

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0051281 (43) 공개일자 2014년04월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61B 5/15 (2006.01)		(71) 출원인 백톤 디킨슨 앤드 컴퍼니
(21) 출원번호 10-2014-7002651		미합중국, 뉴저지주, 프랭클린 레이크스, 1백톤 드라이브 (우:07417-1880)
(22) 출원일자(국제) 2012년07월02일 심사청구일자 없음		(72) 발명자 먼로 더겔드
(85) 번역문제출일자 2014년01월29일		미국 27510 노쓰캐롤라이나주 칼버러 파인 힐 드 라이브 102
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/045243		노바라 샤바즈
(87) 국제공개번호 WO 2013/006550 국제공개일자 2013년01월10일		미국 21223 메릴랜드주 볼티모어 사전트 스트리트 1108
(30) 우선권주장 61/504,496 2011년07월05일 미국(US)		(뒷면에 계속)
		(74) 대리인 백만기, 양영준

전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **응고 조절제 및 그를 포함하는 장치**

(57) 요약

혈액 샘플 중 응고를 조절하기 위한 장치 및 키트, 및 방법에 관한 것이다. 응고 조절제는 시트레이트, 프로타민 염, 그의 동족체 및 유도체, 벤즈아미딘, 또는 파라-아미노벤즈아미딘 중 하나 이상의 것이다. 첨가제, 예컨대, 수용성 중합체 및 당이 또한 고려된다. 장치 및 키트는 유효량의 트롬빈 및 응고 조절제를 포함하는 용기(10)를 포함한다. 본 방법은 트롬빈과 응고 조절제를 조합하여 트롬빈을 안정화시키거나, 혈액 샘플 중 트롬빈의 활성을 가속화시킨다.

(72) 발명자

호크 랜달 앨랜

미국 27513 노스캐롤라이나주 캐리 커플러스 코트
104

홈스 폴 에프.

미국 10016 뉴욕주 뉴욕 아파트먼트 3씨 이스트 3
0번가 스트리트 43

두다로벡 저스티나

미국 07960 뉴저지주 모리스타운 레이노어 로드 22

특허청구의 범위

청구항 1

혈액을 수용하기 위한 저장소부를 형성하는 제1 단부 및 제2 단부와 하나 이상의 내벽, 및 마개를 포함하며, 상기 저장소는 트롬빈 및 1종 이상의 응고 조절제를 포함하는, 혈청 수집용 용기.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 응고 조절제가 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산 화합물인 것인 용기.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리카르복실산 화합물이 시트레이트 또는 이소시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용기.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 100 mM인 것인 용기.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 1 mM 내지 약 50 mM인 것인 용기.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 응고 조절제가 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체인 것인 용기.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 혈액 샘플 mL당 약 0.05 mg/mL 내지 약 5 mg/mL인 것인 용기.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 혈액 샘플 mL당 약 0.25 mg/mL 내지 약 0.5 mg/mL인 것인 용기.

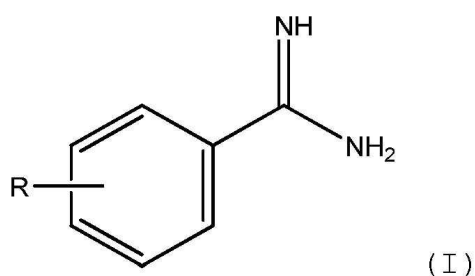
청구항 9

제1항에 있어서, 상기 응고 조절제가, 억제 상수가 0.1 마이크로몰 초과인 트롬빈의 약한 경쟁 억제제인 것인 용기.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 트롬빈의 약한 경쟁 억제제가 하기 화학식(I)의 화합물인 것인 용기:

<화학식(I)>



상기 식에서,

R은 $-NR^1R^2$; $-NO_2$; 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지는 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 알킬기; 할로젠;

$-\text{CO}(\text{O})\text{R}^1$; $-\text{CO}-\text{NR}^1\text{R}^2$; $-\text{OH}$; 또는 $-\text{OR}^1$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이할 수 있고, 수소, 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 알킬기 및 $-(\text{CH}_2)_x-$ 아틸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

x 는 1 내지 10 범위의 정수이다.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 응고 조절제가 벤즈아미딘인 것인 용기.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 응고 조절제가 파라-아미노벤즈아미딘인 것인 용기.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 20 mM인 것인 용기.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 1 mM 내지 약 10 mM인 것인 용기.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 수집용 용기가 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함하는 것인 용기.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 수용성 중합체가 폴리비닐피롤리돈, 다당류, 및 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용기.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 당이 텍스트란, 시클로텍스트린, 트레할로스, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용기.

청구항 18

제1항에 있어서, 분리 부재를 추가로 포함하는 것인 용기.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 분리 부재가 겔 조성물을 포함하는 것인 용기.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 겔 조성물이 요변성 겔을 포함하는 것인 용기.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 겔 조성물이 캡슐에 함유되어 있는 것인 용기.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 분리 부재가 기계식 분리 부재를 포함하는 것인 용기.

청구항 23

제1항에 있어서, 마개가 바늘에 의해 천공가능하고, 용기는 바늘을 통해 용기 내로 도입된 혈액을 추가로 포함하는 것인 용기.

청구항 24

트롬빈, 및 트롬빈을 안정화시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 상기 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 응고 조절제가 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산 화합물인 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 폴리카르복실산 화합물이 시트레이트 또는 이소시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 100 mM인 것인 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 응고 조절제가 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체인 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 혈액 샘플 mL당 약 0.05 mg/mL 내지 약 5 mg/mL인 것인 방법.

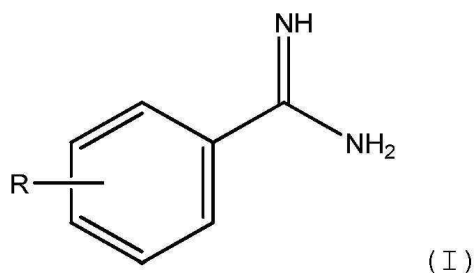
청구항 30

제24항에 있어서, 상기 응고 조절제가, 억제 상수가 0.1 마이크로몰 초과인 트롬빈의 약한 경쟁 억제제인 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 트롬빈의 약한 경쟁 억제제가 하기 화학식(I)의 화합물인 것인 방법:

<화학식(I)>



상기 식에서,

R은 $-NR^1R^2$; $-NO_2$; 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지는 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 알킬기; 할로젠; $-CO(O)R^1$; $-CO-NR^1R^2$; $-OH$; 또는 $-OR^1$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이할 수 있고, 수소, 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 C_1-C_{10} 알킬기 및 $-(CH_2)_x-$ 아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

x는 1 내지 10 범위의 정수이다.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 응고 조절제가 벤즈아미딘인 것인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 응고 조절제의 농도 범위가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 20 mM인 것인 방법.

청구항 34

제24항에 있어서, 상기 용기가 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 35

트롬빈, 및 트롬빈의 활성을 가속화시키는 데 충분한 농도로 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 상기 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체의 농도 범위가 혈액 샘플 mL당 약 0.05 mg/mL 내지 약 5 mg/mL인 것인 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 용기 중에서 저분자량 폴리카르복실산 또는 트롬빈의 약한 경쟁 억제제 중 하나 이상을 조합하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

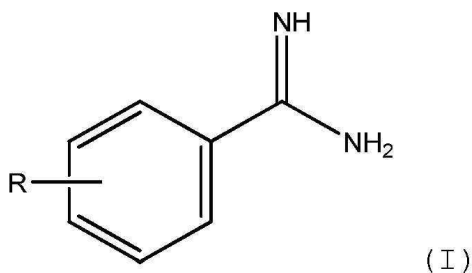
청구항 38

제37항에 있어서, 상기 용기 중에서 저분자량 폴리카르복실산 및 트롬빈의 약한 경쟁 억제제 둘 모두를 조합하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 트롬빈의 약한 경쟁 억제제가 하기 화학식(I)의 화합물인 것인 방법:

<화학식(I)>



상기 식에서,

R은 $-NR^1R^2$; $-NO_2$; 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지는 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 알킬기; 할로겐; $-CO(O)R^1$; $-CO-NR^1R^2$; $-OH$; 또는 $-OR^1$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이할 수 있고, 수소, 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 C_1 - C_{10} 알킬기 및 $-(CH_2)_x-$ 아틸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

x는 1 내지 10 범위의 정수이다.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 응고 조절제가 벤즈아미딘인 것인 방법.

청구항 41

제37항에 있어서, 상기 저분자량 폴리카르복실산의 농도 범위가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 100 mM인 것인 방법.

청구항 42

제37항에 있어서, 상기 트롬빈의 약한 경쟁 억제제가 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 20 mM인 농도 범위로 존재하는 것이 방법.

