



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103477224 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201280015593. 8

(22) 申请日 2012. 03. 02

(30) 优先权数据

61/449, 337 2011. 03. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/027391 2012. 03. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/121998 EN 2012. 09. 13

(73) 专利权人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·克拉夫特 P·阿普特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 焦丽雅

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101294187 A, 2008. 10. 29, 全文.

CN 1564828 A, 2005. 01. 12, 全文.

WO 2009/042922 A2, 2009. 04. 02, 全文.

审查员 周露露

权利要求书1页 说明书14页

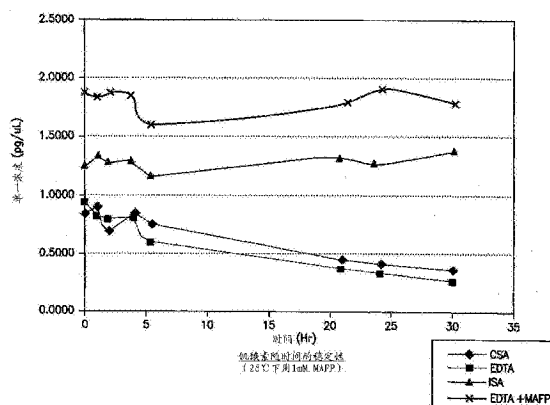
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

含有溶血磷脂酶抑制剂的血液收集装置

(57) 摘要

公开了用于收集和稳定全血或其成分的收集装置,其包括第一端和第二端,以及至少一个限定存储器的内壁,其中存储器含有包括溶血磷脂酯酶(LysoPLA)抑制剂的稳定剂。还公开了制备和使用该装置的方法。



1. 一种用于收集和稳定全血或其成分的收集装置,其包括第一端和第二端,以及至少一个限定存储器的内壁,其中存储器含有包括溶血磷脂酶抑制剂的稳定剂和抗凝剂,其中所述稳定剂进一步包括丁基胆碱酯酶抑制剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂,或其组合。

2. 权利要求 1 的装置,其是管子。

3. 权利要求 2 的装置,其中管子进一步包括通过针可以刺穿以将血液提供给存储器的关闭部件。

4. 权利要求 3 的装置,其中管子是至少部分排空的管子。

5. 权利要求 4 的装置,其中管子是无菌的。

6. 权利要求 1-5 任一项的装置,其中内壁包括塑料或玻璃。

7. 权利要求 2-5 任一项的装置,其中存储器包括分离元件。

8. 权利要求 1-5 任一项的装置,其中溶血磷脂酶抑制剂是甲基花生四烯酸氟代磷酸酯。

9. 权利要求 1-5 任一项的装置,其中溶血磷脂酶抑制剂选自溴烯醇内酯、乙基辛基氟磷酸酯、异丙基十二烷基氟磷酸酯、n- 十二烷基 - 苯并二氧杂磷杂苯 2- 氧化物、棕榈酰三氟甲基酮和棕榈酰肉碱。

10. 权利要求 9 的装置,其中丁基胆碱酯酶抑制剂是他克林,或其衍生物。

11. 权利要求 1-5 任一项的装置,其中稳定剂进一步包含蛋白酶抑制剂。

12. 权利要求 11 的装置,其中蛋白酶抑制剂是丝氨酸蛋白酶的抑制剂、内肽酶的抑制剂、外肽酶的抑制剂,或其两种或多种的组合。

13. 权利要求 12 的装置,其中所述外肽酶的抑制剂是二肽酰肽酶的抑制剂。

14. 权利要求 1-5 任一项的装置,其中稳定剂是冻干的。

15. 权利要求 1 的装置,其中抗凝剂是 EDTA 或其盐,或肝素。

16. 权利要求 15 的装置,其中将抗凝剂涂覆或喷干在内壁的至少一部分上。

17. 一种用于收集和稳定全血或其成分的方法,包括将来自病人的全血或其成分收集至权利要求 1-16 任一项的装置中。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述全血或其成分获自糖尿病病人并且所述全血或其成分含有饥饿素、胰高血糖素、 $GIP_{(1-42)}$ 、 $GLP-1-(7-36)NH_2$ 、 $GLP-1-(7-37)$, 及其两种或多种的组合。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述成分是血浆。

20. 权利要求 1-16 任一项的收集装置制备用于诊断代谢疾病或监控患有代谢疾病的病人的物品的用途。

21. 一种用于检测血液或其成分中前药和 / 或其活性代谢物的存在或含量的方法,包括检测来自已经给药前药的病人的血液样品或其流体成分中带有脂族酯基的前药和 / 或其活性代谢物的存在或测量含量,其中将血液或其流体成分收集至权利要求 1-16 任一项的收集装置中,并且将检测的存在或测量的含量与对照相比。

含有溶血磷脂酶抑制剂的血液收集装置

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2011 年 3 月 4 日提交的美国临时专利申请 No. 61/449,337 的提交日权益,在此按引用将其公开内容引入本文中作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 糖尿病是失调代谢的综合症,通常是由于遗传和环境因素的结合引起的,导致异常的高血糖水平(高血糖症)。血糖水平通过体内的多种化学物质和激素的复杂相互作用来控制,包括在胰腺的 β 细胞中制得的激素胰岛素。糖尿病指的是由于体内缺乏胰岛素分泌或胰岛素作用导致高血糖水平的一组疾病。

[0005] 由于减少的胰岛素产生(1 型)或对其作用的抵抗(2 型和妊娠性),产生了糖尿病。两种情况都导致高血糖症,其很大程度上引起糖尿病的急性信号,即过量的尿液产生,导致补偿性口渴和增加的流体摄入,视力模糊,无法解释的体重减轻,嗜睡和能量代谢的改变。

[0006] 通过注射器、胰岛素泵或胰岛素笔的注射来传送胰岛素,这是 1 型糖尿病的基础治疗。2 型糖尿病通过饮食处理、锻炼、药物和胰岛素补充来控制。所有形式的糖尿病都已经是可治疗的,因为胰岛素在医学上是可获得的,但仍然存在不能治愈的问题。

[0007] 根据世界卫生组织在 2000 年的报告,全世界至少有 171 百万人或 2.8% 的人群患有糖尿病。然而,其发病率快速递增,并且估计到 2030 年,这一数字将几乎翻倍。糖尿病在全世界发生,但在更发达的国家中更为常见(尤其是 2 型)。然而,预计最大的发病率增加发生在亚洲和非洲,其中大部分病人将很可能在 2030 年之前被发现。

[0008] 已经报道了胰高血糖素-样肽(GLP-1)、胃抑制肽(GIP)、胰高血糖素和饥饿素(ghrelin)作为代谢疾病(如,糖尿病)的肽生物标记物。体内的 GLP-1 的主要来源发现在肠道中。通常,循环中正常的 GLP-1 血液浓度在 3-85 皮摩尔范围内。GLP-1 具有几个生理学特性,使其成为加强观察的潜在糖尿病治疗的主体。Gautier 等,Diabetes Met. 31:233-42 (2005)。已知 GLP-1 提高胰腺的胰岛素分泌,降低胰腺的胰高血糖素分泌,增加 β 细胞质量和胰岛素基因表达,抑制胃中的酸分泌和胃排空,以及通过增加饱腹感降低食物摄入。Baggio 等,J. Gastroenterol. 132:2131-57 (2007)。然而,一旦在循环中,已经报道了由于由包括二肽酰肽酶(DPP)-IV 的蛋白酶引起的蛋白水解的分解作用,GLP-1 呈现出约 1.5-5 分钟的短生物半衰期(Hui 等,Eur. J. Endocrinol. 146:863-9 (2002))。

[0009] GIP 的活性形式是由序列 YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKKGK KNDKHNITGQ 表示的 42 个氨基酸的多肽("GIP₍₁₋₄₂₎")。GIP₍₁₋₄₂₎ 通过 K 细胞合成,K 细胞是在胃肠道的十二指肠和空肠的粘膜中发现的。认为 GIP₍₁₋₄₂₎ 通过涉及胰腺 β 细胞上的 GIP 和 7 跨膜 GIP₍₁₋₄₂₎ 之间的相互作用的机理诱导胰岛素分泌。血浆中正常的 GIP₍₁₋₄₂₎ 禁食浓度为约 6-12pmol/L,而正常的非禁食浓度为约 80-300pmol/L。已经报道了 GIP₍₁₋₄₂₎ 在循环中呈现出约 5 分钟的半衰期。

[0010] 胰高血糖素,29 个氨基酸的肽,涉及碳水化合物代谢。通过胰腺产生,当血液中的葡萄糖水平低时(低血糖症),释放。其结合肝细胞(肝实质细胞)上的受体,引起肝将存储的糖原转化成葡萄糖并释放,然后将葡萄糖释放至血流中。随着这些存储耗尽,然后糖原刺激

