der Beschreibung dieser Erfindung haben die folgenden Bezeichnungen die folgenden Bedeutungen:

[0018] Agonist bedeutet einen beliebigen Liganden, der sich an ein Protein auf der Zelloberfläche eines Blutplättchens bindet und die Aktivierung der Funktion des Blutplättchens bewirkt. Zu den Agonisten zählen Thrombin, Epinephrin, ADP und Kollagen.

[0019] Pentose bedeutet einen Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen, der D-Ribose oder Xylulose ist oder ein Vorläuferstoff für Ribose mit fünf Kohlenstoffatomen. Die Pentose, die sich von dem Alkohol Xylitol (Xylit) ableitet, ist ebenfalls in die Definition der Pentose einbezogen.

[0020] Standardbedingungen für die Lagerung von Blutplättchen bedeutet eine Suspension mit einer Konzentration von etwa 10×10^5 bis 10×10^{10} Blutplättchen pro Milliliter in einer balancierten oder ausgewogenen (balanced), isotonischen Salzlösung mit einem anfänglichen pH von mindestens 7, schwach bewegt oder rotiert, in einem gasdurchlässigen Lagerbehälter, der bei Raumtemperatur gehalten wird.

Beschreibung der Zeichnungen

[0021] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Morphologie der Blutplättchen.

[0022] [Fig. 2](#) ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Blutplättchen vor und nach der Aktivierung.

[0023] [Fig. 3](#) zeigt die Grundexpression von P-Selectin zwei Stunden nach der Gewinnung der Blutplättchen (a) alle Blutplättchen und (b) aktivierte Blutplättchen.

[0024] [Fig. 4](#) zeigt die Grundexpression von Selectin zwei Stunden nach der Gewinnung der Blutplättchen (a) alle Blutplättchen und (b) mit Thrombin aktivierte Blutplättchen.

[0025] [Fig. 5](#) zeigt Blutplättchen, die drei Tage lang ohne Pentose gelagert wurden, (a) alle Blutplättchen und (b) aktivierte Blutplättchen.

[0026] [Fig. 6](#) zeigt Blutplättchen, die drei Tage lang ohne Pentose gelagert wurden, (a) alle Blutplättchen und (b) mit Thrombin aktivierte Blutplättchen.

[0027] [Fig. 7](#) zeigt die Grundexpression von P-Selectin nach drei Tagen mit Ribose.

[0028] [Fig. 8](#) zeigt die Expression von P-Selection bei Lagerung über drei Tage mit Ribose nach Aktivierung durch Thrombin.

[0029] [Fig. 9](#) ist eine schematische Darstellung des Luciferin/Luciferase-Assays.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0030] Blutplättchen sind kernlose Zellfragmente, die von großen Knochenmarkszellen, Megakaryozyten genannt, abgetrennt werden. Da sie keinen Kern haben, verfügen sie über keinen Mechanismus für die Erneuerung von verbrauchten Proteinen. So bleiben sie nichtfunktional, wenn sie einmal aktiviert wurden oder ihre Funktion verloren haben. Obwohl Blutplättchen nicht in der Lage sind, Protein für die Zellerneuerung zu synthetisieren, enthalten sie mehr Glykogen pro Einheit Zellmasse als fast jede andere Zelle. Wie in [Fig. 1](#) dargestellt, enthalten Blutplättchen auch Mitochondrien, die Organellen, die die oxidative Phosphorylierung (oxidation phosphorylation) ausführen, die zur Synthese von ATP führt. Der Lagerbehälter muß gasdurchlässig sein, so daß die oxidative Phosphorylierung gegenüber der Glykolyse begünstigt wird, was zur Produktion von Lactat und zur Erniedrigung des pH führt. Weiterhin haben Blutplättchen dichte Körnchen, die Adenosintriphosphat enthalten. Die Blutplättchen sind somit gut ausgerüstet mit Energie erzeugenden Substraten und den Organellen, die für die Ausübung ihrer Funktion erforderlich sind. [Fig. 1](#) illustriert auch einige der vielen Rezeptoren an der Zelloberfläche, die eine Rolle bei der Regulierung der Funktion des Blutplättchens spielen, und einige der internen Proteine, die nach der Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Einige besonders brauchbare Agonisten für die experimentelle Induzierung der Aktivierung sind Thrombin, Epinephrin, ADP und Kollagen, obwohl auch andere Stoffe in dieser Erfindung brauchbar sind. Gleichmaßen können beliebige Rezeptoren an der Zelloberfläche verwendet werden, um die Gesamtzahl der Blutplättchen zu bestimmen, wenn auch der Rezeptor GPIIb/IIIa ein gut brauchbarer Marker ist. In gleicher Weise kann ein beliebiges internes Protein, das sich nach der Aktivierung durch einen Agonisten auf der Oberfläche des Blutplättchens zeigt (exprimiert wird), verwendet werden, um den Prozentsatz an aktivierten Zellen zu schätzen, wenn auch P-Selectin besonders brauchbar ist. Die Aktivierung bewirkt morphologische Veränderungen, wie aus [Fig. 2](#) ersichtlich ist.

[0031] P-Selectin ist ein internes Protein, das nach der Aktivierung auf der Oberfläche des Blutplättchens exponiert ist. Wenn Blutplättchen einmal aktiviert sind, können sie nicht erneut aktiviert werden; das bedeutet, daß sie nicht funktional sind. Blutplättchen, die aggregiert sind, sind gleichmaßen nicht funktional. Die Messung von P-Selectin vor und nach der Aktivierung mit Thrombin ergibt ein Maß für die Fähigkeit der Blutplättchen, aktiviert zu werden.

Beispiel 1

Assay für die Expression von P-Selectin

[0032] Die Expression von P-Selectin als Antwort auf eine Herausforderung mit 10 nM Thrombin ist eine sehr genaue und quantitative Methode, um die Funktion der Blutplättchen zu bestimmen, wobei man Verfahren der Durchflußzytometrie (flow cytometry) verwendet. Ein monoklonaler Antikörper gegen den Rezeptor GPIIb/IIIa des Blutplättchens (Becton-Dickinson) wird mit grüner Fluoreszenz konjugiert, wodurch alle Blutplättchen mit einer Grün-Detektion markiert werden. Ein roter PE-konjugierter monoklonaler Antikörper (Becton-Dickinson) wird zugesetzt, der nur Blutplättchen anfärbt, die aktiviert sind und P-Selectin auf der Membran des Blutplättchens exprimieren (ruhende, nicht aktivierte Blutplättchen haben kein P-Selectin, das an der Oberfläche exprimiert wird und somit für den Antikörper zugänglich ist). Etwa 10.000 bis 25.000 Blutplättchen werden gezählt und auf Expression von P-Selectin hin bestimmt, und der Prozentsatz der positiven Zellen wird definiert als aktivierte Blutplättchen, die P-Selectin exprimieren. Blutplättchen, die einmal aktiviert sind, können nicht ein zweites Mal aktiviert werden; d.h. daß sie im wesentlichen nicht funktional sind.

