



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21)(22) Заявка: 2014103327, 02.07.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.07.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.07.2011 US 61/504,496

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2015 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 19.06.2017

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)(48) Коррекция опубликована:
08.08.2017 Бюл. № 22(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.02.2014(86) Заявка РСТ:
US 2012/045243 (02.07.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/006550 (10.01.2013)

Адрес для переписки:

191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнеры"

(72) Автор(ы):

МОНРО Дугальд (US),
НОВАРРА Шэбэзз (US),
ХОУК Рэндэл Алан (US),
ХОЛМС Пол Ф. (US),
ДУДАРОНЕК Жюстина (US)

(73) Патентообладатель(и):

БЕКТОН, ДИКИНСОН ЭНД КАМПАНИ
(US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 5634474 A, 03.06.1997. EP
0353710 A2, 07.02.1990. US 5860937 A,
19.01.1999. US 6784191 B2, 31.08.2004.
MONROE D M ET AL, "Use of p-
aminobenzamidine to monitor activation of
trypsin-like serine proteases", ANALYTICAL
BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC,
NEW YORK, vol. 172, no. 2, doi:10.1016/0003-
2697(88)90465-4, ISSN 0003-2697, (19880801),
PAGE (см. прод.)(54) **СРЕДСТВА, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ КОАГУЛЯЦИЮ, И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ УСТРОЙСТВА**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к лабораторной диагностике, и касается контейнера для сбора крови. Указанный контейнер содержит первый конец и второй конец и по меньшей мере одну внутреннюю стенку, образующую резервуарную часть для приема крови, причем данный резервуар содержит смесь,

содержащую тромбин и соединение поликарбоновой кислоты с молекулярной массой менее чем примерно 500 г/моль, и крышку. Также предложен способ сбора крови. Группа изобретений обеспечивает стабилизацию тромбина и ускорение его действия в образце крови. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):
427 - 435.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61B 5/15 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21)(22) Application: **2014103327, 02.07.2012**

(24) Effective date for property rights:
02.07.2012

Priority:

(30) Convention priority:
05.07.2011 US 61/504,496

(43) Application published: **10.08.2015 Bull. № 22**

(45) Date of publication: **19.06.2017**

(15) Correction information:
Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:
08.08.2017 Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **05.02.2014**

(86) PCT application:
US 2012/045243 (02.07.2012)

(87) PCT publication:
WO 2013/006550 (10.01.2013)

Mail address:

191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i partnery"

(72) Inventor(s):

**MONRO Dugald (US),
NOVARRA Shebezz (US),
KHOUK Rendel Alan (US),
KHOLMS Pol F. (US),
DUDARONEK Zhyustina (US)**

(73) Proprietor(s):

BEKTON, DIKINSON END KAMPANI (US)

(54) **TOOLS FOR CONTROLLING COAGULATION, AND DEVICES CONTAINING THEM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: said container comprises the first end and the second end and at least one inner wall forming a reservoir portion for blood reception, wherein the reservoir contains a mixture comprising thrombin and a polycarboxylic acid compound with molecular

weight less than approx. 500 g/mol, and a cover. A method for blood collection is presented as well.

EFFECT: stabilization of thrombin and acceleration of its actions in a blood sample.

15 cl, 7 dwg, 4 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка претендует на приоритет даты подачи предварительной заявки US No. 61/504496, поданной 5 июля 2011, описание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сыворотка представляет собой жидкую часть цельной крови, остающаяся, когда крови дают возможность свернуться. Без сыворотки остаются компоненты цельной крови, которые потребляются или улавливаются во время процесса свертывания, а именно эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и факторы свертывания крови. Такие образом, сыворотка включает все белки, не используемые в процессе свертывания, а также включает сахара, жиры, ферменты, антитела, антигены, гормоны, заряженные частицы (то есть электролиты) и экзогенные вещества (например, лекарственные средства и микроорганизмы). Сыворотка, таким образом, является предпочтительным тестируемым субстратом, на котором проводят клинические тесты, применяемые для 10 диагностики и мониторинга функции мышц и органов, метаболических балансов и базовых физиологических функций. Сыворотка также предпочтительна для проведения других аналитических тестов, таких как анализы ферментов, электролитов, белков и глюкозы, поскольку вмешательство нежелательных веществ удалено в результате процесса свертывания.

Сыворотку получают путем центрифугирования свернувшейся крови. В прошлом получение сыворотки из цельной крови являлось пассивным процессом, при котором свежесобранную кровь добавляют в стеклянную пробирку и дают возможность свернуться. Альтернативно другие пробирки для сыворотки могут содержать кремнезем или эллаговую кислоту, чтобы стимулировать каскад коагуляции. Кровь, как только она извлечена из организма, имеет естественную склонность к свертыванию, и 20 воздействие на нее поверхности, такой как стекло, более эффективно стимулирует свертывание. Контакт со стеклянной поверхностью вызывает активацию факторов коагуляции, которые взаимодействуют по механизму, который обычно называют каскадом коагуляции. При данном процессе неактивный фактор коагуляции химическим 30 путем преобразуется в активный фермент, который затем преобразует еще один другой неактивный предшественник. Конечным результатом каскада коагуляции является преобразование растворимого плазматического белка фибриногена в нерастворимый белок фибрин, в результате чего фибриновый сгусток улавливает лейкоциты, эритроциты и тромбоциты, образуя твердую желатиновую массу. Вещества, не потребляемые в 35 данном процессе, такие как описано выше, остаются свободными от этой желатиновой массы и находятся в жидком матриксе, то есть в сыворотке.

Описанный выше пассивный процесс свертывания вызывает несколько проблем. Лейкоциты от нормальных здоровых индивидуумов могут свертываться в стеклянной пробирке за 30 минут или дольше; для крови от больных людей, которые могут иметь 40 дефициты белков коагуляции, или от пациентов, получающих антикоагуляционную терапию (то есть пероральные антикоагулянты или гепарин), может требоваться продолжительное время для свертывания (то есть 2-8 часов). Следовательно, происходит задержка, связанная с получением образцов крови и проведением аналитических тестов, что, таким образом, влияет на способность врача быстро обеспечить оптимальное 45 лечение пациента. Кроме того, кровь от людей, имеющих дефициты белков коагуляции, или от пациентов, получающих антикоагуляционную терапию, может никогда не образовать полную и адекватную фибриновую массу. Например, неполное свертывание в гепаринизированных образцах крови приводит в результате к плохому качеству

сывороточного субстрата, на котором нужно проводить химический тест. Кроме того, сывортка крови, подвергнутой антикоагуляционному действию гепарина, которая может сначала не свернуться, может начать свертываться при помещении ее в аналитическое устройство, в результате чего закупоривает систему и вызывает отключение прибора.

С целью повышения предсказуемости и однородности процесса образования сгустка технические специалисты обычно добавляют к образцу крови агент тромбин, способствующий образованию сгустка, и/или близкородственный фермент, обладающий "тромбиноподобной" активностью (например, батроксобин). Тромбин активно преобразует фибриноген в фибрин, образуя посредством этого сгусток более эффективно, чем происходит более медленный процесс свертывания, активируемый стеклом. Один из недостатков использования тромбина и/или другого фермента в пробирке для сбора крови состоит в том, что эти белки не настолько стабильны, как контактные активаторы биохимического пути на основе диоксида кремния. Например, воздействие влаги или повышенных температур может инактивировать тромбин. Тем не менее, способы, основанные на кремнеземе, часто неспособны обеспечить полное свертывание крови, приводя в результате к получению частично свернувшегося материала, который может препятствовать тестированию образцов крови, таких как сывортка, полученная из цельной крови.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении раскрыт стерильный и вакуумированный контейнер для сбора сывортки, содержащий первый конец и второй конец и по меньшей мере одну внутреннюю стенку, образующую резервуарную часть для приема крови, причем, резервуар содержит тромбин и по меньшей мере одно средство, контролирующее коагуляцию, и крышку, которая поддается прокалыванию иглой, для подачи крови в резервуар.

В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данной работе, средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой поликарбоновую кислоту, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления поликарбоновая кислота представляет собой цитрат или изоцитрат ("цитрат"). В следующих вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, представляющего собой поликарбоновую кислоту, находится в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 100 мМ концентрированного препарата. В следующих вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, представляющего собой поликарбоновую кислоту, находится в диапазоне от примерно 1 мМ до примерно 50 мМ концентрированного препарата.