청구항 43

제35항에 있어서, 상기 용기 중에서 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 조합하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2011년 7월 5일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/504,496호의 출원일에 대한 이점을 주장하고, 그의 개시내용은 본원에서 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 혈청은 혈액을 응고시킨 후에 남은 전혈의 액체 부분이다. 혈청에는, 응고 과정 동안 소비되거나 포획되는 전혈 성분, 즉, 적혈구 세포, 백혈구 세포, 혈소판 및 혈액 응고 인자가 없다. 따라서, 혈청은 응고 동안에 사용되지 않는 모든 단백질을 포함하고, 이는 또한 당, 지방, 효소, 항체, 항원, 호르몬, 하전된 입자 (즉, 전해질) 및 외인성 물질 (예컨대, 약물 및 미생물)을 포함한다. 따라서, 혈청은 근육 및 기관의 기능, 대사 균형, 및 기본 생리학적 기능을 진단하고 모니터링하는 데 사용되는 임상 시험의 대상이 되는 우선적 시험 기질이다. 또한 혈청은 응고 과정을 통해 원치않는 물질의 개입이 제거되었는 바, 다른 분석 시험, 예컨대, 효소, 전해질, 단백질 및 글루코스 검정법을 수행하는 데 바람직하다.

[0004] 혈청은 응고된 혈액을 원심분리함으로써 수득된다. 과거의 전혈로부터 혈청을 제조하는 방법은 새로 수집된 혈액을 유리 시험관에 첨가하고, 응고시키는 수동적인 과정이었다. 별법으로, 다른 혈청 관은 응고 캐스케이드를 자극시키기 위해 실리카 또는 엘라그산을 함유할 수 있다. 일단 신체로부터 제거되고 나면, 혈액은 응고되는 자연적 성향을 가지며, 혈액이 예컨대, 유리와 같은 표면에 노출되면 더욱 효율적인 방식으로 응고가 촉진된다. 유리 표면과 접촉하게 되면, 보통 응고 캐스케이드로 지칭되는 기전에서 상호작용하는 응고 인자가 활성화된다. 이러한 과정에서, 불활성 응고 인자는 화학적으로 활성 효소로 전환되고, 이어서, 상기 효소는 추가의 또 다른 불활성 전구체를 전환시킨다. 응고 캐스케이드의 최종 결과는 가용성 혈장 단백질인 피브리노겐의 불용성 단백질인 피브린으로의 전환이며, 이에 의해 피브린 응괴(clot)는 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포획하여 고체 젤라틴성 덩어리를 형성하게 된다. 예컨대, 상기 기술된 것과 같이, 상기 과정에서 소비되지 않는 물질은 젤라틴성 덩어리에는 없고, 액체 매트릭스, 즉, 혈청 중에서 발견된다.

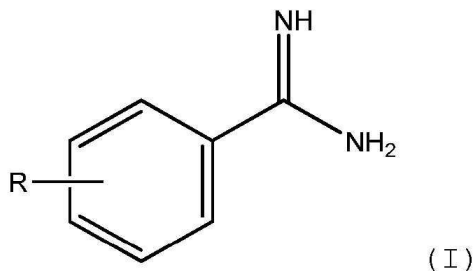
[0005] 상기 기술된 수동적인 응고 과정은 몇가지 문제를 일으킨다. 정상적인 건강한 개체로부터의 혈액은 유리 시험관에서 30분 이상의 시간이 경과한 후에 응고될 수 있지만, 응고 단백질이 결핍되어 있는 아픈 개체로부터, 또는 항응고 요법 (즉, 경구용 항응고제 또는 헤파린)을 받고 있는 환자로부터의 혈액은 응고되는데 장시간 (즉, 2-8시간)이 요구될 수 있다. 결과적으로, 혈액 표본 수득, 및 분석 시험 수행과 관련되는 지연이 존재하게 되며, 이로써, 빠르게 최적으로 환자를 치료할 수 있는 임상사의 능력에 영향을 주게 된다. 추가로, 응고 단백질이 결핍되어 있는 개체로부터, 또는 항응고 요법을 받고 있는 환자로부터의 혈액은 완전하고 적절한 피브린 덩어리를 전혀 형성하지 않을 수도 있다. 예를 들어, 헤파린 처리된 혈액 표본에서의 불완전한 응고는 화학 시험을 수행할 때, 불량한 품질의 혈청 기질을 초래한다. 추가로, 헤파린에 의해 응고가 억제된 혈액으로부터의 혈청은 처음에는 응고되지 않을 수 있는데, 이는 일단 분석 장치에 배치되고 나면 응고하기 시작할 수 있고, 이로 인해 시스템은 막히게 되고, 장치는 멈추게 된다.

[0006] 응괴 형성 과정의 예측가능성 및 균일성을 개선시키기 위하여, 기술자들은 통상 응고 촉진제인 트롬빈 및/또는

"트롬빈-유사" 활성을 가지는 매우 밀접한 관계가 있는 효소 (예컨대, 바트록소빈)를 혈액 표본에 첨가하였다. 트롬빈은 능동적으로 피브리노겐을 피브린으로 전환시킴으로써 보다 저속인 유리 활성화된 응고 과정에서보다 더 효율적으로 응고를 형성한다. 혈액 수집 관 중 트롬빈 및/또는 또 다른 효소를 사용하는 것이 가지는 한가지 단점은 상기 단백질이 실리카 기반 접촉 경로 활성 인자만큼 안정적이지 못하다는 점이다. 예를 들어, 수분 및 승온에의 노출은 트롬빈을 불활성화시킬 수 있다. 그러나, 실리카 기반 방법은 대개 완전하게 혈액을 응고시키지 못하며, 이로 인해 부분적으로 응고된 물질이 형성되는데, 이는 혈액 샘플, 예컨대, 전혈로부터의 수득된 혈청 시험을 방해할 수 있다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명의 간단한 요약
- [0008] 본원에서는 혈액을 수용하기 위한 저장소부를 형성하는 제1 단부 및 제2 단부와 하나 이상의 내벽, 및 혈액을 저장소로 공급하기 위한 바늘에 의해 천공가능한 마개를 포함하며, 저장소는 트롬빈 및 1종 이상의 응고 조절제를 포함하는 것인, 혈청 수집용의 멸균 및 진공형 용기를 개시한다.
- [0009] 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산이다. 일부 실시양태에서, 폴리카르복실산은 시트레이트 또는 이소시트레이트 ("시트레이트")이다. 추가의 실시양태에서, 폴리카르복실산 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 100 mM이다. 추가의 실시양태에서, 폴리카르복실산 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 1 mM 내지 약 50 mM이다.
- [0010] 다른 실시양태에서, 응고 조절제는 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체이다. 추가의 실시양태에서, 프로타민 응고 조절제의 농도 범위는 혈액 샘플 mL당 약 0.05 mg/mL 내지 약 5 mg/mL이다. 추가의 실시양태에서, 프로타민 응고 조절제의 농도 범위는 혈액 샘플 mL당 약 0.25 mg/mL 내지 약 0.5 mg/mL이다.
- [0011] 다른 실시양태에서, 응고 조절제는 트롬빈의 약한 경쟁 억제제이다. 약한 억제제는 트롬빈 활성을 억제시키는 방식으로 억제제 결합을 촉진시키는 것인 아닌 조건을 샘플에 가함으로써 가역화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제의 억제 상수는 약 0.1 마이크로몰 초과이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 하기 화학식(I)의 화합물이다:
- [0012] <화학식(I)>



- [0013]
- [0014] 상기 식에서,
- [0015] R은 $-NR^1R^2$; $-NO_2$; 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지는 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 알킬기; 할로젠; $-CO(O)R^1$; $-CO-NR^1R^2$; $-OH$; 또는 $-OR_1$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0016] R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이할 수 있고, 이는 수소, 할로젠, 치환 또는 비치환된, 선형 또는 분지형 C_1-C_{10} 알킬기 및 $-(CH_2)_x$ -아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;
- [0017] x는 1 내지 10 범위의 정수이다.
- [0018] 추가의 예시적인 실시양태에서, 응고 조절제는 벤즈아미딘이다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 응고 조절제는 파라-아미노벤즈아미딘이다. 추가의 실시양태에서, 화학식(I)의 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 20 mM이다. 추가의 실시양태에서, 화학식(I)의 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 1

mM 내지 약 10 mM이다.