肝脏中的其他葡萄糖的合成。因此,胰高血糖素的作用与胰岛素的作用是相对的,其命令体内的细胞从血液中获得葡萄糖。胰高血糖素还通过称为脂解作用的过程调节葡萄糖的生产速率。通常,循环中正常的胰高血糖素血液浓度为 11-17 皮摩尔。一旦在循环中,胰高血糖素具有约 8-18 分钟的半衰期。

[0011] 饥饿素是主要通过衬在人胃基底的 P/D1 细胞和刺激食欲的胰腺的 ϵ 细胞产生的激素。通常,正常的血液浓度也是皮摩尔范围的。饥饿素是具有序列 $\text{NH}_2\text{-GSSFLSPEHQRVQQRKESKPPAKLQPR-COOH}$ 的 28 个氨基酸的肽。这种肽的生物活性形式之一,称为酰化饥饿素,在 Ser3 上含有 n - 辛酰基(即, $-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}-$)。这种肽发挥出内分泌作用,如刺激脑垂体释放生长激素(GH),以及各种生理作用,如由于食欲刺激作用和增加的食物摄入,诱导肥胖(脂肪组织增加)和体重增加,以及刺激胃酸分泌和运动。Kojima 等, Trends Endocrinol. Metab. 12:118-122 (2001); Kojima 等, Physiol. Rev. 85:495-532 (2005)。因此,除了糖尿病,酰化饥饿素是已知的相关病症的代谢生物标记物,所述病症如节食引起的体重减轻和禁食。另一种形式的饥饿素肽称为脱酰基饥饿素,其是代谢上无活性的形式,具有其自身的功能,包括调节细胞增殖(Baldanzi 等, J. Cell Biol. 159:1029-37 (2002); Ariyasu 等, Endocrinol. 2005:355-64 (2005))和脂肪生成(Muccioli 等, Eur. J. Pharmacol. 498:27-35 (2004))。正常的饥饿素(包括活性和无活性形式)血浆浓度在约 300 至约 700pg/ml 的范围内(或约 0.08 至约 0.19nM 或约 0.09 至约 0.19fmol/ μl),并且随时间波动。饥饿素的主要循环形式是脱酰基饥饿素 [Hosoda 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 279:909-13 (2000)], 并且因此这个含量的大部分不是更准确的代谢生物标记物的形式。一旦在循环中,饥饿素具有约 30 分钟的半衰期。

[0012] 例如, Yi 等, J. Proteome Res. 6(5):1768-819 (2007), 报道了在样品收集和操作的第一分钟内发生了由内在的蛋白酶引起的血清和血浆蛋白的蛋白水解的分解作用(其表明是快速的离体蛋白水解的分解作用)。在一篇随后的出版物中, Yi 等, J. Proteome Res. 7(12):5112-8 (2008), 报道了尽管由于蛋白组学技术变得越来越强大和越来越广泛利用,血液流体中疾病标记物的发现持续加快,但将这些发现转变成临床实用,成功的特别少,使得对这种转变的障碍的理解产生了很大兴趣。除了 GLP-1、GIP、胰高血糖素和饥饿素(并且特别是其生物活性形式)在血浆中的短半衰期和相当小的浓度以外,由于预分析的可变性,引起了复杂性,尤其是在血液收集和早期样品操作过程中。Yi (2008) 还报道了在一些肽生物标记物的情况中,蛋白水解的分解作用在几秒钟内发生。

[0013] 发明概述

[0014] 饥饿素含有肽主链和含有 8- 碳酯基的侧链,其分别对人血浆中存在的内源性蛋白酶和酯酶敏感。如工作实施例中所示,申请人已经发现了通过包含溶血磷脂酶(LysoPLA)抑制剂(与蛋白酶或脂酶的抑制剂相对),能更有效地稳定所收集的血液或流体成分(例如,血清或血浆)样本中的饥饿素。实际上,申请人的数据表明在体外,另外存在的脂酶抑制剂减弱或降低了饥饿素的稳定性。除了饥饿素的侧链是“酯”基的事实以外,这些发现是令人惊讶的并且是出人预料的,尤其是考虑到在胃和肠中检测到 LysoPLA 活性,但在血浆中未检测到的报道。因此,为了进行可靠的临床测试,如生物标记(如,饥饿素)的测量,本发明提供了血液及其成分相对较长时间的储存稳定性。

[0015] 因此,本发明的第一个方面涉及用于收集和稳定全血或其成分的收集装置,其

包括第一端和第二端以及至少一个限定存储器的内壁,其中存储器含有包括溶血磷脂酶(LysoPLA)抑制剂的稳定剂。在一些实施方案中,稳定剂还包括通常存在于血液中并分解代谢疾病诊断标记物的另一种酶的至少一种抑制剂。这些酶包括酯酶和蛋白酶。因此,在其他实施方案中,血液收集装置还可以包括酯酶抑制剂,如丁基胆碱酯酶(BChE)或乙酰基胆碱酯酶(AChE)抑制剂,和/或蛋白酶的抑制剂(例如,丝氨酸蛋白酶抑制剂、外肽酶抑制剂、二肽酰肽酶抑制剂,及其两种或多种的组合)。

[0016] 还提供了制造和使用用于收集和存储全血或其成分的装置的方法。

[0017] 本发明的再一个方面涉及一种用于诊断疾病或监控患病(如,代谢疾病(例如,糖尿病))个体治疗的方法,包括测量随着时间(或至少一个约定的时间或时间间隔)在使用本发明的血液收集装置从病人收集的血液样品或其成分中的一种或多种疾病标记物的存在或含量,包括生物(代谢)活性的饥饿素。在一些实施方案中,该方法还包括测量至少一种选自胰高血糖素、GIP、饥饿素和 GLP-1 (其包括 GLP-1-(7-36)NH₂和 GLP-1-(7-37)),及其两种或多种组合的其他代谢疾病标记物。

[0018] 本发明的再一个方面涉及用于监控已经给予前药的个体中含有脂族酯侧基(例如,酰基基团)的前药的血液水平的方法,其包括使用本发明的血液收集装置从病人收集血样,和测量样品或其成分中的前药和/或活性代谢物的存在或含量。可以测量前药和前药的活性代谢物的存在或含量。可以超过一次,如以预定的时间间隔,进行前药和/或代谢物的血液水平的测量。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 是本发明的典型血液收集装置的透视图。

[0021] 图 2 是展示出四个不同血液收集管中 30hr 内的酰基-饥饿素稳定性比较的图,所述四个管子含有:1) LysoPLA 抑制剂甲基花生四烯酸氟代膦酸酯(MAFP)、EDTA、酯酶抑制剂、他克林和蛋白酶抑制剂 L-苏-异亮氨酰噻唑烷(L-threo-isoleucyl thiazolidide)、贝他定和亮肽素(本发明的稳定剂“ISA”,图中用▲表示);2) 另一种本发明的稳定剂,其包括抗凝剂 EDTA 和 MAFP(在图中用 x 表示);3) EDTA 以及酯酶抑制剂和蛋白酶抑制剂(比较稳定剂“CSA”,在图中用◆表示);和 4) 单独的 EDTA (图中用■表示),接着用 1pg/uL 酰基-饥饿素强化(spiking)。

[0022] 图 3 是显示出从禁食人患者收集的并且存储在强化(◆)和未强化(■) EDTA 管以及含有本发明的代表性稳定剂(包括 MAFP 作为 LysoPLA 抑制剂)的收集管(强化(▲)和未强化(x))中的血液样品中随着时间的饥饿素稳定性图。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明的收集装置用于收集和稳定全血或其成分,如红细胞浓缩物、血小板浓缩物、白细胞浓缩物和血液流体成分,包括血浆和血清。

[0025] 宽泛地,本发明的血液样品收集装置可以涵盖包括管的任何收集装置,所述管如试管和离心管;闭合系统血液收集装置,如收集袋;注射器,尤其是预填充注射器;导管;微量滴定管和其他多孔平板;矩阵;管道系统;实验室容器,如烧瓶、旋转烧瓶、滚瓶、小瓶、显微镜载玻片、显微镜载玻片组件、盖玻片、膜以及多孔基质和组件;移液管和移液管尖;组织和其他生物样品收集容器;和适用于容纳生物样品的任何其他容器,以及涉及转移样品的容器和元件。几种这样的装置的实例和说明公开于共有的 Stevens 等的 U. S. 专利