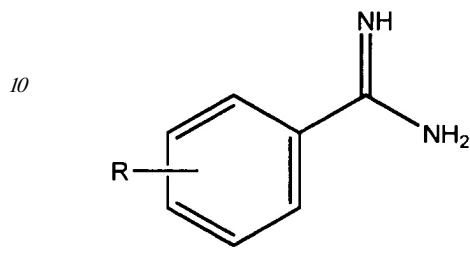
В других вариантах осуществления средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой соль протамина или его гомолог или производное. В следующих вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, представляющего собой протамин, находится в диапазоне от примерно 0,05 мг/мл до примерно 5 мг/мл образца крови. В следующих вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, представляющего собой протамин, находится в диапазоне от примерно 0,25 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл образца крови.

В других вариантах осуществления средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой слабый конкурентный ингибитор тромбина. Слабое ингибирование является обратимым путем воздействия на образцы условий, не благоприятствующих связыванию ингибитора, которое ингибировало бы активность тромбина. В некоторых

вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина имеет константу ингибирования, составляющую более чем

5 примерно 0,1 микромоль.

В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой соединение, имеющее формулу (I):



15 в котором R выбран из группы, состоящей из -NR¹R²; -NO₂; замещенной или незамещенной, нормальной или разветвленной алкильной группы, имеющей от 1 до 6 атомов углерода; галогена; -CO(O)R¹; -CO-NR¹R²; -OH; или -OR¹;

20 R¹ и R² могут быть одинаковыми или разными, и могут быть выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, замещенной или незамещенной, нормальной или разветвленной C₁-C₁₀ алкильной группы и -(CH₂)_x-арила; и

x представляет собой целое число, находящееся в интервале от 1 до 10.

25 В следующем иллюстративном варианте осуществления средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой бензамидин. В другом иллюстративном варианте осуществления средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой пара-аминобензамидин. В следующем варианте осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, имеющего формулу (I), находится в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 20 мМ концентрированного препарата. В следующем

30 варианте осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, имеющего формулу (I), находится в диапазоне от примерно 1 мМ до примерно 10 мМ концентрированного препарата.

В другом варианте осуществления контейнер дополнительно содержит контейнер для сбора, дополнительно содержащий добавку, выбранную из группы, состоящей из

35 водорастворимого полимера и сахара. В другом варианте осуществления водорастворимый полимер выбран из группы, состоящей из поливинилпирролидона, полисахаридов и полиэтиленгликоля. В следующем варианте осуществления сахар выбран из группы, состоящей из декстрана, трегалозы, лактозы, сахарозы, глюкозы, маннита и сорбита.

40 В другом варианте осуществления контейнер дополнительно содержит разделительный элемент. В следующем варианте осуществления разделительный элемент содержит механический разделительный элемент. В другом варианте осуществления разделительный элемент содержит композицию в виде геля. В следующем варианте осуществления композиция в виде геля содержит тиксотропный гель. В следующем

45 варианте осуществления композиция в виде геля содержится в капсуле.

В другом варианте осуществления контейнер дополнительно содержит собранную кровь.

В данной работе также раскрыт способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в

концентрации, достаточной для стабилизации тромбина и/или ускорения его активности, и добавление в этот контейнер образца крови.

В данной работе также раскрыт способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в концентрации, достаточной для снижения концентрации фибрина в образце сыворотки крови, и добавление в этот контейнер образца крови.

В данной работе также раскрыт способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в концентрации, достаточной для стабилизации тромбина, и добавление в этот контейнер образца крови.

В некоторых вариантах осуществления описанных выше способов средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой поликарбоную кислоту, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления описанных выше способов поликарбонвая кислота представляет собой цитрат. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, находится в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 100 мМ концентрированного препарата.

При описанных выше способах средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой соль протамина или его гомолог или производное, как описано выше, и находится в концентрациях, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, находится в диапазоне от примерно 0,05 мг/мл до примерно 5 мг/мл образца крови.

В некоторых вариантах осуществления средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой слабый конкурентный ингибитор тромбина. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых воплощениях слабый конкурентный ингибитор тромбина имеет константу ингибирования, составляющую выше, чем примерно 0,1 микромоль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой соединение, описанное выше формулой (I).

В некоторых вариантах осуществления описанных выше способов средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой пара-аминобензамидин, как описано, в концентрации, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления концентрация средства, контролирующего коагуляцию, имеющего формулу (I), находится в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 20 мМ концентрированного препарата.

В некоторых вариантах осуществления описанных выше способов контейнер для сбора дополнительно содержит добавку, выбранную из описанной выше группы, состоящей из водорастворимого полимера и сахара.

В данной работе также раскрыт способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в концентрации, достаточной для ускорения активности тромбина, и добавление в этот контейнер образца крови. В некоторых вариантах осуществления описанного выше способа средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой описанную выше соль протамина или ее гомолог или производное в описанных выше концентрациях.

В некоторых вариантах осуществления описанного выше способа этот способ дополнительно включает обеспечение в контейнере по меньшей мере одного из следующих веществ: поликарбонвой кислоты, имеющей молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль, или слабого конкурентного ингибитора

тромбина. В некоторых вариантах осуществления описанного выше способа этот способ дополнительно включает обеспечение в контейнере как поликарбоневой кислоты, имеющей молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль, так и слабого конкурентного ингибитора тромбина. В некоторых вариантах осуществления способов сбора крови поликарбоневая кислота представляет собой цитрат, как описано выше, в описанной выше концентрации. В некоторых воплощениях слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина имеет константу ингибирования, составляющую выше, чем примерно 0,1 микромоль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина представляет собой соединение, описанное выше формулой (I). В некоторых вариантах осуществления способов сбора крови средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой описанный выше пара-аминобензамидин в описанной выше желаемой концентрации.

В некоторых вариантах осуществления контейнер для сбора крови для контролирующих способов дополнительно включает добавку, выбранную из группы, состоящей из водорастворимого полимера и сахара.

В данной работе также раскрыт способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в концентрации, достаточной для снижения концентрации фибрина в образце крови, и добавление образца крови в этот контейнер.

В некоторых вариантах осуществления данного способа сбора крови средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой поликарбоневую кислоту, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль, как описано выше, в описанной выше концентрации.

В некоторых вариантах осуществления данного способа сбора крови средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой соль протамина или его гомолог или производное, как описано выше, в описанных выше концентрациях.

В некоторых вариантах осуществления данного способа сбора крови средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой соединение, имеющее описанную выше формулу (I).

В некоторых вариантах осуществления данного способа сбора крови средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой пара-аминобензамидин, как описано выше, в описанных выше концентрациях. В некоторых вариантах осуществления данного способа сбора крови контейнер для сбора дополнительно содержит добавку, выбранную из группы, состоящей из водорастворимого полимера и сахара.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 изображен контейнер для сбора, подходящий для применения в настоящем изобретении.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий действия протамина на ослабление образования фибриновой массы.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий отношение между концентрацией протамина и временем свертывания.

Фиг. 4 представляет собой график, иллюстрирующий действие протамина на активность тромбина.

Фиг. 5 представляет собой график, иллюстрирующий действие протамина на активность тромбина.

Фиг. 6 представляет собой график, иллюстрирующий действие пара-аминобензамидина на активность тромбина.

Фиг. 7 представляет собой график, иллюстрирующий действие пара-аминобензамидина на активность тромбина.

5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данной работе раскрыты способы, устройства и наборы, применяемые для усиления, стимуляции, стабилизации, ускорения или контроля действия тромбина (далее в данной работе называемые "контроль коагуляции"). Под усилением, стимуляцией или контролем действия тромбина подразумевают, что кровь будет коагулировать или свертываться
10 более полно и/или более быстро, чем один только образец крови или кровь, содержащая добавленный тромбин или тромбиноподобное вещество (далее в данной работе "тромбин"). Более конкретно раскрыты способы и устройства, применяемые для стабилизации, ускорения или иного контроля способности тромбина к преобразованию фибриногена в фибрин и/или иного снижения количества нерастворимого фибрина и/
15 или фибриногена в образце крови (например, в сыворотке).

Согласно одному варианту осуществления, раскрытому в данной работе, устройство имеет контейнер, в котором содержатся следующие вещества: (1) количество тромбина (или тромбиноподобного вещества) и (2) количество по меньшей мере одного средства, контролирующего коагуляцию. Тромбин и средство, контролирующее коагуляцию,
20 предназначены для смешивания с образцом крови, предпочтительно сразу после его сбора. Тем не менее, любое из веществ: тромбин или средство, контролирующее коагуляцию, можно добавлять к образцу после его сбора.