- [0019] 또 다른 실시양태에서, 용기는 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함하는 수집용 용기를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 다당류 및 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 당은 텍스트란, 트레할로스, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0020] 또 다른 실시양태에서, 용기는 분리 부재를 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 분리 부재는 기계식 분리 부재를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 분리 부재는 겔 조성물을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 겔 조성물은 요변성 겔을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 겔 조성물은 캡슐에 함유되어 있다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 용기는 수집된 혈액을 추가로 포함한다.
- [0022] 본원에서는 또한 트롬빈, 및 트롬빈을 안정화시키고/거나, 그의 활성을 가속화시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법을 개시한다.
- [0023] 본원에서는 또한 트롬빈, 및 혈액 혈청 샘플 중 피브리노의 농도를 감소시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법을 개시한다.
- [0024] 본원에서는 또한 트롬빈, 및 트롬빈을 안정화시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법을 개시한다.
- [0025] 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산이다. 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 폴리카르복실산은 시트레이트이다. 일부 실시양태에서, 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 100 mM이다.
- [0026] 상기 기술된 방법에서, 응고 조절제는 앞서 기술된 바와 같은 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체이고, 이는 앞서 기술된 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 응고 조절제의 농도 범위는 혈액 샘플 mL당 약 0.05 mg/mL 내지 약 5 mg/mL이다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 트롬빈의 약한 경쟁 억제제이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제의 억제 상수는 약 0.1 마이크로몰 초과이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 앞서 기술된 화학식(I)의 화합물이다.
- [0028] 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 앞서 기술된 농도의, 기술된 바와 같은 파라-아미노벤즈아미딘이다. 일부 실시양태에서, 화학식(I)의 응고 조절제의 농도 범위는 농축 제제의 약 0.5 mM 내지 약 20 mM이다.
- [0029] 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 수집용 용기는 앞서 기술된, 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함한다.
- [0030] 본원에서는 또한 트롬빈, 및 트롬빈의 활성을 가속화시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법을 개시한다. 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 앞서 기술된 농도의, 상기 기술된 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체이다.
- [0031] 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 본 방법은 용기에 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산, 또는 트롬빈의 약한 경쟁 억제제 중 하나 이상을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 기술된 방법의 일부 실시양태에서, 본 방법은 용기에 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산 및 트롬빈의 약한 경쟁 억제제 둘 모두를 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 수집 방법의 일부 실시양태에서, 폴리카르복실산은 앞서 기술된 농도의, 앞서 정의된 시트레이트이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제의 억제 상수는 약 0.1 마이크로몰 초과이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 앞서 기술된 화학식(I)의 화합물이다. 수집 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 상기 기술된 농도의, 상기 기술된 파라-아미노벤즈아미딘이다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 조절 방법을 위한 수집용 용기는 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는

첨가제를 추가로 포함한다.

- [0033] 본원에서는 또한 트롬빈, 및 혈액 샘플 중 피브린의 농도를 감소시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계, 및 용기에 혈액 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액을 수집하는 방법을 개시한다.
- [0034] 수집 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 앞서 기술된 농도의, 앞서 기술된, 분자량이 약 500 g/mol 미만인 폴리카르복실산이다.
- [0035] 수집 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 앞서 기술된 농도의, 앞서 기술된, 프로타민 염, 또는 그의 동족체 또는 유도체이다.
- [0036] 수집 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 상기 기술된 화학식(I)의 화합물이다.
- [0037] 수집 방법의 일부 실시양태에서, 응고 조절제는 상기 기술된 농도의, 앞서 기술된 파라-아미노벤즈아미딘이다. 수집 방법의 일부 실시양태에서, 수집용 용기는 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 본 발명에서 사용하기에 적합한 수집용 용기를 도시한 것이다.
- 도 2는 프로타민이 피브린 덩어리 형성 경감에 미치는 효과를 보여주는 차트이다.
- 도 3은 프로타민 농도와 응고 시간 사이의 관계를 보여주는 차트이다.
- 도 4는 프로타민이 트롬빈 활성화에 미치는 효과를 도시한 차트이다.
- 도 5는 프로타민이 트롬빈 활성화에 미치는 효과를 도시한 차트이다.
- 도 6은 p-아미노벤즈아미딘이 트롬빈 활성화에 미치는 효과를 도시한 차트이다.
- 도 7은 p-아미노벤즈아미딘이 트롬빈 활성화에 미치는 효과를 도시한 차트이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본원에서는 트롬빈의 작용을 증진, 촉진, 안정화, 가속화, 또는 조절하기 위한 (이하, "응고 조절"로 언급) 방법, 장치, 및 키트를 기술한다. 트롬빈의 작용을 증진, 촉진, 또는 조절한다는 것은, 혈액만 단독으로, 또는 트롬빈 또는 트롬빈-유사 물질 (이하, "트롬빈")이 첨가된 혈액으로 이루어진 샘플보다 더욱 완전하게 및/또는 더욱 빠르게 응고되거나, 응고된다는 것을 의미한다. 더욱 특히, 방법, 및 장치는 피브리노겐에서 피브린으로 전환시킬 수 있는 트롬빈의 능력을 안정화시키거나, 가속화시키거나, 또는 다르게는 조절하거나, 및/또는 다르게는 혈액 샘플 (예컨대, 혈청) 중 불용성 피브린 및/또는 피브리노겐의 양을 감소시키기 위한 것으로 기술된다.
- [0040] 한 실시양태에 따라, 본원에서는 (1) 일정량의 트롬빈 (또는 트롬빈-유사 물질), 및 (2) 일정량의 본원의 1종 이상의 응고 조절제를 포함하는 용기를 가지는 장치를 기술한다. 트롬빈 및 응고 조절제는 혈액 샘플과 함께, 바람직하게는 그의 수집시에 즉시 혼합하기 위해 존재한다. 그러나, 트롬빈 또는 응고 조절제 중 임의의 것은 그의 수집 이후에 샘플에 첨가될 수 있다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바, "혈액 샘플"이라는 용어는 응고 가능한 혈액 성분을 적어도 일부 함유하는 임의의 생물학적 샘플을 의미한다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플은 전혈이다. 다른 실시양태에서, 혈액 샘플 (예컨대, 혈청)은 전혈 샘플로부터 유래된 것이고, 이에 의해 혈액 중 하나 이상의 성분은 원심분리에 의해 이미 제거되어 있는 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 혈액 샘플은 혈장 농축물이다.
- [0042] 용기는 관, 예컨대, 시험관 및 원심분리관; 밀폐형 시스템 혈액 수집용 장치, 예컨대, 수집용 백; 시린지, 특히, 사전 충전된 시린지; 카테터; 마이크로웰 및 다른 다중 웰 플레이트; 어레이; 배관; 실험실용 베셀, 예컨대, 플라스크, 스피너 플라스크, 롤러 병, 바이알, 현미경용 슬라이드, 현미경용 슬라이드 조립체, 커버슬립, 필름 및 다공성 기관 및 조립체; 피펫 및 피펫 팁 등; 랜셋, 모세관, 및 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)로부터 이용가능한 마이크로테이너(Microtainer)® 브랜드 제품; 트롬빈이 사전 패키징된 관을 포함하는, 벡톤 디킨슨로부터 이용가능한 배큐테이너(Vacutainer)® 브랜드의 정맥혈 수집용 관을 비롯한, 조직 및 다른 생물학적 샘플

플 수집용 용기를 비롯한 임의의 샘플 수집용 장치; 및 생물학적 샘플을 수용하는 데 적합한 임의의 다른 용기 뿐만 아니라, 샘플을 옮기는 데 관여하는 용기 및 부재도 포함할 수 있다. 응고 조절제는 본원에 개략적으로 설명된 기준을 충족시킨다면, 상기 용기들 중 임의 것으로 도입될 수 있다.

[0043] 용기는 본원의 기준을 충족시킨다면, 플라스틱 또는 유리로 구성될 수 있다 (즉, 그로부터 제작될 수 있다). 일부 실시양태에서, 용기는 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리스티렌, 폴리카르보네이트, 셀룰로스 화합물, 폴리테트라플루오로에틸렌으로 구성되고, 다른 불소화된 중합체 또한 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 용기는 폴리올레핀, 폴리아미드, 폴리에스테르, 실리콘, 폴리우레탄, 에폭시, 아크릴, 폴리 아크릴레이트, 폴리술폰, 폴리메타크릴레이트, PEEK, 폴리이미드 및 플루오로중합체, 예컨대, PTFE 테플론 (Teflon)®, FEP 테플론®, 테프젤(Tefzel)®, 폴리(비닐리덴 플루오라이드), PVDF 및 퍼플루오로알콕시 수지로 구성된다. 실리카 유리를 포함하는 유리 제품 또한 용기를 제작하는 데 사용된다. 한 예시적인 유리 제품으로는 코닝 글래스, 코닝(Corning Glass, Corning: 미국 뉴욕)으로부터 이용가능한 피렉스(PYREX)®가 있다. 세라믹 용기가 본 발명의 실시양태에 따라 사용될 수 있다. 셀룰로스 제품, 예컨대, 종이 및 강화 종이 용기 또한 용기 물질로서의 역할을 할 수 있다.