7, 309, 468 中。

[0026] 图 1, U. S. 专利 7, 309, 468 中也有说明, 显示了本发明中有用的典型血液收集装置 10, 其包括限定了内室或存储器 14 的容器 12。在所示的实施方案中, 容器 12 是具有侧壁 16、封闭底端 18 和开口上端 20 的中空管。任选, 在容器室 14 内提供了分离构件 13。分离构件 13 用于帮助分离血液样品的成分, 例如, 通过离心来分离。设定容器 12 的大小, 用于收集合适体积的血液。在需要无菌产品的情况中, 用于覆盖开口端 20 以闭合容器的关闭部件 22 是必需的。在一些实施方案中, 将管子构造成适用于螺帽。然而, 在其中排空管子的实施方案中, 如在其中存储器含有 BChE 抑制剂但不含有蛋白酶抑制剂的情况中, 通常使用密封连接的弹性塞子来含有所需存储时间段过程中的真空。优选, 关闭部件 22 形成能够有效封闭容器 12 并将生物样品保留在室 14 内的封口。关闭部件 22 可以是各种形式中的一种, 包括但不限于, 橡胶关闭部件、HEMOGUARD™关闭部件、金属封口、金属镶边的橡胶封口以及不同聚合物和设计的封口。保护性护罩 24 可以盖在关闭部件 22 上。

[0027] 容器 12 可以由适用于实验室容器的任何材料制得, 包括, 例如, 塑料(例如, 聚烯烃、聚酰胺、聚酯、有机硅、聚氨酯、环氧树脂、丙烯酸树脂、聚丙烯酸酯、聚酯、聚砜、聚甲基丙烯酸酰胺、PEEK、聚酰亚胺和含氟聚合物)和玻璃产品, 包括石英玻璃。优选, 容器 12 是透明的。适用于容器 12 的透明热塑性材料的实例包括聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯和聚乙二醇对苯二甲酸酯。塑料材料可以是不透氧材料或可以含有不透氧或半渗透层。或者, 容器 12 可以由透水透气的塑料材料制得。

[0028] 选择室 14 中的压力, 以将约定体积的生物样品吸入室 14 中。优选, 关闭部件 22 由能够维持大气压和低于大气的压力之间的内压差的弹性材料制得。如本领域所知的, 关闭部件 22 使得通过针 26 或其他套管可以刺穿, 以将生物样品引入容器 12 中。优选, 关闭部件 22 是可再次密封的。用于关闭部件 22 的合适材料包括, 例如, 硅酮橡胶、天然橡胶、丁苯橡胶、乙烯-丙烯共聚物和聚氯丁烯。

[0029] 容器 12 的合适实例包括单壁和多层管。更特定的合适容器 12 的实例公开于 U. S. 专利 5, 860, 937 中。

[0030] 容器 12 还可以含有如凝胶这样的分离器、机械分离器或其他类型的分离构件(例如, 滤纸等)。分离器用于血浆制备, 尤其是用于从人或动物全血分离出血浆。凝胶理想地是触变聚合凝胶制剂。凝胶可以是均聚物或共聚物, 并且可以包括基于硅酮的凝胶, 如, 例如, 聚硅氧烷, 或基于有机烃的凝胶, 如, 例如, 聚丙烯酸、聚酯、聚烯烃、氧化的顺聚丁二烯、聚丁烯、环氧化大豆油和氯代烃的混合物、二酸和丙二醇的共聚物、氢化环戊二烯以及 α -烯烃与二烷基马来酸盐的共聚物。可以用于本发明中的机械分离器的实例描述于 U. S. 专利 6, 516, 953 ; 6, 406, 671 ; 6, 409, 528 ; 和 6, 497, 325 中。

[0031] 容器 12 还适用于从全血样品的较重相中离心分离出淋巴细胞和单核细胞。在这样的实施方案中, 装置还可以含有液体密度梯度介质和用于防止离心前液体密度梯度介质与血样混合的部件。合适的淋巴细胞/单核细胞收集管的实例公开于 U. S. 专利 5, 053, 134 中。

[0032] 除了图 1 中所示的实施方案以外, 适用于本发明的其他可购得的血液收集管包括以下全部由 Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N. J. 销售的产品, 所有注册和商标属于 Becton, Dickinson and Company : **VACUTAINER®** 血液管(例如, 目录编

号 367650-1、367661、6405、6385、6564、367653、367665、367658、367669、6450-8、6535-37 和 367662)；**VACUTAINER®** K₂EDTA 管(例如，目录编号 367841-2、367856 和 367861)；**VACUTAINER®** PST 管(例如，目录编号 367793-4、6698、6595 和 6672)；**VACUTAINER®** CPT 管(例如，目录编号 362753 和 362760-1)；**VACUTAINER®** SST 管(例如，目录编号 367782-89、6509-17 和 6590-92)；和 **VACUTAINER®** ACD 管(例如，目录编号 367756、364012 和 4816)，以及具有 **BD Microgard®** 关闭部件的非排空 **BD Microtainer®** 管(例如，365987、365965 和 365974)，或常规 **BD Microtainer®** 管(例如，365956、365957、365958、365959、365971 和 365973)。许多商业血液收集管具有标准体积，通常为 250 微升至并且包括约 10.0ml，在一些情况中，高达 16ml。典型的体积包括 250、400 和 500 微升，以及 2.0ml、3.5ml、4.0ml、5.0ml、8.0ml、8.5ml 和 10.0ml。

[0033] 在其他实施方案中，装置可以包括整合在测试筒内的存储器，存储器能够容纳 2 至 200 微升体积范围的全血，更优选为 50-150 微升。这样的筒例如以商品名 i-STAT Point of Care System 由 Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois) 销售，并且与能够与筒接口的手持分析仪一起使用。本发明可以使用的这样的筒和手持分析仪的实例各自包括 i-STAT CHEM8+ 筒和 **i-STAT®** 1 手持分析仪。例如，在 U. S. 专利 5,096,669、5,112,455、5,821,399、5,628,961、7,419,821、6,750,053 和 US D337,164 中教导了这样的装置。

[0034] 溶血磷脂酶(LysoPLA)是水解溶血磷脂(LysoPL)并且特异性地在羧酸酯键水解的酶，其是磷脂代谢中去污剂-样中间体，并且在许多生理和病理过程中起着重要作用。溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)，是细胞膜的正常组分，并且认为其作为脂质信使，传导从膜受体开始的信号，是 LysoPLA 的内源性底物。人 LysoPLA 的氨基酸和相应核酸序列是本领域已知的。参见，例如，U. S. 专利 5,858,756；6,004,792 和 7,294,496。根据 U. S. 专利 7,294,496 中呈现的一点证据，LysoPLA mRNA 广泛分布于许多组织中，心脏、胎盘和骨骼肌是最大量的组织，接着是肝脏、胰腺、肾脏、脑和肺，在另一点证据中(其包含来自更多组织的信使)，观察到相似的模式，尽管一些组织的相对强度有变化，因为胎盘和睾丸是 hLysoPLA 的最大量来源，接着是肾上腺和唾液腺、肝脏、心脏、骨骼肌和气管、结肠。还报道了溶血磷脂酶以多种异构形式出现。

[0035] 适用于本发明中的 LysoPLA 抑制剂的代表性实例包括乙基辛基氟磷酸酯、异丙基十二烷基氟磷酸酯、n-十二烷基-苯并二氧杂磷杂苯 2-氧化物、棕榈酰肉碱、溴烯醇内酯、棕榈酰三氟甲基酮和甲基花生四烯酰氟磷酸酯(MAFP)。其他抑制剂可以使用本领域已知的试验方法来鉴定。参见，例如，U. S. 专利 7,294,496。

[0036] LysoPLA 抑制剂以有效量存在于收集装置中，以稳定生物样品中可能存在的各种内源性蛋白(例如，饥饿素)，以及对于生物活性需要脂族酯基的其他蛋白质和肽。因此，除了饥饿素(饥饿素是代谢疾病(如，糖尿病)的标记物)以外，收集装置提供了其他神经肽的稳定。LysoPLA 抑制剂通过抑制脂族酯基的分裂来起作用。待包括在血液收集装置中的 LysoPLA 抑制剂的含量的测定取决于几个因素，包括效力、水中的溶解度、血液收集装置的体积以及非特异性相互作用的性质和程度(例如，由于血液中其他蛋白的存在，如血清白蛋白)。因此，对于本发明的目的，根据浓度范围(从其可以容易地计算出抑制剂的实际含量)

来方便地表示 LysoPLA 抑制剂的含量(和可能存在的其他稳定剂的含量)。LysoPLA 抑制剂的浓度通常为约 $0.1 \mu\text{M}$ 至约 10mM , 并且在一些实施方案中, 约 10uM 至约 1mM , 并且在一些实施方案中, 约 100um 至约 1mM (即, $10,000,000\text{nM}$)。也考虑了这些范围内的所有子范围。结合本文中公开的所有浓度值使用的术语“约”指的是 50% 的可变性(加 / 减)。

