

LEE'S PHARM.

李氏大藥廠

Department of medicine and information

医学及信息部

医学信息速递

Medical Information Express



传递最有价值的医学信息

速乐滑可有效促进低凝状态下小鼠止血凝块的形成并减少出血

Slounase, a Batroxobin Containing Activated Factor X Effectively Enhances Hemostatic Clot Formation and Reducing Bleeding in Hypocoagulant Conditions in Mice

医学及信息部 信息事务组

2021-06-11



01

文献简介

- 文献概述
- 内容提要

02

文献重点内容

- 止血相关内容简介
- 速乐涓能够有效的控制出血
- 速乐涓具有更好的安全性

03

小结



01

文献简介

- 文献概述
- 内容提要



Slounase, a Batroxobin Containing Activated Factor X Effectively Enhances Hemostatic Clot Formation and Reducing Bleeding in Hypocoagulant Conditions in Mice

Reheman Adili, MD¹, Madeline Jackson, BS¹, Livia Stanger, BA¹, Xiangrong Dai, MA², Mandy Li, PhD³, Benjamin Xiaoyi Li, PhD³, and Michael Holinstat, PhD^{1,4}

Abstract

Uncontrolled bleeding associated with trauma and surgery is the leading cause of preventable death. Batroxobin, a snake venom-derived thrombin-like serine protease, has been shown to clot fibrinogen by cleaving fibrinopeptide A in a manner distinctly different from thrombin, even in the presence of heparin. The biochemical properties of batroxobin and its effect on coagulation have been well characterized *in vitro*. However, the efficacy of batroxobin on hemostatic clot formation *in vivo* is not well studied due to the lack of reliable *in vivo* hemostasis models. Here, we studied the efficacy of batroxobin and slounase, a batroxobin containing activated factor X, on hemostatic clot composition and bleeding using intravital microscopy laser ablation hemostasis models in micro and macro vessels and liver puncture hemostasis models in normal and heparin-induced hypocoagulant mice. We found that prophylactic treatment in wild-type mice with batroxobin, slounase and activated factor X significantly enhanced platelet-rich fibrin clot formation following vascular injury. In heparin-treated mice, batroxobin treatment resulted in detectable fibrin formation and a modest increase in hemostatic clot size, while activated factor X had no effect. In contrast, slounase treatment significantly enhanced both platelet recruitment and fibrin formation, forming a stable clot and shortening bleeding time and blood loss in wild-type and heparin-treated hypocoagulant mice. Our data demonstrate that, while batroxobin enhances fibrin formation, slounase was able to enhance hemostasis in normal mice and restore hemostasis in hypocoagulant conditions via the enhancement of fibrin formation and platelet activation, indicating that slounase is more effective in controlling hemorrhage.

Keywords

hemostasis, platelet, fibrin, coagulation, bleeding, batroxobin

Date received: 10 February 2021; revised: 6 April 2021; accepted: 28 April 2021.

Introduction

Life-threatening bleeding due to traumatic injury or surgical procedures is the leading cause of preventable death in the world.¹ Excessive blood loss accounts for around 40% of the deaths associated with trauma.² Hemostasis is a complex physiological process, which arrests bleeding and involves blood cells and plasma as well as extracellular and matrix proteins. Platelet accumulation and activation of the coagulation system are two key mechanisms required for hemostatic clot formation to stop bleeding.^{3,4} Platelet adhesion and subsequent platelet

are the two molecules required for platelet adhesion and aggregation in the event of vascular injury.^{5,6} Interestingly, platelet adhesion and aggregation still persist in mice lacking both

¹Department of Pharmacology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

²Zhaoke Pharmaceutical (Hefei) Co. Limited, Hefei, Anhui, China

³Lee's Pharmaceutical Holdings Limited, Sha Tin, Hong Kong, China

⁴Department of Internal Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Clinical and Applied
Thrombosis-Hemostasis
Volume 27: 1-13
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/08850666211011810
journals.sagepub.com/home/cas
SAGE

速乐涓可有效促进低凝状态下小鼠止血凝块的形成并减少出血

【作者】 Reheman Adili, MD, Benjamin Xiaoyi Li, PhD

【作者单位】 密歇根大学, 李氏大药厂控股有限公司

【出版时间】 2021年04月

【影响因子】 1.852

【杂志】 Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis



背景

- 巴曲酶一种蛇毒衍生的凝血酶样丝氨酸蛋白酶，已被证实可以通过裂解纤维蛋白肽A来凝结纤维蛋白原，其方式与凝血酶截然不同。巴曲酶的生化特性及其对凝血的影响已在体外得到了很好的表征。然而，由于缺乏可靠的体内止血模型，巴曲酶对体内止血凝块形成的疗效研究尚不充分；