Как используют в данной работе, термин "образец крови" означает любой биологический образец, содержащий по меньшей мере некоторые компоненты крови,
25 способные к свертыванию. В некоторых образцах крови образец крови представляет собой цельную кровь. В других вариантах осуществления образец крови (например, сыворотка) выделен из образца цельной крови, в результате чего один или более чем один компонент крови уже удален путем центрифугирования. В других вариантах осуществления образец крови представляет собой концентрат плазмы.

30 Контейнер может включать любое устройство для сбора крови, включающее пробирки, такие как лабораторные пробирки и центрифужные пробирки; устройства для сбора крови замкнутой системы, такие как пакеты для сбора крови; шприцы, в частности, предварительно заполненные шприцы; катетеры; микролуночные и другие многолуночные планшеты; матрицы; трубки; лабораторные сосуды, такие как флаконы,
35 флаконы с перемешиванием, роллерные флаконы, виалы, предметные стекла, комплекты предметных стекол, покровные стекла, пленки, а также пористые субстраты и их комплекты; пипетки и наконечники для автоматических пипеток и т.д.; контейнеры для сбора биологических образцов тканей, включая скальпели, капиллярные трубки и продукты марки Microtainer®, имеющиеся в продаже от фирмы Becton Dickinson; трубки
40 для сбора венозной крови марки Vacutainer®, имеющиеся в продаже от фирмы Becton Dickinson, включая трубки, предварительно упакованные с тромбином; и любой другой контейнер, подходящий для содержания биологического образца, а также контейнеры и элементы, вовлеченные в перенос образцов. Средство, контролирующее коагуляцию, можно вводить в любой из этих контейнеров, при условии, что они соответствуют
45 критериям, изложенным в данной работе.

Контейнер может состоять (то есть быть изготовленным из) полимера или стекла, при условии, что он соответствует критериям изобретения. В некоторых вариантах осуществления можно также применять контейнер, состоящий из полипропилена,

полиэтилена, полиэтилентерефталата, полистирола, поликарбоната, целлюлозных материалов, политетрафторэтилена и других фторированных полимеров. В других вариантах осуществления контейнер состоит из полиолефинов, полиамидов, полиэфиров, силиконов, полиуретанов, эпоксидных смол, акриловых смол, полиакрилатов, полисульфонов, полиметакрилатов, полиэфирэфиркетонов (ПЭЭК), полиимида и фторполимеров, таких как политетрафторэтилен (ПТФЭ) Teflon®, фторированный этилен-пропилен (ФЭП) Teflon®, Tefzel®, поли(винилиденфторид), поливинилиденфторид (ПВДФ) и перфторалкокси-смолы. Стеклообразные изделия, включающие кремнеземное стекло, также применяют для изготовления контейнера.

Одним из иллюстративных стеклянных изделий является PYREX®, имеющийся в продаже от фирмы Corning Glass, Corning, N.Y. Керамические контейнеры можно применять согласно воплощениям изобретения. Целлюлозные изделия, такие как контейнеры из бумаги и армированной бумаги, могут также служить в качестве материалов контейнера.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения контейнер предварительно обрабатывают по меньшей мере одним из следующих веществ: тромбином или средством, контролирующим коагуляцию, и упаковывают в форму, готовую к применению. В других воплощениях контейнер предварительно обрабатывают и тромбином, и средством, контролирующим коагуляцию. В характерном случае упакованный контейнер является стерильным и также упакован в стерильные упаковочные материалы. Упакованная сборка (или "набор") может содержать инструкции по применению, хранению, перевозке и/или обращению.

Тромбин, применяемый как часть настоящего изобретения, может иметь происхождение из любого источника, включая, например, источники природного и синтетического происхождения. В некоторых вариантах осуществления применяют бычий тромбин. В других вариантах осуществления применяют тромбин из других видов. В других вариантах осуществления применяют рекомбинантный тромбин. Рекомбинантный тромбин может быть модифицирован таким образом, чтобы он обладал улучшенной стабильностью или устойчивостью к инактивации другими компонентами крови по сравнению с немодифицированным тромбином. В предпочтительных вариантах осуществления тромбин представляет собой альфа-тромбин. Альфа-тромбин хорошо известен специалистам в данной области техники и подробно описан в данной работе. Концентрация тромбина, применяемая в контейнере, находится в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 100 единиц (ед.) на миллилитр объема крови (ед./мл). В некоторых воплощениях концентрация тромбина, применяемая в контейнере, находится в диапазоне от примерно 1 до примерно 20 единиц на миллилитр объема крови.

Контейнер также содержит по меньшей мере одно средство, контролирующее коагуляцию. Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что средство, контролирующее коагуляцию, способно достигать одного или более чем одного из следующих результатов: (1) по меньшей мере частично стабилизировать тромбин; (2) по меньшей мере частично уменьшать количество нерастворимого фибрина и/или фибриногена в образце крови (например, в сыворотке); или (3) по меньшей мере частично ускорять действие тромбина.

В одном воплощении, раскрытом в данной работе, средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой протамин или его соль или гидрат. Можно применять любой протамин или его производное при условии, что он соответствует критериям заявленного изобретения, описанным выше. В некоторых воплощениях протамин выделяют из спермы лосося, и он имеет последовательность, идентифицированную в

SEQ. ID. NO. 1. (SEQ. ID. NO. 1: PRRRRSSSR PVRRRRRRPRV SRRRRRRRGGR RRR).

Дополнительно могут быть рассмотрены последовательности протамина из других родственных источников, поскольку они обладают в высокой степени подобными последовательностями и могут также обладать желаемыми свойствами. Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что протамин может либо стабилизировать тромбин, либо ускорять его действие.

В одном варианте осуществления, раскрытом в данной работе, средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой слабый конкурентный (и, следовательно, обратимый) ингибитор активного центра тромбина. Считают, что добавление такого ингибитора стабилизирует тромбин в процессе хранения упакованной комбинации устройства для сбора крови и препарата, содержащего тромбин. Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что слабый конкурентный ингибитор активного центра тромбина стабилизирует тромбин за счет замедления его самодеструктивной аутолитической активности. Считают, что при разведении кровью слабый ингибитор диссоциирует от тромбина, таким образом, давая ему возможность лучше диспергироваться в образце перед вовлечением его в образование сгустка.

В некоторых вариантах осуществления слабый ингибитор активного центра тромбина представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина имеет константу ингибирования (K_i), составляющую более, чем примерно 0,1 микромоль. В других вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина имеет константу ингибирования, находящуюся в диапазоне от примерно 0,1 микромоль до примерно 1000 микромоль. В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина включает соединения, имеющие формулу (I).

В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор активного центра представляет собой замещенный или незамещенный бензамидин, такой как представлен описанной выше формулой (I).

В одном варианте осуществления соединение, имеющее формулу (I), представляет собой бензамидин. В других вариантах осуществления средство, контролирующее коагуляцию, выбрано из группы, состоящей из пара-аминобензамидина, мета-аминобензамидина и орто-аминобензамидина.

В другом варианте осуществления, описанном в данной работе, средство, контролирующее коагуляцию, представляет собой низкомолекулярное соединение поликарбоновой кислоты (или ее соль), имеющее молекулярную массу, составляющую менее чем примерно 500 г/моль. Например, подходящие соединения поликарбоновой кислоты могут иметь следующую формулу: $C(O)OH-R^1-R^2-(C(O)OH)-R^3-C(O)OH$, где R^1 , R^2 и R^3 могут быть одинаковыми или разными, и могут представлять собой замещенную или незамещенную алифатическую или ароматическую группу, и где любой из R^1 , R^2 или R^3 может содержать любое число дополнительных карбоново-кислотных групп. В некоторых вариантах осуществления соединение поликарбоновой кислоты представляет собой цитрат натрия. В других вариантах осуществления соединение поликарбоновой кислоты представляет собой изоцитрат.

Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что цитрат стабилизирует альфа-тромбин за счет снижения скорости, при которой он расщепляется и преобразуется в менее активные формы (например, бета-тромбин или гамма-тромбин). Кроме того, и снова не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают,

что цитрат способен стабилизировать альфа-тромбин сравнительно лучше, чем альфа-тромбин, объединенный с одним из следующих буферов: Трис-буфером, фосфатным, гистидиновым или N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (ГЭПЭС).