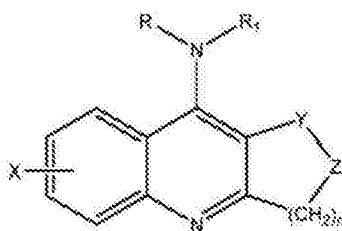
[0037] 尽管不打算被理论束缚, 但本发明的发明人认为 LysoPLA 抑制剂可以提供双重益处, 因为在保护脂族酯基被 LysoPLA 分裂中, 通常在血液中发现的内在蛋白酶在空间上被阻碍了肽的氨基酸链降解。根据如分析物的性质、试验形式和工作流(即, 分析前所收集的血液样品的操作和存储)这些因素, 本发明的血液收集装置可以提供几小时乃至一天或数天的生化标记物(如, 饥饿素)的稳定性, 长于不含 LysoPLA 抑制剂的相似装置。

[0038] 在一些实施方案中, 本发明的血液收集容器可以包括至少一种其他稳定剂, 如酯酶的抑制剂, 例如, 羧基酯酶, 如丁基胆碱酯酶和乙酰基胆碱酯酶。这些稳定剂可以给对于生物活性需要脂族酯基的蛋白和肽提供对抗离体降解的额外保护。因此, 除了饥饿素(其是代谢疾病(如糖尿病)的标记物)以外, 酯酶抑制剂可以提供增强的其他神经肽的稳定。然而, 在一些实施方案中, 稳定剂(和作为整体的装置)不包括酯酶抑制剂。

[0039] 丁基胆碱酯酶(BChE)(E. C. 3. 1. 1. 8), 也称为血清或血浆胆碱酯酶, 认为在身体代谢可可碱和其他药物(如, 琥珀酰胆碱和阿司匹林)的能力中起着作用。参见, Lockridge, “Genetic Variants of Human Serum Butylcholinesterase influence the metabolism of the muscle relaxant succinylcholine (人血清丁基胆碱酯酶的遗传变体影响肌肉松弛剂琥珀酰胆碱的代谢)”, 见, Kalow (编辑) Pharmacogenetics of Drug Metabolism (药物代谢的药物遗传学) New York: Pergamon Press, Inc, pp. 15-50。BChE 通常以约 5mg/l (或约 5U/ml) 的含量存在于人血浆中。本发明中有用的 BChE 抑制剂具有不高于约 $0.5 \mu\text{M}$ (500nM) K_i 的 K_i 值, 或在其他实施方案中, 不高于约 $0.05 \mu\text{M}$ (50nM) 的 K_i , 或在其他实施方案中, 不高于约 $0.010 \mu\text{M}$ (10nM) 的 K_i (并且包括其中的所有子范围)。 K_i 是动力学变量(与物理特性相对, 如分子量、熔点和沸点等)并且因此, 可以接收相对宽的变化, 尤其是取决于用于测定该数值的方法。因此, 本文中结合 K_i 值使用的术语“约”指的是 50% 的可变性(即, 加 / 减)。

[0040] 本发明中有用的 BChE 抑制剂是化合物 9-氨基-1, 2, 3, 4-四氢吡啶, 也称为他克林(及其衍生物)。参见, U. S. 专利 4, 816, 456。他克林是 FDA 批准用于阿尔茨海默病治疗的中心作用的胆碱酯酶抑制剂。其由 Sciele Pharma 以商品名 COGNEX 销售。U. S. 专利 4, 754, 050 中教导了适用于本发明中的他克林衍生物的代表性实例, 如以下通式所示:

[0041]



[0042] 其中 n 是 1、2 或 3; X 是氢、低级烷基、低级烷氧基、卤素、羟基、硝基、三氟甲基、 NHCOR_2 , 其中 R_2 是低级烷基, 或 NR_3R_4 , 其中 R_3 和 R_4 独立地是氢或低级烷基; R 是氢或低级烷基; R_1 是氢、低级烷基、二低级烷基氨基低级烷基、芳基低级烷基、二芳基低级烷基、呋喃基

低级烷基、噻吩基低级烷基、氧桥芳基低级烷基、氧桥二芳基低级烷基、氧桥呋喃基低级烷基或氧桥噻吩基低级烷基；Y 是 C=O 或 CR₅OH，其中 R₅是氢或低级烷基；Z 是 CH₂或 C=CR₆R₇，其中 R₆和 R₇独立地是氢或低级烷基；或 Y 和 Z 合在一起是 CR₅=CH，其中 CR₅和 CH 各自对应于 Y 和 X；及其光学对映体；或其药物学上可接受的酸式加成盐。

[0043] 该通式包括的特异性他克林衍生物包括以下的：9-氨基-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-3,4-二氢-6-甲基吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-3,4-二氢-6-甲氧基吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-3,4-二氢-6-氟代吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-6-氯-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-7-氯-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-3,4-二氢-6-三氟甲基吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-3,4-二氢-7-硝基吡啶-1(2H)-酮；7,9-二氨基-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；N-[9-氨基-3,4-二氢-1(2H)-氧吡啶-7-基]乙酰胺；3,4-二氢-9-甲基氨基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-甲基氨基-7-硝基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-丙基氨基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-[2-(二甲基氨基)乙基]氨基吡啶-1(2H)-酮；9-苄基氨基-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-苄基氨基-3,4-二氢-6-甲基吡啶-1(2H)-酮；9-苄基氨基-3,4-二氢-6-氟吡啶-1(2H)-酮；9-苄基氨基-6-氯-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-苄基氨基-3,4-二氢-6-三氟甲基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(2-甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(3-甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4-甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(2-甲氧基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(3-甲氧基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4-甲氧基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(2-氟苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(3-氟苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4-氟苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；6-氯-3,4-二氢-9-(4-氟苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；9-(2-氯苄基氨基)-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-(3-氯苄基氨基)-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-(4-氯苄基氨基)-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-[(2,3,4,5,6-戊氟苄基)氨基]吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(2-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-6-氟-9-(2-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(3-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-苄乙基氨基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4,4-二苯丁基)氨基吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(4,4-二苯丁基)-6-三氟甲基吡啶-1(2H)-酮；9-[4,4-双(3-氟苯基)丁氨基]-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-[4,4-双(4-氟苯基)丁氨基]-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-(3-苯氧基丙氨基)吡啶-1(2H)-酮；9-[2-双(4-氟苯基)甲氧基]乙基氨基-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；9-[4-(苄氧基)苄基氨基]-3,4-二氢吡啶-1(2H)-酮；3,4-二氢-9-[(2-噻吩基)甲基氨基]吡啶-1(2H)-酮；9-氨基-2,3-二氢-环戊基[b]喹啉-1-酮；9-氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-氨基-6-氯-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-氨基-7-氯-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-氨基-6-甲氧基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-氨基-6-氟-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-氨基-1,2,3,4-四氢-6-三氟甲基吡啶-1-醇；9-甲基氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-丙基氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-[2-(二甲基氨基)乙基]氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-苄基氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-苄基氨基-6-甲基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-苄基氨基-6-氟-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇；9-苄基氨基-6-氯-1,2,3,4-四

氢吡啶-1-醇;9-苄基氨基-1,2,3,4-四氢-6-三氟甲基吡啶-1-醇;9-(2-甲基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(3-甲基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(4-甲基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(2-甲氧基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(3-甲氧基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(4-甲氧基苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(2-氟苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(3-氟苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(4-氟苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;6-氯-9-(4-氟苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(2-氯苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(3-氯苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(4-氯苄基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;1,2,3,4-四氢-9-(2-三氟甲基苄基)氨基吡啶-1-醇;6-氟-1,2,3,4-四氢-9-(2-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1-醇;1,2,3,4-四氢-9-(3-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1-醇;1,2,3,4-四氢-9-(4-三氟甲基苄基氨基)吡啶-1-醇;9-[(2,3,4,5,6-戊氟苄基)氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-苄乙基氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(4,4-二苯基丁基)氨基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-[4,4-双(3-氟苯基)丁基氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-[4,4-双(4-氟苯基)丁基氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-(苯氧基丙基氨基)-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-[[2-[双(4-氟苯基)甲氧基]乙基]氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-[4-(苄氧基)苄基氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-[(2-噻吩基)甲基氨基]-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-氨基-3,4-二氢吡啶;9-氨基-1-甲基-1,2,3,4-四氢吡啶-1-醇;9-氨基-3,4-二氢-2-亚甲基吡啶-1(2H)-酮;9-氨基-1,2,3,4-四氢-环戊[b]噻啉-1-醇;2-(3-氧环乙基)氨基苯并腈;和4-氯-2-(3-氧环己基)氨基苯并腈。