Beispiel 2

Bestimmung der Konzentration an Ribose für die Lagerung von Blutplättchen

[0033] Es wurde vor Jahren von Dawson (Transfusion 21:215–218 (1981)) vorgeschlagen, daß Ribose in der Konzentration von 15 mM für gelagertes natürliches Blut vorteilhaft ist. Es wurde angenommen, daß die Ribose wirkte, indem sie die Energieniveaus der Zellen steigerte, wie ausführlich in dem US-Patent Nr. 6, 159,942 diskutiert wird. Probanden, die nach diesem Patent Ribose zu sich nahmen, tolerierten die Einnahme von 30 g Ribose pro Tag ohne Krankheitserscheinungen. Es sollte jedoch bemerkt werden, daß das Milieu für die Lagerung von Blutplättchen eine karge (austere) Umgebung ist, in der die homöostatischen und puffernden Mechanismen der Nieren, Lungen und Leber eines intakten Organismus fehlen. Verschiedene Konzentrationen an D-Ribose wurden untersucht, um den optimalen Wert für die Lagerung von Blutplättchen zu ermitteln. Die 15 mM, welche Dawson für die Lagerung von natürlichem Blut verwendete, waren der Ausgangspunkt, aber dieser Gehalt an D-Ribose führte zu einer hohen Produktion von Lactat mit einhergehendem niedrigem pH. Ein Abfall des pH unter etwa 6 ist für Blutplättchen toxisch, und so wurden niedrigere Konzentrationen untersucht. Beutel mit Blutplättchenkonzentraten wurden von einem lokalen Transfusionszentrum innerhalb von zwei Stunden nach der Abnahme von dem Spender erhalten. Den Blutplättchen wurde entweder der D-Ribose-Cocktail direkt in den Beutel zugesetzt oder die Blutplättchen wurden in eine Reihe von zehn Gefäßen aufgeteilt, wobei in jedes der Gefäße 2 ml Blutplättchen eingefüllt wurden. Die Funktion der Blutplättchen wurde durch Sekretion von ATP, Aggregation der Blutplättchen, Expression von P-Selectin, Zählung der Blutplättchen und den pH bestimmt. Die Funktion der Blutplättchen wurde alle 24 Stunden gemessen. Die Beutel und Gefäße wurden während der Dauer des Versuchs bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Rad plaziert.

[0034] Für die Prüfung der Konzentration wurden die Blutplättchen fünf Tage in einer Standard-Lagerlösung für Blutplättchen bei Raumtemperatur unter sanfter Bewegung mit oder ohne verschiedene Gehalte an Ribose aufbewahrt. Nach fünf Tagen wurde der Test auf exprimiertes P-Selectin durchgeführt. Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, war 1,5 µM bis 150 nM Ribose optimal für die Erhaltung der Aktivität.

Tabelle I

Wirkung von D-Ribose auf fünf Tage gelagerte Blutplättchen

Probe	Expression von P-Selectin	% Positiv	Differenz (% aktivierbare Blutplättchen)
O Vergleich	15.390	37,7	
O Vergleich+Thrombin	15.315	42,5	4,8
1,5 mM	21.605	40,4	
1,5 mM+Thrombin	32.400	60,0	34,4
15 µM	3.275	6,1	
15 µM+Thrombin	34.960	64,4	58,3
150 nm	2.465	5,1	
150 nm+Thrombin	41.480	65,7	60,6
150 pM	11.260	31,7	
150 pM+Thrombin	15.475	42,6	10,9

[0035] Blutplättchen, die fünf Tage lang ohne Ribose gelagert wurden, waren im wesentlichen nicht funktional,

wie der Test der Expression von P-Selectin bei Herausforderung mit Thrombin zeigt. 1,5 mM und 150 nM D-Ribose erlaubten den Blutplättchen, etwa 60 % ihrer Aktivität für die Expression von P-Selectin zu erhalten, während 150 μ M D-Ribose für die Erhaltung der Funktion unwirksam war.

[0036] Kurz gesagt zeigen die Daten der Durchflußzytometrie, daß D-Ribose die Alterung von Blutplättchen während der Lagerung verhindert und die Antwort auf die Herausforderung durch einen Agonisten unter diesen Bedingungen mit der Zeit nicht schwächer wird. Einfach gesagt, die Blutplättchen sind am fünften Tag so aktiv wie sie am ersten Tag waren, wenn sie mit D-Ribose behandelt wurden.

4. Expression von P-Selectin in Blutplättchen, die drei Tage gelagert wurden.

[0037] Blutplättchen wurden suspendiert in einem Standard-Cocktail für die Lagerung von Blutplättchen und behandelt, wie zuvor beschrieben. Die US-Patente Nrn. 4,828,975, erteilt in 1989 an Murphy, und 4,447,415, erteilt in 1984 an Rock, offenbaren mehrere üblicherweise verwendeten balancierten Salzlösungen, die in dieser Erfindung brauchbar sind. Eine beliebige Lösung kann verwendet werden, vorausgesetzt sie ist isotonisch (zwischen etwa 310 und 140 mOsm), hat einen pH von mindestens 7,0 und enthält Magnesiumionen. Representative Cocktails sind:

Tabelle II

Typische balancierte Salzlösungen für die Lagerung von Plasma

Bestandteil	Anmelder	Murphy	Rock
Zitrat	3,8 %	13–20 mM	11,8
Kalium	3,6–4,8 mEq/l	2,5–5,5 mM	2,4
Natrium	135–145 mEq/l	160–215 mM	166
Calcium	2,0	2,5	1,8
Magnesium	1,7–2,1 mM	0,25–1 mM	1,2
Bicarbonat	um pH auf 7,4 zu bringen	20–50 mM	um pH auf 7,4 zu bringen
Glukose	0 bis Millimolar	0	22
D-Ribose	50 nM bis 1,5 μ M	0	0

[0038] Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ist die Zusammensetzung der gelösten Stoffe dieser drei Lösungen für die Lagerung von Blutplättchen sehr ähnlich. Beliebige dieser Lösungen oder andere Lösungen können in dieser Erfindung verwendet werden, vorausgesetzt, daß Magnesium eine Komponente ist und die Lösung isotonisch ist und der pH mindestens 7 beträgt. Auch Plasma kann als die Lösung verwendet werden, der Ribose zugesetzt wird. Die Metallsalze sind typischerweise Chlorid-, Phosphat-, Carbonat-, Bicarbonat- oder Sulfat-Salze. Zitrat ist von der Blutabnahme her allgemein zugegen, wo es als Antikoagulans zugegen ist.