В одном варианте осуществления цитратное средство, контролирующее коагуляцию, объединяют с дополнительным компонентом, выбранным из группы, состоящей из водорастворимых полимеров и Сахаров. Иллюстративные водорастворимые полимеры включают поливинилпирролидон (ПВП), полисахариды и полиэтиленгликоль. Иллюстративные сахара включают декстран, циклодекстрины, трегалозу, лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит и сорбит. Действительно, дополнительный компонент(ы) может быть выбран из обычных фармацевтических эксципиентов, хорошо известных специалистам в области приготовления фармацевтических препаратов.

Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что водорастворимый полимер может действовать как связующее вещество, чтобы способствовать нанесению препарата путем распыления на поверхность устройства для сбора крови.

В других вариантах осуществления цитратное средство, контролирующее коагуляцию, объединяют с сурфактантом. Примеры подходящих сурфактантов включают сурфактанты, принадлежащие к классу соединений, известных как "силоксаналкоксилаты".

В некоторых вариантах осуществления рН цитратного раствора с тромбином находятся в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 7,5.

В некоторых вариантах осуществления цитратное средство, контролирующее коагуляцию, содержит другие соли, буферы или белки. В других вариантах осуществления цитратный раствор по существу не содержит другие соли, буферы или белки. В других вариантах осуществления цитратный раствор не содержит по меньшей мере одно из следующих веществ: альбумин, хлорид натрия или Трис-НСI.

Специалисты в данной области техники способны выбрать подходящую концентрацию средства, контролирующего коагуляцию, подходящую для применений, раскрытых в данной работе, на основании руководства, приведенного в данной работе. Конечно, различные концентрации средства, контролирующего коагуляцию, могут быть необходимы в зависимости от количества тромбина, находящегося в пробирке с образцом, типа применяемого тромбина, способа нанесения препарата в контейнер, объема образца крови и типа собранного образца крови. Для получения желаемого результата можно также применять смеси различных средств, контролирующих коагуляцию, в варьирующих концентрациях. Например, для получения желаемого эффекта тромбин можно объединять как с протамином, так и с соединением, имеющим формулу (I). Тромбин можно также объединять как с протамином, так и с поликарбоновой кислотой. Как таковые, устройства, содержащие тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, можно изготавливать на заказ в зависимости от типа образца и предназначенного применения.

В некоторых воплощениях, где протамин добавляют к образцу, содержащему тромбин, протамин находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 0,25 мг/мл до примерно 5 мг/мл при диспергировании в образце крови. В других вариантах осуществления, где протамин добавляют к образцу, содержащему тромбин, протамин находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 0,25 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл при диспергировании в образце крови.

В некоторых вариантах осуществления слабый конкурентный ингибитор тромбина находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 1-до примерно 200-

кратного значения описанной выше константы ингибирования. В некоторых вариантах осуществления, где соединение, имеющее формулу (I), добавляют к препарату, содержащему тромбин, соединение, имеющее формулу (I), находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 20 мМ в препарате жидкого тромбина для нанесения (например, путем распыления) и высушивания на поверхности устройства для сбора крови. В других воплощениях, где соединение, имеющее формулу (I), добавляют к препарату, содержащему тромбин, соединение, имеющее формулу (I), находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 1 мМ до примерно 10 мМ в препарате жидкого тромбина для нанесения (например, путем распыления) и высушивания на поверхности устройства для сбора крови.

В некоторых воплощениях, где цитрат добавляют к препарату, содержащему тромбин, отдельно или в комбинации с дополнительным компонентом, цитрат находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 0,5 мМ до примерно 100 мМ в препарате жидкого тромбина для нанесения (например, путем распыления) и высушивания на поверхности устройства для сбора крови. В других воплощениях, где цитрат добавляют к препарату, содержащему тромбин, отдельно или в комбинации с дополнительным компонентом, цитрат находится в концентрации, находящейся в диапазоне от примерно 1 мМ до примерно 50 мМ в препарате жидкого тромбина для нанесения (например, путем распыления) и высушивания на поверхности устройства для сбора крови.

Любое из средств, контролирующих коагуляцию, можно применять отдельно или в комбинации с буферным раствором. Буферные растворы хорошо известны обычным специалистам в данной области техники и могут быть легко адаптированы к применению по настоящему изобретению.

Средство, контролирующее коагуляцию, тромбин и любые добавки или буферы могут быть расположены на любой поверхности контейнера. Тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, могут быть расположены на одних и тех же поверхностях или на различных поверхностях, могут быть взаимно перемешаны, либо могут быть отделены друг от друга (для удобства любая ссылка на применение тромбина или средства, контролирующего коагуляцию, вместе следует также рассматривать как включающее их по отдельности). Тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, может быть также расположено на пробках и пломбах для закрытия таких устройств, либо на механических или других вставках, помещенных внутри таких устройств. Тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, расположено в любом месте вдоль по меньшей мере одной внутренней стенки контейнера или в любом месте внутри резервуарной части. Расположение тромбина или средства, контролирующего коагуляцию, определяется несколькими параметрами, включая способ нанесения, конкретное применяемое средство, контролирующее коагуляцию, внутренний объем и внутреннее давление контейнера, и объем биологического образца, отбираемый из контейнера.

Тромбин, средство, контролирующее коагуляцию, и добавки или буферы можно наносить в контейнер любыми способами, известными в данной области техники. Тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, можно наносить одними и теми же средствами или различными средствами. Их можно также наносить вместе или по отдельности. Например, тромбин и/или средства, контролирующие коагуляцию, можно распылять на поверхности (в виде жидкости, порошка или геля), высушивать распылительной сушкой, рыхло распределять или лиофилизировать на поверхности внутренней стенки контейнера. В одном варианте осуществления тромбин и/или

средство, контролирующее коагуляцию, находится в жидком растворе, и его распыляют или иным путем помещают в контейнер. Затем раствор можно лиофилизировать способами, известными в данной области техники, такими как, например, сушка вымораживанием. Например, путем замораживания раствора, а затем медленного подогрева после замораживания, при одновременном применении вакуума, лиофилизированный порошок остается в пробирке для сбора. Добавку, такую как эксципиент, например, ПВП или трегалозу, можно также добавлять к тромбину и/или средству, контролирующему коагуляцию, перед лиофилизацией, чтобы гранулировать полученный в результате стабилизирующий агент в контейнере. Альтернативно тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, например, в форме геля или в жидкой форме, можно располагать, например, в резервуарной части контейнера. В характерном случае, чтобы дозировать желаемое количество тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию, в контейнер, восстанавливают твердую форму тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию, а затем дозируют соответствующее количество жидкости в контейнер. Жидкость можно высушивать распылительной сушкой, дозировать на дно контейнера или впоследствии лиофилизировать. В другом аспекте тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, формируют в виде жидкого или твердого аэрозоля и распыляют на одну или более чем одну поверхность внутренней части контейнера.

В некоторых воплощениях контейнер предназначен для отбора образца цельной крови непосредственно у пациента для свертывания образца крови сразу в момент сбора, и, следовательно, его применяют в качестве пробирки для сбора сыворотки. Устройство может представлять собой вакуумированную систему для сбора крови. Альтернативно устройство может представлять собой частично вакуумированную или не вакуумированную систему для сбора крови. Подходящим примером вакуумированной системы является закрытая пробирка. Ручной отбор шприцом является подходящим примером как частично вакуумированной, так и не вакуумированной системы. Не вакуумированные системы могут также включать автоматические системы отбора.

На фиг. 1 показан типичный контейнер 10 для сбора крови, включающий контейнер 12, определяющий внутреннюю камеру 14. В проиллюстрированном воплощении контейнер 12 представляет собой полую трубку, имеющую боковую стенку 16, замкнутый нижний конец 18 и открытый верхний конец 20. Возможно, разделительный элемент 13 представлен внутри камеры 14 контейнера. Разделительный элемент 13 служит, чтобы способствовать разделению компонентов образца, например, путем центрифугирования. Контейнер 12 имеет размеры, дающие возможность для сбора подходящего объема биологической жидкости, предпочтительно крови. Крышка 22 для закрытия открытого конца 20, чтобы закрыть контейнер 12, предпочтительна, когда требуется стерильный препарат.