[0044] 适用于本发明中的其他丁酰基胆碱酯酶抑制剂包括他克林二聚物,如爱普巴嗪(ethopropazine)(即,N,N,N-二乙基- α -甲基-10H-吩噻嗪-10-乙胺;10-(2-二乙基氨基-2-甲基乙基)噻吩嗪;或二乙异丙嗪),及其衍生物。参见,例如,U.S. 2,607,773和4,833,138。FDA已经批准爱普巴嗪盐酸盐用于帕金森病的治疗中。

[0045] 还有其他的丁酰基胆碱酯酶抑制剂包括他克林和(-)-石杉碱A(其是从石松科(Huperziaceae),石松属(Lycopodium)物种,蛇足石松(Huperzia serrata)的石松分离出来的光学异构的石松定(lycodine)生物碱)。石杉碱A-他克林杂合体的实例作为化合物5a、5b和5c以及Huprine X是本领域已知的。它们相应的化学名称如下:((9E)-N1-(7-(1,2,3,4-四氢吡啶-9-基氨基)庚基)-9-亚乙基-4,4,7-三甲基二环[3.3.1]壬-6-烯-1,3-二胺)(5a);((9E)-N1-(7-(1,2,3,4-四氢吡啶-9-基氨基)庚基)-9-亚乙基-47-甲基二环[3.3.1]壬-6-烯-1,3-二胺)(5b);((9E)-N1-(7-(1,2,3,4-四氢吡啶-9-基氨基)庚基氨基)-9-亚乙基-3-甲基二环[3.3.1]壬-3-烯-1-羧酸甲酯)(5c);和(1S)-7-氯-15-乙基-10-氮杂四环[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]十七烷基-2(11),3,5,7,9,14-己-3-胺)(Huprine X)。合成这些化合物的方法公开于Gemma等,J. Med. Chem. 49(11):3421-25(2006)(5a、5b和5c)和Camps等,Mol. Pharmacol. 57:409-17(2000)(Huprine X)。

[0046] BChE的浓度通常为约5 μ M至约500mM(即, 5×10^8 nM),并且在一些实施方案中,范围为约0.5 μ M至约50mM,并且在其他实施方案中,约0.1 μ M至约10mM。还考虑了这些范围内的所有子范围。与K_i值的情况一样,结合本文中公开的所有浓度值使用的术语“约”指

庚基)-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(16.50nm 的 K_i); AP2238 (3-(4-[[苄基(甲基)氨基]甲基]-苯基)-6, 7-二甲氧基-2H-2-色烯酮 | 3-(4-[[苄基(甲基)氨基]甲基]苯基)-6, 7-二甲氧基-2H-色烯-2-酮)(21.70nm 的 K_i); 他克林二聚物 4i (N-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基)-N-[8-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基)辛-1-基]胺 | N-[8-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基)辛基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(30nm 的 K_i); 他克林杂二价化合物 3g (6, 8-二氯-N-[7-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)庚基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(41nm 的 K_i); 他克林二聚物 4m (N-[3-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基氨基)丙基]-N-[4-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)丁基]乙酰胺)(47nm 的 K_i); 9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶(6-氯-2-甲氧基吡啶-9-胺)(49nm 的 K_i); 他克林二聚物 4k (N-[3-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基氨基)丙基]-N-[3-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)丙基]乙酰胺)(50nm 的 K_i); 他克林杂二价化合物 3i (N-[6-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)己基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(100nm 的 K_i); 他克林同型二价化合物 3b (6, 8-二氯-N-{7-[(6, 8-二氯-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基)氨基]庚基}-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(150nm 的 K_i); 他克林二聚物 3a (N-[5-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基氨基)戊基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(210nm 的 K_i); 他克林二聚物 4g (N-[8-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)辛基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(250nm 的 K_i); 他克林杂二价化合物 3f (N-{7-[(6, 8-二氯-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基)磺酰基]庚基}-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺)(290nm 的 K_i); 基于 1, 2-二酮的化合物, 8 (1, 2-二氢萘-1, 2-二酮 | 1, 2-萘醌)(320nm 的 K_i); 他克林二聚物 4f (N-[7-(1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-基磺酰基)庚基]-1, 2, 3, 4-四氢吡啶-9-胺 | 他克林杂二价化合物 3e)(340nm 的 K_i); 和 6, 9-二氨基-2-乙氧基吡啶(7-乙氧基吡啶-3, 9-二胺)(490nm 的 K_i)。本文中公开的用于上述 AChE 抑制剂的 K_i 值记载于 Gemma 等, J. Med. Chem. 49:3421-5 (2006); Campiani 等, J. Med. Chem. 48:1919-29 (2005); Wong 等, J. Am. Chem. Soc. 125:363-73 (2003); Savini 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:1779-82 (2001); Piazzzi 等, J. Med. Chem. 46:2279-82 (2003); Bencharit, 上文; 和 Hyatt 等, J. Med. Chem. 50:5727-34 (2007)。

[0050] 可以用于本发明中的 AChE 抑制剂的更多实例包括以下的: 有机磷酸酯(例如, 美曲磷酯(metrifonate)、乙磷硫胆碱、二异丙基氟代磷酸酯、环沙林(Cyclosarin)、乐果(Dimethoate)、沙林(Sarin)、索曼(Soman)、塔崩(Tabun)、VX、VE、VG、VM、二嗪农(Diazinon)、马拉硫磷(Malathion)和硝苯硫磷酯(Parathion)); 氨基甲酸酯(例如, 毒扁豆碱(Physostigmine)、新斯的明(Neostigmine)、吡啶斯的明(Pyridostigmine)、阿伯农(Ambenonium)、Demarcarium、里斯的明(Rivastigmine)、涕灭威(Aldicarb)、恶虫威(Bendiocarb)、合杀威(Bufencarb)、西维因(Carbaryl)、多菌灵(Carbendazim)、长杀草(Carbetamide)、虫螨威(Carbofuran)、氯草灵(Chlorbufam)、氯苯胺灵(Chlorpropham)、乙硫苯威(Ethiofencarb)、伐虫脒(Formetanate)、灭虫威(Methiocarb)、灭多虫(Methomyl)、草氨酰(Oxamyl)、苯敌草(Phenmedipham)、Pinmicarb、抗蚜威(Pirimicarb)、霜霉威(Propamocarb)、苯胺灵(Propham)和残杀威(Propoxur)); 菲(Penanthrane) 衍生物(例如, 加兰他敏(galantamine)); 哌啶(例如, 多奈哌齐(Donepezil) (E2020) (2.9nm 的 K_i)); 氯滕西隆(Edrophonium); 和天然化合物(例如, 加兰他敏和 Onchidal)。

[0051] 由于一些 BChE 抑制剂也呈现出有效的 AChE 抑制活性, 因此本发明的实施方案可

以包括同时具有 BChE 和 AChE 抑制活性的单一酯酶抑制剂。

[0052] 可以存在于血液收集装置中的其他血清酯酶抑制剂的浓度通常为约 0.1 μ M 值约 70mM, 并且在一些实施方案中, 为约 1mM 至约 7mM。

[0053] 稳定剂还可以包括蛋白酶抑制剂。本发明中有用的蛋白酶抑制剂呈现出对抗一个或多个种类的蛋白酶的抑制活性, 所述蛋白酶包括, 例如, 丝氨酸蛋白酶、外肽酶和二肽酰肽酶。因此, 装置可以含有两种或多种这样的抑制剂的混合物, 包括, 例如, 丝氨酸蛋白酶的抑制剂和外肽酶的抑制剂, 丝氨酸蛋白酶的抑制剂和二肽酰肽酶的抑制剂, 外肽酶的抑制剂和二肽酰肽酶的抑制剂以及丝氨酸蛋白酶的抑制剂、外肽酶的抑制剂和二肽酰肽酶的抑制剂。参见, 例如, Stevens 等的 U. S. 专利 7, 309, 468。

[0054] 丝氨酸蛋白酶抑制剂的代表性实例包括抗痛素 (antipain)、抑肽酶、抗凝血酶、抑凝乳蛋白酶素、DFP、弹性蛋白酶抑制剂、APMSF、苯基甲基磺酰基氟化物 (PMSF)、AEBSF、TLCK、TPCK、亮肽素 (leupeptin)、胰蛋白酶和大豆胰蛋白酶抑制剂。丝氨酸蛋白酶抑制剂的浓度通常为约 0.1 μ M 至约 100 μ M。

