



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103384496 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201180058163.X

K·莫斯克维兹

(22)申请日 2011.12.02

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 103384496 A

代理人 罗菊华

(43)申请公布日 2013.11.06

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61B 5/15(2006.01)

61/419,063 2010.12.02 US

A61B 5/157(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.31

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/063086 2011.12.02

WO 2008155658 A2, 2008.12.24,

US 2009123907 A1, 2009.05.14,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/075407 EN 2012.06.07

US 2004013575 A1, 2004.01.22,

CN 1846603 A, 2006.10.18,

CN 1703621 A, 2005.11.30,

CN 1568307 A, 2005.01.19,

CN 1053192 A, 1991.07.24,

CN 1662307 A, 2005.08.31,

(73)专利权人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

审查员 桂叶晨

(72)发明人 C·A·捷尔芬德 D·马奇阿鲁洛

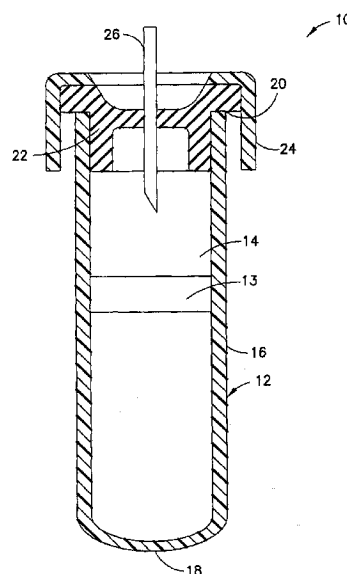
权利要求书2页 说明书23页 附图4页

(54)发明名称

含有血液稳定剂的血液收集装置

(57)摘要

公开了一种用于收集和稳定血液的装置(10),其含有血液稳定剂,所述血液稳定剂包括variegin或其类似物、多硫酸二糖、或它们的组合,每个的量有效地稳定血液。还提供了制造和使用所述装置的方法以及包含所述装置的试剂盒。



1. 一种用于收集和稳定血液或其组分的装置, 其中所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁, 其限定用于接收血液的存储器部分, 其中该存储器含有血液稳定剂, 所述血液稳定剂包括a) 具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins, 或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins的具有血小板稳定活性的类似物, 所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins的具有血小板稳定活性的类似物以10 μ m至1mM的浓度存在; b) 多硫酸二糖, 其以50 μ m至50mM的浓度存在; 或a) 和b) 的组合, 每个的量有效地稳定血液或其组分; 其中variegins的类似物为SEQ ID NO:1的片段, 选自SEQ ID NO:2-5, 或者示为SEQ ID NO:6。

2. 如权利要求1的装置, 其中所述装置是无菌并且抽空的, 而且还包括可由针刺穿的封闭件。

3. 如权利要求2的装置, 其中所述装置是管。

4. 如权利要求3的装置, 其中所述装置还包括分离器。

5. 如权利要求1的装置, 其中所述血液稳定剂包括示为SEQ ID NO:1的variegins。

6. 如权利要求1的装置, 其中所述多硫酸二糖是蔗糖八硫酸酯。

7. 如权利要求1的装置, 其中所述血液稳定剂还包括直接凝血酶抑制剂。

8. 如权利要求7的装置, 其中所述直接凝血酶抑制剂选自: 阿加曲班、rOicPaF(p-Me)-NH₂、水蛭素、比伐卢定、抑肽酶、和D-苯丙氨酰-L-脯氨酰基-L-精氨酸以及其两种或更多种的组合。

9. 如权利要求1的装置, 其中所述血液稳定剂还包括间接凝血酶抑制剂。

10. 如权利要求9的装置, 其中所述间接凝血酶抑制剂选自肝素和低分子量肝素。

11. 如权利要求1的装置, 其中所述血液稳定剂为干燥形式。

12. 如权利要求1的装置, 其还包括抗凝血剂。

13. 如权利要求12的装置, 其中所述抗凝血剂选自: 安替斯塔新、阿加曲班、E-76、抗凝血酶-III, 因子Xa抑制剂、因子VII抑制剂、因子IX抑制剂、因子XII抑制剂和因子II抑制剂, 以及两种或更多种的组合。

14. 如权利要求13的装置, 其中所述因子Xa抑制剂选自: 6-(4-{1-[(二甲基氨基)甲基]环丙基}苯基)-1-(4-甲氧基苯基)-3-(三氟甲基)-1,4,5,6-四氢-7H-吡啶并[3,4-c]吡啶-7-酮; 以及1-(4-甲氧基苯基)-6-[4-[1-(吡咯烷-1-基甲基)环丙基]苯基]-3-(三氟甲基)-4,5-二氢吡啶并[3,4-c]吡啶-7-酮, 以及其组合。

15. 如权利要求1的装置, 其中配方还包括血小板拮抗剂。

16. 如权利要求15的装置, 其中所述血小板拮抗剂选自: 环氧合酶抑制剂、P2Y₁₂抑制剂、抗血小板抗体, 以及它们中的两种或更多种的组合。

17. 一种稳定血液的方法, 所述方法包括将血液或包含血液组分的组合物引入到装置中, 所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁, 其限定用于接收所述血液或所述组合物的存储器部分; 其中该存储器包含血液稳定剂, 所述血液稳定剂包括a) 具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins, 或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins的具有血小板稳定活性的类似物, 所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegins的具有血小板稳定活性的类似物以10 μ m至1mM的浓度存在; b) 多硫酸二糖, 其以50 μ m至50mM的浓度存在; 或a) 和b) 的

组合,每个的量有效地稳定血液或所述血液组分;其中variegin的类似物为SEQ ID NO:1的片段,选自SEQ ID NO:2-5,或者示为SEQ ID NO:6。

18.如权利要求17的方法,其中所述组合物是抽取的血液样本。

19.如权利要求17的方法,其中所述组合物包括血小板。

20.如权利要求19的方法,其中所述组合物是富血小板血浆。

21.如权利要求20的方法,其中所述组合物包括白细胞。

22.一种用于体外测量血液参数的方法,包括:a)将血液或包含血液组分的组合物引入到装置中,所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁,其限定用于接收血液或包含血液组分的组合物的存储器部分,其中所述存储器包括血液稳定剂,所述血液稳定剂包括a)具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin,或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin的具有血小板稳定活性的类似物,所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin的具有血小板稳定活性的类似物以10 μ m至1mM的浓度存在;b)多硫酸二糖,其以50 μ m至50mM的浓度存在;或a)和b)的组合,每个的量有效地稳定血液;以及b)测量血液参数;其中variegin的类似物为SEQ ID NO:1的片段,选自SEQ ID NO:2-5,或者示为SEQ ID NO:6。

23.如权利要求22的方法,其中所述血液参数是血小板功能,并且其中方法还包括c)向所述血液或所述组合物中加入刺激血小板聚集的血小板激动剂,和d)测定血小板聚集程度。

24.如权利要求23的方法,其中所述激动剂包括胶原、二磷酸腺苷、花生四烯酸、肾上腺素、凝血酶受体活化肽、凝血酶、胶原-相关肽、瑞斯托霉素、凝血酶、凝血酶类似物、血栓素受体激动剂、阳离子没食子酸丙酯、和惊厥蛋白,以及其两种或多种的组合。

25.如权利要求24的方法,还包括,在步骤d)之前,步骤e)将抑制血小板聚集的血小板拮抗剂加入到所述组合物中。

26.如权利要求25的方法,其中所述血小板拮抗剂选自乙酰水杨酸、氯吡格雷、坎格雷洛、替卡格雷、和2-甲硫腺苷5'-一磷酸,及其两种或两种以上的组合。

27.一种试剂盒,其包括至少一个用于收集和稳定血液或包含血液组分的组合物的装置,其中所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁,其限定用于接收所述血液或所述组合物的存储器部分,其中该存储器含有血液稳定剂,所述血液稳定剂包括a)具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin,或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin的具有血小板稳定活性的类似物,所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin或所述具有示为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的variegin的具有血小板稳定活性的类似物以10 μ m至1mM的浓度存在;b)多硫酸二糖,其以50 μ m至50mM的浓度存在;或a)和b)的组合,每个的量有效地稳定所述血液或血液组分;其中variegin的类似物为SEQ ID NO:1的片段,选自SEQ ID NO:2-5,或者示为SEQ ID NO:6。

28.如权利要求27的试剂盒,还包括第二装置,所述第二装置包括血小板拮抗剂。

含有血液稳定剂的血液收集装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2010年12月2日提交的美国临时专利申请No.61/419,063的提交日优先权,其全部内容通过引用在此并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,所述序列表已经通过EFS-Web以ASCII格式提交并且其全部内容通过引用在此并入。所述ASCII副本于2011年11月30日创建,名为Sequence Listing for Blood Collection Devices_ST25.txt,且文件大小为6.18千字节。

背景技术

[0005] 对人体血液进行体外评估具有以诊断为目的的广泛应用。血液由血细胞和血浆组成。血小板,作为三种主要血细胞中最小的那个,其直径是红细胞(血液中最多数细胞)的约20%。正常的血小板计数是每微升血液150,000-350,000,但由于血小板如此之小,因此它们仅是血液量微小的部分。血小板的一个主要功能是保持血液的稳态和防止出血。因此,血小板功能是血液稳态的指标之一。

[0006] 血液稳态是指以保存完好和正常运作方式的血流表现。这包括血液化学性质的维持,以及血液和血管系统的完好性。在血管完整性中断的情况下,例如从切割,外伤,手术,或通常会导致“出血”的其他事件,在血液中的细胞和生化过程的级联启动,其最终目标是防止或减少失血。这种生物反应的一个可视化终点是形成结痂。在分子和细胞水平,该过程包括在血液和血小板中正常流通的蛋白质之间的相互作用。血液中的几种蛋白质以及血小板本身,反应并揭示出称为“组织因子”的蛋白质,其在整个身体的许多其他组织中出现,但值得注意的是没有在包括正常血管的动脉和静脉的内侧出现。通过直接和间接的化学途径,血小板通过聚集响应组织因子的存在,所述聚集是一个不可逆(或“仅一次”)的过程,在其中它们显著地改变形状和积极彼此结合。这个过程被称为血小板聚集。血液中的其他酶也进行反应并开始改变血液中的蛋白质,其开始形成不溶性纤维聚集。与采用抹墙粉填补孔的过程类似,蛋白质,血小板和其他血液组分的不溶性混合物堵塞在血管壁上的“洞”中,简单来说,“止血”。

[0007] 更科学地,当暴露于损坏的血管时,血小板会黏附到被暴露的内皮下基质。初始黏附之后,在伤口处将释放或产生激活血小板的各种因子(包括凝血酶,ADP,生长因子,和胶原蛋白)。一旦血小板被激活,血小板膜糖蛋白GPIIb/IIIa受体发生构象变化,允许其结合纤维蛋白原和/或血管性血友病因子。据信,通过相邻血小板上GPIIb/IIIa受体而产生的该多价纤维蛋白原和/或血管性血友病因子分子的结合,导致额外的血小板补充到伤口位置并且其聚集形成止血塞或血栓。血小板聚集是一个术语,用来描述血小板的彼此结合。这个过程也与脱颗粒相关,脱颗粒是指通过该过程颗粒剂(含有蛋白质和小分子的“包被”)被释放到周围的血浆中。这个过程被称为脱颗粒。这些颗粒内容物有助于进一步加快血管壁和任何非血管组织上的恢复稳态并刺激细胞修复(愈合)过程。

[0008] 没有足够的血小板数量,或者正常的血小板功能受损甚至缺失的情况下,大量出

血存在显著风险。对经历了严重创伤,或在紧急手术的情况下一直存在大量失血的病人,进行血小板输血给药。

[0009] 可以理解的是,测量血小板聚集以及从而促进或加速血液凝固的能力,在大量临床环境中是重要的。已知的是血小板聚集在血栓形成和急性冠状动脉疾病的发病机理中起着关键的作用。有证据表明,响应各种抗血小板药物,血小板功能抑制中存在显著的变化。它也被证明当使用P2Y₁₂拮抗剂,如氯吡格雷(Plavix)治疗患者以实现抗聚集效果时,在血小板聚集存在个体变异。例如,一项研究结果表明,接受该药物的患者中有至少10%并没有达到预期的血小板聚集抑制率(Muller等人,Thromb Haemost.89(5):783-7(2003))。因此,鉴于心血管不良事件的急性性质,至关重要的是,要知道,为患者采用第一选择的治疗方法进行治疗将具有直接的好处,其是理想地无需监测患者并被迫选择替代疗法。因此,在患者接受这种治疗之前,他们往往已提取血液样本和测试血小板功能。类似的测试往往用于术前筛查,以排除在手术/恢复过程中潜在不利的出血效果。