Для традиционных пробирок обычно достаточно завинчивающейся крышки. Для вакуумированных пробирок для сбора обычно используют плотно пригнанную эластомерную пробку, чтобы удерживать вакуум в течение необходимых периодов хранения. Крышка 22 образует пломбу, способную к эффективному закрытию контейнера 12 и сохранения биологического образца в камере 14. Крышка 22 может иметь одну из разнообразных форм, включающих, но не ограниченных ими, резиновые крышки, крышки HEMOGARD®, металлические пломбы, резиновые пломбы с металлической каймой и пломбы из различных полимеров, имеющие различные дизайны. Защитная оболочка 24 может закрывать сверху крышку 22. Контейнер 12 также содержит тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, в соответствии с

настоящим изобретением. Контейнер может содержать одно или оба вещества: тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию. Конечно, можно добавлять другие вещества, кроме тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию, перед сбором образца или после сбора образца.

5 Контейнер 12 может быть изготовлен из стекла, полимера или других подходящих материалов, раскрытых в данной работе. Полимерные материалы могут представлять собой материалы, непроницаемые для кислорода, или могут содержать слой, непроницаемый или полупроницаемый для кислорода. Альтернативно контейнер 12 может быть изготовлен из водо- или воздухопроницаемого полимерного материала.

10 Давление в камере 14 выбрано таким образом, чтобы отобрать предопределенный объем биологического образца в камеру 14. Крышка 22 является такой, что ее можно пробить иглой 26 или другой канюлей, чтобы ввести биологический образец в контейнер 12, как известно в данной области техники. Предпочтительно крышка 22 является перепломбируемой. Подходящие материалы для крышки 22 включают, например, 15 силиконовый каучук, натуральный каучук, галобутиловый каучук, бутадиен-стирольный каучук, сополимеры этилена и пропилена и полихлоропрен.

Подходящие примеры контейнера 12 включают одностенные и многослойные трубки. Более конкретный пример подходящего контейнера 12 раскрыт в патенте США №5860937 автором Cohen, который полностью включен в настоящее описание 20 посредством ссылки.

В качестве примера, один из полезных способов изготовления устройств согласно настоящему изобретению включает следующие стадии: получение контейнера; добавление в этот контейнер тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию; 25 высушивание или лиофилизацию тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию; вакуумирование контейнера; и стерилизацию контейнера. Тромбин и/или средство, контролирующее коагуляцию, можно дозировать в контейнер в форме раствора. До или после добавления тромбина и/или средства, контролирующего коагуляцию, в контейнер для сбора в контейнер при желании может быть добавлено разделительное устройство. Пример подходящего способа лиофилизации/ 30 вакуумирования состоит в следующих стадиях: контейнер, в который дозирован тромбин и/или контролирующий агент, замораживают при температуре, составляющей примерно -40°C , при давлении, составляющем примерно 760 мм, в течение примерно от 6 до 8 часов; контейнер высушивают, в то время как температура скачкообразно повышается с -40°C до примерно 25°C , при давлении, составляющем примерно 0,05 мм, в течение 35 примерно от 8 до 10 часов; а затем контейнер вакуумируют при температуре, составляющей примерно 25°C , при давлении, составляющем примерно 120 мм, в течение примерно 0,1 часа. В некоторых вариантах осуществления при методе стерилизации используют облучение с помощью излучения кобальта 60.

В некоторых вариантах осуществления применяют пробирку для сбора образцов, 40 имеющая разделительный элемент 13 (например, механический разделительный элемент, гель или другой разделительный элемент, включающий фильтровальную бумагу и тому подобное) для разделения компонентов крови. В таком аспекте внутренняя часть пробирки и/или наружная часть разделительного элемента может быть обработана тромбином и/или средством, контролирующим коагуляцию. В таких случаях тромбин 45 и/или средство, контролирующее коагуляцию, можно высушить распылительной сушкой и/или лиофилизировать на наружной поверхности разделительной среды.

Контейнер 12 может также представлять собой контейнер для сбора или получения сыворотки крови. Такой контейнер содержит, в дополнение к тромбину и/или средству,

контролирующему коагуляцию, элемент для отделения сыворотки от цельной крови человека или животного. Элемент для отделения сыворотки от цельной крови может представлять собой разделительный элемент, такой как препарат в виде геля или механическую среду. В некоторых воплощениях гель представляет собой препарат в виде тиксотропного геля. Гель может представлять собой гомополимер или сополимер и может включать сложный полиэфир, полиакриловую смолу или гели на силиконовой основе.

Другие имеющиеся в продаже пробирки для сбора крови, подходящие для применения в данной работе, включают следующие пробирки, все из которых продаются фирмой Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., со всеми регистрационными и товарными знаками, принадлежащими Becton, Dickinson and Company: пробирки VACUTAINER® марка SST™, номера по каталогу включают, но не ограничены ими, 367983, 367977 и 367986; сывороточные пробирки VACUTAINER® марка Serum tubes, номера по каталогу включают, но не ограничены ими, 367812 и 367815, пробирки с тромбином VACUTAINER® марка Thrombin tubes, номера по каталогу включают, но не ограничены ими, 367755 и 366525, пробирки VACUTAINER® марка RST, номера по каталогу включают, но не ограничены ими, 368771 или 368774, и любые из MICROTAINER® марка Serum and serum separator tubes. Как отмечено выше, любое подходящее устройство для сбора крови, вакуумированное или невакуумированное, рассмотрено авторами изобретения с включением агентов коагуляции, раскрытых в данной работе. Конечно, специалисты в данной области техники могут модифицировать любой контейнер в соответствии с настоящим изобретением, чтобы сделать его подходящим для применения.

Согласно другому воплощению в данной работе раскрыт набор, имеющий по меньшей мере два контейнера, содержащих тромбин и средство, контролирующее коагуляцию. Например, этот набор имеет первую пробирку для сбора, например, пробирку для отделения плазмы, в которой имеется разделительный элемент, и вторую пробирку для тестирования, например, для наливания или иного дозирования собранной плазмы в первую пробирку для сбора. Возможно, этот набор может включать устройство для переноса из одной пробирки в другую, чтобы предотвратить необходимость в налипании или в других небезопасных практиках переноса, и в этом случае вторая пробирка находится при пониженном давлении, чтобы отбирать в нее плазму. Пользователь такого набора соберет образец в первую пробирку, даст возможность компонентам крови свернуться с центрифугированием или без центрифугирования, перенесет интересующий образец во вторую пробирку для тестирования и проведет тестирование. Вторая пробирка для тестирования может иметь разнообразные размеры в зависимости от желаемого тестирования. Набор может также включать упаковку и/или инструкции по применению.

В одном воплощении набор для сбора и хранения биологического образца имеет первый стерильный и вакуумированный контейнер, где в первом контейнере имеется тромбин и по меньшей мере одно средство, контролирующее коагуляцию, и крышку, пробиваемую иглой; и второй контейнер, где во втором контейнере также имеется средство, контролирующее коагуляцию.

Согласно другому воплощению в данной работе раскрыт способ стимуляции или усиления коагуляции или свертывания компонентов крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, в концентрации, достаточной для получения следующих результатов: (i) стабилизации и/или ускорения действия тромбина, или (ii) снижения количества растворимого фибрина

в образце; и добавление в контейнер образца цельной крови.

Иллюстративные способы включают получение образца крови и введение образца в контейнер, содержащий тромбин и средство, контролирующее коагуляцию. В некоторых вариантах осуществления образец крови отбирают непосредственно у пациента в контейнер без каких-либо промежуточных стадий способа. Хотя не придерживаясь конкретной теории операции, считают, что сбор биологического образца непосредственно у пациента, например, если собирают образец цельной крови, и введение образца непосредственно в контейнер, уже содержащий (то есть предварительно обработанный агентом) тромбин и средство, контролирующее коагуляцию, существенно помогает при стабилизации или ускорении или ином контроле действия тромбина или при снижении количества растворимого фибрина, присутствующего в образце. Раскрытые способы применимы с любыми контейнерами, добавками и дополнительными антикоагулянтами, раскрытыми в данной работе.

ПРИМЕРЫ

15 Пример 1: Ослабляющее действие протамина на фибриновые массы в образцах сыворотки

Сначала протамина сульфат растворяли в приблизительно 5 М соляной кислоте при концентрации, составляющей примерно 250 мг/мл. Затем этот раствор титровали до значения рН, составляющего примерно 6, 5 н. гидроксидом натрия. Это титрование до 20 примерно рН 6 выполняли сразу, поскольку пролонгированное воздействие на протамин низких значений рН, как считают, приводит в результате к его гидролизу и потере активности. Также считают, что для приготовления раствора протамина можно использовать более разбавленные растворы соляной кислоты.