[0039] Blutplättchen wurden auf die Expression von P-Selectin untersucht, um einen Grundwert zu ermitteln. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt ist, sind nach zwei Stunden bereits 2,2 % der Blutplättchen aktiviert worden. Wenn sie durch Zusatz von 10 nM Thrombin aktiviert werden, sind 80,9 % der Zellen fähig, aktiviert zu werden, wie in [Fig. 2](#) gezeigt wird. Nach drei Tagen Lagerung unter Standardbedingungen waren 61,2 % der Blutplättchen aktiviert worden, d.h. sie waren im wesentlichen nicht funktional, wie aus [Fig. 5](#) hervorgeht. Wenn ein getrennter aliquoter Teil mit Thrombin herausgefordert wurde, war keine zusätzliche Aktivierung festzustellen. Im Gegenteil, die mit 153 nM D-Ribose gelagerten Zellen zeigten nur 5 % positive (aktivierte) Zellen, und die Aktivierung mit Thrombin ergab, daß selbst nach drei Tagen Lagerung 78,8 % Aktivierungsaktivität erhalten geblieben war.

[0040] Eine Studie über längere Zeiträume zeigte, daß Blutplättchen, die mit 150 nM D-Ribose gelagert worden waren, eine Aktivität von mehr als 75 % selbst nach acht Tagen Lagerung und mehr als 50 % Aktivität nach zehn Tagen Lagerung beibehielten.

5. Sekretion von ATP

[0041] Die in [Fig. 1](#) gezeigten dichten Körnchen der Blutplättchen enthalten ATP, das als Antwort auf Agonisten für Blutplättchen, wie z.B. Thrombin, Collagen oder Adenosindiphosphat (ADP), freigesetzt wird. Die Freisetzungsreaktion von ATP aus Blutplättchen dient als ein anderes Verfahren zur Überwachung der Funktion der Blutplättchen. Es gibt viele Methoden, um ATP zu analysieren. Ein praktisches Verfahren ist die gut bekannte Luciferin/Luciferase-Reaktion (Sigma Chemical, St. Louis). Dieser Assay leitet sich von dem Licht erzeugenden System der Feuerfliege ab. Das Substrat Luciferin wird in Gegenwart von ATP durch das Enzym Luciferase gespalten, wobei Licht emittiert wird. Das emittierte Licht wird mit einem Photoelektronenvervielfacher gemessen.

[0042] Suspensionen von Blutplättchen, die etwa 350 Einheiten in 40 µl enthalten, wurden mit 10 µl Luciferin/Luciferase-Reagenz gemischt. Ein Agonist wird injiziert. Wenn die dichten Körnchen der Blutplättchen ATP freisetzen, findet die Biolumineszenz-Reaktion statt, die durch den Photoelektronenvervielfacher gemessen wird. [Fig. 9](#) zeigt ein Diagramm der Reaktion und der Messanordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird festgehalten, und wenn die Funktion der Blutplättchen nachläßt, läßt auch die Geschwindigkeit nach. Die Gesamtmenge an ATP wurde gemessen, indem die Zellen mit Triton lysiert wurden und der ATP-Gehalt bestimmt wurde. Die Ergebnisse, die in Tabelle III wiedergegeben sind, werden als Intakt-Rate (intact rate) der Sekretion von ATP ausgedrückt.

Tabelle III

Sekretion von ATP als Antwort auf 10 nM Thrombin: Vergleich unbehandelte Blutplättchen gegen mit 150 nM D-Ribose behandelte Blutplättchen

Probe	Tag	Rate	ATP gesamt
Unbehandelt	1	1,9	3,1
Ribose	1	1,9	3,0
Unbehandelt	3	0,67	1,2
Ribose	3	1,9	3,2
Unbehandelt	5	0,28	0,72
Ribose	5	1,7	3,4
Unbehandelt	7	0,00	0,00
Ribose	7	1,6	3,4

[0043] Die Ergebnisse in Tabelle III zeigen, daß die Daten der ATP-Sekretion von Blutplättchen, die mit D-Ribose behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Blutplättchen eine starke Wirkung zeigen, die mit keinem anderen Konservierungsmittel gefunden wurde. Es wurde beobachtet, daß die unbehandelten Blutplättchen an jedem Tag der Lagerung an Aktivität verloren, und nach fünf Tagen war die durchschnittliche Rate weniger als 15 %, während ATP-Gesamt weniger als 25 % des Grundwertes (baseline) betrug. Bei Blutplättchen, die mit optimalen Mengen an D-Ribose behandelt wurden, betrug die mittlere Aktivität nach fünf Tagen noch 90 % des Grundwertes, während die Aktivität nach sieben Tagen noch oberhalb von 80 % lag.

[0044] Die Sekretion von ATP hängt von der Dosis ab. 15 mM haben keine Wirkung (und es wurde festgestellt, daß diese Dosis toxisch für Blutplättchen ist), und nach acht aufeinanderfolgenden seriellen Verdünnungen betrug die Konzentration 1,5 nM, und keine konservierende Wirkung wird festgestellt. Daher wurde dieser Test bei einer Konzentration von 150 nM D-Ribose durchgeführt. Es sollte bemerkt werden, daß der Gehalt der behandelten Zellen an ATP-Gesamt tatsächlich um mehr als 10 % anstieg.

6. Aggregation der Blutplättchen

[0045] Als ein zweites Maß für die Wirkung von Ribose auf Blutplättchen wurde die Aggregation der Blutplättchen bestimmt. Die Aggregation der Blutplättchen ist eine entscheidende Funktion der Blutplättchen-Aktivität; Blutplättchen, die nicht aggregieren können, sind im wesentlichen ohne Funktion. Blutplättchen wurden gelagert, wie zuvor beschrieben. Die optische Dichte der Suspension wurde vor und nach Herausforderung durch Thrombin gemessen. In diesem Test zeigten Blutplättchen, die in 1,5 mM oder 150 pM D-Ribose gelagert wurden, auf Herausforderung keine Aggregation, während 15 µM D-Ribose einen sehr schwachen Effekt zeigte. In 150 nM D-Ribose gelagerte Blutplättchen zeigten eine starke Aggregation bei Herausforderung mit Thrombin.