[0044] 본 발명의 한 실시양태에 따라, 용기는 트롬빈 또는 응고 조절제 중 하나 이상의 것으로 전처리되고, 즉석 사용 형태로 패키징된다. 다른 실시양태에서, 용기는 트롬빈 및 응고 조절제 둘 모두로 전처리된다. 전형적으로, 패키징된 용기는 멸균된 것이고, 이는 또한 멸균 포장재로 패키징된다. 패키징된 컬렉션 (또는 "키트")은 사용, 보관, 수송, 및/또는 취급에 관한 설명서를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일부로서 사용되는 트롬빈은 천연 및 합성 기원의 것을 비롯한, 임의의 공급원으로부터 유래된 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소 트롬빈이 사용된다. 다른 실시양태에서, 다른 종으로부터 유래된 트롬빈이 사용된다. 추가의 다른 실시양태에서, 재조합 트롬빈이 사용된다. 재조합 트롬빈은 변형되지 않은 트롬빈과 비교하였을 때, 안정성이 개선되도록, 또는 다른 혈액 성분에서 의한 불활성화에 대하여 내성하도록 변형된 것일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 트롬빈은 알파-트롬빈이다. 알파-트롬빈은 당업자에게 주지되어 있고, 이는 본원에 상세하게 기술되어 있다. 용기에 사용되는 트롬빈의 농도 범위는 혈액 부피 1 밀리리터당 약 0.1 내지 약 100 유닛 (u) (u/ml)이다. 일부 실시양태에서, 용기에 사용되는 트롬빈의 농도 범위는 혈액 부피 1 밀리리터당 약 1 내지 약 20 유닛이다.

[0046] 용기는 또한 1종 이상의 응고 조절제를 포함한다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 응고 조절제는 하기: (1) 트롬빈을 적어도 부분적으로 안정화시키는 것; (2) 혈액 샘플 (예컨대, 혈청) 중 불용성 피브리린 및/또는 피브리노겐의 양을 적어도 부분적으로 감소시키는 것; 또는 (3) 트롬빈의 작용을 적어도 부분적으로 가속화시키는 것 중 하나 이상을 달성할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0047] 본원에 기술된 한 실시양태에서, 응고 조절제는 프로타민, 또는 그의 염 또는 수화물이다. 임의의 프로타민 또는 그의 유도체는, 그가 상기 기술된 주장하는 본 발명의 기준을 충족시킨다면, 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로타민은 연어 정자로부터 유래된 것이며, 이는 서열 번호 1로 확인되는 서열을 가진다 (서열 번호 1: PRRRSSSR PVRRRRPRV SRRRRRGR RRR). 다른 관련된 공급원으로부터의 프로타민 서열도 매우 유사한 서열을 가지며, 이 또한 바람직한 특성을 가질 수 있는 바, 추가로 고려될 수 있다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 프로타민은 트롬빈을 안정화시키거나, 또는 그의 활성을 가속화시킬 수 있다고 여겨진다.

[0048] 본원에 기술된 한 실시양태에서, 응고 조절제는 트롬빈의 약한 활성 부위의 경쟁 (및 따라서 가역성) 억제제이다. 상기 억제제의 첨가가, 혈액 수집용 장치 및 트롬빈 함유 체제로 이루어진 패키징된 조합물의 저장 수명 동안 트롬빈을 안정화시키는 것으로 여겨진다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 약한 활성 부위의 경쟁 억제제는 트롬빈의 자기 파괴성 자가용해 활성을 저속화시킴으로써 이를 안정화시키는 것으로 여겨진다. 혈액으로 희석시켰을 때, 약한 억제제는 트롬빈으로부터 해리되고, 이로써, 응괴 형성에 관여하기 이전에 샘플 중에 더욱 잘 분산될 수 있다.

[0049] 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 활성 부위의 경쟁 억제제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제의 억제 상수 (K_i)는 약 0.1 마이크로몰 초과이다. 다른 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제의 억제 상수 범위는 약 0.1 마이크로몰 내지 약 1,000 마이크로몰이다. 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 화학식(I)의 화합물을 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 약한 활성 부위의 경쟁 억제제는 예컨대, 상기 기술된 화학식(I)의 것으로 나타낸, 치환 또

는 비치환된 벤즈아미딘이다.

- [0051] 한 실시양태에서, 화학식(I)의 화합물은 벤즈아미딘이다. 추가의 다른 실시양태에서, 응고 조절제는 파라-아미노벤즈아미딘, 메타-아미노벤즈아미딘, 및 오르토-아미노벤즈아미딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0052] 본원에 기술된 또 다른 실시양태에서, 응고 조절제는 분자량이 약 500 g/mol 미만인 저분자량 폴리카르복실산 화합물 (또는 그의 염)이다. 예를 들어, 적합한 폴리카르복실산 화합물은 식 $C(O)OH-R^1-R^2(C(O)OH)-R^3-C(O)OH$ 를 가질 수 있고, 여기서, R^1 , R^2 , 및 R^3 은 동일하거나 상이할 수 있고, 치환 또는 비치환된 지방족 또는 방향족 기일 수 있고, 여기서, R^1 , R^2 , 및 R^3 중 임의의 것은 임의의 개수의 추가의 카르복실산 기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리카르복실산 화합물은 시트르산 나트륨이다. 다른 실시양태에서, 폴리카르복실산 화합물은 이소시트레이트이다.
- [0053] 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 시트레이트는 알파-트롬빈이 절단되고, 활성이 더 낮은 형태 (예컨대, 베타-트롬빈 또는 감마-트롬빈)로 전환되는 속도를 감속시킴으로써, 알파-트롬빈을 안정화시키는 것으로 여겨진다. 또한, 및 추가로 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 시트레이트는 알파-트롬빈을, TRIS, 포스페이트, 히스티딘, 또는 HEPES 완충제 중 하나와 조합된 알파-트롬빈보다 비교적 더 잘 안정화시킬 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0054] 한 실시양태에서, 시트레이트 응고 조절제는 수용성 중합체 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 추가의 성분과 조합된다. 수용성 중합체의 예로는 폴리비닐피롤리돈, 다당류, 및 폴리에틸렌글리콜을 포함한다. 당의 예로는 텍스트란, 시클로텍스트린, 트레할로스, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 소르비톨을 포함한다. 실제로, 추가의 성분(들)은 제약 제제 분야의 당업자에게 주지되어 있는 일반 제약 부형제로부터 선택될 수 있다.
- [0055] 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 수용성 중합체는 혈액 수집용 장치의 표면 상에 제제를 분무 적용시키는 것이 쉽게 이루어질 수 있도록 촉진시키는 결합제로서의 역할을 할 수 있다고 여겨진다.
- [0056] 다른 실시양태에서, 시트레이트 응고 조절제는 계면활성제와 조합된다. 적합한 계면활성제의 예로는 "실록산 알콕실레이트"로서 알려져 있는 화합물 부류에 속하는 것을 포함한다.
- [0057] 일부 실시양태에서, 트롬빈을 포함하는 시트레이트 용액의 pH 범위는 약 5.5 내지 약 7.5이다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 시트레이트 응고 조절제는 다른 염, 완충제, 또는 단백질을 함유한다. 다른 실시양태에서, 시트레이트 용액은 실질적으로는 다른 염, 완충제, 또는 단백질을 함유하지 않는다. 추가의 다른 실시양태에서, 시트레이트 용액은 알부민, 염화나트륨, 또는 TRIS-HCl 중 하나 이상의 것을 함유하지 않는다.
- [0059] 당업자는 본원에서 제공하는 가이드에 기초하여 본원에 기술된 용도에 적합한, 적절한 농도의 응고 조절제를 선택할 수 있다. 물론, 샘플 관에 제공된 트롬빈의 양, 사용된 트롬빈의 유형, 제제를 용기에 적용시키는 방법, 혈액 샘플의 부피, 수집된 혈액 샘플의 유형에 따라 다른 농도의 응고 조절제가 필요할 수 있다. 다양한 농도의 상이한 응고 조절제로 이루어진 혼합물 또한 원하는 결과를 제공하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 트롬빈을 프로타민 및 화학식(I)의 화합물 둘 모두와 함께 조합하여 원하는 효과를 제공할 수 있다. 유사하게, 트롬빈을 프로타민 및 폴리카르복실산 둘 모두와 함께 조합할 수 있다. 따라서, 트롬빈 및 응고 조절제를 함유하는 장치는 샘플 유형 및 의도된 용도에 따라 맞춤 제작될 수 있다.
- [0060] 트롬빈을 함유하는 샘플에 프로타민을 첨가하는 경우의 일부 실시양태에서, 프로타민은 혈액 샘플 중에 분산되어 있을 때, 약 0.25 mg/mL 내지 약 5 mg/mL 범위의 농도로 존재한다. 트롬빈을 함유하는 샘플에 프로타민을 첨가하는 경우의 다른 실시양태에서, 프로타민은 혈액 샘플 중에 분산되어 있을 때, 약 0.25 mg/mL 내지 약 0.5 mg/mL 범위의 농도로 존재한다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 트롬빈의 약한 경쟁 억제제는 상기 기술된 억제 상수 값의 약 1 내지 약 200배 되는 범위의 농도로 존재한다. 트롬빈을 함유하는 제제에 화학식(I)의 화합물을 첨가하는 경우의 일부 실시양태에서, 화학식(I)의 화합물은 혈액 수집용 장치의 표면 상에 (예컨대, 분무에 의해) 적용되고, 건조되는 액체 트롬빈 제제 중 약 0.5 mM 내지 약 20 mM 범위의 농도로 존재한다. 트롬빈을 함유하는 제제에 화학식(I)의 화합물을 첨가하는 경우의 다른 실시양태에서, 화학식(I)의 화합물은 혈액 수집용 장치의 표면 상에 (예컨대, 분무에 의해) 적용되고, 건조되는 액체 트롬빈 제제 중 약 1 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다.