目的

- 评估速乐涓的止血效果；

方法

- 本研究采用微血管和宏观血管中的活体显微镜激光消融止血模型和肝穿刺止血模型，研究了巴曲酶和含有活化因子X的速乐涓对正常和肝素诱导的低凝小鼠止血凝块形成和出血的影响；

结果

- 在肝素处理的小鼠中，巴曲酶治疗导致可检测到的纤维蛋白形成和止血凝块大小适度增加，而活化因子X没有影响；
- 相比之下，速乐涓治疗显著增强了野生型和肝素处理的低凝小鼠血小板聚集和纤维蛋白形成，形成稳定的血凝块并缩短出血时间和失血量；

结论

- 我们的数据表明，虽然巴曲酶可增强纤维蛋白形成，但速乐涓能够增强正常小鼠的止血能力，并通过增强纤维蛋白形成和血小板活化来恢复低凝状态下小鼠的止血能力，表明**速乐涓在控制出血方面更有效**。



02

文献重点内容

- 止血相关内容简介
- 速乐涓能够有效的控制出血
- 速乐涓具有更好的安全性



- 内容 -

01

止血相关内容简介

- 血小板聚集和凝血系统的激活是止血凝块形成的两个关键机制
- 巴曲酶的纤维蛋白(原)亲和力比凝血酶更高，是一种潜在止血剂

02

速乐涓能够有效的控制出血

- 没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集
- 速乐涓治疗可以促进血小板-纤维蛋白止血凝块形成
- 速乐涓恢复肝素诱导的低凝小鼠血小板纤维蛋白凝块的形成并缩短出血时间
- 速乐涓显著增强肝素治疗小鼠大血管中止血凝块的形成
- 速乐涓治疗可显著减少肝脏损伤模型小鼠的总失血量

03

速乐涓具有更好的安全性

- 速乐涓在止血方面比活化因子X具有更好的安全性



血小板聚集和凝血系统的激活是止血凝块形成的两个关键机制

研究发现



外伤或外科手术引起的危及生命的出血是导致可预防性死亡的主要原因^[1]。与创伤相关的死亡中，失血过多约占40%^[2]



血小板聚集和凝血系统的激活是止血凝块形成的两个关键机制^[3,4]



血小板黏附及随后血小板在血管损伤部位的活化和聚集是启动止血过程形成血小板栓(初期止血)、防止失血的重要步骤^[3,5]



研究表明血管性血友病因子(VWF)和纤维蛋白原(Fg)是血管损伤时血小板粘附和聚集所需的两种分子^[3,5,6]

1. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. Crit Care. 2016;20:100.
2. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. J Trauma. 2006;60(6 Suppl):S3-11.
3. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nat Med. 2002;8(11): 1227-1234.
4. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. Transfus Apher Sci. 2003;28(3):257-264.
5. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. Blood. 2007;109(12):5087-5095.
6. Wang Y, Andrews M, Yang Y, et al. Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2012;12(2):126-132.



巴曲酶的纤维蛋白(原)亲和力比凝血酶更高，是一种潜在止血剂

1

巴曲酶是一种从矛头蝮蛇蛇毒中提取的类凝血酶丝氨酸蛋白酶，是目前研究最深入的蛇毒活性药物成分。巴曲酶已被证实具有比凝血酶更高的纤维蛋白(原)亲和力；

2

与凝血酶裂解纤维蛋白原（Fg）不同，巴曲酶只释放FpA导致纤维蛋白单体聚合或作为降纤酶。这一过程不受抗凝血酶或肝素辅助因子II的抑制；

3

因此，在肝素存在的情况下，巴曲酶可以在富含血小板的血浆中诱导凝块形成，而不会影响体外血小板功能，使其成为一种可行的肝素不敏感诊断测试；

4

巴曲酶的聚合纤维蛋白能力使其成为一种潜在的止血剂，并已成功分离出用于开发医用胶粘剂止血药物。



- 内容 -

01

止血相关内容简介

- 血小板聚集和凝血系统的激活是止血凝块形成的两个关键机制
- 巴曲酶的纤维蛋白(原)亲和力比凝血酶更高，是一种潜在止血剂

02

速乐涓能够有效的控制出血

- 没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集
- 速乐涓治疗可以促进血小板-纤维蛋白止血凝块形成
- 速乐涓恢复肝素诱导的低凝小鼠血小板纤维蛋白凝块的形成并缩短出血时间
- 速乐涓显著增强肝素治疗小鼠大血管中止血凝块的形成
- 速乐涓治疗可显著减少肝脏损伤模型小鼠的总失血量