[0046] Die Aggregation der Blutplättchen wurde mit einem Blutplättchen-Aggregometer (Chronolog, Inc., Irvine, CA) gemessen. An Blutplättchen reiche, trübe Suspensionen wurden in einer Küvette gerührt, und die Transmission von Licht durch die Probe im Vergleich zu einer an Blutplättchen armen Blindprobe (platelet poor blank) wird festgehalten. Wenn ein aggregierendes Agens zugefügt wird, werden aktivierte Blutplättchen mit exponierten Fibrinogen-Rezeptoren (GPIIb/IIIa) in einem Medium, das Calcium und Fibrinogen enthält, in engen Kontakt miteinander gebracht und bilden zunehmend große Aggregate von Blutplättchen, was von einer Abnahme der Trübung begleitet wird. Die Veränderung der optischen Dichte wurde dann von dem Instrument in Prozent Aggregation umgewandelt. Einfach gesagt, es geht mehr Licht durch die Küvette, wenn Blutplättchen aggregieren.

[0047] Die Aggregation der Blutplättchen als Antwort auf 10 nM Thrombin am dritten Tag zeigte, daß bei unbehandelten Blutplättchen nur in einer von fünf Proben eine aggressive Aggregation eintrat, während alle fünf mit D-Ribose behandelten Proben von Blutplättchen am dritten Tag eine aggressive Antwort zeigten. Am fünften Tag zeigten vier von fünf mit Ribose behandelten Proben von Blutplättchen eine Antwort, und am siebten Tag waren drei von fünf mit D-Ribose behandelte Proben von Blutplättchen in der Lage, als Antwort auf die Herausforderung mit Thrombin zu aggregieren.

7. pH

[0048] Der pH der Blutplättchen-Konzentrate wurde täglich überwacht. Die Standardregeln der Transfusion verlangen, daß die Blutplättchen nicht mehr verwendet werden, wenn der pH-Wert unter 6,4 abfällt. Der Zusatz von D-Ribose kann die Lactat-Produktion steigern, was einen Abfall des pH verursachen würde. Mit D-Ribose in hohen Gehalten (15 nM) behandelte Proben zeigen typischerweise einen Abfall des pH auf 6,0 nach vier Tagen Lagerung. Bei der bevorzugten Konzentration von 150 nM bleibt der pH jedoch konstant, obwohl Lactat ansteigt.

8. Andere Pentosen

[0049] Es ist bekannt, daß andere Pentosen ähnliche Wirkungen wie D-Ribose haben können, entweder durch intrazelluläre Umwandlung in Ribose oder durch eine direkte Wirkung. Ribulose-5 Phosphat, Xylulose-5-phosphat und Xylitol wurden auf eine konservierende Wirkung auf gelagerte Blutplättchen nach den Methoden der Beispiele 1 bis 6 untersucht.

A. Ribulose-5-phosphat:

[0050] Ribulose-5-phosphat wurde von Sigma Chemical (St. Louis) gekauft und der Standard CPD-Lösung für die Lagerung von Blutplättchen zugesetzt. Die folgenden funktionalen Parameter wurden geprüft: Sekretion von ATP als Antwort auf 10 nM Thrombin; Aggregation der Blutplättchen; Expression von P-Selectin als Antwort auf Herausforderung mit Thrombin; Veränderung des pH; und Zahl der Blutplättchen. Beutel mit Blutplättchen-Konzentrat wurden von einem Transfusionszentrum innerhalb von Stunden nach der Blutabnahme erhalten. Aliquote Teile wurde den Beuteln mit den Konzentraten als Proben entnommen, und diesen wurde Ribulose-5-Phosphat zugesetzt, so daß die endgültigen Konzentrationen von 1,5 mM bis runter auf 150 pM gingen. Proben ohne Ribulose-5-phosphat wurden zum Vergleich analysiert. Die Proben wurden alle 24 Stunden auf Funktion der Blutplättchen analysiert. Kein Unterschied zu den Vergleichsproben wurde für irgendeinen der oben gemessenen Parameter festgestellt.

B. Xylulose-5-phosphat

[0051] Xylulose-5-phosphat wurde von Sigma gekauft und der CPD-Lösung für die Lagerung von Blutplätt-

chen zugesetzt. Die experimentellen Verfahren wurden ausgeführt, wie in Beispiel 8 (A). Es wurde gefunden, daß Blutplättchen, die mit Xylulose-5-phosphat gelagert wurden, gemessen an der Sekretion von ATP nach fünf Tagen 64,5 % des Grundwertes zurückbehalten hatten. Die Aggregation der Blutplättchen war nach fünf Tagen schwach, während die Blutplättchen des Vergleichs nicht aggregierten. Die spontane Expression von P-Selectin der fünf Tage lang mit Xylulose-5-phosphat behandelten Blutplättchen betrug 37,5 % gegenüber 64,1 % für die Blutplättchen des Vergleichs. Als Antwort auf die Herausforderung mit 10 nM Thrombin stieg die Expression von P-Selectin auf 67,7 % an.

C. Xylitol

[0052] Überraschenderweise zeigte der mit Pentosen verwandte Alkohol Xylitol einigen Nutzen für die Konservierung der Funktion der Blutplättchen. Die Trends waren jedoch widersprüchlich, und genauere Schlußfolgerungen konnten nicht gezogen werden.

9. Reduktion der Verunreinigung mit Bakterien

[0053] Es wurde überraschend gefunden, daß der Zusatz von D-Ribose zu dem Lagerungscocktail zu einem geringeren Vorkommen an Verunreinigung durch Bakterien führte. Die Verunreinigung durch Bakterien wurde gemessen durch Zählung der Kolonien in üblichen Petri-Schalen, die mit der Testlösung geimpft waren. Es wird angenommen, daß die Glukose-Konzentration im millimolaren Bereich in den meisten Lösungen zur Lagerung von Blutplättchen zum Wachstum von Bakterien beiträgt. Wie zuvor bemerkt, beschreibt Murphy (Tabelle II) eine von Glukose freie Lösung für die Lagerung von Blutplättchen. Die Eliminierung oder Reduktion der Glukose-Gehalte von millimolaren zu mikromolaren Konzentrationen hat eine starke Wirkung auf die Reduktion der Verunreinigung durch Bakterien, jedoch war die Funktion der Blutplättchen nach fünf Tagen nur gering, gemessen an der Sekretion von ATP und an der Expression von P-Selectin. Es wurde gefunden, daß Glukose eliminiert oder auf mikromolare Konzentrationen in der Lagerlösung reduziert werden konnte, wenn D-Ribose in der bevorzugten Konzentration von 150 nM der Lösung zugesetzt wurde, während die Funktion der Blutplättchen ähnlich derjenigen war, die in den obigen Beispielen 1 bis 6 für Blutplättchen gefunden wurde, die in Gegenwart von Glukose gelagert waren.