[0055] 本发明中可用的外肽酶抑制剂的代表性实例包括阿吗他定 (amastatin)、贝他定 (bestatin)、抑二肽素 A 和抑二肽素 B。外肽酶抑制剂的浓度通常为约 0.01mM 至约 1mM。

[0056] 循环中存在的二肽酰肽酶活性 (其包括 DPP-IV 和 DPP-IV- 样活性) 在从生物活性肽的 N- 末端释放二肽中是高度特异性的, 肽底物的 N- 端序列的倒数第二个位置为脯氨酸或丙氨酸。葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 GIP_{1-42} 和 GLP-1_{7-36} (其促进胰腺的葡萄糖诱导的胰岛素分泌 (肠促胰岛素)), 是 DPP-IV 的底物。DPP-IV 酶在体外和体内分别从这些肽的 N- 端释放二肽酪氨酰 - 丙氨酸和组氨酰 - 丙氨酸。Mentlein 等, Eur. J. Biochem. 214, 829 (1993)。可以用于本发明中的二肽酰肽酶 IV (DPP-IV) 的抑制剂的代表性实例包括维格列汀 (vildagliptin)、西他列汀 (sitagliptin)、沙格列汀 (saxagliptin)、利拉利汀 (linagliptin) 和阿格列汀 (alogliptin)。其他 DPP-IV 抑制剂包括从氨基酸 (如, 异亮氨酸、Asn、Asp、Glu、His、Pro 和 Val) 和噻唑烷或吡咯烷基团形成的二肽化合物, 及其立体异构体, 例如, L- 苏和 L- 别形式, 及其无机和有机盐 (例如, 磷酸盐、硫酸盐、醋酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐和延胡索酸盐)。二肽化合物的特定实例包括 L- 苏 - 异亮氨酰噻唑烷 (thiazolidide)、L- 别 - 异亮氨酰噻唑烷、L- 苏 - 异亮氨酰吡咯烷 (pyrrolidide) 和 L- 别 - 异亮氨酰吡咯烷。二肽酰肽酶抑制剂的浓度通常为约 0.01mM 至约 1mM。

[0057] 稳定剂可以进一步含有其他类别的蛋白酶的抑制剂。因此, 在进一步的实施方案中, 血液收集装置可以含有半胱氨酸蛋白酶的抑制剂 (例如, IAA (吡啶乙酸) 和 E-64)、丝氨酸 / 半胱氨酸蛋白酶的抑制剂 (例如, 亮肽素、TPCK、PLCK-HCl、2- 庚酮 -HCl 和抗痛素 -HCl)、天冬氨酸蛋白酶 (例如, 抑胃肽和 VdLPFFVdL)、金属蛋白酶的抑制剂 (例如, EDTA、贝他定、1, 10- 邻二氮杂菲和 phosphoramidon)、巯基蛋白酶的抑制剂、天冬氨酸 / 卡配因蛋白酶的抑制剂 (例如, 抑胃肽、N- 乙酰基 -leu-leu- 正亮氨酸和 N- 乙酰基 -leu-leu- 甲硫氨酸)、半胱天冬酶的抑制剂、内肽酶的抑制剂 (例如, α_2 - 巨球蛋白 (称为通用内肽酶抑制剂)、 α_1 - 抗 - 胰蛋白酶和硫甲基氧代苯丙甘氨酸), 及其两种或多种的组合。蛋白酶抑制剂的其他实例包括大豆或利马豆胰蛋白酶抑制剂、胰腺蛋白酶抑制剂、蛋清 ovostatin 和蛋清半胱氨酸蛋白酶抑制剂。蛋白质学领域的技术人员认识到给定的抑制剂可以呈现出对抗相同类别的蛋白酶中的一种或多种蛋白酶的抑制活性, 以及对抗不同类别的蛋白酶中的一种或

多种蛋白酶的抑制活性。例如,贝他定和阿吗他定呈现出对抗金属蛋白酶以及外肽酶的抑制活性。

[0058] 使用多种稳定剂(例如,除了 LysoPLA 抑制剂或蛋白酶抑制剂,或 BChE 抑制剂和蛋白酶抑制剂)的本发明的实施方案在本文中也称为稳定剂混合物。

[0059] 稳定剂可以以任何合适的形式存在,包括液体(例如,溶液和悬浮液)和固体(例如,丸剂、片剂、胶囊、喷雾干燥的材料、冷冻干燥的材料、粉末、颗粒、晶体和冻干材料)和半固体(例如,凝胶)。冻干特别有用,因为其提供了良好的稳定性(例如,就最大化稳定剂的货架期而言)并且还允许随后的灭菌。例如,可以将稳定剂以液体组合物的形式引入装置的容器中,然后通过标准技术冻干。例如,冷冻干燥,需要将液体组合物冷冻,然后在冷冻后缓慢温热,同时使用真空,使得冷冻干燥的粉末保持在收集装置中。各种添加剂(如,PVP 或海藻糖)可以在冷冻干燥之前加入液体组合物中,以促进稳定剂的粒化和冻干的制剂接触血液时的重建。在加入液体组合物后,也可以使用真空干燥。在其他实施方案中,将稳定剂形成液体或固体气溶胶,并且喷在容器内部的一个或多个表面上。包裹或配制片剂形式的稳定剂保护其免受光暴露并且防止抑制剂和容器中的其他元素之间的其他不利相互作用。用于制备片剂和胶囊中有用的样品收集时溶解的包裹材料和赋形剂是本领域公知的。

[0060] 除了分配在存储器中,稳定剂也可以位于收集装置接触所收集血液的任何表面。例如,稳定剂还可以位于用于关闭装置的塞子和封口上,或位于装置内放置的机械或其他插入物上。

[0061] 除了稳定剂,本发明的装置还可以含有载体介质(例如,水或醇)、稳定或重建介质(例如,聚乙烯吡咯烷酮、海藻糖、甘露糖醇等)和/或一种或多种用于处理生物样品的其他添加剂。通常的添加剂包括苯酚、苯酚/氯仿混合物、醇、醛、酮、有机酸、有机酸盐、卤化物的碱金属盐、有机螯合剂、荧光染料、抗体、结合剂、抗凝剂,如柠檬酸钠、肝素、EDTA 及其盐(例如,EDTA 钾)、抗氧化剂、还原剂和缓冲剂。优选,载体和添加剂不会降解蛋白。在抑制剂是片剂形式的情况中,如果需要,可以包括药物片剂崩解材料,这是本领域技术人员已知的。

[0062] 用于本发明装置的有用制造方法涉及获得收集容器,如管子;将稳定剂(例如,LysoPLA 抑制剂和蛋白酶抑制剂)加入容器中;将抑制剂冷冻;排空容器;并将容器灭菌。如果需要,可以将分离构件加入容器中。合适的冻干/排空过程的实例如下:将容器在约-40℃的温度和约760mm的压力下冷冻约6至8小时;在约0.05mm压力下,随着温度从-40℃升至约25℃,持续8至10小时,将容器干燥;然后在约25℃的温度和约120mm的压力下,将容器排空,持续约0.1小时。优选,灭菌技术使用钴60辐射。

[0063] 可以从病人抽取全血或其成分,直接放入血液收集装置中,没有任何干预处理步骤。已经发现了从病人直接收集全血,并且将样品直接引入含有稳定剂的装置中,基本上防止了与稳定剂混合之前将样品存储时会发生的蛋白降解和/或分裂。使用开口的收集装置和使用其中开口由闭合部件关闭的闭合收集装置,本发明的方法都是有用的。

[0064] 在优选的实施方案中,收集装置是用于直接从病人抽取全血样品的管子,用于在收集点立即稳定蛋白。收集管可以是用于收集血液的排空系统。或者,管子可以用于收集血液的部分排空或非排空系统。排空系统的合适实例是闭合管。手动注射器抽取是部分排空和非排空系统的合适实例。非排空系统还可以包括自动抽取系统。排空系统是特别优选

的。

[0065] 本发明的血液收集装置特别适用于稳定含有脂族酯侧链的蛋白,如饥饿素,并且在包括蛋白酶抑制剂的实施方案中,适用于稳定疾病的其他蛋白生物标记物,例如, GLP-1、GIP 和胰高血糖素,这些也是代谢疾病(如,糖尿病)的生物标记物。因此,收集装置可以用于提供可靠的标准,其中有助于试验(如,ELISA)的设计,其将允许检测 10^{-9} - 10^{-11} M 范围内的这些蛋白,其包括健康个体中这些蛋白的循环水平以及治疗水平。因此,除了诊断疾病(如,代谢失调(其中相对于对照(如,确立的医学标准和 / 或源自非病理捐赠者的统计学显著群的浓度范围) 升高水平的标记物表示疾病的存在)) 的方法以外,它们允许在患有疾病(如,代谢失调) 的病人中监控治疗的方法,其中这些蛋白含量的正常化(或朝向正常化的趋势) 表示成功的治疗。