Затем раствор протамина смешивали в соотношении, составляющем 1:1, с раствором 25 приблизительно 1250 ед./мл тромбина в приблизительно 40 мМ цитрате натрия при рН примерно 6,0, содержащим примерно 20 мг/мл силоксаналкоксилатного сурфактанта и 2 мг/мл поливинилпирролидона (ПВП).

Полученный в результате реагент фильтровали и распыляли дозами по 20 мкл в пробирки из полиэтилентерефталата (ПЭТ) размером 13×100 мм. Затем пробирки 30 высушивали путем продувки горячим воздухом, вакуумировали и закупоривали.

Пробирки заполняли свежесобранной кровью человека, и давали ей возможность свернуться в течение от примерно 1 до примерно 3,5 минут (образцы рандомизировали), а затем центрифугировали. Полученную сыворотку оценивали путем визуальной оценки на присутствие "фибриновой массы" в отсеке сыворотки по шкале от 0 до 3, где 3 35 является наиболее тяжелой. Результаты для "фибриновых масс" представлены, как на фиг. 2. Отсутствие фибриновой массы (балл "ноль") показывает, что реакция свертывания была быстрой и полной, причем, весь фибрин (фибриноген) осаждался до стадии центрифугирования.

Как показано на фиг. 2, протамин при концентрации, составляющей примерно 0,5 40 мг/мл, резко повышал качество пробирки. При добавлении протамина только 1 пробирка из 8 имела видимую фибриновую массу либо примерно при 5 ед./мл, либо примерно при 10 ед./мл тромбина. Эти данные противоречили пробиркам без протамина, где 7 из 8 имели видимые массы примерно при 5 ед./мл тромбина, и 6 из 8 имели видимые массы примерно при 10 ед./мл тромбина. Соответственно, считают, что добавление в 45 контейнер с образцом крови средства, контролирующего коагуляцию, представляющего собой протамин, где контейнер также содержит тромбин, ослабляло тенденцию к образованию таких масс (свойственных неполному действию тромбина на фибриноген перед центрифугированием).

Пример 2: Протамина ускоряет свертывающее действие тромбина Растворы тромбина и протамина в примерно 20 мМ цитрата при значении рН, составляющем примерно 6, смешивали в соотношении, составляющем примерно 1:1, с восстановленной коммерческой лиофилизированной плазмой человека и тестировали на коагулографе Stago Compact. Полученные в результате значения времени свертывания измеряли в зависимости от концентрации тромбина и протамина для данной концентрации тромбина. Концентрации, приведенные на графике фиг. 3, представляют собой растворы тромбин/протамина перед смешиванием с плазмой.

Результаты показали уменьшенное время свертывания с возрастанием концентрации протамина. Таким образом, считают, что добавление протамина усиливает свертывающую активность тромбина. Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, установлено, что протамина ускоряет время свертывания крови посредством следующих механизмов: (1) прямого ускорения ферментативного действия тромбина; (2) предотвращения инактивации тромбина эндогенными ингибиторами в плазме; (3) ускорения осаждения фибрина или некоторого сочетания этих действий.

Пример 3: Результаты ускоренной стабильности с тромбином и протамином

Смесь тромбина (приблизительно 1250 ед./мл), протамина (приблизительно 125 мг/мл или приблизительно 62,5 мг/мл) и силоксаналкоксилатного сурфактанта готовили в примерно 20 мМ цитрате при значении рН, составляющем примерно 6,0. Приблизительно 20 мкл этой смеси распыляли в пробирки ПЭТ размером 13×100 мм. Пробирки высушивали путем продувки горячим воздухом, вакуумировали и хранили в холодильнике. В начале исследования с пробирок снимали крышки и помещали в камеру с контролируемой окружающей средой, предварительно уравновешенную до примерно 50°C и относительной влажности, составляющей примерно 45%. Через различные интервалы времени пробирки извлекали и оценивали на активность тромбина на коагулографе Stago Compact. Результаты представлены на фиг. 4. Планки погрешностей показывают 95% доверительный интервал для активности тромбина при 5 повторах. На фиг. 4 четко проиллюстрировано, что активность тромбина со временем стала лучше при добавлении протамина, чем без него.

Когда активность тромбина последующих моментов времени нормализовали по исходному значению, полученные кривые можно использовать для сравнения относительной стабильности каждого препарата (см. фиг. 5). На основании фигур наблюдают, что образцы крови с препаратами, содержащими протамина сульфат, более стабильны, чем образцы крови, объединенные с препаратами тромбина без протамина.

Пример 4: Результаты ускоренной стабильности с тромбином и пара-аминобензамидином

Средство, контролирующее коагуляцию, представляющее собой пара-аминобензамидин, оценивали, чтобы определить, улучшает ли оно стабильность распыленного тромбина в условиях ускоренной стабильности. Не желая связываться какой-либо конкретной теорией, считают, что пара-аминобензамидин стабилизирует распыленный тромбин в условиях крайне высокой влажности, где аутолитическое расщепление тромбина может идти быстро даже при комнатной температуре.

Тромбин готовили в примерно 5 мМ цитрате или изоцитрате при значении рН, составляющем примерно 6,1. Пара-аминобензамидин добавляли при концентрации, составляющей примерно 3 мМ. Приблизительно 16 мкл этого раствора распыляли в пробирки ПЭТ размером 13×100 мм. Пробирки высушивали путем продувки горячим воздухом и вакуумировали. Затем герметично закрытые пробирки и помещали в камеру

с контролируемой окружающей средой, предварительно уравновешенную до примерно 43°C и относительной влажности, составляющей примерно 75%.

5 Через различные интервалы времени пробирки извлекали и оценивали на активность тромбина на коагулографе Stago Compact. Результаты представлены на фиг. 6 и на фиг. 7. Планки погрешностей показывают 95% доверительный интервал для активности тромбина при 5 повторях. Данные на фигурах показывают, что средство, контролирующее коагуляцию, представляющее собой пара-аминобензамидин, сохраняет стабильность тромбина со временем (по сравнению с одними цитратами) в упакованном препарате до применения.

10 Хотя данное изобретение раскрыто со ссылкой на конкретные воплощения, должно быть понятно, что эти воплощения являются исключительно иллюстративными для принципов и применений настоящего изобретения. Следовательно, понятно, что могут быть выполнены различные модификации этих иллюстративных воплощений, и что могут быть выведены другие порядки без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Контейнер для сбора крови, содержащий первый конец и второй конец и по меньшей мере одну внутреннюю стенку, образующую резервуарную часть для приема крови, причем данный резервуар содержит смесь, содержащую тромбин и соединение поликарбоневой кислоты с молекулярной массой менее чем примерно 500 г/моль, и крышку.

2. Контейнер по п. 1, в котором указанное соединение поликарбоневой кислоты выбрано из группы, состоящей из цитрата и изоцитрата.

25 3. Контейнер по п. 1, в котором концентрация указанного соединения поликарбоневой кислоты составляет от примерно 0,5 до примерно 100 мМ концентрированного препарата.

4. Контейнер по п. 1, где указанный контейнер дополнительно содержит добавку, выбранную из группы, состоящей из водорастворимого полимера и сахара.

30 5. Контейнер по п. 4, в котором указанный водорастворимый полимер выбран из группы, состоящей из поливинилпирролидона, полисахаридов и полиэтиленгликоля.

6. Контейнер по п. 4, в котором указанный сахар выбран из группы, состоящей из декстрана, циклодекстринов, трегалозы, лактозы, сахарозы, глюкозы, маннита и сорбита.

35 7. Контейнер по п. 1, дополнительно содержащий разделительный элемент, выбранный из группы, состоящей из композиции в виде геля и механического разделительного элемента.

8. Контейнер по п. 7, где указанная композиция в виде геля содержит тиксотропный гель.

9. Контейнер по п. 7, где указанная композиция в виде геля содержится в капсуле.

40 10. Контейнер по п. 1, в котором крышка поддается прокалыванию иглой, и контейнер дополнительно содержит кровь, введенную в контейнер через иглу.

11. Способ сбора крови, включающий обеспечение контейнера, содержащего смесь, содержащую тромбин и соединение поликарбоневой кислоты с молекулярной массой менее чем примерно 500 г/моль, в концентрации, достаточной для стабилизации тромбина или ускорения активности тромбина, и добавление в контейнер образца крови.