[0010] 出于疾病生物标志物测试的目的,同样期望稳定所抽取血液样本中的血小板。血小板含有诊断感兴趣的蛋白质和代谢物。然而,这些生物标志物在血浆中自由流通形式下的浓度与诊断疾病条件的目的更为相关。据信,血小板脱颗粒,特别是血小板活化或聚集后,可导致人为升高这些标志物的水平并且如果不加以控制将表现为分析前的错误。血小板颗粒还含有酶,它可以催化降解这些循环的生物标志物,从而导致所感兴趣的生物标志物的人为低水平。

[0011] 另外,期望在治疗应用中使用时提供稳定的血小板。自体血小板凝胶治疗(涉及分离所谓的“富血小板血浆”)是用来治疗某些伤口及范围广泛的其他病症,包括从牙科植入物愈合到修复韧带损伤中的注射。如果血小板聚集或成熟期被激活,它们可能会失去这种治疗的效果。因此,有需要提供稳定的血小板,来进一步改善这些过程。

[0012] 如果在抽血样本中的血小板并不稳定,或者让它们在测试之前聚集(例如,没有“留下”功能来测试),或者可以在测试之前“死”或以其他方式失去自然功能,那么体外血小板功能的结果可能并不准确。所抽取血液中的血小板本质上是不稳定的,这主要是因为它们的自然特性是响应血管系统的破坏而聚集。在抽取的血液样本中在一个较低的水平自发地产生血小板聚集的化学刺激。抽血后,随着时间的推移,血小板由于这种自发刺激而聚集,因此当血液样本最终要被测试时,仍能够被刺激的血小板越来越少地处于其原始状态。血小板功能检测的临床实践的目前黄金标准要求,在抽血后最多**2~4**小时内在柠檬酸钠抗凝血液样本上完成(临床实验室标准化研究所指南,“凝集的血小板功能检测”,H58-A (Vol.28, No.31(2008))).过了这段时间,样品已经失去了大量原有的血小板功能,可能无法用于临床测量。这种广泛应用的运行标准限制了血小板功能检测的广泛应用。在目前的实践中,例如,许多血液样本从医生的办公室送出到区域测试装置并且可能在被抽取后很多小时或甚至可能数天内无法测试。

[0013] 因此,需要保持血液或血液组分诸如组分(诸如所收集的血液样本)中的血小板的稳定,其在收集后、贮存或运输过程中、以及分析之前更好地保持了功能。

发明内容

[0014] 本发明的一方面涉及一种用于收集和稳定血液(例如全血样本)或组合物的装置,

该组合物含有血液组分(例如,细胞组分如白细胞或血小板),所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁,其限定用于接收血液或其组分的存储器部分。该存储器含有血液稳定剂,其包括variegins或其类似物、多硫酸二糖(如蔗糖八硫酸酯),或它们的组合,每个的量有效地稳定血液,例如,保持血小板功能诸如它们的聚集能力。虽然本发明的实施例中描述血小板功能作为血液稳定的量度,但本领域技术人员将会理解,还可以测量其他血液参数(例如,血浆或血清中的分析物水平,细胞计数,细胞稳定性,细胞完好性,溶血,等)作为血液样本中相对稳定性或不稳定性的其它证明。在一些实施例中,该装置配置有可由针(例如,用于将血液供给到存储器)刺穿的封闭件并且是无菌的并抽真空的。

[0015] 本发明的另一个方面涉及收集和稳定血液或组合物的方法,该组合物含有血液组分(例如,细胞组分如白细胞或血小板),所述方法包括将血液或组合物引入到装置中,所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁,其限定用于接收血液或其组分的存储器部分。该存储器包含了血液稳定剂,其中包括variegins或其类似物、多硫酸二糖(如蔗糖八硫酸酯),或它们的组合,每个的量有效地稳定血液,例如,保持血小板功能诸如聚集能力。在收集和存储之后,可以利用血液或组合物,例如,用于诊断分析或治疗目的。

[0016] 本发明的又一个方面涉及一种用于体外测量血液功能参数(例如,血小板功能)的方法,包括:a)将血液或包括血液组分(例如,血小板)的组合物导入装置,用于收集和稳定血小板,其中所述装置具有第一端部和第二端部以及至少一个内壁,其限定用于接收血液或其组分的存储器部分,其中所述存储器包括血液稳定剂,所述血液稳定剂包含具有氨基酸序列的variegins,所述氨基酸序列表示为SEQ ID NO:1或其类似物、多硫酸二糖、或它们的组合,每个的量有效地稳定血液,例如,保持血小板功能诸如聚集能力;以及b)测量血液参数。在一些血液参数涉及到血小板功能的实施例中,该方法还可以进一步涉及c)在组合物中加入刺激血小板聚集的血小板激动剂,和c)测定血小板聚集程度,其中激动剂诱发的血小板聚集程度是血小板功能的决定性因素。

[0017] 本发明的又一方面涉及一种组件(package)或试剂盒,其包括至少一个这样的装置(优选多个这样的装置)。

[0018] 尽管已经发现variegins及多硫酸二糖(诸如蔗糖八硫酸酯)基于它们在体内(和体外)失活凝血酶的能力而应用于治疗用途,但是本申请人已经发现(如工作实施例中所指示的),凝血酶抑制活性本身并不预示给定试剂稳定所收集血液样本中所包含的血液或其组分(特别是血小板)任何延长的临床上有意义的时间的能力。不受任何特定的操作理论的约束,申请人推测,在体内给定的凝血酶抑制剂的活性不预示其在非生理性环境下(例如收集的血液样品或含有血液组分如血小板的组合物(例如,富含血小板的血浆(PRP)))将如何表现,尤其是从下列角度出发将如何表现:其保持血小板功能并因此保持样品的完好性用于存储和后续分析的目的的能力。

[0019] 附图简述

[0020] 图1是适于在本发明中使用的装置的透视图。

[0021] 图2示出了发明实施方式相比于非发明比较实施方式的一系列测绘血小板聚集的图,其中血小板聚集通过阻抗测量为y轴上任意无量纲量度,并且作为x轴上(在引入血小板刺激剂之后)6分钟运行时间的函数。

[0022] 图3是示出了含有variegins(SEQ ID NO:1)的发明实施方式中收集的血液样本中

血小板聚集(测量为曲线下面积(AUC))作为时间的函数的图,其中其结合使用具有或不具有血小板拮抗剂乙酰水杨酸(ASA,或阿司匹林)的测定,比较对象是包含柠檬酸盐、具有或不具有ASA的胶原的非发明装置。

[0023] 图4是显示作为时间函数的血小板聚集(以初始值的百分比形式测量)的柱状图,测量的是包含variegin(SEQ ID NO:1)的发明实施方式中所收集的血液样本,其结合作为血小板拮抗剂使用的胶原,比较对象是含有柠檬酸盐和胶原的非发明装置。

[0024] 发明详述

[0025] 广而言之,本发明的收集装置可以包括任何收集装置,包括例如测试管和离心管的管;封闭系统的采血装置,如收集袋;注射器,尤其是预充式注射器;导管;微量滴定和其他多孔板;阵列;管道;实验室容器如烧瓶,转瓶,滚瓶,小瓶,显微镜载玻片,显微镜载玻片组件,盖玻片,薄膜和多孔基质和组件;移液器和移液头;组织和其他生物样本收集容器;以及任何其他适于容纳生物样品的容器,以及样品传输所涉及的容器和元件。几个这样的装置的实例和图释公开在Stevens等人共同拥有的美国专利7,309,468中。该装置可抽真空和无菌的,包括可由针头刺穿的封闭件。另外,该装置可以是收集血液的部分真空或非真空的系统。抽真空系统的合适例子,是封闭管。手动注射器抽取也是部分真空和非真空系统的合适例子。非真空系统可以还包括自动抽取系统。

[0026] 图1(其也在美国专利7,309,468中示出),显示了可用于本发明的一种典型血液收集装置10,其包括限定内部腔室或贮存器14的容器12。在所示的实施方式中,容器12是具有侧壁16、封闭的底端18和开口顶端20的空心管。可选地,分离部件13设置在容器腔室14内。分离部件13,用于帮助分离血液试样的组成部分,例如,通过离心分离。设计容器12的尺寸以用于收集合适体积的血液。在要求无菌产品的情况下还需要用于覆盖开口端20以闭合容器12的封闭装置22。在一些实施方式中,管子被配置螺丝帽。优选地,封闭件22形成密封,能够有效地闭合容器12和在室14中保存生物样品。封闭件22可以是各种形式,包括,但并不限于,胶塞,HEMOGUARD™闭合件,金属密封件,金属条带状橡胶密封件和不同的聚合物和设计的密封件。防护罩24可以位于封闭件22之上。

[0027] 容器12可以由适用于实验室容器的任何材料制成,包括,例如塑料(例如,聚烯烃,聚酰胺,聚酯,聚硅氧烷,聚氨酯,环氧树脂,丙烯酸树脂,聚丙烯酸酯,聚酯,聚砜,聚甲基丙烯酸酯,PEEK(聚醚醚酮),聚酰亚胺和含氟聚合物)和包括石英玻璃的玻璃制品。优选地,容器12是透明的。作为容器12的合适透明热塑性材料包括聚碳酸酯,聚乙烯,聚丙烯和聚对苯二甲酸乙二醇酯。塑料材料可以是不透氧的材料,或可含有氧不透或半透层。可选地,容器12可以采用水和空气可透过的塑料材料制成。

[0028] 选择室14内的压力以抽取预定容积的生物样本进入到室14内。优选地,封闭件22采用能够在气压和小于气压的压力之间保持内部压力差的弹性材料制成。封闭件22是这样的,其可以由针26或其它插管刺穿以如现有技术已知的将生物样本引入到容器12中。优选地,封闭件22是可重复密封的。封闭件22的合适的材料包括,例如,硅橡胶,天然橡胶,苯乙烯丁二烯橡胶,乙烯-丙烯共聚物和聚氯丁二烯。

[0029] 容器12的合适的实例包括单壁管和多层管。合适的容器12的更具体的例子,在美国专利5,860,937中公开。

[0030] 容器12还可包含分离器13诸如凝胶,机械分离器或其它类型的分离部件(例如,

滤纸等等)。分离器典型的用于血浆制备,特别适用于将血浆从人体或动物全血中分离。在一些实施方式中,分离器具有位于白细胞和血小板中间的密度,并且其可以用于将PRP从全血样品的其他细胞元件中隔离。理想地,凝胶是触变聚合物凝胶制剂。该凝胶可以是均聚物或共聚物并且可包括硅树脂基的凝胶,如例如,聚硅氧烷,或有机烃类凝胶如,例如,聚丙烯酸,聚酯,聚烯烃,氧化顺式聚丁二烯,聚丁烯,环氧化大豆油和氯代烃类的共混物,二酸和丙二醇的共聚物,氢化环戊二烯和具有双烷基马来酸的 α -烯烃的共聚物。美国专利6,516,953,6,406,671,6,409,528和6,497,325中描述了可在本发明中使用的机械分离器的实例。

[0031] 容器12还可以适于从全血样品的较重的相离心分离淋巴细胞和单核细胞。在这样的实施方式中,本装置还可以含有液体的密度梯度介质和用于防止液体的密度梯度介质与血液试样在离心前混合的装置。一个合适的淋巴细胞/单核细胞收集管的实例,在美国专利5,053,134中公开。

[0032] 除了图1中所示的实施方式,适合在本发明中使用的其他市售血液收集管包括以下产品,所有这些都是由Becton Dickinson公司(新泽西州富兰克林湖)出售,并且所有注册及商标属于Becton Dickinson公司: **VACUTAINER®**血液管(例如,目录号367650-1,367661,6405,6385,6564,367653,367665,367658,367669,6450-8,6535-37和367662); **VACUTAINER®**K₂EDTA管(例如,目录号367841-2,367856和367861)和具有BD Microgard™封闭件的非真空BD **Microtainer®**管(例如,365987,365965,365974)或传统BD**Microtainer®**管(例如,365956,365957,365958,365959,365971,365973)。许多商业的血液收集管的标准容积一般从250微升到约10.0毫升,在某些情况下最多至16毫升。典型容积包括250,400,和500微升,以及2.0毫升,3.5毫升,4.0毫升,5.0毫升,8.0毫升,8.5毫升,和10.0毫升。