10. Mechanismus der Konservierung der Funktion von Blutplättchen durch D-Ribose

[0054] Keiner der Standardmechanismen, die für die durch Ribose bewirkte Steigerung der physiologischen Funktion durch die Produktion von ATP vorgeschlagen wurde, scheint auf die Konservierung von Blutplättchen anwendbar zu sein. Die sehr geringe optimale Dosierung im nanomolaren Bereich würde als nicht signifikant für die Energieproduktion erscheinen. Blutplättchen haben sehr hohen Stoffwechsel, insbesondere wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden. Sie weisen hohe Gehalte an Glykogen auf, eine Energiequelle für die anaerobe Glykolyse; sowie Mitochondrien, die eine oxidative Phosphorylierung ausführen können. Es ist bemerkt worden, daß die Blutplättchen Sauerstoff für bestes Überleben benötigen, möglicherweise weil die Glykolyse zur Produktion von Lactat führt. Trotzdem zeigt diese Erfindung klar, daß D-Ribose ein konservierendes Agens für die Konservierung von Blutplättchen ist.

Patentansprüche

1. Medium für die Lagerung von Blutplättchen, enthaltend eine isotonische, im Gleichgewicht befindliche Salzlösung und eine Pentose in einer Konzentration von 50 nanomolar bis 15 mikromolar, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose, Xylulose-5-phosphat oder Xylitol handelt.

2. Medium gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose handelt.

3. Medium gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Pentose in einer Konzentration von 100 nanomolar bis 5 micromolar vorliegt.

4. Medium gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medium ferner ein Magnesiumsalz umfasst, dass in einer Konzentration von 0,5 bis 2,5 millimolar vorliegt.

5. Medium gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, aus dem Glukose ausgeschlossen wurde.

6. Medium gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei der im Gleichgewicht befindlichen Salzlösung um Blutplasma handelt.

7. Flüssige Zusammensetzung, umfassend Blutplättchen; eine isotonische, im Gleichgewicht befindliche Salzlösung oder Plasma; und eine Pentose mit einer Konzentration von 50 nanomolar bis 15 mikromolar, bei der es sich um D-Ribose, Xylulose-5-phosphat oder Xylitol handelt.

8. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose handelt.

9. Verfahren zur Lagerung von Blutplättchen, umfassend
(a) Abtrennen von Blutplättchen aus Gesamtblut oder Plasma;
(b) Suspendieren der Blutplättchen in isotonischer, im Gleichgewicht befindlicher Salzlösung oder in Plasma in einer Konzentration von etwa 10^6 bis etwa 10^{11} Blutplättchen pro Milliliter in einem gasdurchlässigen Lagerungsbeutel; und
(c) Hinzufügen einer Pentose, bei der es sich um D-Ribose, Xylulose-5-phosphat oder Xylitol handelt, zur genannten Lösung oder zu genanntem Plasma in einer Menge, die ausreicht, um eine Pentose-Konzentration in der genannten Suspension von 50 nanomolar bis 15 mikromolar bereitzustellen. 10 Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose handelt.

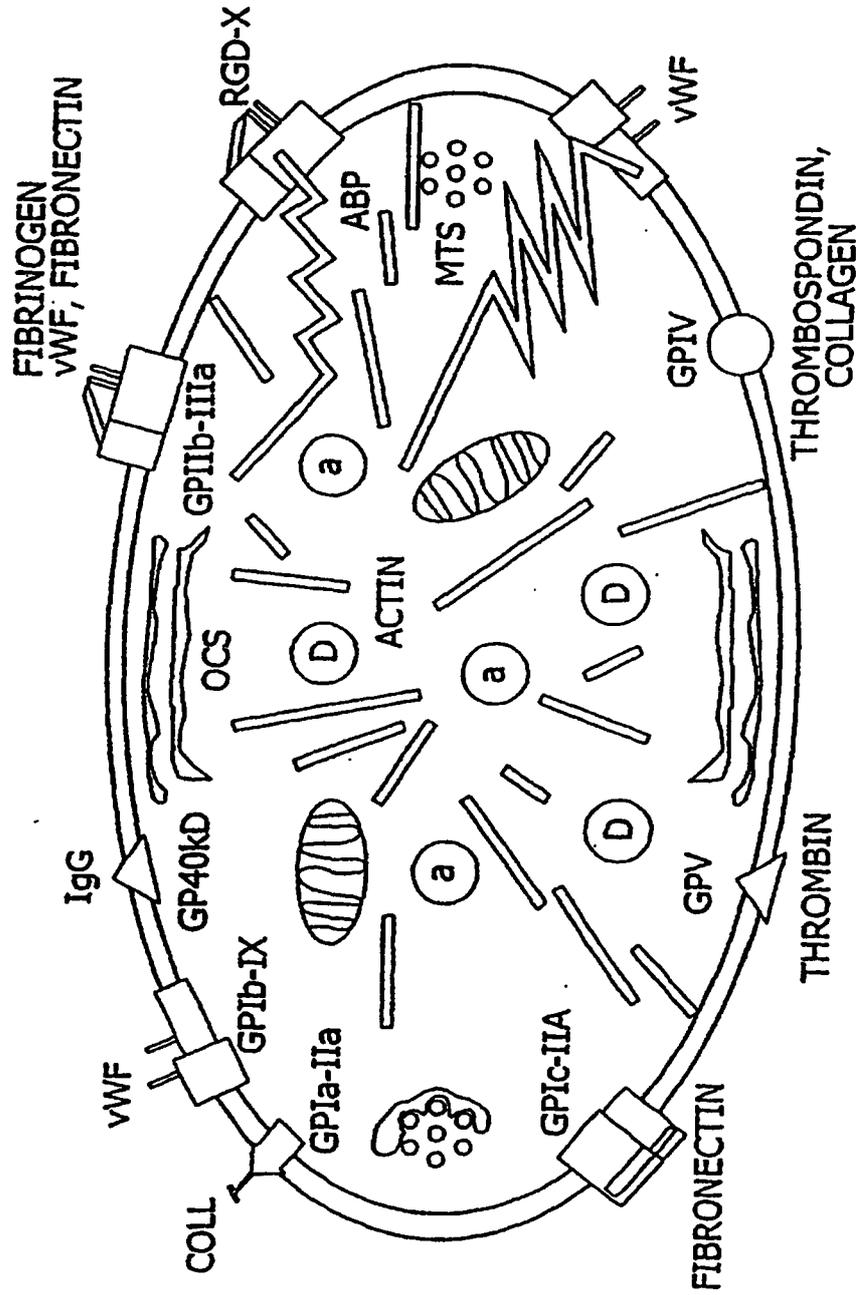
10. Verwendung eines Mediums für die Lagerung von Blutplättchen, enthaltend eine isotonische, im Gleichgewicht befindliche Salzlösung und eine Pentose in einer Konzentration von 50 nanomolar bis 15 mikromolar, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose, Xylulose-5-phosphat oder Xylitol handelt, zur Verlängerung der Funktion der gelagerten Blutplättchen, die messbar ist anhand
(1) der internen Proteinexpression auf der Zellmembran in Antwort auf Behandlung mit einem die Aktivierung induzierenden Agonisten;
(2) der Fähigkeit, bei Behandlung mit einem Agonisten zu aggregieren; und
(3) der Sekretion von Adenosin-triphosphat; und/oder zur Reduktion von bakterieller Kontamination.

11. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei die Pentose in einer Konzentration von 100 nanomolar bis 5 mikromolar vorliegt.

12. Verwendung gemäß Anspruch 11 oder 12, wobei es sich bei der Pentose um D-Ribose handelt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Morphologie der Blutplättchen



Figur 1

Blutplättchen - Rasterelektronenmikroskop

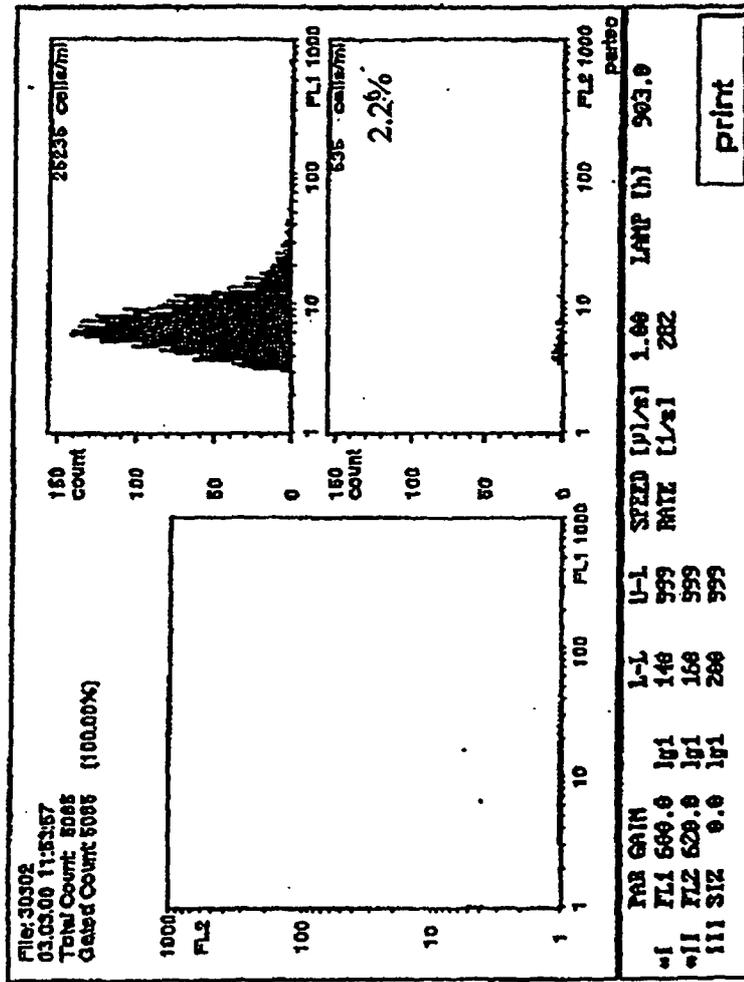


Blutplättchen im Grundzustand