- [0062] 단독으로, 또는 추가의 성분과 함께 조합하여 트롬빈을 함유하는 제제에 시트레이트를 첨가하는 경우의 일부 실시양태에서, 시트레이트는 혈액 수집용 장치의 표면 상에 (예컨대, 분무에 의해) 적용되고, 건조되는 액체 트롬빈 제제 중 약 0.5 mM 내지 약 100 mM 범위의 농도로 존재한다. 단독으로, 또는 추가의 성분과 함께 조합하여 트롬빈을 함유하는 제제에 시트레이트를 첨가하는 경우의 다른 실시양태에서, 시트레이트는 혈액 수집용 장치의 표면 상에 (예컨대, 분무에 의해) 적용되고, 건조되는 액체 트롬빈 제제 중 약 1 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재한다.
- [0063] 임의의 응고 조절제는 단독으로, 또는 완충액과 함께 조합하여 사용될 수 있다. 완충액은 당업계의 숙련자에게 주지되어 있는 것이고, 이는 본 발명에서의 사용을 위해 쉽게 적합화될 수 있다.
- [0064] 응고 조절제, 트롬빈, 및 임의의 첨가제 또는 완충제는 용기의 임의의 표면 상에 위치할 수 있다. 트롬빈 및 응고 조절제는 같은 표면 상에 또는 다른 표면 상에 위치할 수 있거나, 혼합될 수 있거나, 서로로부터 분리되어 있을 수 있다 (편의상, 트롬빈 또는 응고 조절제를 함께 사용하는 것에 관한 임의의 언급은 또한 그를 따로 포함하는 것으로 간주되어야 한다). 트롬빈 및/또는 응고 조절제는 또한 상기 장치를 폐쇄시키기 위한 스톱퍼 및 시일 상에, 또는 상기 장치 내에 배치되어 있는 기계 또는 다른 삽입체 상에 위치할 수 있다. 트롬빈 및/또는 응고 조절제는 용기의 하나 이상의 내벽을 따라 어느 곳에나, 또는 저장소부 내의 어느 곳에나 위치할 수 있다. 트롬빈 또는 응고 조절제의 위치는 적용 모드, 사용되는 구체적인 응고 조절제, 용기의 내부 부피 및 내부 압력, 및 용기 안으로 유입된 생물학적 샘플의 부피를 비롯한, 수개의 변수에 의해 결정된다.
- [0065] 트롬빈, 응고 조절제, 및 첨가제 또는 완충제는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 용기에 적용될 수 있다. 트롬빈 및 응고 조절제는 같은 수단에 의해 또는 다른 수단에 의해 적용될 수 있다. 유사하게, 이는 함께 또는 따로따로 적용될 수 있다. 예를 들어, 트롬빈 및/또는 응고 조절제(들)를 (액체, 분말, 또는 젤로서) 표면 상에 분무하거나, 용기 내벽 표면 상에서 분무 건조시키거나, 밀집되지 않게 분배하거나, 동결건조시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 트롬빈 및/또는 응고 조절제는 액체 용액 중에 존재하고, 분무되거나, 또는 다르게는 용기 내로 배치된다. 이어서, 용액을 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 냉동 건조에 의해 동결건조시킬 수 있다. 예를 들어, 동시에 진공을 가하면서, 용액을 냉동시킨 후, 냉동 후 서서히 가온시킴으로써, 이에 따라 냉동 건조된 분말은 수집관에 남게 된다. 생성된 안정화제가 용기에서 펠릿화될 수 있도록 하기 위해, 냉동 건조 전에 첨가제, 예컨대, 부형제, 예를 들어, PVP 또는 트레할로스를 또한 트롬빈 및/또는 응고 조절제에 첨가할 수 있다. 별법으로, 트롬빈 및/또는 응고 조절제는 예를 들어, 젤 또는 액체 형태일 때, 용기의 저장소부에 배치될 수 있다. 전형적으로, 원하는 양의 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 용기 내에 배치시키기 위해, 고체 형태의 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 재구성한 후, 적절한 양의 액체를 용기 내로 분배한다. 액체를 분무 건조시키거나, 용기의 바닥에 배치시키거나, 또는 이어서 동결건조시킬 수 있다. 또 다른 측면에서, 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 액체 또는 고체 에어로졸로 형성하고, 용기 내부의 하나 이상의 표면 상에 분무한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 용기는 수집 장소에서 즉시 혈액 샘플을 응고시키기 위하여 환자로부터 직접 전혈 샘플을 채혈하기 위한 것이고, 따라서, 이는 혈청 수집관으로서 사용된다. 상기 장치는 혈액 수집용 진공형 시스템일 수 있다. 별법으로, 상기 장치는 혈액 수집용 부분-진공형 또는 비-진공형 시스템일 수 있다. 진공형 시스템의 적합한 예로는 폐관이 있다. 부분-진공형 및 비-진공형 시스템 둘 모두에 대한 적합한 예는 수동식 채혈용 시린지(manual syringe draw)이다. 비-진공형 시스템 또한 자동 채혈 시스템을 포함할 수 있다.
- [0067] 도 1에는 내부 챔버 (14)를 형성하는 용기 (12)를 포함하는, 전형적인 혈액 용기 (10)가 제시되어 있다. 도시된 실시양태에서, 용기 (12)는 측벽 (16), 폐쇄형 하단부 (18) 및 개방형 상단부 (20)를 가지는 중공관이다. 임의적으로, 분리 부재 (13)가 용기 챔버 (14) 내에 제공된다. 분리 부재 (13)는 예를 들어, 원심분리에 의한 샘플 성분의 분리를 지원하는 역할을 한다. 용기 (12)는 적합한 부피의 생물학적 유체, 바람직하게, 혈액을 수집하기 위한 것으로 치수화된다. 멸균 생성물이 요구되는 경우, 용기 (12)를 폐쇄시키기 위해 개방형 단부 (20)를 덮기 위한 마개 (22)가 바람직하다. 종래의 관인 경우, 보통은 스크류 캡이면 충분하다. 진공형 수집관인 경우, 필요한 보관 기간 동안 진공을 포함하기 위해 일반적으로 밀착식 엘라스토퍼 플러그가 사용된다. 마개 (22)는 효과적으로 용기 (12)를 폐쇄시키고, 챔버 (14) 중의 생물학적 샘플을 유지시킬 수 있는 시일을 형성한다. 마개 (22)는 고무 마개, 헤모그라드(HEMOGARD)® 마개, 금속성 시일, 금속 밴드 고무 시일 및 다른 중합체 및 디자인의 시일을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 형태의 것들 중 하나일 수 있다. 보호용 차폐부 (24)가 마개 (22)를 덮을 수 있다. 용기 (12)는 또한 본 발명에 따라 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 포함할 수 있다. 용기는 트롬빈 및/또는 응고 조절제 중 하나, 또는 그 둘 모두를 포함할 수 있다. 물론, 트롬빈 및/또는 응고 조절제 중 나머지 다른 하나는 샘플 수집 이전에, 또는 샘플 수집 이후에 첨가될 수 있다.