[0033] 在其它实施方式中,该装置可以包括集成于测试盒中的存储器,存储器能够保存一定体积的全血,所述体积的范围为2至200微升,更优选为50-150微升。该种测试盒可以是例如由Abbott实验室(雅培公园,伊利诺伊州)名称为i-STAT点护理系统的商品,并且可以使用手持式分析仪而与测试盒连接。可在本发明中使用的这种测试盒和手持式分析仪的实例,分别包括i-STAT CHEM8+测试盒和**i-STAT®1**手持式分析仪。这种装置的在例如美国专利5,096,669,5,112,455,5,821,399,5,628,961,7,419,821,6,750,053,和美国D337,164中教导。

[0034] 在一些实施方式中,该装置是注射器。注射器组件可包括桶(barrel),其具有开放式近端、远端和位于近端和远端之间用于接收血液的无菌中空室;位于所述开放式近端的柱塞;固定到所述桶的针;和位于所述室内的血小板稳定剂。

[0035] 本发明的装置可以根据本领域中已知的材料、试剂和流程进行制造或组装。通过举例的方式,一种这样的方法包括增加血小板稳定性,至少一种血小板稳定剂(如本文所述的,可具有干燥或冻干形式)有效地稳定器件中的血小板;然后可选地,增加分离部件到所述装置中;以及对所述装置进行抽真空和/或灭菌。

[0036] 一种典型的冻干/抽真空过程可涉及步骤如下:在温度约-40℃且压力约760mm情况下,冰冻装置约6~8小时;随着温度从-40℃增加至约25℃,在压力约0.05mm情况下,干燥装置约8~10小时;然后在约25℃温度,压力约120mm情况下,抽真空约0.1小时;然后例如采用钴60辐射,对装置灭菌。添加剂和抗凝血剂可以采用以液体形式加入到管中,并在随后以

这种方式干燥。

[0037] 如本文所用,术语“血液”和“血液样品”是指全血,或其组分(例如,组合物诸如包含血液组分的其它身体组织或体液等),特别是它们的细胞组分,包括例如,红细胞浓缩物,血小板浓缩物(例如,富含血小板的血浆(platelet-rich plasma,PRP)),白细胞浓缩物,或血浆和血清。因此,在其他实施方式中,样品可以是含有血细胞或未成熟血细胞的体液或组织,如骨髓。

[0038] 在一些实施方式中,血液稳定剂是天然存在或合成的肽,其从吸血节肢动物的唾液腺中提取或衍生,优选来自蜱的唾液腺,最优选的来自杂色花蜱(*Amblyomma variegatum*)的唾液腺。这样的肽公开在W029017699,W003091284,W028155658中。这样的肽还公开在Cho等人的J.Biol.Chem.282(40):29101-13(2007)中。Variegin及其类似物是“直接凝血酶抑制剂”,如本领域已知的,是指结合凝血酶的活性位点并因此使可溶性和结合纤维蛋白的凝血酶失活的试剂。

[0039] 在一些实施例中,血液稳定剂具有32个氨基酸的序列NH₂-SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDES-酸,被指定为SEQ.ID NO:1(并在本文中称为variegin)。variegin的功能等同物或类似物,其用于本发明的目的,包括SEQ.ID NO:1的变体、片段(及其变体)和衍生物,其也可以用于本发明中,只要它们仍然保留了所需的稳定血小板活性。除了variegin蛋白质序列的N-末端的1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸或者C-末端的1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或甚至更多个氨基酸的缺失,Variegin片段典型地与SEQ.ID NO:1相同。

[0040] 相比较SEQ.ID NO:1,variegin的变体将典型地含有保守的氨基酸取代。典型的该类取代是在Ala、Val、Leu和Ile之间;在Ser和Thr之间;在Asp和Glu酸性残基之间;在Asn和Gln之间;在Lys和Arg碱性残基之间;或者在Phe、Trp和Tyr的芳族残基之间。在一些实施方式中,在SEQ.ID NO:1的位置4,5,6,8,10,11,12,13,14,17,18,22,25和31发生氨基酸取代。因此,在一些实施方式中,variegin的变体以一个或多个下列取代不同于SEQ.ID NO:1:在第4位的Gly被替换为Ala或Ser;第5位的Val被替换为Gly;第6位的Val被替换为Arg;第8位的Glu被替换为Gln;第10位的Lys被替换为Arg;第11位的Met被替换为Leu;第12位的His被替换为Pro;第13位的Lys被替换为Arg;第14位的Thr被替换为Asn;第17位的被替换为Gln;第18位的Phe被替换为Gly;第22位的Ala被替换为Glu;第25位的Glu被替换为Asp;以及第31位的Glu被替换为His。

[0041] variegin片段的代表性实例列于表1中。

[0042] 表1

[0043]

肽	序列
SEQ.ID.NO.1	NH ₂ -SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDES-酸
SEQ.ID.NO.2	NH ₂ -SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLD-酸
SEQ.ID.NO.3	NH ₂ -SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEE-酸
SEQ.ID.NO.4	NH ₂ -GDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDES-酸

[0044] 本发明中可以使用另一个variegin的片段是

[0045] SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYL(SEQ.ID NO.5)。

[0046] Variegin片段也可含有在一个或多个上述位置的氨基酸取代。这样片段的代表性实例包括具有氨基酸序列的片段,包括:

[0047] SDQGDVAEPAMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES(K10A)(SEQ ID NO:6),

[0048] SDQADRAQPKLHRNAPQGDFEAIPEEYL(SEQ ID NO:7),

[0049] SDQSGRAQPKLPRNAPQGDFEAIPEEYL(SEQ ID NO:8),

[0050] SDQGDVAEPMHKTAPPDFEAIPEEYLD(SEQ ID NO:9),

[0051] SDQADVAEPMHKTAPPDFEAIPEEYLD(SEQ ID NO:10),

[0052] (EP25)EPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES(SEQ ID NO:11)

[0053] EPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES(EP25A22E)(SEQ ID NO:12)

[0054] EPKMHKTAPPDFEAIPEEYL(EP21)(SEQ ID NO:13)

[0055] MHKTAPPDFEAIPEEYL(MH18)(SEQ ID NO:14)

[0056] DVAEPMHKT APPDFEAIPEEYL(DV24)(SEQ ID NO:15)

[0057] 和DVAEPRMHKTAPPDFEAIPEEYL(DV24,K10R)(SEQ ID NO:16)。

[0058] 所以,变体、片段和片段的变体典型地与SEQ ID NO:1具有至少约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或者约97%的序列相似性。

[0059] Variegin的衍生物,以及其变体和片段也可用于本发明的实践中。这种衍生物的代表性实例包括variegin及其变体和片段的改性形式,所述改性形式为通过在variegin序列的氨基酸残基加入糖类基团(例如,糖基(glycosyl group))或聚合物基团(例如,聚乙二醇)而改性。在一些实施方式中,所述衍生物具有variegin糖基化形式,其中SEQ ID NO:1的第14位的Thr被己糖部分而改性。其他实施方式可以包括本领域技术人员已知的其他翻译后修饰,包括磷酸化,往往包含于丝氨酸,苏氨酸或酪氨酸残基,苏素化,添加各种脂肪酸或脂质链,并且所有这些可以单独或包括于组合中。此外,存在可以取代序列中残基的天然或工程化的氨基酸变化,如作为精氨酸的不带电荷类似物的瓜氨酸,作为赖氨酸的不带电荷类似物的甲基赖氨酸,作为脯氨酸结构类似物的羟脯氨酸,其中包括许多在本领域技术人员已知的其他替代。

[0060] 可以根据已知的方法,例如肽合成化学(包括液相和固相化学技术),来合成Variegin及其类似物。例如,可以通过任何的固相肽合成(SPPS)的方法(例如,Fmoc或t-Boc化学方法)进行肽合成,所有这些都是本领域技术人员公知的。通常情况下,这些合成在自动肽合成仪上进行。在其它实施例中,可以在具有编码variegin或其类似物的核酸的微生物或非人类生物体通过基因工程化(例如,通过转化)产生肽。

[0061] 在本发明中有用的其它血液稳定剂包括多硫酸二糖。二糖组分通常是乳糖,海藻糖,蔗糖,麦芽糖,或纤维二糖。在一些实施方式中,二糖组分是蔗糖或海藻糖。二糖组分的硫酸基团的数目通常为4至8。因此,实施方式包括四硫酸化,五硫酸化,六硫酸化,七硫酸化和八硫酸化的乳糖,蔗糖,麦芽糖和纤维二糖,参见例如Wall等人的Thromb.Res.103:325-35(2001);Sarilla等人的J.Biol.Chem.28.5(11):8278-89(2010)。在示范性实施方式中,多硫酸二糖是蔗糖八硫酸酯(SOS),或海藻糖八硫酸酯。多硫酸二糖是间接的凝血酶抑制剂,如本领域技术人员所知晓,其是这样一种试剂,其作为抗凝血酶复合物的一部分并且其自身并不直接与凝血酶活性位点相互作用,使得它们仅可以失活可溶性凝血酶但不可以与结合纤维蛋白的凝血酶反应。SOS已知地通过肝素辅助因子II作用,使得SOS-HCII复合物

结合并抑制凝血酶。

[0062] 血液稳定剂也可包括至少一种其它的直接凝血酶抑制剂和/或至少一种其它的间接凝血酶抑制剂。直接凝血酶抑制剂在本发明中可用的代表性例子包括阿加曲班(((2R,4R)-1-[(2S)-5-(二氨基亚甲基氨基)-2-[[(3R)-3-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉-8-基]-磺酰基氨基]戊酰基]-4-甲基-哌啶-2-羧酸),水蛭素和其类似物比伐卢定,五肽RPPGF的衍生物,其包含D-异构体和/或不常见氨基酸,例如,rOicPaF(p-Me)-NH₂(在本领域中已知为“FM-19”),rOicPsF(p-Me)、rOicPaF(p-Br)、rOicPaF(p-I)、rOicPaF(P-NO₂)、F(p-Me)OicrPa、aPrOicF(p-Me)、PaF(p-Me)rOic、PF(p-Me)Oicra、以及PraF(p-Me)Oic(其中D-异构体通过小写字母指示,“OIC”表示合成的氨基酸(2S,3aS,7aS)-八氢吡啶-2-羧酸))) (例如,Nieman等人,J.Thrombosis Haemostasis6:837-845(2008)),抑肽酶,已知具有抑制凝血酶潜能的肽(Pintigny等人的Eur.J.Biochem.207:89-95(1992)),和D-苯丙氨酰-L-脯氨酰基-L-精氨酸氯甲基酮(PPACK),被称为肝素的替代(例如,Lyon等人,Clin.Chem.41:1038-1041(1995))。

[0063] 可以在本发明中使用的间接凝血酶抑制剂的代表性例子包括肝素,所述肝素具有由特定制备的分子量分布所定义各种形式(例如,未分级的,低分子量(通常为3-7千道尔顿的级分),超低分子量(通常为2-3千道尔顿),和类似的特定大小的亚级分)。肝素的治疗性亚级分,其通过基于大小或各种化学提取过程的不同分级分离(defractionation)方法而分离,包括达肝素,依诺肝素,肾上肝素(adreparin),帕肝素,达肝素,亭扎肝素,双肝素(bioparin),微小肝素,低分子肝素(sandoparin),超低分子量肝素(semuloparin),那屈肝素和其他类似分子。

[0064] 纯化模式可取决于合成方法。在一般情况下,血液稳定剂的纯度会有所不同,这取决于所使用试剂和它的来源。在一般情况下,血小板稳定剂的纯度为至少约70%,75%,80%,85%,90%或95%,或甚至更高。

[0065] 收集装置中所存在的血液稳定剂具有有效量以保留血液和其组分中的实验室可测试功能。例如,在血小板的情况中,所述量是有效的以保留血小板功能(可以包括聚集能力),并且避免或抑制血小板不再保留从而失去其原生颗粒的状态时所发生的血小板脱颗粒,和/或稳定一种或多种内源性蛋白,其可以存在于血液或血液样本或含有血液组分的组合物中。具体血液稳定剂的选择以及装置中所包含的量或浓度取决于多种因素,包括样品、每种试剂的效力及其在水中的溶解度、期望的时间血液稳定量、采血装置的容积、试剂添加到样品中而引起的溶血程度、非特异性相互作用的性质和程度(例如,由于血液中的其它蛋白质如血清白蛋白的存在)。因此,为了本发明的目的,可以存在的血液稳定剂的量以浓度范围更方便地表示(通过浓度可以容易地计算出实际的试剂的量)。