03

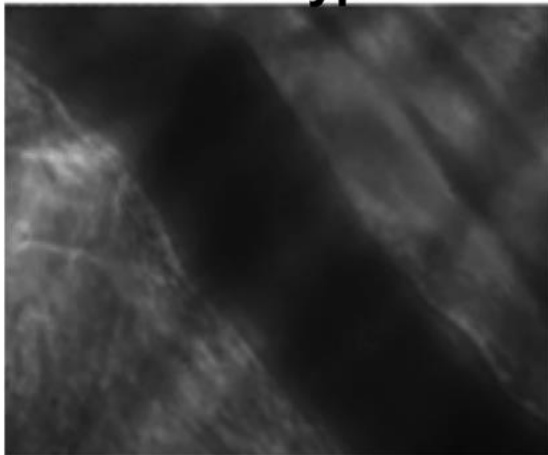
速乐涓具有更好的安全性

- 速乐涓在止血方面比活化因子X具有更好的安全性

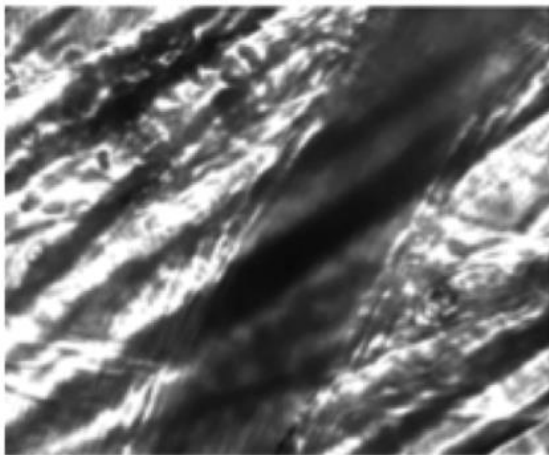


没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集

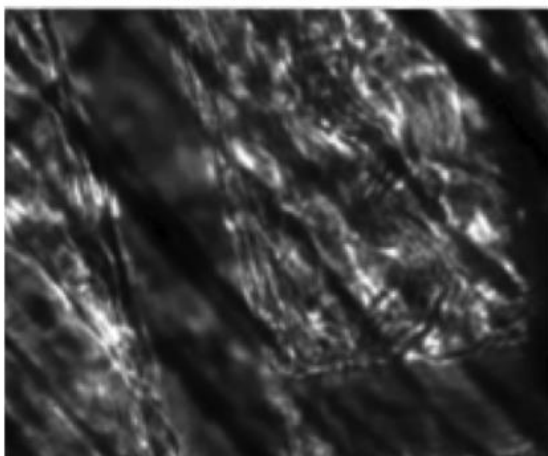
Wild Type



FXa Treated



Batroxobin Treated



Slounase Treated

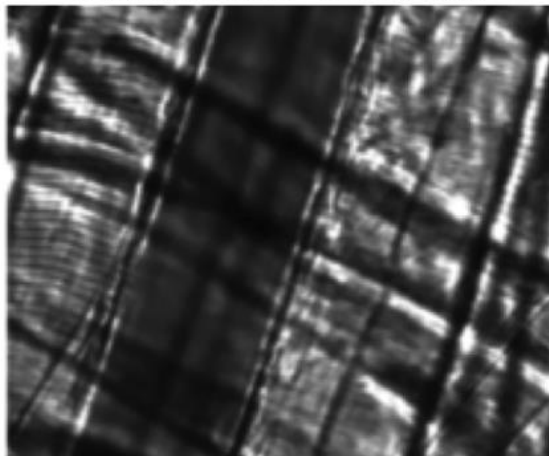


图1

- ✓ 静脉注射速乐涓、巴曲酶、活化因子X。在无血管损伤的情况下，提睾肌小动脉、微静脉和毛细血管各通道均未检测到血小板相互作用、粘附、聚集物形成或纤维蛋白形成；
- ✓ 在延长的90分钟记录时间内，这些药物的静脉治疗没有改变小鼠血流，也没有自发引起小鼠提睾肌微循环中任何可检测到的血小板纤维蛋白血栓；
- ✓ 结果表明，没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集