- [0068] 용기 (12)는 유리, 플라스틱 또는 본원에 기술된 다른 적합한 물질로 제작될 수 있다. 플라스틱 물질은 산소 불투과성 물질일 수 있거나, 또는 산소 불투과성 또는 반투과성 층일 수 있다. 별법으로, 용기 (12)는 투수성 및 통기성 플라스틱 물질로 제작될 수 있다.
- [0069] 챔버 (14) 내 압력은 사전 결정된 부피의 생물학적 샘플이 챔버 (14) 내로 유입될 수 있도록 선택된다. 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 마개 (22)는 생물학적 샘플을 용기 (12) 내로 도입하기 위해 바늘 (26) 또는 다른 캐놀라에 의해 천공될 수 있도록 한다. 바람직하게, 마개 (22)는 재밀봉이 가능한 것이다. 마개 (22)에 적합한 물질로는 예를 들어, 실리콘 고무, 천연 고무, 할로부틸 고무, 스티렌 부탄디엔 고무, 에틸렌-프로필렌 공중합체 및 폴리클로로프렌을 포함한다.
- [0070] 용기 (12)의 적합한 예로는 단일벽 및 다중층 관을 포함한다. 적합한 용기 (12)의 더욱 구체적인 예는 미국 특허 번호 제5,860,937호 (코헨(Cohen))에 개시되어 있고, 상기 특허는 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다.
- [0071] 일례로, 본 발명에 따른 장치를 제작하는 한 유용한 공정은 용기를 수득하는 단계; 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 용기에 첨가하는 단계; 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 건조시키거나 동결건조시키는 단계; 용기를 진공 배기시키는 단계; 및 용기를 멸균시키는 단계를 포함한다. 트롬빈 및/또는 응고 조절제는 용액 형태로 용기에 분배할 수 있다. 원하는 경우, 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 수집용 용기에 첨가하기 전, 또는 이후에, 분리 부재를 용기에 첨가할 수 있다. 적합한 동결건조/진공 배기 공정의 예는 하기와 같다: 내부에 트롬빈 및/또는 조절제가 배치되어 있는 용기를 약 -40℃ 온도에서 약 760 mm 압력하에 약 6 내지 8시간 동안 냉동시키고; 약 0.05 mm 압력하에 약 8 내지 10시간 동안, 온도를 -40℃에서 약 25℃로 램핑시킴에 따라 용기를 건조시킨 후; 이어서, 용기를 약 25℃ 온도에서 약 120 mm 압력하에 약 0.1시간 동안 진공 배기시킨다. 일부 실시양태에서, 멸균 기법은 코발트 60 방사선을 이용함으로써 방사선을 사용한다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 혈액 성분을 분리시키기 위한 분리 부재 (13) (예컨대, 기계식 분리 부재, 겔, 또는 여과지 등을 비롯한 다른 분리 부재)를 가지는 샘플 수집관이 사용된다. 상기 측면에서, 관의 내부 및/또는 분리 부재의 외부를 트롬빈 및/또는 응고 조절제로 처리할 수 있다. 이러한 경우, 트롬빈 및/또는 응고 조절제를 분리 매체의 외부 표면 상에서 분무 건조시키고/거나, 동결건조시킬 수 있다.
- [0073] 용기 (12)는 또한 혈액 혈청 수집 또는 제조용 용기일 수 있다. 상기 용기는 트롬빈 및/또는 응고 조절제 이외에도, 인간 또는 동물의 전혈로부터 혈청을 분리하기 위한 부재를 포함한다. 전혈로부터 혈청을 분리하기 위한 부재는 분리 부재, 예컨대, 겔 제제 또는 기계식 매체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 겔은 요변성 중합체 겔 제제이다. 겔은 동중중합체 또는 공중중합체일 수 있고, 폴리에스테르, 폴리아크릴, 또는 실리콘 기반 겔을 포함할 수 있다.
- [0074] 본원에서 사용하기에 적합한, 다른 상업적으로 이용가능한 혈액 수집관으로는 하기의 것을 포함하며, 이들 모두는 벡톤, 디킨슨 앤드 컴퍼니(Becton, Dickinson and Company: 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에 의해 시판되는 것이며, 모든 등록 및 상표는 벡톤, 디킨슨 앤드 컴퍼니에 속하는 것이다: 배큐테이너® 브랜드 SST™ 관 (카탈로그 번호 367983, 367977 및 367986을 포함하나, 이에 한정되지 않음); 배큐테이너® 브랜드 혈청 관 (카탈로그 번호 367812 및 367815를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 배큐테이너® 브랜드 트롬빈 관 (카탈로그 번호 367755 및 366525를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 배큐테이너® 브랜드 RST 관 (카탈로그 번호 368771 또는 368774를 포함하나, 이에 한정되지 않음) 및 마이크로테이너® 브랜드 혈청 및 혈청 분리관 중 임의의 것. 상기 언급한 바와 같이, 진공형 또는 비-진공형인 임의의 적합한 수집용 장치는 본 발명자들이 본원에 기술된 응고제를 사용하는 데 고려된다. 물론, 당업자는 용기가 적합하게 사용될 수 있도록 하기 위해 본 발명에 따라 임의 용기를 변형시킬 수 있다.
- [0075] 또 다른 실시양태에서, 키트는 본원에 기술된 트롬빈 및 응고 조절제를 포함하는 2 이상의 용기를 가진다. 예를 들어, 키트는 제1 수집관, 예컨대, 그 안에 분리 부재가 내장되어 있는 혈장 분리관, 및 예컨대, 수집된 혈장을 제1 수집관에 주입하거나, 또는 다르게는 분배하기 위한, 제2 시험관을 가진다. 임의적으로, 키트는 주입 또는 다른 안전하지 못한 전달을 수행할 필요가 없도록 관-대-관 전달 장치를 포함할 수 있으며, 이러한 경우, 제2 관은 혈장 유입을 위해 감압 상태가 될 것이다. 상기 키트를 사용하여 제1 관에 샘플을 수집하고, 원심분리하거나 또는 원심분리하지 않고 혈액 성분을 응고시키고, 관심의 대상이 되는 샘플을 제2 시험관으로 전달하고, 시험을 수행할 것이다. 제2 시험관은 원하는 시험에 따라 다양한 크기의 것일 수 있다. 키트는 또한 패키징 및/또는 사용 설명서를 포함한다.
- [0076] 한 실시양태에서, 생물학적 샘플의 수집 및 보관용 키트는 제1 멸균 및 진공형 용기; 및 제2 용기를 포함하며,

제1 용기는 그 안에 트롬빈 및 1종 이상의 응고 조절제, 및 바늘에 의해 천공가능한 막개를 가지고, 제2 용기는 또한 응고 조절제를 가진다.

[0077] 또 다른 실시양태에 따라, 본원에서는 트롬빈, 및 (i) 트롬빈의 활성을 안정화시키고/거나 가속화시키는 데, 또는 (ii) 샘플 중 가용성 피브린의 양을 감소시키는 데 충분한 농도로 응고 조절제를 포함하는 용기를 제공하는 단계; 및 용기에 전혈 샘플을 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액 성분의 응고 또는 응괴를 촉진 또는 증진시키는 방법을 기술한다.

[0078] 예시적인 방법은 혈액 샘플을 수득하는 단계, 및 상기 샘플을 트롬빈 및 응고 조절제를 포함하는 용기 내로 도입시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플을 중간에 개입되는 임의의 공정 단계 없이 직접 환자로부터 용기로 뽑아낸다. 비록 특정의 작동 이론을 고수하고자 하는 것은 아니지만, 예컨대, 전혈 샘플을 수집할 때, 환자로부터 직접 생물학적 샘플을 수집하고, 이미 트롬빈 및 응고 조절제를 포함하고 있는 (즉, 상기 작용제로 전처리된) 용기 내로 직접 샘플을 도입하는 것이, 트롬빈의 작용을 안정화시키거나, 가속화시키거나, 또는 다르게는 조절하는 데, 또는 샘플 중에 존재하는 가용성 피브린의 양을 감소시키는 데 실질적으로 도움이 되는 것으로 여겨진다. 기술된 방법은 본원에 개시된 용기, 첨가제 및 추가의 항응고제 중 임의 것과 함께 유용하다.

[0079] 실시예

[0080] 실시예 1: 프로타민이 혈청 샘플 중 피브린 덩어리에 미치는 경감 효과

[0081] 먼저, 약 0.5 M 염산 중에 프로타민 술페이트를 약 250 mg/mL의 농도로 재현탁시켰다. 이어서, 상기 용액을 5 N 수산화나트륨을 이용하여 pH 약 6으로 적정하였다. 프로타민을 낮은 pH에 장기간 동안 노출시키면, 이로 인해 가수분해되고, 활성을 손실할 것으로 여겨지는 바, 상기의 pH 약 6으로의 적정은 즉시 수행하였다. 또한, 프로타민 용액을 제조하는 데 더욱 묽은 염산 용액이 사용될 수 있을 것으로 여겨진다.

[0082] 이어서, 프로타민 용액을, 약 20 mg/mL의 실록산 알콕실레이트 계면활성제, 및 2 mg/mL의 폴리비닐피롤리돈 (PVP)을 함유하는 약 40 mM 시트르산 나트륨 (약 pH 6.0) 중 약 1,250 U/mL의 트롬빈 용액과 함께 약 1:1의 비로 혼합하였다.

[0083] 생성된 시약을 여과하고, 20 μ l 샷으로 13x100 mm 폴리에틸렌테레프탈레이트 (PET) 관에 분무하였다. 이어서, 강제 온풍에 의해 관을 건조시키고, 진공 배기시키고, 스톱퍼로 막았다.