[0066] 对于血小板,功能的保留意味着在收集之后和分析之前将血小板保持在这样的状态,其中它们能够被激活或重新激活,使得血小板聚集(作为血小板功能的量度)可以在体外测量。激活的或者重新激活的,如本文上下文中所用的,意味着血小板的引发血小板结合级联和聚集的能力被保留以用于实验室体外分析,但是血小板聚集受到抑制而不被诱导,作为典型的采血装置中的收集、运输和存储物质而用于体外诊断程序。

[0067] 例如,取决于应用,某些血液稳定剂相比较其它更为有效,因此所需要的每ml样品的浓度更小。相比于相同体积的全血样品(例如,其每单位体积可以包含更少的组分诸如血

小板),稳定血液组分诸如可存在于富集组合物(诸如PRP)中的血小板可需要不同量的血液稳定剂。

[0068] 通常,可以选择至少一种血液稳定剂来实现在收集、储存和/或运输过程中直到分析测试或治疗使用的时刻,在室温下至少约50%聚集抑制活性,优选地在至少约60%至约75%的抑制活性的范围内,以及更优选为至少约75%的抑制活性。根据需要,稳定化可达到至少1小时至约6、12、24、36、48、60、72、84、96小时或更长时间。

[0069] 本领域技术人员将意识到:溶血样品是无论在血液样本的收集、运输、贮存过程中,血细胞破坏已经发生的一个明显视觉线索。虽然溶血并不一定对于任一项临床实验都是不利的,但是它却仍是一些测试的众所周知的干扰,因此优选的避免引起溶血。溶血可以通过视觉标度进行衡量(例如轻度或略带粉红色,中度或明显的红色,或严重或暗红色)。溶血也可以通过血红蛋白本身的红色分光测定而测量,并且可以通过释放到血清或血浆的血红蛋白浓度而报告(例如,使得释放的血红蛋白浓度小于约20mg/dL的,或,血红蛋白浓度可以不被视觉或光谱测量代表“微小或可忽略不计的”的溶血,约20到约100mg/dL代表“轻度”溶血,约100至约300代表“中度”溶血,或大于约300mg/dL代表“严重”溶血)。

[0070] 根据前面的考虑,血液稳定剂的浓度范围一般从约100nM至约50mM,在一些实施方式中,从约1 μ M至约10mM,在一些实施方式从约5 μ M至约5mM,在一些实施方式中,从约20 μ M至约3mM,在一些实施方式中,从约50 μ M至约2mM。

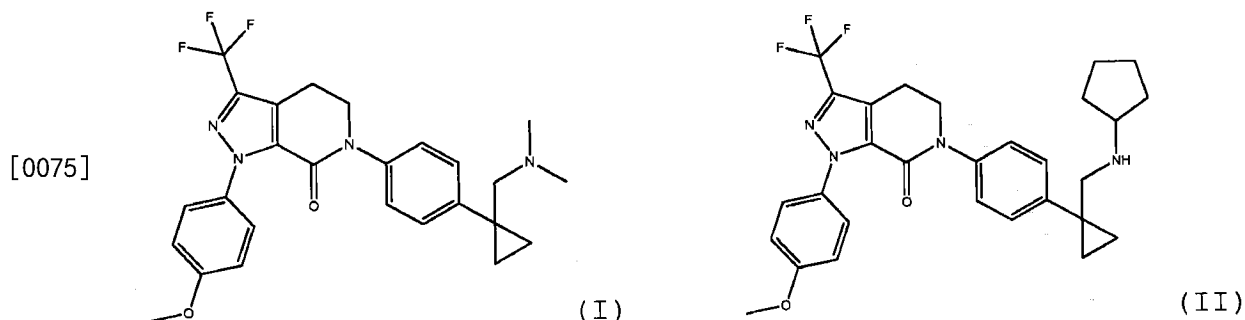
[0071] 例如,variegin或其类似物的浓度一般范围从约1 μ M到约10mM。在其它实施方式中,血液稳定剂的浓度范围为约1 μ M到约10mM。在另一些实施方式中,variegin或其类似物的浓度范围从约10 μ M到约1mM。在又一实施方式中,variegin或其类似物的浓度范围从约25 μ M到约500 μ M。在其它实施方式中,variegin或其类似物的浓度范围从约50 μ M到约300 μ M。在又一实施方式中,血液稳定剂的浓度是约150 μ M,而在其它实施方式中约为300 μ M。

[0072] 多硫酸二糖的浓度一般为约50 μ M到约50mM。在其它实施方式中,多硫酸二糖的浓度范围从约250 μ M到约25mM。在另一些实施方式中,多硫酸二糖浓度范围从约1mM至约5mM,而在另一些实施方式中,从大约为2mM至约3mM。在又一实施方式中,多硫酸二糖的浓度为约2mM,在其它实施方式中约3mM。也可考虑在这些范围内的所有子范围。本文中所公开的结合所有浓度值使用的术语“约”是指50%的可变性(加/减值)。

[0073] 血液稳定剂可以是任何适当的形式,包括溶液,悬液,或其他液体,颗粒,片剂,胶囊剂,喷雾干燥材料,冷冻干燥材料,粉末,颗粒,凝胶,结晶或冻干材料。血液稳定剂优选以这样的形式引入到容器的存储器中使得优化试剂的保质期,即,以防止血液稳定剂的降解(这将导致药效降低)。提供了干燥诸如冷冻干燥形式试剂的优点在于,提供了良好的稳定性并且还允许后续的灭菌作用,这两者从自动化和标准化的角度来看都是关键。除了设置在存储器内,血液稳定剂可以位于装置的任何表面上。稳定剂也可位于内壁上、止动件上和用于封闭该装置的密封件或、或位于该装置内的机械插件或其他插件上。

[0074] 在血液稳定剂之外,本发明的装置也可含有抗凝血剂。样本的凝血并不一定不利地妨碍测量血小板聚集,但太多的不溶性物质的形成将最终阻止获得足够的液体试样进行测试。完全凝结的样本对于血小板研究是无用的。因此,避免不溶性物质的形成是用于血液功能测试的血液试样的优选属性。抗凝血剂可增加抗凝血、血稳定化和/或variegin和/或多硫酸二糖所提供的抗溶血作用。在本发明中可用的抗凝血剂的代表性例子包括凝血因子

Xa抑制剂,凝血因子VII抑制剂,因子IX抑制剂,因子XII抑制剂,和其他凝血酶(因子II)抑制剂。Xa因子抑制剂的几种代表性实例描述在Qiao等人的Bioorg.Med.Chem.Lett.19:462-468(2009)。其中的两个结构如下:



[0076] I=6-(4-{1-[(二甲基氨基)甲基]环丙基}苯基)-1-(4-甲氧基苯基)-3-(三氟甲基)-1,4,5,6-四氢-7H-吡唑并[3,4-c]吡啶-7-酮; II=1-(4-甲氧基苯基)-6-[4-[1-(吡咯烷-1-基甲基)环丙基]苯基]-3-(三氟甲基)-4,5-二氢吡唑并[3,4-c]吡啶-7-酮。这些具体的抗凝血剂的量一般从100μg/ml至25mg/ml范围内,在一些实施方案中,从约1mg/ml至约10mg/ml。

[0077] 在一些实施方案中,另外的抗凝血剂是阿加曲班及其衍生物(例如,Tamura等人,Circ.J.73(3):540-8(2009)和Kalb等人,Platelets,20(1):7-11(2009))。阿加曲班浓度范围一般从约1 μ M至约2mM,在某些实施方案中为约10 μ M至约1mM,在其它实施方案中从25 μ M至约100 μ M。

[0078] 在其它实施方式中,另外的抗凝血剂为安替斯塔辛(antistasin)或安替斯塔辛相关肽(来自安替斯塔辛蛋白的肽片段)(参见Ohta等人,Thromb Haemost.72(6):825-30(1994))。安替斯塔辛的浓度范围一般从100nM到约2mM,在一些实施方式中约1 μ M至约100 μ M。

[0079] 可用于本发明的另一些抗凝血剂的实例包括抗凝血酶III(Jorgensen等人, Biochem.J.231(1):59-63(1985))和E-76,这是一种通过噬菌体文库针对组织因子-VIIa复合物进行的噬菌体文库筛选而获得的肽(Dennis等人, Nature404(6777):465-70(2000))。

[0080] 本发明的装置还可以包括载体介质(例如水或醇),稳定介质(聚乙烯吡咯烷酮,海藻糖,甘露糖醇等)和/或一种或多种的其他添加剂,用于处理血液或血液样本。合适的添加剂包括苯酚,苯酚/氯仿混合物,醇,醛,酮,有机酸,有机酸的盐,碱金属卤化物的盐,有机螯合剂,荧光染料,抗体、结合剂(非螯合剂),缓冲剂,和通常用于处理生物样品以进行分析的任何其他试剂或试剂组合。

[0081] 添加剂和/或抗凝血剂可以被布置在储液器和/或装置中的其它位置,只要它们与样品接触,以提供其预期的效果。例如,这些组分也可以被布置在内壁上,布置在止动件上和用于闭合该装置的密封件上或放置于位于该装置中的机械或其他插件上。

[0082] 本发明的方法包括将血液或血液样品导入到含有血液稳定剂的装置。在一些实施方式中,从患者体内抽出的血液样品直接放入容器中,没有任何干预的处理步骤。在其它实施方式中,对所收集的样品进行进一步处理,以制备组合物,例如包含血液组分的富集组合物,如PRP。

[0083] 随后对该样品进行分析测试,例如诊断测试来测量血液的参数。在一些实施方式

中,被测量的参数是血小板功能,其可以由样品中所含的血小板在刺激后聚集的能力进行评估。即使样品(例如,PRP)意于用于治疗目的时,也可以进行这样的测试。

[0084] 存在若干种体外诊断测试,其可以应用于分析包含血小板的所抽取血液样本和组合物中的血小板功能。光透过集合度测定(LTA)是一种广泛使用的技术。LTA依赖于测量可以通过富血小板血浆(PRP)制剂的光的量。在LTA中,PRP中的大量血小板散射光子,但是经添加血小板激动剂刺激聚集后,血小板聚成团,最后变得如此之大使得落入到试验腔室的底部。整个过程中,光散射减少,而聚集被测量为可通过样本的光量的增加。另一种方法是全血阻抗聚合度测定(WBIA),如下面实施例1中所描述的。另一个相关的技术具体化为Accumetrics公司出售的VerifyNow系统,其使用聚集测量的变化,这依赖于凝集纤维蛋白原涂布乳胶珠的表面上的血小板,和通过信号中吸光度的变化来检测聚集性。由西门子公司销售的称为PFA-100的测量仪器,通过分析在模型系统中的血栓形成所需要时间来测量血小板功能。PFA-100使用具有小孔的盒,通过该小孔血液可以被拉入,并且当诱导血小板聚集时,该小孔被阻塞,并且通过小孔抽血所需要的力作为聚集的函数而增加。PFA-100代表一种“物理”的测量方法,其中测量血小板功能的大分子结果,在本例情况中为装置中的孔阻塞。另一种物理方法是血栓弹力,其中通过移动销浸入样品后的物理阻力的量来测量凝块形成,包括作为血块质量不可分割的一部分的血小板聚集,并且阻力随着血凝块质量的增加而增加。相比之下,流式细胞术测量可直接作用于单个的血小板细胞,其中可以测量细胞内的具体分子变化。使用流式细胞术,可以测量当血小板活化时发生的许多特定变化,有时甚至是在上面测量中聚集的更多物理表征的前身,诸如表面蛋白(包括细胞表面受体蛋白)的形状和方向的变化,或血小板离子含量的变化(例如,已知血小板活化发生后细胞内钙离子浓度发生变化)。此外,血管扩张刺激磷酸蛋白(VASP),一种血小板内磷酸化的蛋白质,在血小板表面上的P2Y₁₂受体活化后变得更少磷酸化,并且因此VASP磷酸化下降(其可以用流式细胞仪监测)可以作为血小板活化的指示(参见,例如,Geiger等人的(2005) *Glin.Chem.* 51(6):957-965)。虽然可以使用流式细胞仪测量血小板内VASP的磷酸化状态,但是使用更典型的免疫化学方法做同样工作的间接方法也被描述。