Aktivierte Blutplättchen

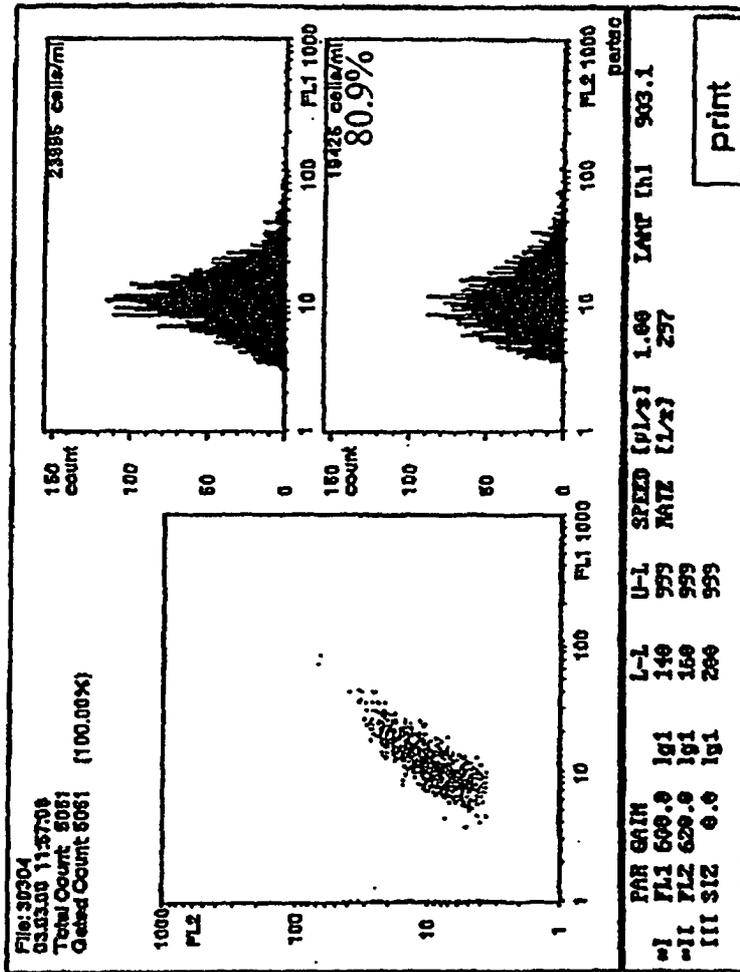
Figur 2

**P-Selectin - Grundwert
2 Stunden nach Entnahme von dem Spender**



Figur 3

**P-Selectin - 10nM Thrombin
2 Stunden nach Entnahme von dem Spender**



Figur 4

**Expression von P-Selectin - Grundwert
3 Tage Lagerung bei Raumtemperatur ohne D-Ribose**

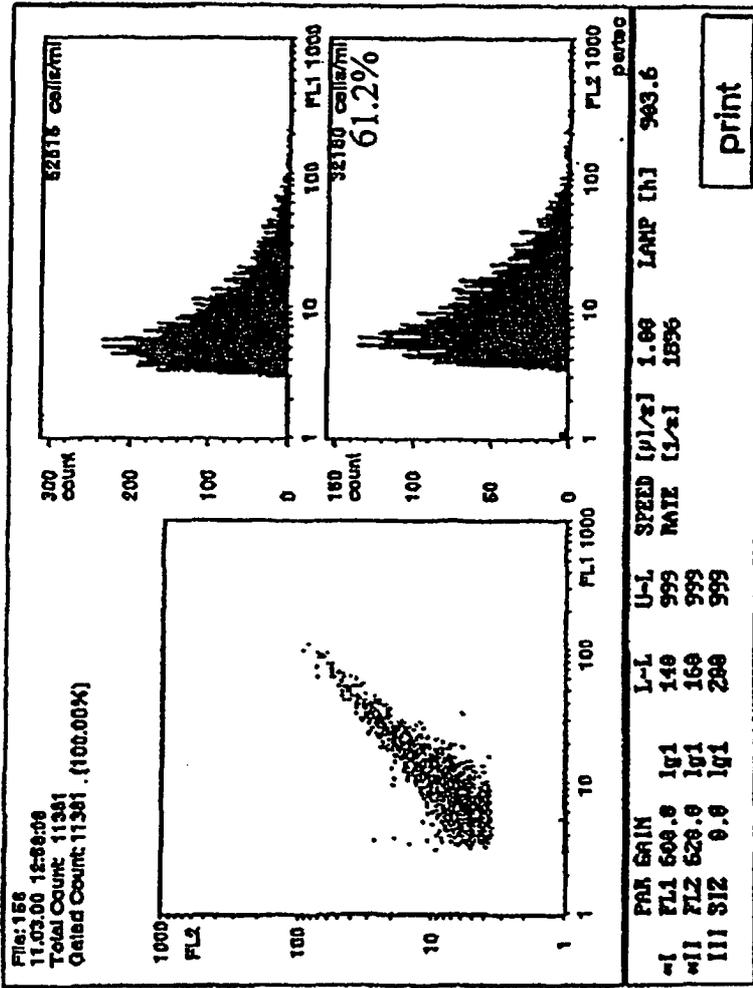
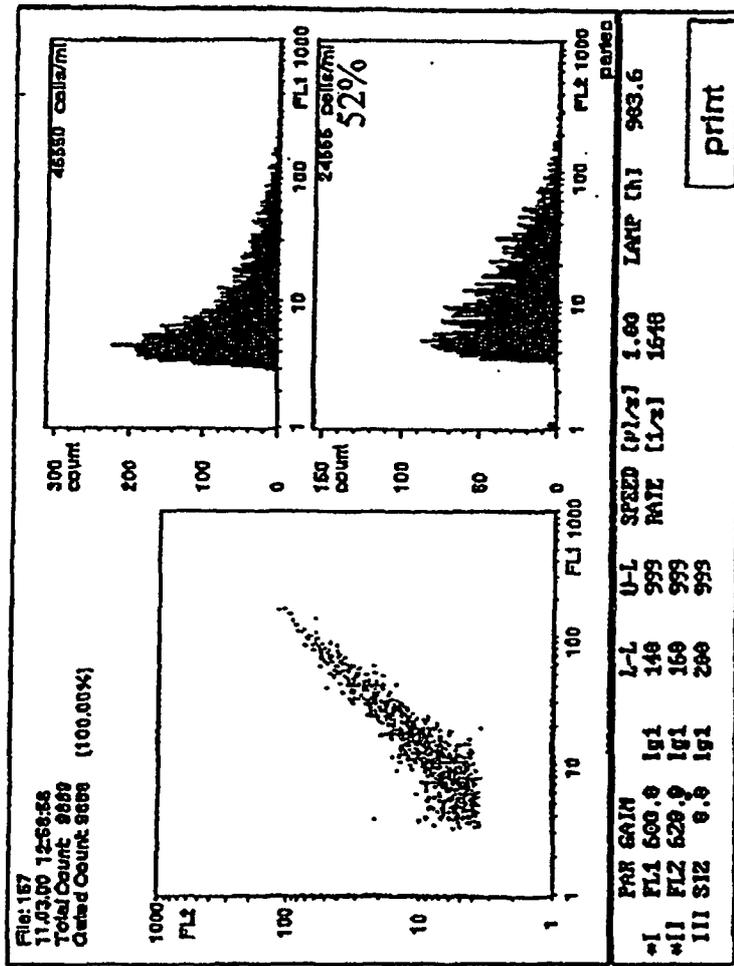