[0084] 관을 새로 채혈된 인간 혈액으로 충전시키고, 약 1 내지 약 3.5분 (무작위화) 동안 응고되도록 한 후, 원심분리하였다. 혈청 구획 중 "피브린 덩어리"의 존재에 대하여 시각적으로 평가함으로써, 생성된 혈청을 0 내지 3 등급으로 점수화하였는데, 3이 정도가 가장 심한 것이었다. "피브린 덩어리"에 대한 결과는 도 2에서와 같이 입증되었다. 피브린 덩어리 부재 ("0" 등급)는 응고 반응이 신속하고 완전하며, 모든 피브린 (피브리노겐)이 원심분리 이전에 침전되었음을 나타내는 것이었다.

[0085] 도 2에서 제시된 바와 같이, 약 0.5 mg/mL 농도의 프로타민은 관의 성능을 급격히 개선시켰다. 약 5 U/mL 또는 약 10 U/mL 트롬빈 존재하에 프로타민 첨가시, 8개의 관 중 단 1개의 관에서만 피브린 덩어리가 관찰되었다. 대조적으로, 프로타민 부재하에 약 5 U/mL 트롬빈을 포함하는 경우, 8개 중 7개의 관에서 덩어리가 관찰되었고, 약 10 U/mL 트롬빈을 포함하는 경우, 8개 중 6개의 관에서 덩어리가 관찰되었다. 따라서, 트롬빈 또한 함유하는 혈액 샘플 용기에 프로타민 응고 조절제를 첨가하는 것이 (원심분리 이전의 트롬빈의 피브리노겐에 대한 불완전한 작용이 원인이 되는) 상기 덩어리가 형성되는 경향을 경감시켰다고 여겨진다.

[0086] 실시예 2: 프로타민이 트롬빈의 응고 작용을 가속화시킨다.

[0087] 약 20 mM의 시트레이트 (pH 약 6) 중 트롬빈 및 프로타민으로 이루어진 용액을, 재구성된 시판용인 동결건조된 인간 혈장과 약 1:1의 비로 혼합하고, 스타고 콤팩트(Stago Compact) 응고 분석기 상에서 시험하였다. 생성된 응고 시간은 주어진 트롬빈 농도에 대한 트롬빈 및 프로타민 농도의 함수로서 측정하였다. 도 3의 그래프에 열거되어 있는 농도는 혈장과 혼합하기 이전의 트롬빈/프로타민 용액을 나타내는 것이다.

[0088] 그 결과, 응고 시간은 프로타민 농도가 증가함에 따라 단축되는 것으로 나타났다. 따라서, 프로타민을 첨가하는 것이 트롬빈의 응고 활성을 증진시키는 것으로 여겨진다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 프로타민은 (1) 트롬빈의 효소 작용을 직접적으로 가속화시킴으로써; (2) 혈장 중 내인성 억제제에 의한 트롬빈 불활성화를 방해함으로써; (3) 피브린의 침전을 가속화시킴으로써, 또는 상기 효과의 일부 조합에 의해, 응고

시간을 가속화시켰다고 상정된다.

[0089] 실시예 3: 트롬빈 및 프로타민 이용에 의한 가속화된 안정성 결과

[0090] 약 20 mM의 시트레이트 (pH 약 6.0) 중에서 트롬빈 (약 1,250 U/mL), 프로타민 (약 125 mg/mL 또는 약 62.5 mg/mL), 및 실록산 알콕실레이트 계면활성제를 혼합하였다. 상기 혼합물 약 20 μ l를 13x100 mm PET 관에 분무하였다. 강제 온풍에 의해 관을 건조시키고, 진공 배기시키고, 냉장고에 보관하였다. 연구 개시시, 관에서 마개를 벗겨 내고, 앞서 약 50℃ 및 약 45% 상대 습도로 평형화된 조절식 환경 챔버에 놓았다. 다양한 시간 간격으로 관을 제거하고, 스타고 콤팩트 응고 분석기 상에서 트롬빈 활성에 대하여 평가하였다. 결과는 도 4에 제시되어 있다. 오차 막대는 5회 반복에 따른 트롬빈 활성에 대한 95% 신뢰 구간을 나타낸다. 도 4는, 시간 경과에 따른 트롬빈 활성은 프로타민 존재하에서 그가 부재하는 경우에서 보다 더 우수하였다는 것을 뚜렷하게 나타낸다.

[0091] 후속 시점의 트롬빈 활성을 초기값으로 정규화시켰을 때, 생성된 곡선을 이용하여 각 제제의 상대적인 안정성을 비교할 수 있었다 (도 5 참조). 프로타민 술페이트를 함유하는 제제를 포함하는 혈액 샘플이 프로타민을 함유하지 않는 트롬빈 제제와 조합된 혈액 샘플보다 더 안정하였다는 것을 도면으로부터 관찰할 수 있었다.

[0092] 실시예 4: 트롬빈 및 파라-아미노벤즈아미딘 이용에 의한 가속화된 안정성 결과

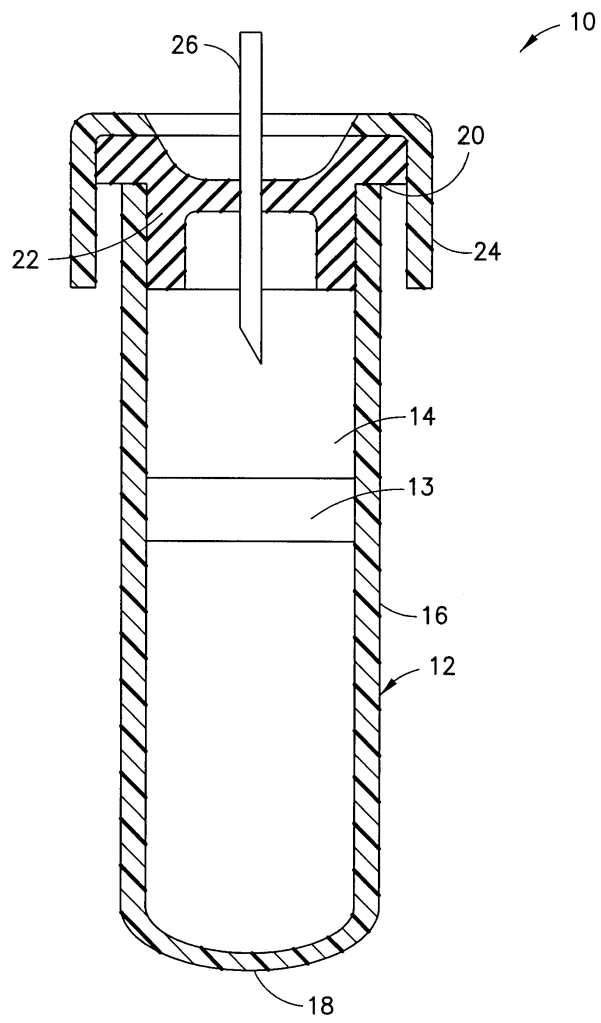
[0093] 응고 조절제 파라-아미노벤즈아미딘이 가속화된 안정성 조건하에서 분무된 트롬빈의 안정성을 개선시켰는지 여부를 측정하는 평가를 수행하였다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 파라-아미노벤즈아미딘은, 트롬빈 자가용해 분해가 빠르게 일어날 수 있는 초고습도인 조건하에서, 심지어는 실온에서 분무 건조된 트롬빈을 안정화시키는 것으로 여겨진다.

[0094] 약 5 mM의 시트레이트 또는 이소시트레이트 (pH 약 6.1) 중에서 트롬빈을 제조하였다. 파라-아미노벤즈아미딘을 약 3 mM 농도로 첨가하였다. 상기 용액 약 16 μ l를 13x100 mm PET 관에 분무하였다. 강제 온풍에 의해 관을 건조시키고, 진공 배기시켰다. 이어서, 실링된 관을 앞서 약 43℃ 및 약 75% 상대 습도로 평형화된 조절식 환경 챔버에 놓았다. 다양한 시간 간격으로 관을 제거하고, 스타고 콤팩트 응고 분석기 상에서 트롬빈 활성에 대하여 평가하였다. 결과는 도 6 및 도 7에 제시되어 있다. 오차 막대는 5회 반복에 따른 트롬빈 활성에 대한 95% 신뢰 구간을 나타낸다. 상기 도면의 데이터는 사용 이전에, 패키징된 제품 중에서 (시트레이트만 단독으로 포함하는 경우와 비교하여) 응고 조절제 파라-아미노벤즈아미딘이 트롬빈의 시간 경과에 따른 안정성을 보존시킨다는 것을 나타낸다.