[0085] 如工作实施例中所示,血小板聚集的能力和程度也可以通过执行“凝集”血液样本而进行测量。凝集可以通过几种进行凝集的方法中的“全血阻抗凝集”(WBIA)而测得。WBIA的一个优势是,尽管LTA需要准备PRP作为测试样本,但WBIA可以在全血样品上进行工作,且也可以采用PRP进行工作。在WBIA中,特殊样品杯内的两根电线被淹没在制备好的血液样本中,导线之间的间隙非常小,小电流在导线之间运行(电流通过小间隙之间的血液而传导)。当由操作者引入化学性刺激后,血小板开始聚集。聚集时血小板优先地在导线的表面上累积,并且血小板的递增累积开始对电流进行绝缘,导致电阻抗的增加,其通过仪器记录。典型的试验在化学刺激剂引入6分钟后收集电流数据。

[0086] 这些测量旨在感应血小板聚集的程度(也称为,在这种情况下,血小板功能),并且也在一定程度上简单感应样品中的血小板数目。在一些实施方式中,在采集后的特定时间诱导血小板聚集是有利的。因此,血小板激动剂可被加入到样品中,以诱发聚合。激动剂通常对本领域技术人员是已知的,并且可以包括,例如,胶原,二磷酸腺苷(ADP),花生四烯酸(AA),肾上腺素,凝血酶受体活化肽(TRAP),胶原蛋白-相关肽(CRP),瑞斯托霉素,凝血酶(和凝血酶类似物),血栓素受体激动剂(例如,U46619),阳离子没食子酸丙酯,以及蛇毒

(convulxin)。在许多情况下,最感兴趣的激动剂被设计为防止血小板聚集的不健康积聚的药物,这将在以下的一些例子中更详细地描述。

[0087] 也存在许多拮抗剂或可以抑制血小板反应的化合物,并且也可测量它们的效应。根据作用方式,本领域技术人员所已知的这些化合物,包括环加氧酶抑制剂(例如,乙酰水杨酸(ASA,或“阿司匹林”)),血栓素受体抑制剂(例如,特鲁托班,苏洛卓班,伊非曲班),凝血酶受体拮抗剂(PAR-1, vorapaxar, atopaxar), GpIIb/IIIa受体抑制剂(如阿昔单抗,依替巴肽,替罗非班), P2Y₁₂受体拮抗剂(如氯吡格雷(商品名:波立维(Plavix))), 二氯[(2R, 3S, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(6-(2-甲硫乙基氨基)-2-(3, 3, 3-三氟丙硫基)嘌呤-9-基]氧杂戊环-2-基]甲氧基-羟基磷酰基]氧基羟基磷酰基]甲基]磷酸(坎格雷洛), 或(1S, 2S, 3R, 5S)-3-[7-[(1R, 2S)-2-(3, 4-二氟苯基)环丙基氨基]-5-(丙硫基)-3H-[1, 2, 3]三唑并[4, 5-D]嘧啶-3-基]-5-(2-羟基乙氧基)环戊烷-1, 2-二醇(替卡格雷), 和可以破坏血小板生化功能的其他化合物。

[0088] 为各种各样的诊断测试以及为后续治疗用途而稳定抽血样和其组分是有利的。下面的公开示出了这些应用的一种代表性实例,特别是在保存血小板功能的情况下。

[0089] 鉴于不良心血管事件的急性性质,知道为患者所选择的第一治疗方法具有立即的好处(理想地,无需监测患者并选择替代疗法)可以是至关重要的。因此,在患者接受这种治疗前,他们可以提取血液样本并测试血小板功能。这样的测试也可被推荐用于持续监测处方抗血栓药的效果,检测血小板功能的过抑制或不足抑制。类似的测试往往作为术前筛查,以排除手术过程/恢复中的潜在的不利出血效果。重要的是,如果所抽取血液样本中血小板的功能不被稳定,那么该测试可能是不准确的,或者让它们在测试之前聚集(例如,无功能“留下”用于测试),或者在测试前可能“死去”或甚至失去自然功能。

[0090] 例如,在美国和世界各地的抗血小板药物具有很高的使用率。每日服用“婴儿”剂量阿司匹林用于心脏健康已成为一种普遍的做法,有多达50万美国人服用每日阿司匹林剂量。波立维(Plavix,或化学名称,氯吡格雷),是在急性情况(例如,介入性心脏病手术之后即刻或在心脏病发作或中风的紧急情况下)和慢性照顾患有心肺或循环系统并发症的患者中广泛使用的一种抗血小板疗法。氯吡格雷和阿司匹林的作用机制最终抑制血小板聚集,其目的在于,例如,减小由于自发形成的血小板聚集而产生动脉堵塞的可能性,这可能导致心脏病发作或中风。每年有超过2千9百万的Plavix书面处方。这些药物通过阻断诱导血小板聚集的化学途径而工作,因而可以帮助减轻危险的心血管事件,该心血管事件可由血小板聚集(血栓)机械阻塞动脉或静脉血流而加剧。也许多达50%的人无法很好地应答这些药物——这一直是目前医学和科学文献具有越来越大的兴趣的一个主题(例如, Tentzeris等人, Thromb Haemost. 105 Suppl 1: S60-6(2011))。“抵抗”这些药物的患者并没有经历该血小板抑制作用,从而处于非常高的不良事件风险中。当患者实际经历了处方试图防止的心脏病发作或中风时,表明这些药物无法按照意图工作的第一或唯一迹象才出现。

[0091] 很像Plavix和阿司匹林,模仿这些效果的血小板抑制剂(激动剂),可以被添加到所抽取的血液试样中以测试疗效,而不一定需要患者(抽血前)服用药物。如上所述,模仿各种化学信号的激动剂可以被添加,其可以在血管损坏时被引入到身体内部,并且可以针对其减弱激动剂反应的能力测试血小板拮抗剂的效果。

[0092] 特别是,阿司匹林即刻抑制血小板的功能,所以分析血小板聚集之前简单地直接在血液试样中添加少量阿司匹林,可允许判定阿司匹林是否将是有益的。某些P2Y₁₂抑制剂,如坎格雷洛和替卡格雷也可以直接结合和抑制血小板,并因此可以在测试其作为血小板抑制剂的疗效之前,直接加入到血液试样中。

[0093] 另一方面,由于Plavix是一种“前体药物”,其必须在摄入后通过代谢处理转化成活性形式。前体药物通常通过肝脏中的酶进行处理,产生可以在血液中循环的活性形式。因此,将Plavix的摄入(前药)形式添加到所抽取的血液样本中,将不会导致抑制血小板聚集。然而,Plavix的行动仍然可以被模仿,使得在不需要患者首先实际服用药物而进行测试。Plavix和其他类似药物作用来抑制允许ADP刺激或激活血小板的通路。化学物质2-甲基腺苷5'-磷酸(2MeSAMP),与Plavix和其它P2Y₁₂体内抑制剂具有相同的抑制目标(Srinivasan等人,J.Biol.Chem.284(24):16108-17(2009)),但可以直接作用在血小板上,所以可以添加到血液样本中后即刻进行测试。因此,在测试血小板聚集之前,添加血小板拮抗剂(如2MeSAMP)到所抽取的血液试样之中允许判定是否Plavix在患者体内对治疗有用。拮抗剂2MeSAMP也提供了坎格雷洛和替格瑞洛的药物效果的恰当模仿。

[0094] 通过例如在启动药物治疗前后抽取血液并测试血小板功能,因此血小板功能测试可以提供直接方式来测量这些药物是否在患者体内产生了期望效果。如果患者恰当地响应了药物,则所测量的血小板功能将在服药后减少。对长期治疗的患者也可以进行持续监测以确保血小板功能被抑制到足够水平,有助于防止心脏病发作或中风,同时确保相同时间内血小板功能没有被过分抑制。在后一种情况中,存在更高的风险令病人经历不可阻挡的出血事件(例如,药物引起的类血友病状态)。

[0095] 这些测试的相关应用是位于在术前筛选中。在术前对患者的固有血小板功能进行测试可以识别出那些倾向于不利的出血事件的患者,使得手术可以推迟或者状况可以在术前处理(参见,例如,Bracey等人Am.J.Cardiol.98(10A):25N-32N(2006))。例如,如果由凝集测试判断的固有血小板聚集潜力低得反常,则患者会被认定为“处于风险”。

[0096] 出于蛋白质或代谢物的生物标志物检测的目的,血小板的功能也可被保留。血小板中包含诊断所感兴趣的蛋白质和代谢物,但更可能是测量这些生物标志物在血浆中自由流通形式下浓度的测定值。据信,血小板脱颗粒,特别是血小板活化或聚集后,可导致这些标志物水平的人为升高并且如果不加以控制将代表解析前的错误。同样,血小板颗粒还含有酶,它可以破坏这些循环的生物标志物,从而导致感兴趣的生物标志物的人为低水平。虽然某些抑制剂可以被引入到血液采集管中以“拦截”从活化血小板演变的任何酶,但是期望的是通过提供稳定的血小板来首先简单地防止血小板活化,以用于这些血浆-源性生物标志物的测试。

[0097] 本发明的另一应用还涉及稳定血小板用于特定的治疗应用中。自体血小板凝胶治疗是一种治疗某些伤口以及从牙科植入物愈合到旨在修复韧带损伤的注射的宽范围的其它状况的方法。前提包括抽取血浆样本、分离“富血小板血浆”以及随后将制剂再引入到患者期望治愈的部位。一方法包括加入凝血酶或另一种促凝剂以诱导凝血,产生“胶水”,其迅速形成并可以应用来提高愈合。血小板脱颗粒,其将释放细胞因子和某些生长因子并且该脱颗粒被认为是在这个自体治疗方法中促进伤口愈合。如果血小板功能丢失并且因此血小板变得过早激活,则它们可失去这种治疗效果。因此从这一角度出发,在本发明的血液稳定

剂的存在下收集和/或存储血小板也是有利的。

[0098] 除了血小板功能分析之外,还可以测量其他临床相关的血液参数。代表的血液参数包括血浆-源性分析物的量度,如通常在临床化学、免疫化学、酶学上测试的量度,以及细胞“外”的其它分子量度(血液中的血浆部分)。其他血液参数包括细胞分析,如血细胞,全血计数(CBC),血液细胞的血液膜和显微分析,血小板颗粒形成/脱颗粒测量,和细胞的生化和代谢的表征(通常通过流式细胞仪、分子生物学、蛋白质组学进行测量)。本发明的具有这些试剂的稳定血液和血液样本将是相容的并且因此可以用于任一标准的临床测定,其中抗凝是血液样本的一个基本要求。例如,标准临床血液学测试诸如全血细胞计数(CBC),其中对血液样本中各种细胞进行区分和计数,依赖于抗凝样本,使得所有细胞保持在悬浮/溶解的全血状态。一般情况下,为了常规CBC目的,使用EDTA稳定血液。血浆的任何测试显然需要抗凝(否则样品将凝成血块,并且然后将定义为血清)。传统的临床化学计量(对于本领域技术人员已知的从几十到几百的菜单)通常采用肝素抗凝血浆样品完成。同样,免疫组织化学,或通过使用作为检测机构的抗体结合的分析物定量分析,也依赖于血浆样品。然而,EDTA和肝素的通常使用浓度(例如,13U/ml)都干扰进行血小板功能检测的实际能力。因此,没有互惠的跨平台的样本适用性。本发明克服了这一限制,因为它为血小板功能检测以及这些常见的临床血液学试验稳定血液样本。

[0099] 为了便于使用本发明,一个或多个装置可以被包装为试剂盒的形式。在一些实施例中,所述试剂盒包括一个或多个装置,例如,配置在开放式支架上或在密封封装的装置。该试剂盒也可包含一个或多个元件,其用于抽取和收集血液,例如,针,止血带,绷带,酒精和抹布,和刺血针。试剂盒还可以包括其他类型的血液收集装置如管,其具有设置在其中的公知血液稳定剂和/或抗凝血剂,其例子包括EDTA管(例如,对常规血液学计数),肝素管(用于临床化学),柠檬酸盐管(用于凝血试验),和其他特种管(用于蛋白质组学,基因组学等)。本发明的试剂盒还可以包括使用说明。

[0100] 在一些其它实施方案中,所述试剂盒可包括主收集装置,例如,具有血浆分离管(其中具有分离元件)的血浆管,以及用于测试的辅助管,例如,以浇注或以其他方式分配收集的血浆。在主管中的分离元件可以具有适当的密度使富含血小板的血浆从其他的血细胞成分中分离。辅助测试管可以与主管具有相同的或不同的大小,这取决于所需的测试。两个管都可以具有设置在其中的血小板稳定剂。该试剂盒可进一步包括管到管传输装置,以防止浇注或其它不安全的传输做法的需要,在这种情况下,辅助管将处于减压以吸引血浆。