[0066] 本发明的血液收集装置还可以用于收集和存储来自为了治疗的目的(例如,作为用于疾病或炎性病症的治疗方案的一部分) 已经摄取酰化的前药(本文中也称为带有脂族酯侧链的前药) 的病人的血液。前药通常理解为表示治疗上无活性的或活性显著低于药剂活性部分(其可以是代谢物) 的实际上是药物前体形式的活性药剂。给药时,如口服摄入,许多前药通过内在溶血磷脂酶分裂酯键转化成活性药物 / 代谢物。例如,依那普利(enalapril) 转化成活性代谢物依那普利拉(enalaprilat),前药伐昔洛韦(valacyclovir) 转化成活性药物 / 代谢物阿昔洛韦(acyclovir)。海洛因脱乙酰基成活性药物 / 代谢物吗啡。在临床情况以及特定的临床试验中,例如,从安全性、有效性、生物活性和生物等效性的一个或多个观点看,在时间过程中监控病人的前药以及活性代谢物的血液水平是有利的。

[0067] 例如,在生物活性研究中,其测量从药品吸收活性成分或活性部分以及在作用位点变成可利用的速率和程度,其推荐测定母药和代谢物的浓度和活性。在生物等效性研究中(其研究在相似条件下以相同摩尔剂量给药时,药物等效物或替换物中的成分或活性部分在药物作用位点变成可利用的速率和程度的差异程度),通常推荐母药(前药) 形式的测量(除了在其中母药水平太低,以致不能在合适的时间长度内可靠分析测量血液、血清或血浆的情况,或当代谢物有意义地有助于安全性和 / 或有效性时,在这些情况中,测量前药和代谢物的浓度和活性)。

[0068] 使用本发明的血液收集装置从已经进行这样的治疗的病人(其包括目前正在经受这样治疗的病人) 收集的血液的定性或定量分析增强了任何这样的分析的精确性,因为在存储过程中抑制了收集的血液中前药的离体酯酶催化降解。可以根据标准技术来进行血液样品的处理,例如,从收集的血液中提取血浆,以及分离前药和活性代谢物,和随后测量这些物质。例如,可以通过反相 HPLC 来分离前药和活性代谢物。可以根据标准技术,如质谱,接着分析结果,例如,通过二次回归或线性回归,来进行前药和活性代谢物的存在或相对含量的检测。参见,例如,Wiltshire 等, J. Chromatogr. B745:373-88 (2000) (和其中引用的参考文献)。测量值可以与其比较的对照包括校准和质量控制样品(参考 Wiltshire, 上文, 作为校准曲线)。

[0069] 现在将通过参考以下非限制实施例描述本发明。除非另外指出,所有份数和百分比是基于重量。

[0070] 实施例 1- 血浆样品中的饥饿素的比较稳定性。

[0071] 在含有 1) LysoPLA 抑制剂甲基花生四烯酸氟代磷酸酯 (MAFP)、EDTA、酯酶抑制剂、他克林和蛋白酶抑制剂 L- 苏 - 异亮氨酰噻唑烷、贝他定和亮肽素 (本发明的稳定剂“ISA”，图中用 ▲ 表示)；2) 另一种本发明的稳定剂，其包括抗凝剂 EDTA 和 MAFP (在图中用 x 表示)；3) EDTA 以及酯酶抑制剂和蛋白酶抑制剂 (比较稳定剂“CSA”，在图中用 ◆ 表示)；和 4) 单独的 EDTA (图中用 ■ 表示)，接着用 1pg/uL 酰基饥饿素强化的 4 个分开的管子中收集血液。对于这个实验，所有四个管子间接从相同患者抽取，并相同处理。图 2 中所示数据清楚地表示在管 3 和 4 中，酰基 - 饥饿素随着时间降解。然而，含有 MAFP 的两个管子 (No. 1 和 2) 显示出在 30hr 血浆孵育时间内稳定。管 2，其含有 MAFP 和 EDTA，优于含有酯酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的管 1。

[0072] 在分开的实验中，从禁食患者抽取血液放入 EDTA 和 EDTA+MAFP 管中。该实验中最终的 MAFP 管浓度为 0.1mM。将来自每个管的血浆分入两个分开的小瓶中。一个小瓶用 1pg/uL 饥饿素强化，而另一个没有强化。将来自 EDTA 和 EDTA+MAFP 的强化和未强化的血浆在室温下孵育 30 小时。图 3 显示了以特定的时间间隔测量的饥饿素水平。数据清楚地证明了在含有 MAFP 的管中更高的酰基 - 饥饿素稳定性。

[0073] 所有专利公开和非专利出版物表示本发明所属领域的技术人员的技术水平。将所有这些出版物按引用并入本文中，如同每篇单独的出版物特意和单独表示按引用并入的相同程度。

[0074] 尽管本文中已经参考特定实施方案描述了本发明，但理解这些实施方案只是本发明的原理和应用的说明。因此理解可以对说明性的实施方案进行各种改变和可以设计其他安排，而没有脱离如所附权利要求限定的本发明的精神和范围。

[0001]

序列表

<110> BECTON, DICKINSON AND COMPANY
<120> 含有溶白磷酸酯酶抑制剂的血液收集装置
<130> BECTON-110
<140> PCT/US2012/027391
<141> 2012-03-02
<150> US 61/449,337
<151> 2011-03-04
<160> 5
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 1
Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15
Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30
Lys Asn Asp Lys His Asn Ile Thr Gly Gln
35 40
<210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 在N-末端的伯胺
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 酰化饥饿素, 在Ser3含有n-辛酰基
(CH₃(CH₂)₆COO)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 在C-末端的羧酸 (-COOH)
<400> 2
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25
<210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> 智人
<220>

[0002]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (36).. (36)
 <223> 被NH2修饰的胰高血糖素样肽-1, GLP - 1 (7 - 36)

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val
 1 5 10

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
 15 20 25

Val Lys Gly Arg
 30

<210> 4
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (31)
 <223> 对应于高胰高血糖素样肽1的7-37位置
 GLP - 1 (7 - 37)

<400> 4

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> N-末端的伯胺

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29).. (29)
 <223> C-末端的羧基 (-COOH)