12. Способ по п. 11, в котором указанное соединение поликарбоневой кислоты выбрано из группы, состоящей из цитрата и изоцитрата.

13. Способ по п. 11, в котором концентрация указанного соединения поликарбонической кислоты составляет от примерно 0,5 до примерно 100 мМ концентрированного препарата.

14. Способ по п. 11, в котором указанный способ дополнительно включает объединение в указанном контейнере добавки, выбранной из группы, состоящей из водорастворимого полимера и сахара.

15. Способ по п. 11, в котором указанный способ дополнительно включает объединение в указанном контейнере разделительного элемента.

10

15

20

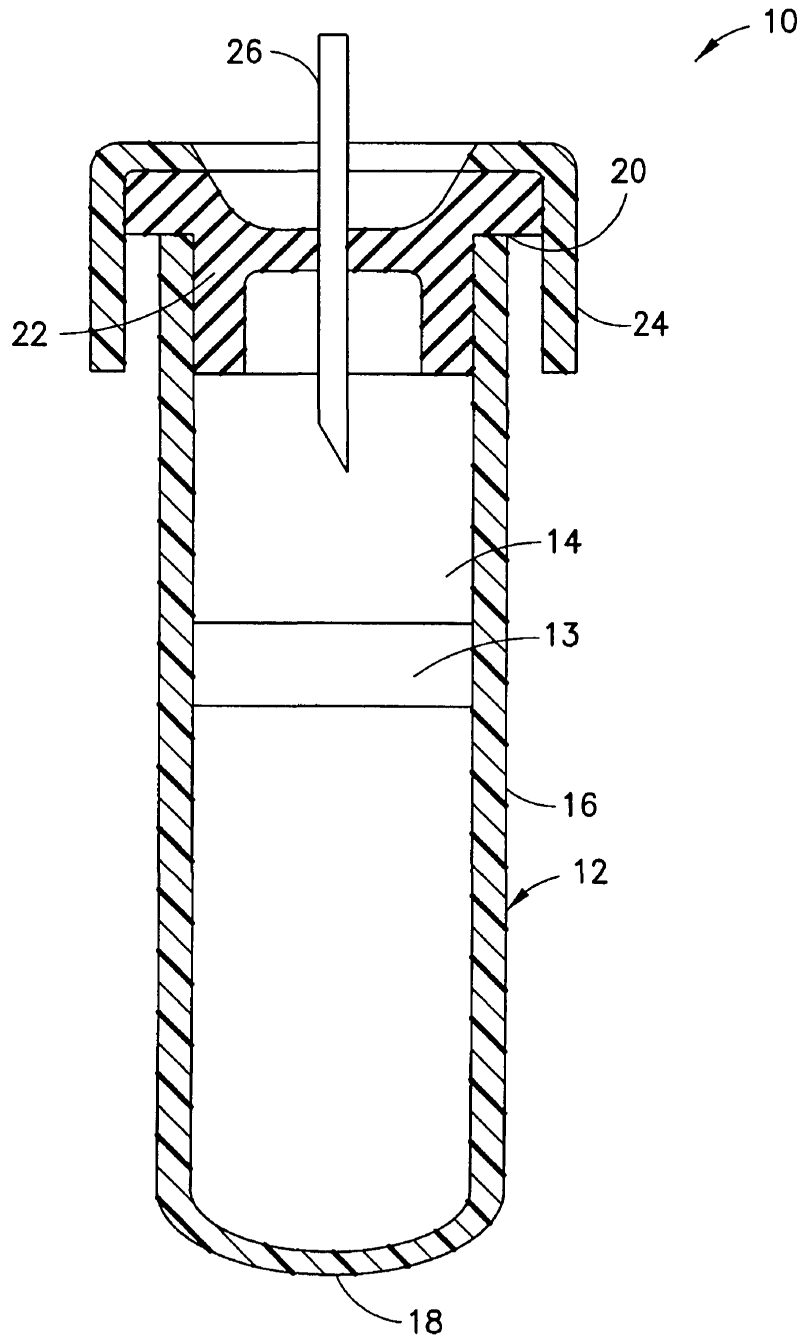
25

30

35

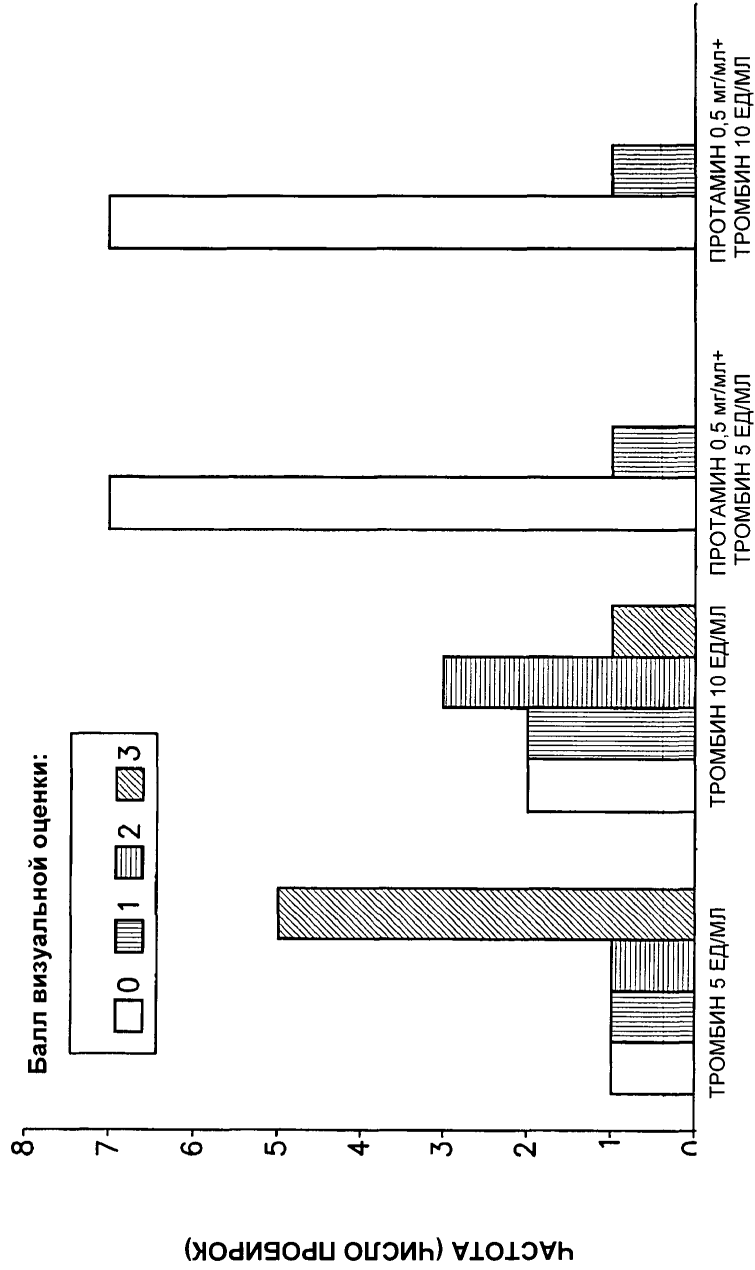
40

45



ФИГ. 1