[0101] 在本发明的另一个方面,血小板拮抗剂可以随着血液稳定剂一起包括在主血液采集管中。通过用适当的激动剂刺激,测试该样本的血小板功能来作为体外诊断试验的一部分,这可以直接反映该患者血液内的拮抗剂/药物的功效。在一个优选的实施方案中,试剂盒可以包含至少两个管,其中一个管中含有血液稳定剂,另一试管中含有血液稳定剂和血小板拮抗剂,从而使操作员可以同时抑制和不受抑制的状态测量血小板,而无需在执行聚集试验前执行血液样本的任何其它操作。

[0102] 本发明将在以下的非限制性实施例进行说明。

[0103] 实施例1:用于血小板功能检测的全血样品中的稳定性增强,由血小板聚集的测量来反映。

[0104] 血液样本:从人体对象抽取静脉血到含有柠檬酸钠(3.2%)或150 μ Mvariegin(SEQ

ID NO:1)的管中。将血液在室温下静置,在未受干扰的等分试样中,直到在所示时间进行测试。测试之前立即将样品倒置几次,以重新悬浮随着时间推移而自然沉淀的血细胞。

[0105] 测量:使用多片仪(Verum Diagnostics,Munich,Germany)且使用全血作为样本来进行血小板功能的测试(在该试验中,是聚集活性),并测量阻抗增加作为血小板聚集的量度。按照制造商的说明使用该仪器。简单地说,在每个反应容器中温热300微升等渗盐水,向其中加入300微升的全血样品。在如阿司匹林或其他血小板拮抗剂(抑制剂)中加入反应的体外实验中,20微升(μL)的阿司匹林的储液被掺入到样本中。加入血小板激动剂启动聚集反应,在该情况下,胶原蛋白为 $3.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 并且体积按照制造商说明(20 μL)。加入胶原蛋白后,阻抗测量自动开始,并持续6分钟,代表沿着图2所示曲线图中x轴的全程。该曲线图将由阻抗所报告的血小板聚集显示为随着x轴6分钟运行时间上的y轴任意无量纲量度。所示轨迹是从仪器中输送的原始血小板聚集数据。在一些图中明显的重复轨迹代表了两个总是同时运行的重复测量通道,以协助数据的统计学意义,而且在一些图中经常如此紧密地重叠使得看起来像只有一个单一轨迹。血液的代表性数据表示为在最初抽血之后在室温下保留1小时、24小时、48小时和72小时。还示出了血液本身,以及在测试之前即刻对血液预先用阿司匹林处理以抑制血小板功能的相关数据。

[0106] 根据诊断监管机构诸如临床实验室标准研究所(CLSI),柠檬酸盐全血被认为是血小板功能检测的临床使用标准。因此,我们相对柠檬酸盐比较本发明实施方案。如图2所示,新鲜时柠檬酸盐和本发明样品,在一小时时功能相当类似。两者对于胶原均强烈反应,并且均阿司匹林均显示出可测量的拮抗。然而,用于本发明实施方案中的信号强度高于柠檬酸盐参考样品,即使在“新鲜”样品中进行测试,表明即使在目前临床指南建议的抽血后最长2-4小时内测试柠檬酸盐血液的情况下,本发明的测试仍具有优势。血液立即暴露于本发明的化学具有可测量的优点。在所有更长时间处,明确的是所有柠檬酸盐血液信号明显损失,导致几乎不可测量的信号,从而使得任何对阿司匹林的拮抗作用进一步下跌的观察基本上是不可能的。相比较之下,在24和48小时处,本发明实施方案将血小板功能基本保持在1小时龄样品的水平,并且也保持测量阿司匹林拮抗作用的能力。在72小时,信号略有减少,但仍然足够强,使得当已经添加阿司匹林时仍然允许对进一步减少的观察。因此,该试验结果表面本发明的两方面优点,即新鲜采样后更强的血小板功能信号以及在抽取后若干天内仍能强大的保持血小板功能,同时允许血液在室温条件下简单贮存。

[0107] 实施例2:用于血小板功能测量的延长抽血样本可用时间

[0108] 图3示出血小板功能的测定方法的局限性,以及样本抽取后功能的损失将如何对产生临床诊断有用数据的能力带来不利影响。如实施例1所描述的进行实验。在该情况下,数据被绘制成血液样品在体外停留的时间(x轴)相对于显示为曲线下面积(AUC)的血小板功能的函数,所述曲线下面积是血小板聚集信号的一种表示。AUC是如实施例1所示的原始数据轨迹的积分后信号,并且被报告为无量纲量度。仪器有效背景水平被绘制为横跨整个曲线底部的虚线。处于该水平或低于该水平的任何聚集AUC测量值被认为是非常弱以致于无法报告,基本上表示为“空(null)”数据级。

[0109] 在24小时,变得明显的是,柠檬酸化的血液样品中的血小板失去了足够的功能,以至于非常接近有效空水平,而在阿司匹林的存在下已经达到了这个空的水平。到48小时,即使没有加入阿司匹林,柠檬酸盐样品中也无法检测到有意义的聚集。通过比较,本发明的实

施方案中稳定的血小板功能允许进行有意义的测量,即使在抽血后72小时也是如此。

[0110] 数据的另一视图表示在图4中,其中为每种类型的样品测得的血小板聚集被报告为相对于1小时的样品测得聚集的百分比。该图中的数据报告为三个人对象的平均值,而误差条表示从平均值产生的标准差。在该视图中,数据示出了在24小时内,具有柠檬酸盐的所收集和存储的血小板失去了超过其功能的一半,以及至48小时,失去了功能的超过80%。相比较,至48小时时,本发明实施方案所收集和存储的血小板保持了信号的超过一半。

[0111] 实施例3:不同浓度的variegin对血小板功能保持和抗凝的影响。

[0112] 在variegin(SEQ ID NO:1)的浓度范围内检测血小板的相对稳定性。如上所述进行试验,所有按照生产商的建议方案,使用胶原或二磷酸腺苷(ADP)作为激动剂。表2列出了稳定性的定性评估,即最初抽血后血小板聚集在多长时间位于可测量的有效仪器基线以上,同样也记录第一视觉观察凝块的时间,全血样本中的不溶性物质,以及该不溶性物质的存在下评估的严重性或程度。

[0113] 表2:不同浓度的variegin(SEQ ID NO:1)对血小板的稳定性和血液试样的质量的影响。

[0114]

发明实施方案	抽血后聚集仍在基线以上能够测量的时间	不溶性物质的可视检查
150 μM variegin	72 小时或更长	在 48-72 小时, 痕量 在 96 小时, 固体凝块
75 μM variegin	48-72 小时	在 32 小时, 痕量
50 μM variegin	24 小时	在 24 小时, 中度量 在 48 小时, 广泛凝块
15 μM variegin	24 小时	在 24 小时, 中度量 在 48 小时, 凝块
2 μM variegin	2 小时	在 7 小时, 固体凝块

[0115] 结果表明,无论是具有可测量血小板聚集信号还是全血样本中不溶性物质出现的延迟方面,variegin浓度的增加都导致更长的整体功能保持(稳定化)效果。

[0116] 结果还表明,本发明的应用是可定制的并且适合于特定的使用要求。例如,在样品可能需要迅速收集和测试的情况下,例如在医院的急诊室中,可以通过使用相对低的浓度(如,2 μ M)的血稳定剂如variegin来实现几个小时的稳定性。当较长的稳定时间是必要的,如测试可能将在完成收集数天后才进行,则结果表明使用相对高的浓度(例如,150 μ M)的血液稳定剂如variegin是有益的。与柠檬酸盐相比,本发明的好处在于,本发明可以通过选择合适浓度的血液稳定剂而在时间框架范围内提供更强的血小板聚集信号。

[0117] 实施例4:variegin和该variegin肽的其它变形对于血小板功能的保持和样品质量其它方面的影响。

[0118] 对variegin(SEQ ID NO:1)的几种类似物进行测试。表3列出了进行测试的肽,所

有这些都通过典型的固相合成产生。

[0119] 表3:variegins和变体的序列

[0120]

肽	序列号	序列
Variegins (全长 32 残基)	1	SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIP E EYLDDES
Variegins Nt29*	2	SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIP E EYLD
Variegins Nt26	3	SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIP E E
Variegins Ct29	4	GDVAEPKMHKTAPPFDFEAIP E EYLDDES
Variegins	17	MHKTAPPFDFEAIP E EYLDDES

[0121]

Ct22		
Variegins K10A	6	SDQGDVAEP<u>A</u>MHKTAPPFDFEAIP E EYLDDES

[0122] 术语:Nt是表示氨基末端的氨基酸的缩写,数字表示氨基末端开始的残基计数。Ct表示所有的羧基末端氨基酸,类似地,从氨基末端开始编号。根据标准的蛋白质序列命名,K10A是单一残基变体。

[0123] 这些肽作为血液稳定剂,在血液收集到空的真空血液收集管中后立即掺入到血液,达到最终浓度为150μM。允许血液在室温下保持全血状态,直到测试血小板聚集潜能,其全都如实施例1所述。按照制造商的说明,所用的激动剂包括胶原和ADP。表4列出了稳定性的定性评估,即在初始抽取样本后多长时间内血小板聚集位于可测量的有效仪器基线以上。同样,也记录第一视觉观察凝块的时间,全血样本中的不溶性物质,以及不溶性物质存在下的评估严重性或程度。在一些情况下,仅仅报告不溶性物质的数量可视性特性,而不会执行其它任何血小板聚集测量。

[0124] 表4:variegins变体以及它们对血小板功能保持及样品溶解性(抗凝)稳定性的影响。

[0125]

肽, 浓度	抽血后聚集仍在基线以上能够测量的时间	不溶性物质的可视检查
150μM variegin (SEQ ID NO: 1)	72 小时	在 48-72 小时, 痕量不溶物质
150μM Nt29 (SEQ ID NO: 2)	n.d.	在 32 小时, 痕量不溶物质
150μM Nt26 (SEQ ID NO: 3)	n.d.	在 7 小时, 痕量不溶物质, 在 24 小时, 固态凝块
150μM Ct29 (SEQ ID NO: 4)	54-79 小时	在 48 小时, 痕量不溶物质

[0126]

150μM Ct29+ 1.17U/ml 肝素	48 小时 (48 小时后未测量)	在 120 小时, 无或痕量不溶物质
150μM Ct22 (SEQ ID NO: 5)	n.d.	仅 1 小时内, 由痕量变成固态凝块
150μM K10A (SEQ ID NO: 6)	n.d.	在 4 小时, 固态凝块

[0127] 如数据所示, variegin 序列的缩短导致样品稳定性的持续时间较短, 特别是如通过直到全血样本中形成视觉可检测量的不溶材料的室温停留时间所判断。尽管如此, 缩短的 variegin 序列可用于, 在较短时间内总体样本稳定性就已经足够的情况下实现保持血小板功能, 例如在住院或急诊室情况下, 其中血小板测试可以在抽血后相对很快进行。

[0128] 这些 variegin 类似物中的两个 (SEQ ID: 6 和 16) 被用于研究当 variegin 最终由凝血酶裂解时产品血小板功能的保持能力。variegin 竞争结合凝血酶的活性位点, 因此, 其本身就受凝血酶裂解 (Koh 等人, J. Biol. Chem. 282(40):29101-13(2007))。另外, 易断裂残基的突变, 在位置 10 的赖氨酸变为丙氨酸, 阻止凝血酶裂解命名为 SEQ ID NO: 6 的肽的能力, 这导致了样品在抽血后 4 小时内牢固地凝块。同样, 添加 Ct22 (其表示在凝血酶裂解 variegin 后的仅 22 个羧基末端残基) 导致在一小时内牢固地凝块的几乎不可用的样品, 这基本上如果是没有向血液添加任何物质并且在放血后允许自身凝块将发生的情况。

[0129] 这些结果与 Koh 报告中所发现的结果是不一致的, 其报告 Ct22, 由传统的酶学实验测量得出, 特别地是一种用于治疗目的的有效凝血酶抑制剂。在此背景下, 在治疗目的的凝血酶抑制程度不必然预示在非生理性条件下诸如在收集的血液样品中稳定血液和其组分

(例如血小板)的目的的凝血酶抑制(或者不必然与在非生理性条件下诸如在收集的血液样品中稳定血液和其组分(例如血小板)的目的的凝血酶抑制相关联)这个意义上,本文的结果印证了在本领域中的不可预测性。