速乐涓治疗可以促进血小板-纤维蛋白止血凝块形成

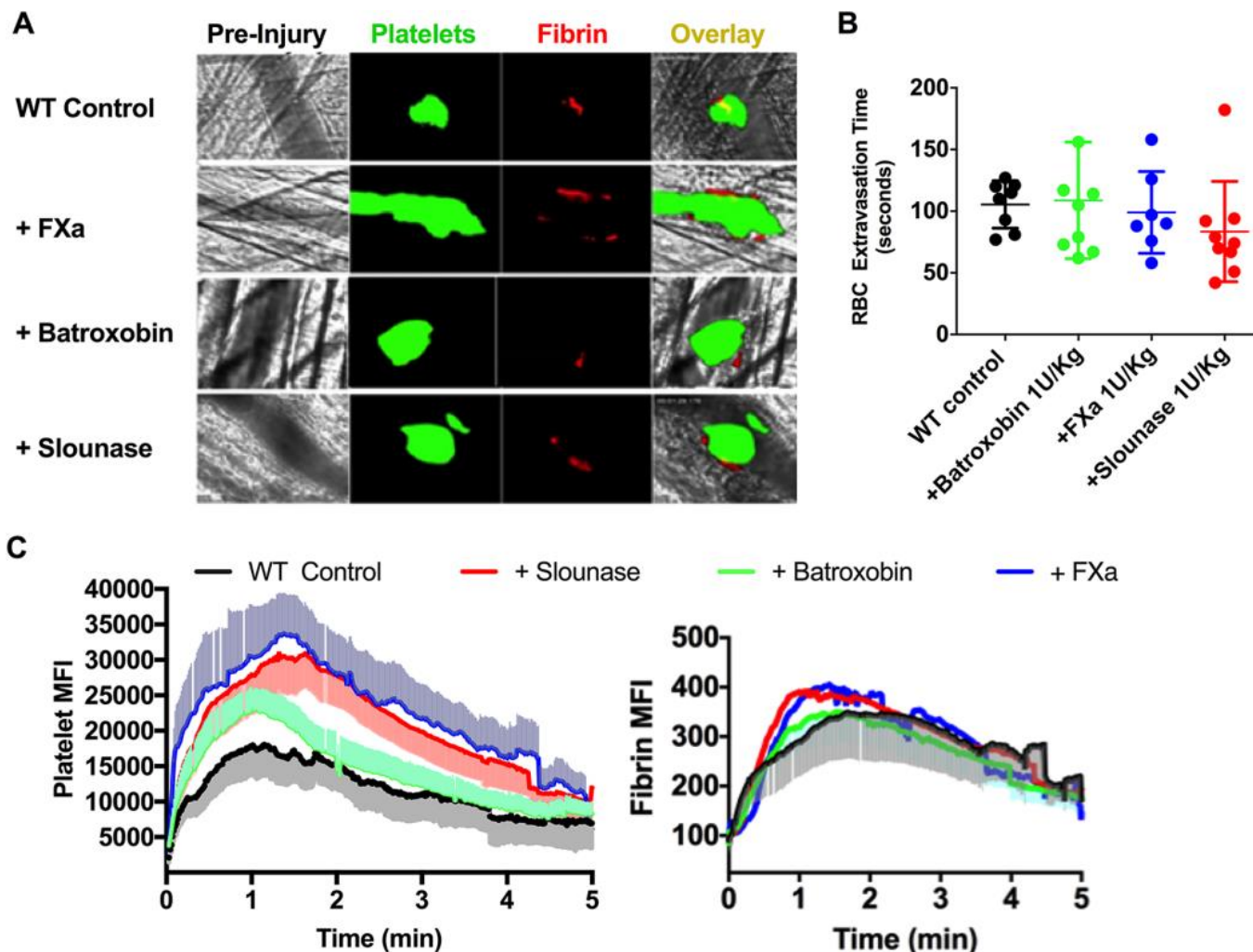


图2. (A)激光诱发提睾肌小动脉壁破裂后止血凝块形成的代表性图像。绿色为血小板聚集，红色为纤维蛋白形成，黄色为止血凝块形成的复合图像；(B) WT对照小鼠和WT小鼠经1U/kg速乐涓、巴曲酶或活化因子X治疗后，红细胞停止从小动脉外渗所需的时间（数据来自每只小鼠2-3个独立创伤，每组3只小鼠。P<0.001）；(C)止血凝块中血小板(左)和纤维蛋白(右)的平均荧光强度随时间变化的动态。WT小鼠分别用速乐涓、巴曲酶、活化因子X或对照缓冲液预处理，并记录5分钟以上的荧光强度。阴影部分代表标准误差(SEM)。