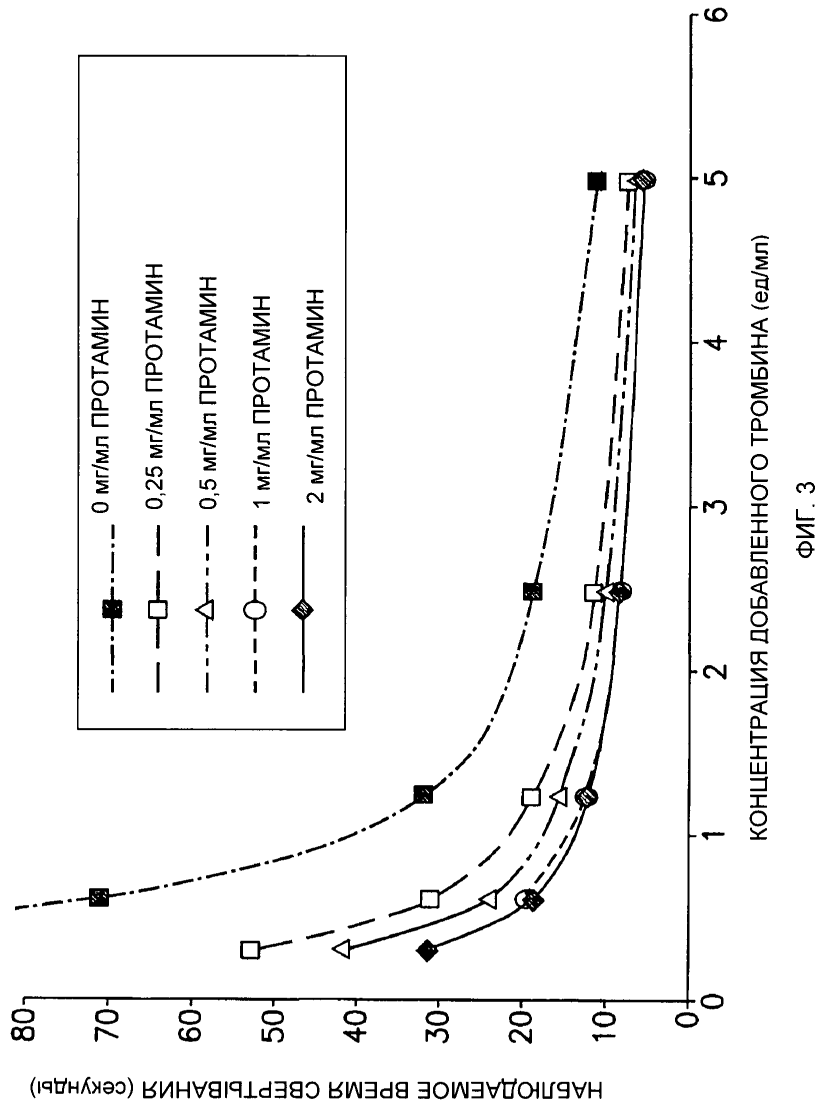
ДЕЙСТВИЕ ПРОТАМИНА НА ЧАСТОТУ ФИБРИНОВЫХ МАСС
(СВЕРТЫВАНИЕ В ТЕЧЕНИЕ ОТ 1 ДО 3,5 МИНУТ ПЕРЕД ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ)



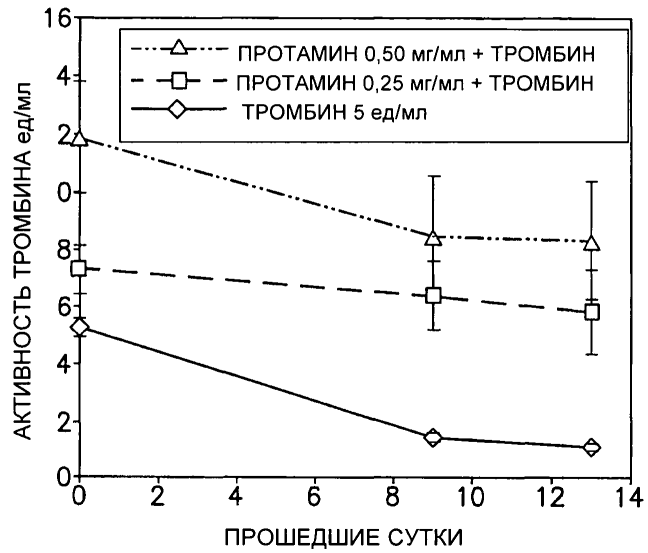
ПРЕПАРАТ

ФИГ. 2

СТИМУЛЯЦІЯ СВЕРТІВАННЯ, ОПОСРЕДОВАНОГО ТРОМБІНОМ, СУЛЬФАТОМ ПРОТАМИНА

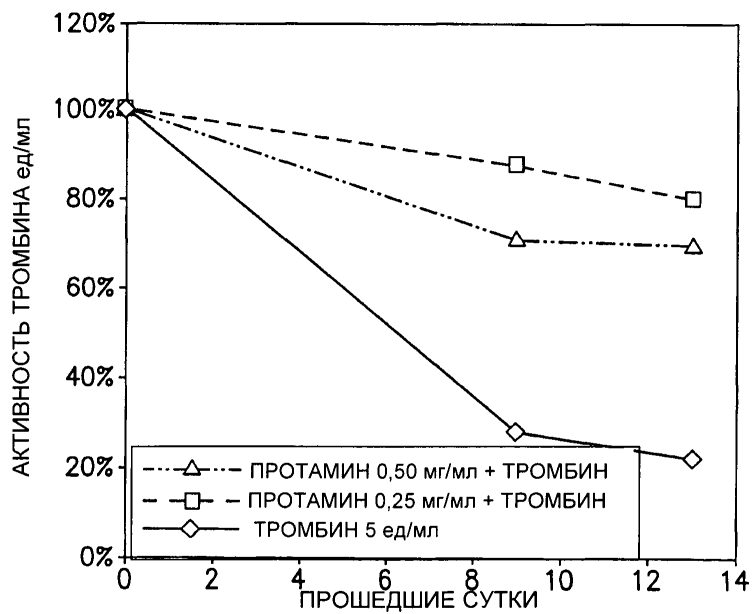


УСКОРЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ 50°C 45%ОВ



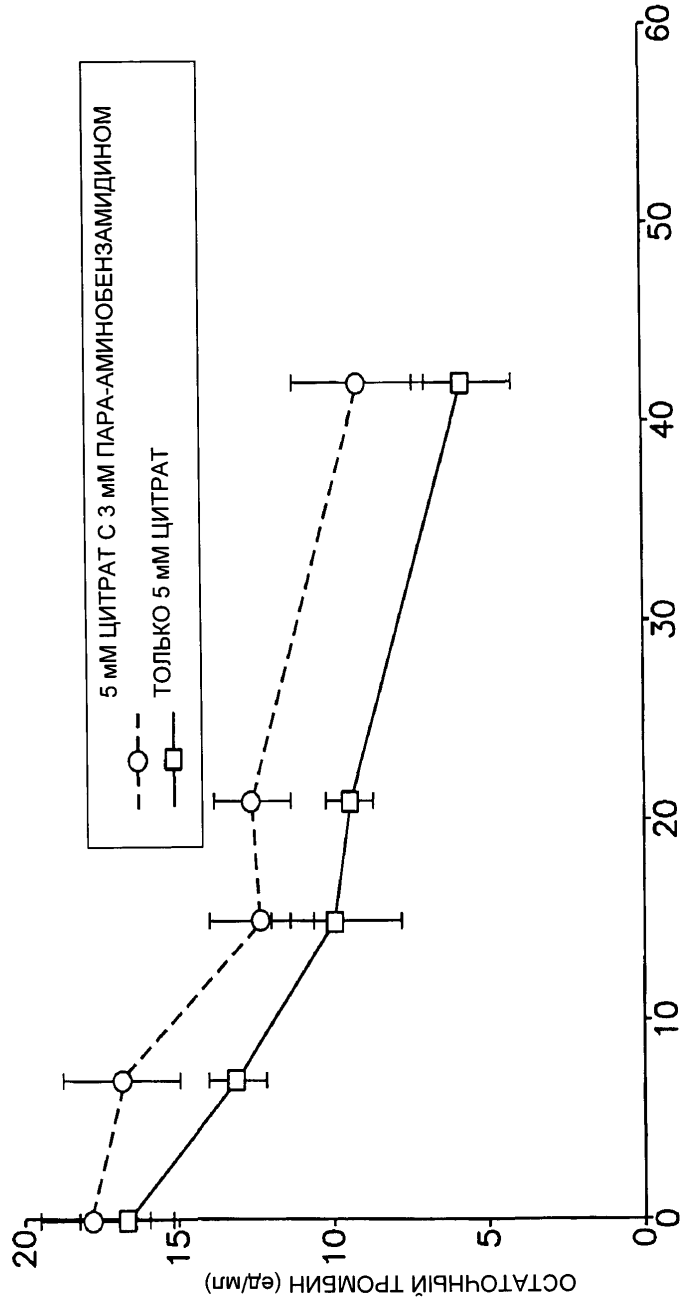
ФИГ. 4

УСКОРЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ 50°C 45%ОВ



ФИГ. 5

СТАБИЛЬНОСТЬ ТРОМБИНА 43°C/75%ОВ (95% ДИ, n=5) ЦИТРАТ 5 мМ рН 6.1



СТАБИЛЬНОСТЬ ТРОМБИНА 43°C/75%ОВ (95% ДИ, n=5) ИЗОЦИТРАТ 5 мМ рН 6.1

ПРОШЕДШЕЕ ВРЕМЯ (СУТКИ)

ФИГ. 6