[0130] 数据还显示,Ct29和1.17U/ml肝素的组合延长具有样品稳定性的小时数。

[0131] 实施例5:其他直接或间接凝血酶抑制剂所提供的血小板功能保持的测试。

[0132] 评估多个直接或间接凝血酶抑制剂(单独或结合其它抑制剂)的通过保持血小板功能而稳定血液样本的能力。如在前实施例所描述的,使用胶原和/或ADP作为血小板激动剂并且按照制造商所建议方案,来执行血小板聚集的测量。

[0133] 除了variegin,被检测的直接凝血酶抑制剂是阿加曲班、FM-19、抑肽酶和D-苯丙氨酰-L-脯氨酰-L-精氨酸氯甲基酮(PPACK)。

[0134] 被检测的间接凝血酶抑制剂是肝素和蔗糖八硫酸酯(SOS)。

[0135] 对所有抑制剂测试其对所收集血液样本中保持血小板功能的能力,无论是单独或与variegin(SEQ ID NO:1)组合使用。

[0136] 其结果示出在表5中,其列出单独或组合使用的添加到新鲜抽取的全血样本中的添加剂。在此表中报告了三个性能参数,即:1)抽血后可以在聚集度仪基线以上进行可靠血小板聚集测量的最长时间;2)观测到不溶解物质的可视化检测的最早时间(其包括不溶性程度的定性描述,无论痕量(低水平的可检测到的材料,需要仔细视觉观察)还是中度(粗略评估后很容易看到)量,以及随后完全凝块的样品(固化为任何不受干扰的血清样品,并且一般不能以任何方式用于血小板聚集测量)),和3)溶血定性估计,如直观地确定,其是一种在临床实验室中常见和接受的做法。对于一些测试条件,仅仅记录这3个参数的子集。

[0137] 表5

[0138]

	添加剂配方	在抽血后聚集仍在基线以上可测量的时间	不溶物质的可视观察	溶血的可视观察
A	150 μ M variegin	72 小时	在 48-72 小时, 痕量。在 96 小时, 固态凝块	无-轻微
D	150 μ M variegin +1.17 U/ml USP 单位未分级肝素	72-96 小时	在 72-96 小时, 痕量	无-轻微
E	150 μ M variegin +1 mM SOS		在 72 小时, 痕量	无-轻微
F	150 μ M variegin +1 mM SOS + 1.17 U/ml 肝素		在 72 小时, 无	无-轻微
G	30 μ M Thrombostatin (FM-19)	未测定	在 24 小时, 固态凝块	无-轻微
H	150 μ M variegin + 30 μ M Thrombostatin (FM-19)	72 小时	在 72 小时, 痕量	无-轻微
I	2mM SOS	72 小时	在 96 小时, 无	无-轻微
J	150 μ M variegin +2mM SOS	72 小时	在 96 小时, 无	无-轻微
	阿加曲班 100 μ M + variegin 150 μ M	48 小时	在 48 小时, 痕量	广泛
	阿加曲班 100 μ M	24 小时	在 24 小时, 中度量,	广泛

[0139]

			在 32 小时开始， 固态凝块	
	阿加曲班 50 μ M+ 150 μ M variegin	48 小时	在 48 小时，痕量	无
	阿加曲班 50 μ M	30 小时	在 30 小时，中度 量或更糟	轻微-中度
	阿加曲班 75 μ M+ 150 μ M variegin	72 小时	在 72-96 小时， 痕量	32 小时，轻微
	阿加曲班 75 μ M	24 小时	在 24 小时中度 量，32 小时开始 固态凝块	中度-广泛
	抑肽酶 500KIU/ml + variegin 150 μ M	48 小时	在 24 小时痕量到 中度量，48 小时 固态凝块	无-轻微
	PPACK 75 μ M	n.d.	24 小时固态凝块	
	PPACK 75 μ M +150 μ M variegin	48 小时	在 32 小时痕量， 48 小时固态凝块	

[0140] 如表5所示，150 μ M的variegin和2mM的SOS，无论单独还是组合，都证明对所有三个性能指标方面是有效的。在本发明的实施方案中获得长时间框架内的稳定性(即，至少72小时)并且很大程度上没有出现不溶物形式和溶血现象的不太理想属性。

[0141] 与之形成鲜明对比的是，一些直接凝血酶抑制剂以推荐浓度或报道的有用治疗浓度单独使用时，提供很少的稳定益处或根本没有提供稳定益处。尤其是，如果在抽血后24小时内没有完全(outright)固态凝块，则FM-19、CTI和PPACK导致广泛的不溶性物质。类似地，使用相对高浓度的阿加曲班导致凝血起效更快，和更短时间的样本稳定性以进行血小板聚集测量，以及更广泛量的溶血。此外，1.17U/ml单独使用的肝素，其大约是典型肝素血浆样品的定量给料的大约十三分之一(1/13)，具有相对较差表现(数据未示出)。

[0142] 就使用已知的凝血酶抑制剂和抗凝血剂在体外稳定血液(例如，保持血小板功能)来说，这些结果进一步强调了不可预测性，并因此与申请人执行的假设相一致，所述假设是指相比较在更简单系统(诸如不存在其余的血液组分情况下的纯化凝血酶抑制研究)下对这些抑制剂的评估，至少在体外血液样本的背景下，血液的稳定性特别是血液凝块具有不同的并且可能是更为复杂的生物/生化组的要求。此外，很多关于直接凝血酶抑制剂的研究涉及用于治疗凝血障碍的潜在疗效，但是，重要的是，这样的研究和最终与作出成功治疗剂量相关的基础生化因素并不一定相关于或预测它们稳定血液组分(诸如特别是在很多小时

或很多天的周期后,所收集血液中的血小板)的能力。换言之,仅仅因为试剂已知的可用于医学上用作凝血酶抑制剂,无论是有效的特性还是适当浓度,都不必然意味着其将作为有效的血液稳定剂而用于体外测试目的。

[0143] 另一方面,结果表明,即使这些其他试剂在单独使用时效果不佳或几乎无效,但是当它们与本发明实施方案——variegin和SOS结合使用时,它们提供额外的血小板稳定效果。例如,在肝素和variegin共同使用的情况下,我们发现在全血样本中具有更长时间的聚集测量稳定性以及减少或延迟的不溶性物质形成。类似观察也出现在FM-19和variegin的组合使用中。对于FM-19和SOS,发现与variegin的组合还可以略微增加整个实验的时间框架内所测量的总体血小板聚集信号。所以,观测结果示出了:当在体外使用以稳定所抽取的血液样本时,这些抑制剂所提供的活性和最终的附加益处(其在多种情况下,已知的是通过结合凝血酶中相同区域而发挥其作用),这不同于它们在所设计的模型酶学系统中的活性,以评估它们的实际抑制潜能而用于治疗目的。

[0144] 实施例6:本发明实施方案和水蛭素之间的比较。

[0145] 使用包含150 μ M variegin(SEQ ID NO:1)+1.17USP/ml未分级肝素的本发明血液收集管,从5个不同人类对象中收集血液,以进行血小板的相对稳定性检查,并且采用可从Verum Diagnostica市售的含水蛭素采血管(产品编号MP0600的“水蛭素真空采血管”)作为比较。如实施例1所述的进行实验,使用全血阻抗聚集计,并且使用低剂量ADP(1.25 μ M最终浓度)作为激动剂。

[0146] 如表6中所示,本发明收集管中的血小板功能测量值相比于作为比较的、非本发明的水蛭素样品,在即刻和24小时后,都更为强。

[0147] 表6:使用低剂量ADP受体激动剂的血小板聚集测量

[0148]

	聚集, AUC	
	本发明管	水蛭素
0 小时 对象 1	58	34
对象 2	51	18
对象 3	88	84
对象 4	120	113
对象 5	67	59
24 小时 对象 1	32	27
对象 2	26	15
对象 3	33	25
对象 4	32	22
对象 5	44	37

[0149] 对于新鲜血液,在抽取1小时内测试,本发明采血管中所采集的血液的可测量ADP-

诱导的血小板聚集相比较在含有水蛭素的管中所收集的血液,平均高出56%。对于相同的比较,24小时时的那些相同样品示出了平均高出38%的活性。还示出了水蛭素样本在0时刻时相比较本发明配方显示更宽的分布。5个水蛭素样本示出了 62 ± 38 的聚集,表示标准差约为61% ($38/62 \times 100$)。与此相反,在本发明的管内聚集是 77 ± 28 ,标准误差仅为36%。这些结果表明本发明采血装置的使用在样本人群中实现了更均匀的响应,提高了测定的重现性。这些优点导致血小板功能测量改善的临床效用。例如,通过为健康人群制造更小的“正常”范围,具有无关(outlying)聚集的样品,其可能反映疾病或对抗血小板药物的不佳反应,可能会更容易检测。

[0150] 本发明实施方案,variegin,类似水蛭素,是从食血动物中获得的肽。但是,数据再次表明,作为一类,例如天然来源的直接凝血酶抑制剂,作为血液添加剂特别是对血小板功能分析并不具有相等或相似的疗效(在某些情况下),以及它们在这方面的功能是不可预测的。

[0151] 同样重要的是,考虑其中如表6中的数据可能被利用的其它方式。例如,如表6中所报告的,至少在患者正确响应于药物/拮抗剂情况下,期望引入血小板拮抗剂以广泛减少非拮抗信号。相关的拮抗剂包括抗血小板药物,如阿斯匹林,氯吡格雷(Plavix)和其他已经讨论过的药剂。在以前实验中,2MeSAMP的添加可能导致高达50%或更多的激动剂诱导血小板聚集,例如,67% (2/3左右),这会导致低信号,其可以证明难以可靠地在聚集仪器的检测下限之上进行测量。在2MeSAMP存在情况下落入该操作下限附近或之下的任意测量值可能无法被测量。在这些实验所使用的装置中,可靠信号的下限范围是8或9AUC。因此,至少为了用于进行该实验的特定仪器的目的,可以考虑至少约27AUC的非拮抗ADP诱导聚集测量作为最小可靠信号(从27AUC下降67%将是9AUC,其是该特定仪器的检测限)。所以27AUC的阈值是表6中数据应该针对判断的度量。

[0152] 在五个水蛭素样品的一个中,1小时样本的曲线下面积测定为18,低于该功能阈值27,从而会导致2MeSAMP存在下的读数临床不可测。在24h后,五个水蛭素样品中的三个跌破27AUC,而第四个正好是在27。

[0153] 与此相反,在本发明采血管中所收集的所有5个样本都在1小时时刻时保持了良好的血小板聚集性,位于27阈值之上,并且5个中有4个在24小时时保持在阈值之上。这结果表明本发明在收集和随后存储过程期间稳定血小板,其有利于临床相关的血小板功能数据的明确确定,特别是在聚集低水平精确测量重要的情况下,改善了随时间变化测量可使用数据的可能性(诸如在新鲜样品和存储24小时样品的水蛭素之上)。

[0154] 所有专利出版物和非专利出版物是表示在本八名所属领域的技术人员的水平。所有这些出版物引入本文作为参考,如同每个单独的出版物具体地和单独地指明是通过引用并入到相同的程度。

[0155] 虽然参照具体实施方案描述了本发明,但是应当理解,这些实施方案仅仅是说明本发明的原理和应用。因此,应当理解在不脱离由所附权利要求所限定的本发明的精神和范围的情况下可以对说明性实施方案作出许多修改并可以设计出其他排列。