- ✓ 与缓冲对照组相比，经巴曲酶、活化因子X或速乐涓预处理的小鼠对血管损伤的止血反应显著增强(图2A)；
- ✓ 与巴曲酶和对照组相比，活化因子X和速乐涓条件下的红细胞外渗时间均有减少的趋势(图2B)；
- ✓ 速乐涓和活化因子X治疗后，血小板聚集和纤维蛋白形成显著增加(血小板:P<0.0001;纤维蛋白:P<0.001)，而巴曲酶对血凝块内血小板纤维蛋白的影响不大(图2C)
- ✓ 与活化因子X治疗相比，速乐涓对血小板-纤维蛋白凝块的增强作用温和且仅限于血管损伤部位，但强于巴曲酶；
- ✓ 结果表明，速乐涓治疗可以促进野生型小鼠激光消融提睾肌小动脉穿刺止血模型中血小板-纤维蛋白止血凝块的形成。



速乐涓恢复肝素诱导的低凝小鼠血小板纤维蛋白凝块的形成并缩短出血时间

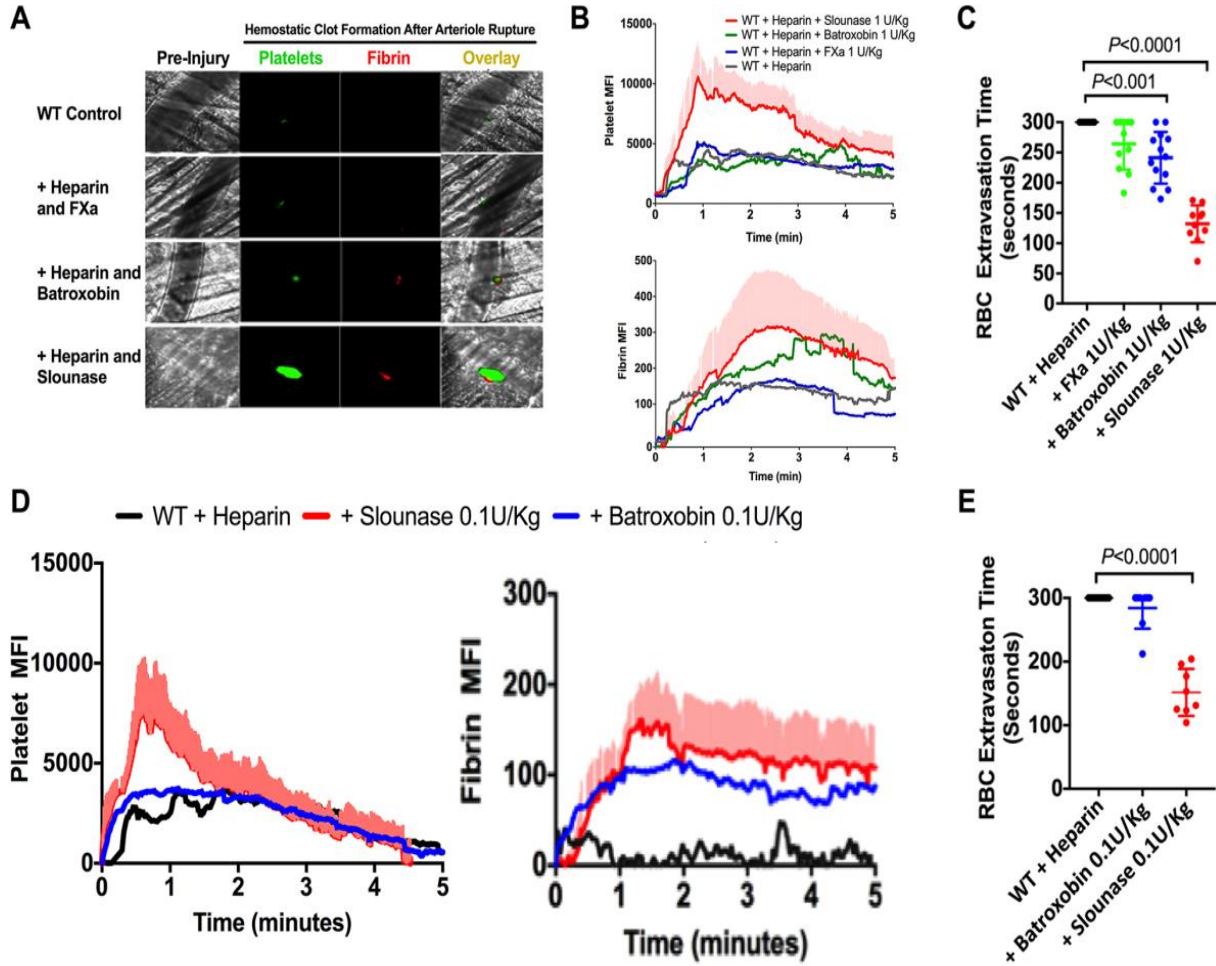


图4

- ✓ 肝素治疗的对照组小鼠(缓冲治疗)纤维蛋白形成和血小板聚集完全被抑制，证明其丧失止血反应(图4A)；
- ✓ 给予1u/kg的巴曲酶的小鼠体内血管破裂部位可检测到纤维蛋白形成。但从血小板的荧光强度动态显示，血小板聚集到凝块中没有明显的增强(图4A)；
- ✓ 1u/kg活化因子X不能促进凝块的形成，因为肝素-抗凝血酶复合物强烈抑制活化因子X。
- ✓ 1u/kg速乐涓显著促进血小板聚集和纤维蛋白形成，并在肝素存在下部分恢复了凝块的形成。明显缩短了出血时间；
- ✓ 表明速乐涓比巴曲酶或活化因子X有更好的止血效果(图4A和B以及补充片2A-D)；
- ✓ 与巴曲酶相比，1 U/kg和0.1 U/kg的速乐涓停止红细胞外渗所需的时间更短($P < 0.001$)。0.1U/ kg巴曲酶没有缩短动脉出血时间($P > 0.05$)(图4C和E)