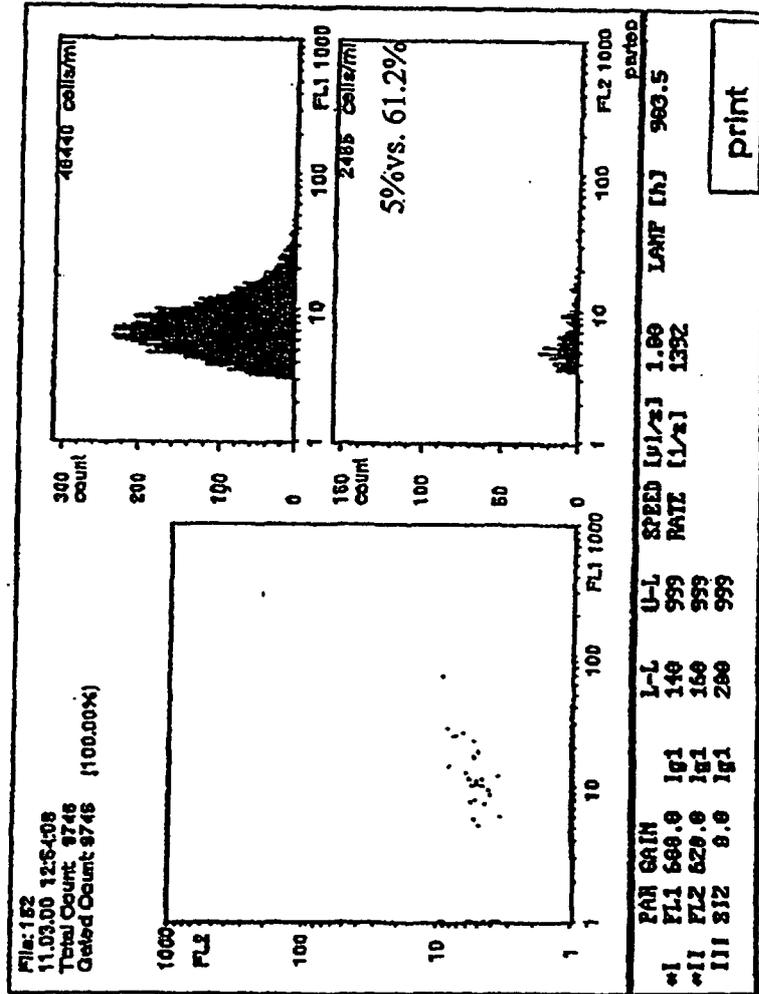
Figure 5

**Expression von P-Selectin - 10 nm Thrombin
3 Tage Lagerung bei Raumtemperatur ohne D-Ribose**



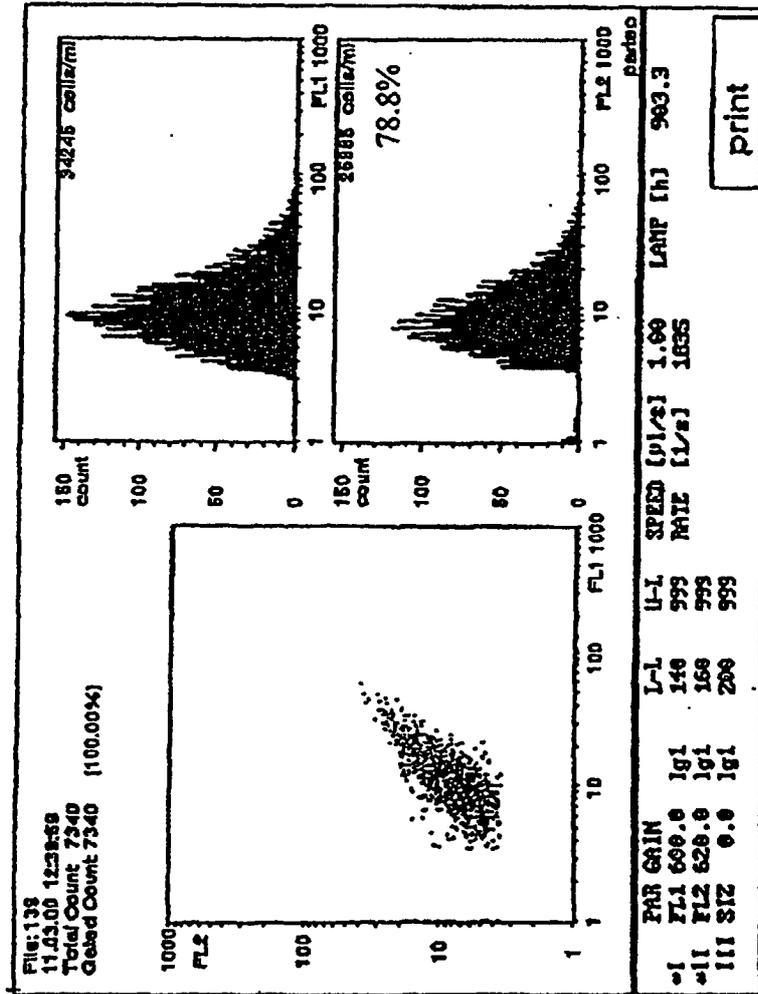
Figur 6

**Expression von P-Selectin - Grundwert
3 Tage Lagerung bei Raumtemperatur - 153 nM D-Ribose**

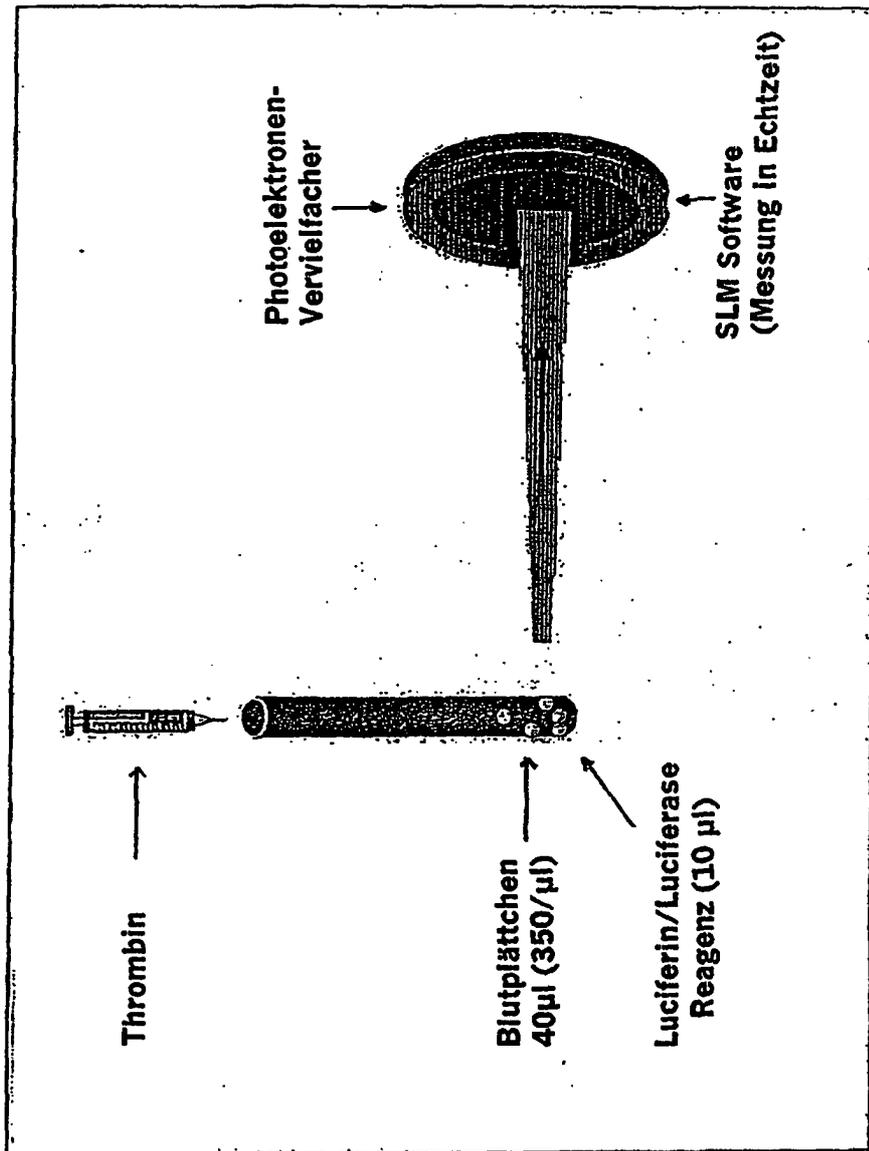


Figur 7

**Expression von P-Selectin - 10 nm Thrombin
3 Tage Lagerung bei Raumtemperatur - 153 nM D-Ribose**



Figur 8



Figur 9