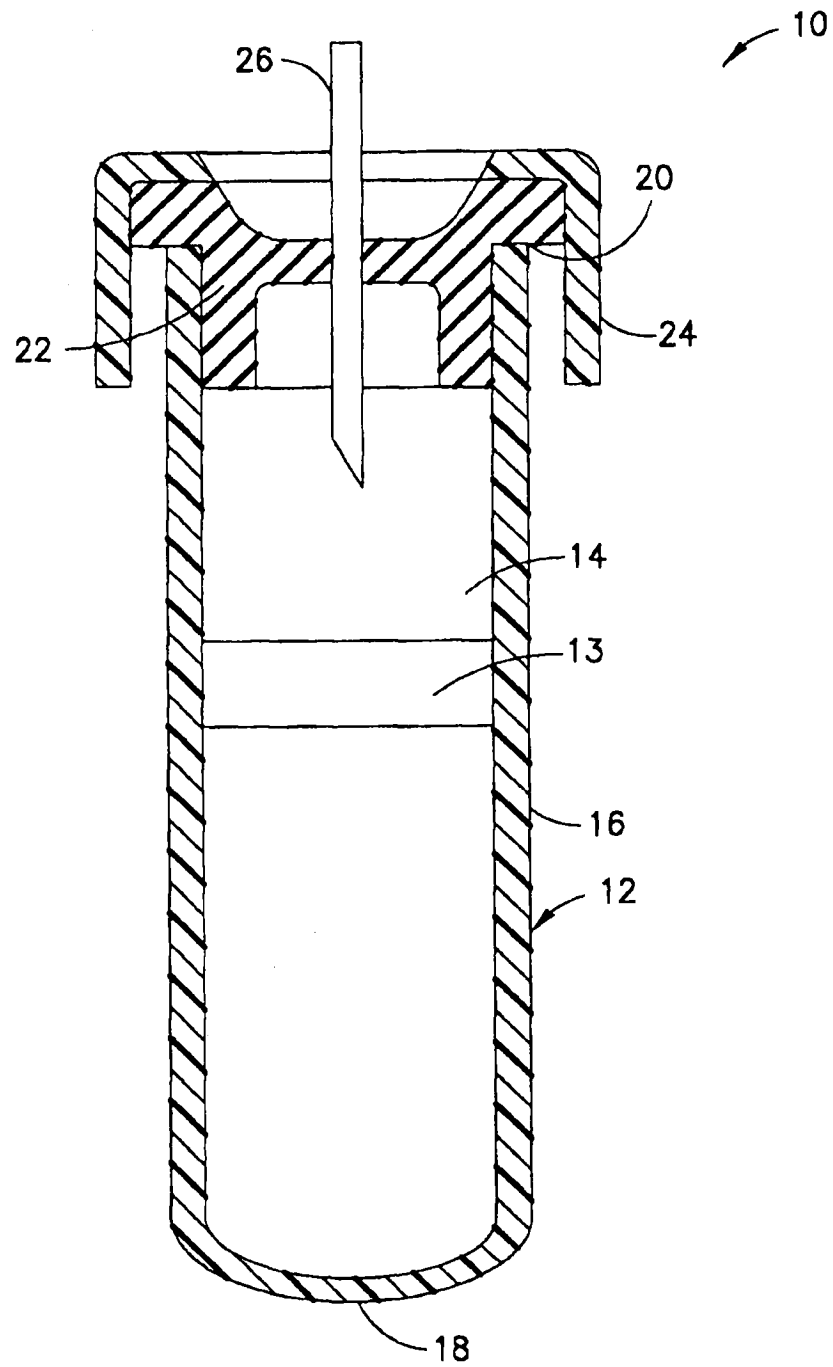


图1

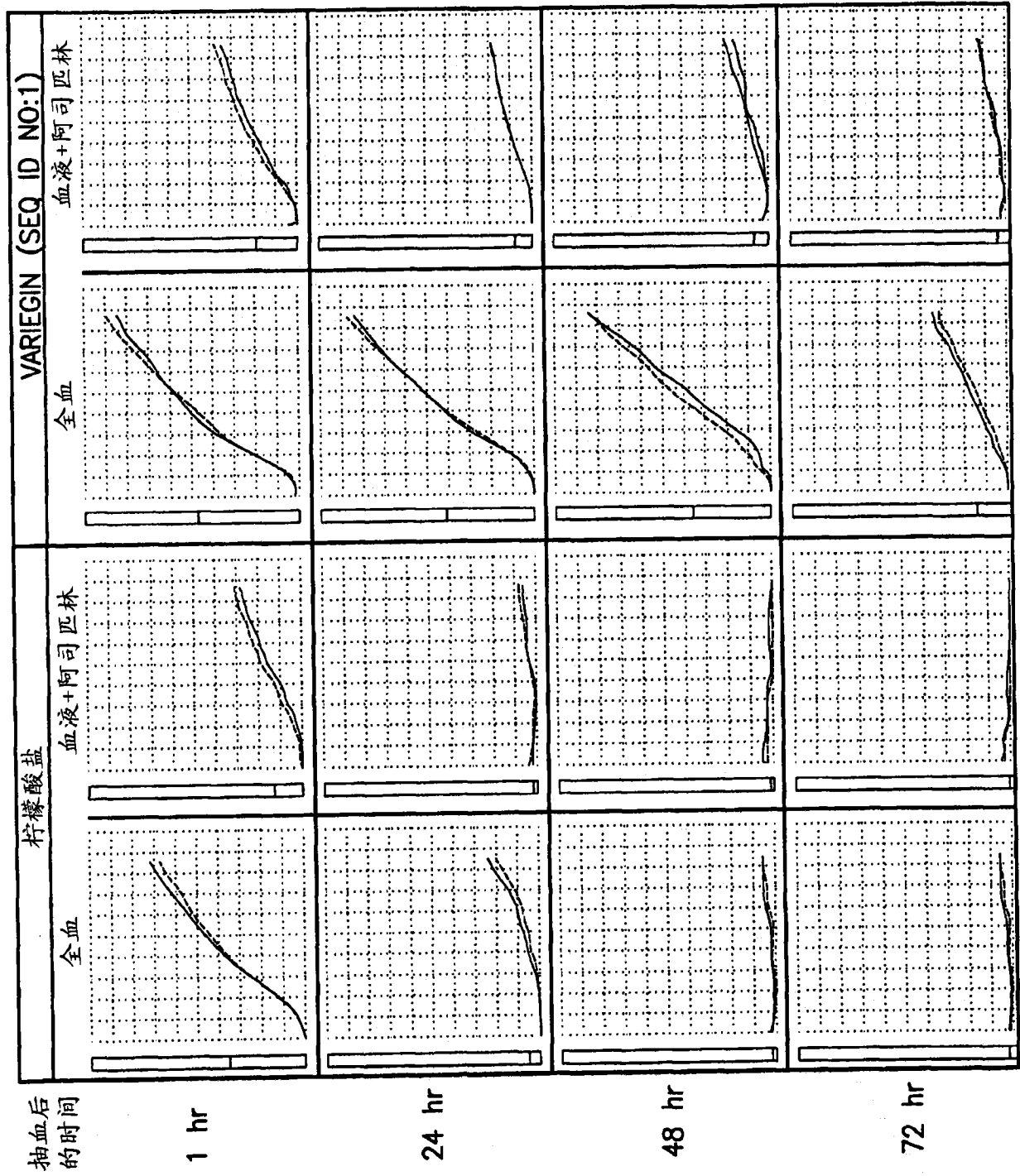


图2

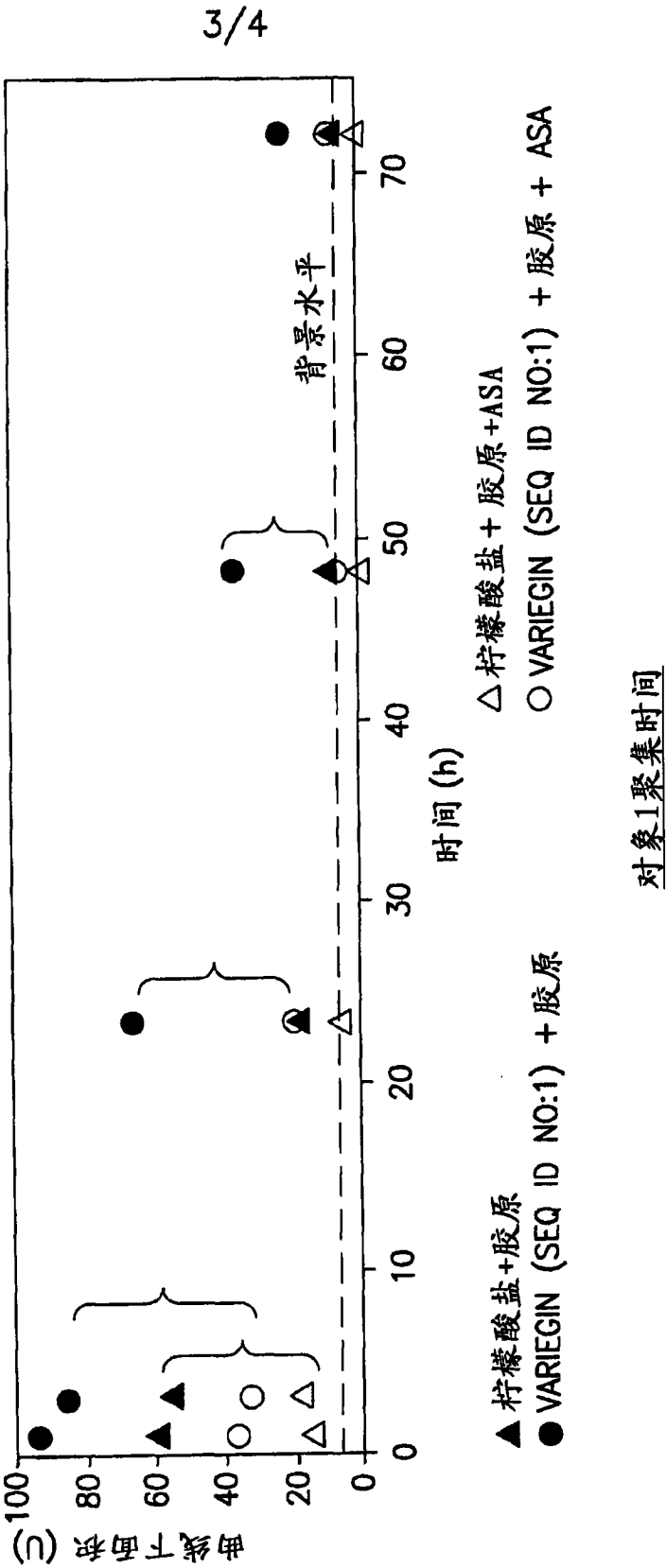


图3

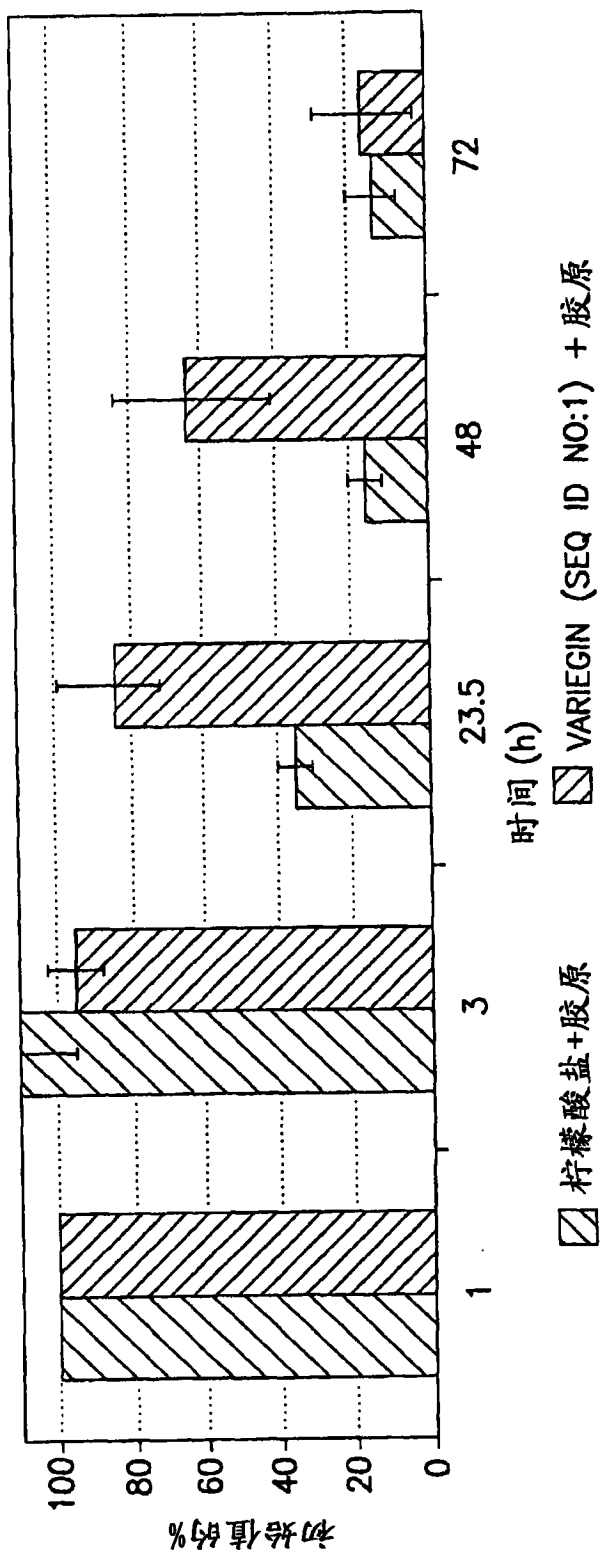


图4