速乐涓显著增强增强肝素治疗小鼠大血管中止血凝块的形成

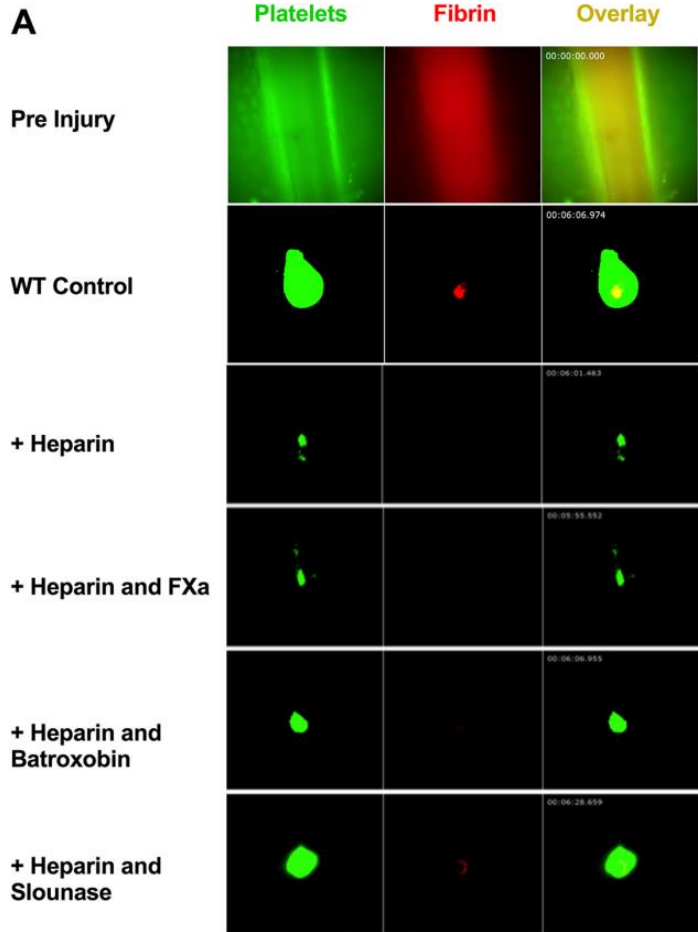
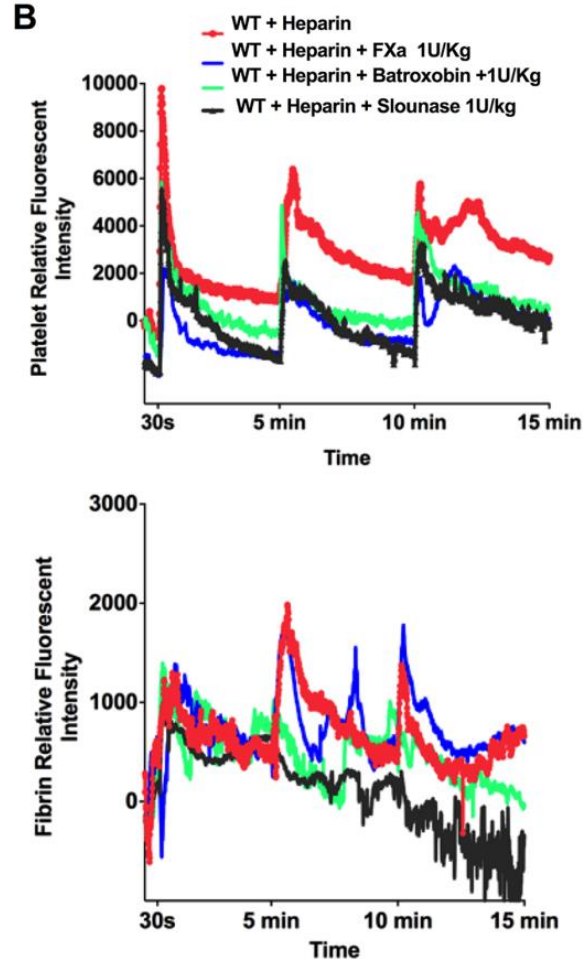
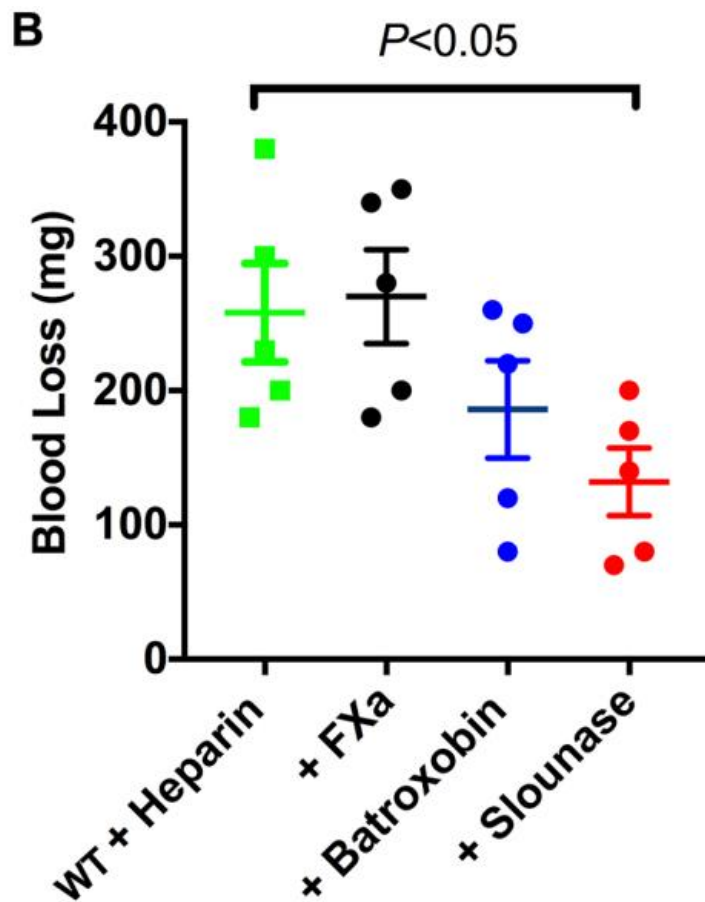
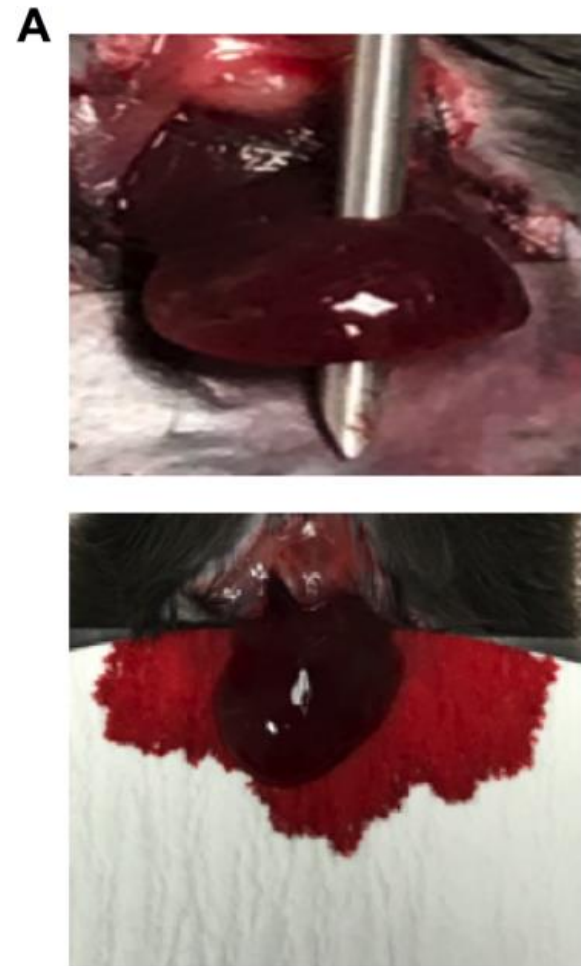


图5



- ✓ 活化因子X治疗并没有显著增强损伤部位的血小板纤维蛋白凝块的形成；
- ✓ 巴曲酶治疗恢复了血管损伤部位部分纤维蛋白的形成，但没有促进血小板的聚集；
- ✓ 速乐涓治疗显著增强了血小板聚集和纤维蛋白形成，形成了更稳定的止血凝块(N = 6, N = 8每组, P < 0.01, 图5B)