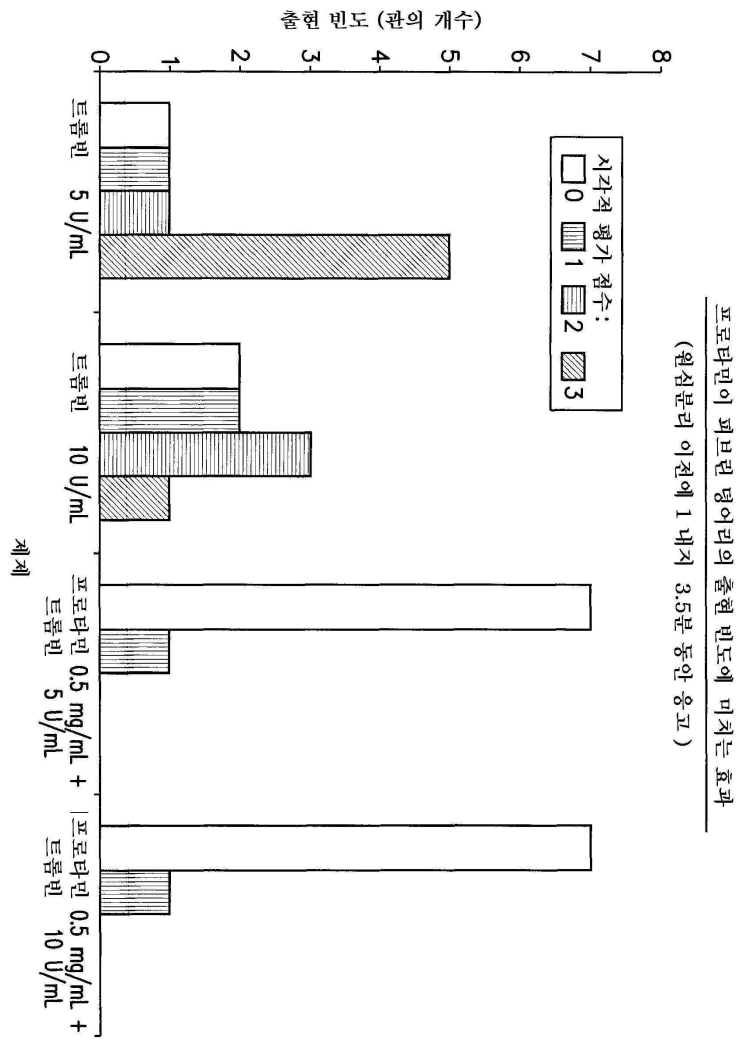
[0095] 비록 본 발명이 특정 실시양태를 참고로 하여 기술되었지만, 이러한 실시양태는 단지 본 발명의 원리 및 적용을 설명하기 위한 것임을 이해하여야 한다. 그러므로, 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 정신 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 예시적인 실시양태는 다수 변형될 수 있고, 다른 방식도 고안될 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

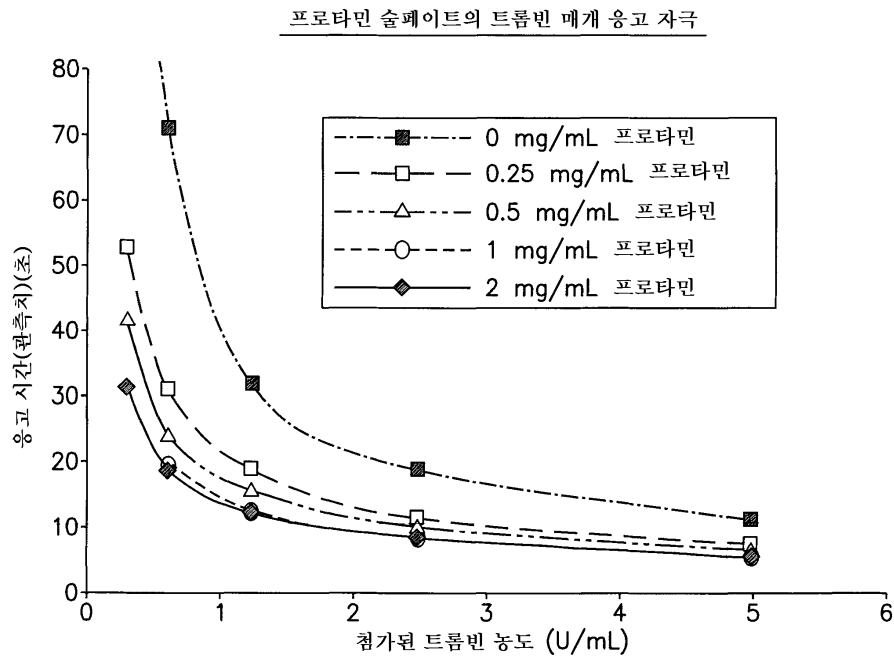
도면1



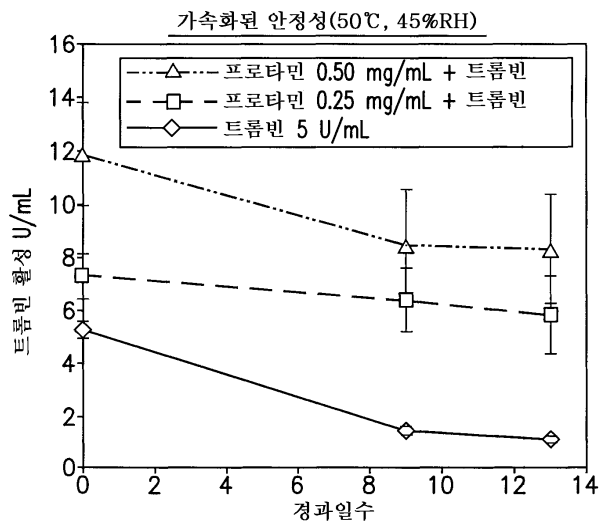
도면2



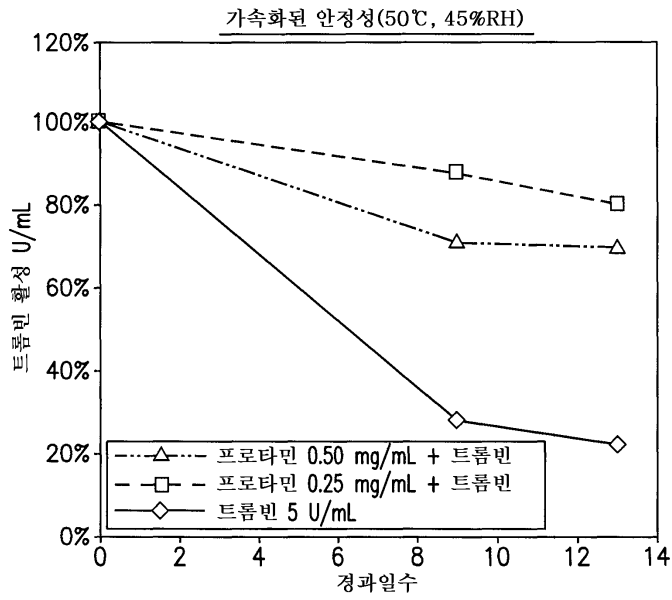
도면3



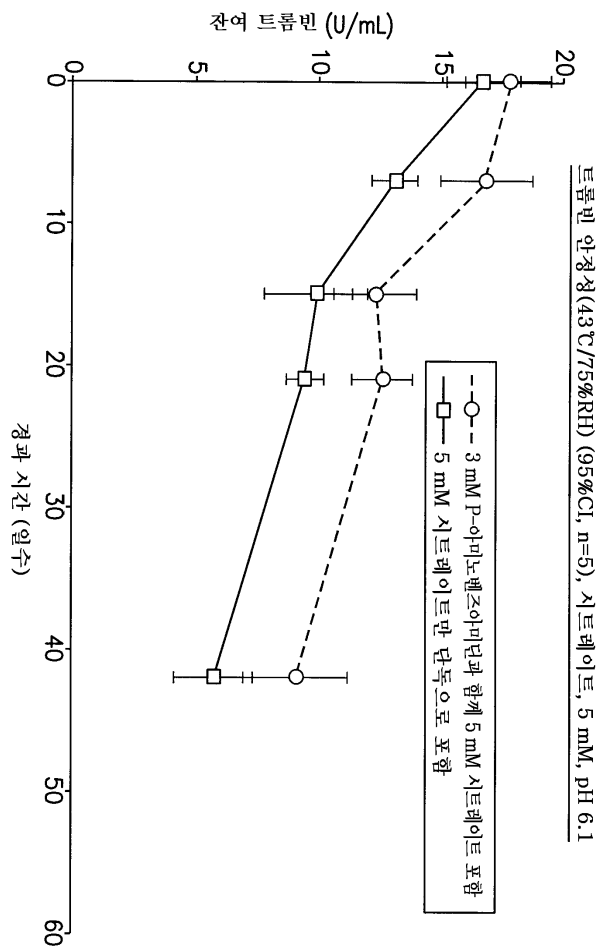
도면4



도면5



도면6



도면7