速乐涓治疗可显著减少肝脏损伤模型小鼠的总失血量



- ✓ 速乐涓治疗组小鼠总失血量显著减少，这与其他止血模型测试的结果一致（图6A和B; $P < 0.05$);
- ✓ 在相同的实验条件下，活化因子X治疗组小鼠出血量没有显著变化（5只/组, $P < 0.05$);
- ✓ 巴曲酶治疗后，小鼠失血量有减少的趋势，但没有统计学意义 ($P > 0.05$)

图6



- 内容 -

01

止血相关内容简介

- 血小板聚集和凝血系统的激活是止血凝块形成的两个关键机制
- 巴曲酶的纤维蛋白(原)亲和力比凝血酶更高，是一种潜在止血剂

02

速乐涓能够有效的控制出血

- 没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集
- 速乐涓治疗可以促进血小板-纤维蛋白止血凝块形成
- 速乐涓恢复肝素诱导的低凝小鼠血小板纤维蛋白凝块的形成并缩短出血时间
- 速乐涓显著增强肝素治疗小鼠大血管中止血凝块的形成
- 速乐涓治疗可显著减少肝脏损伤模型小鼠的总失血量

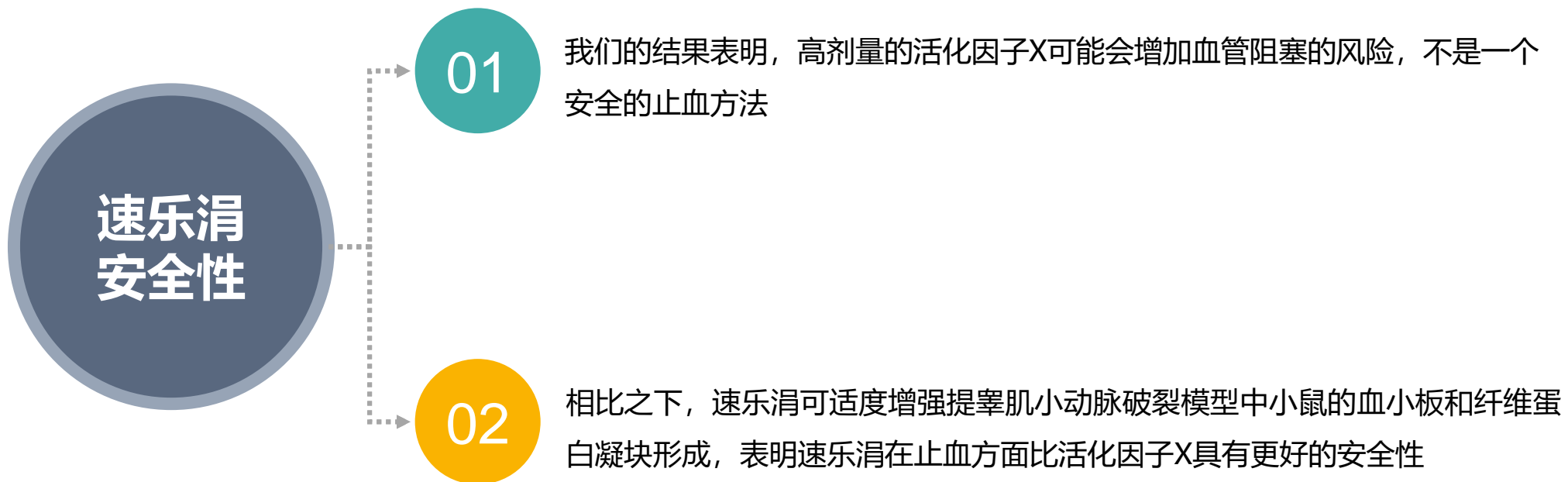
03

速乐涓具有更好的安全性

- 速乐涓在止血方面比活化因子X具有更好的安全性



速乐涓在止血方面比活化因子X具有更好的安全性



03

小结



- ☑ 没有血管损伤的情况下，速乐涓治疗不能诱导血小板粘附或聚集；
- ☑ 速乐涓能恢复肝素诱导的低凝小鼠血小板纤维蛋白凝块的形成并缩短出血时间；
- ☑ 速乐涓治疗可显著增强肝素治疗小鼠大血管中止血凝块的形成；
- ☑ 速乐涓治疗可显著减少肝脏损伤模型小鼠的总失血量；
- ☑ 速乐涓在止血方面比活化因子X具有更好的安全性。



谢谢关注！

thanks for your attention.