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

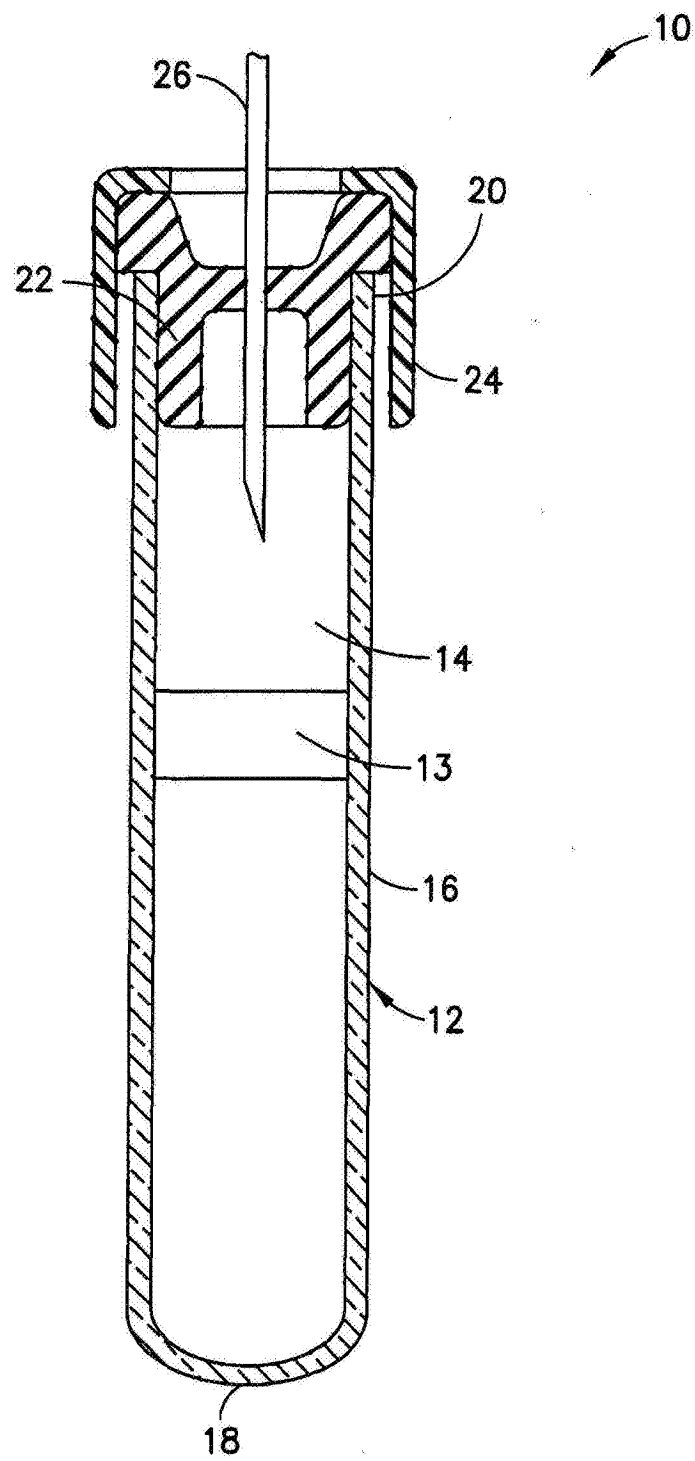


图 1

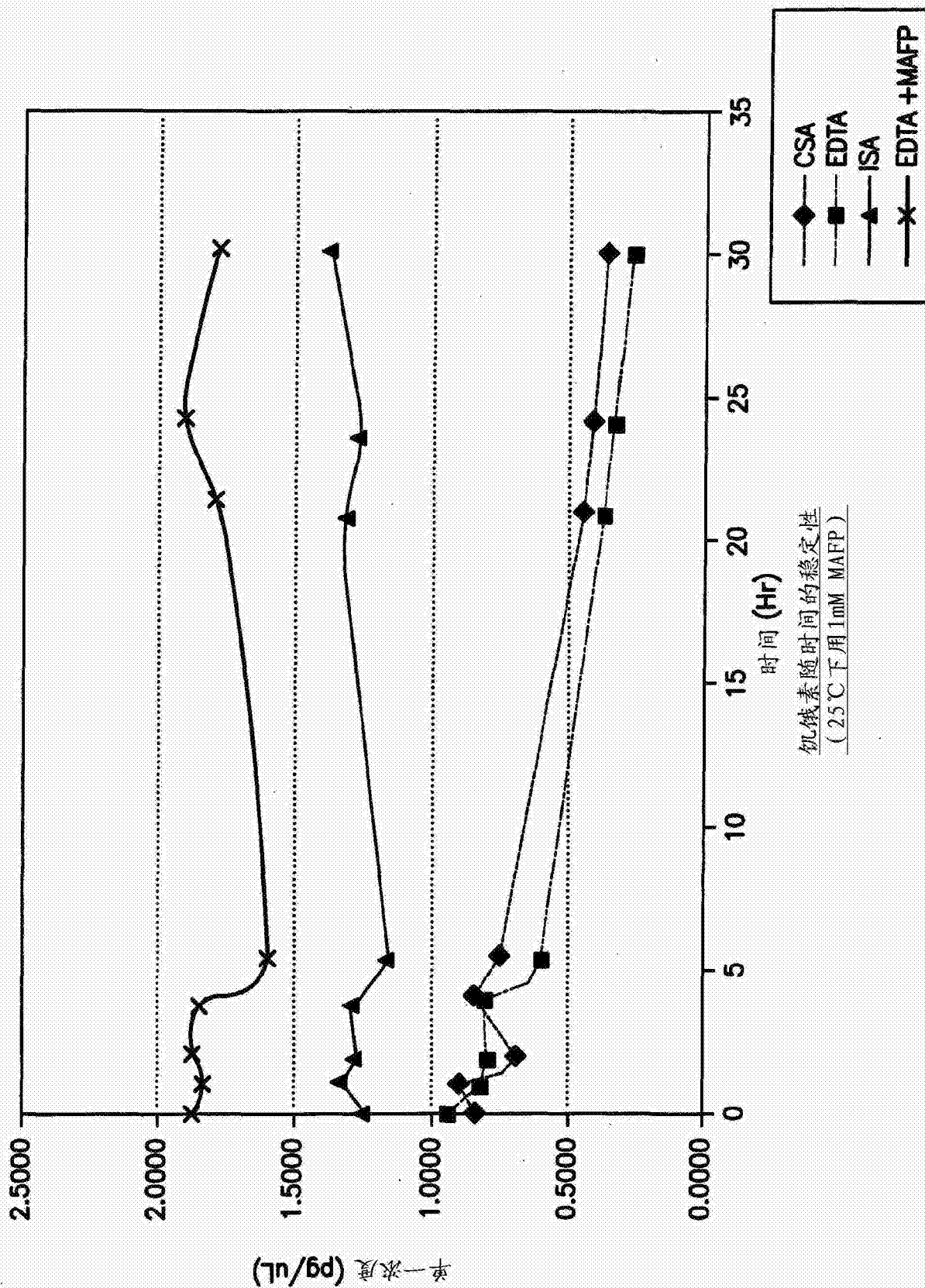


图 2

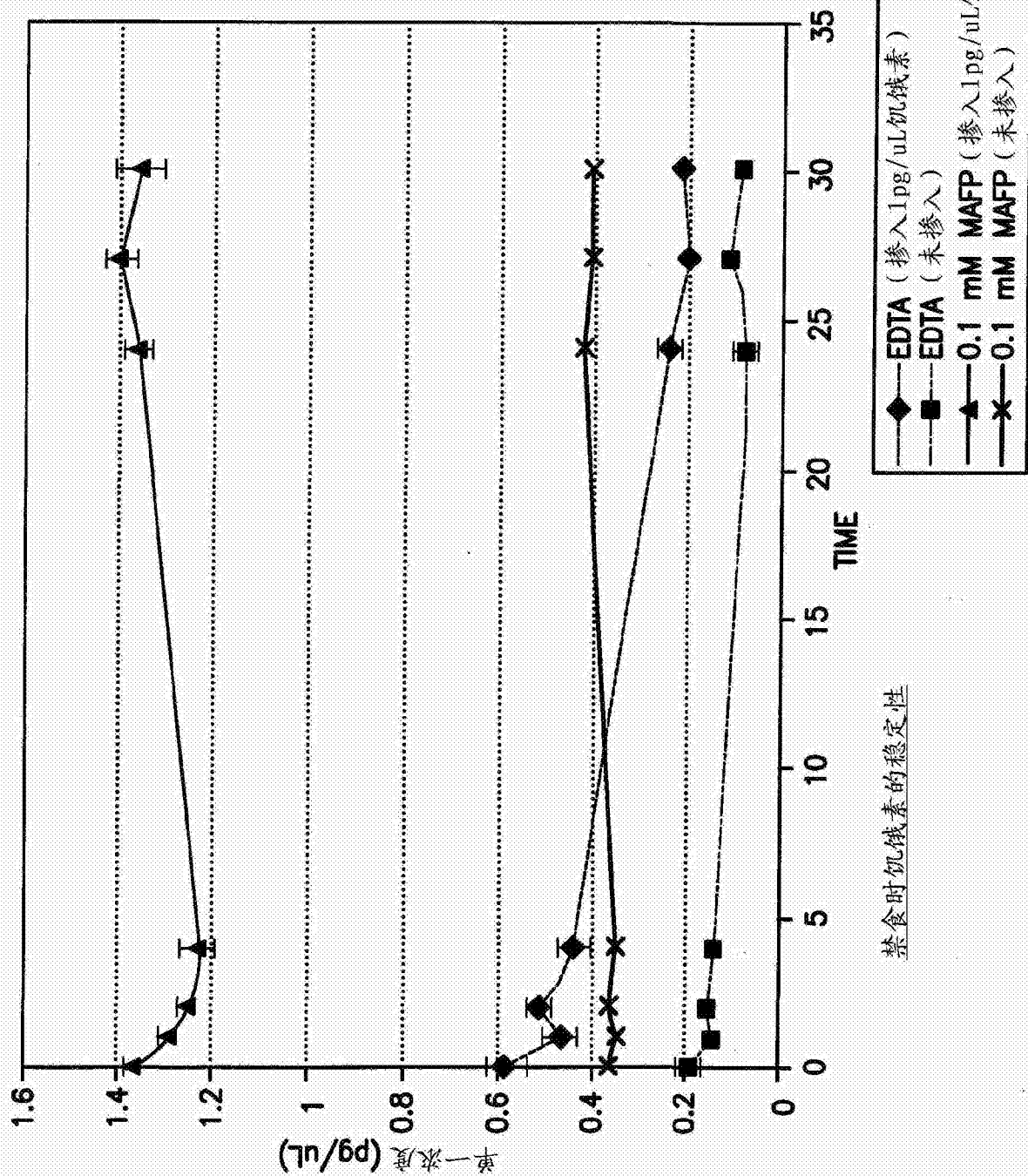


图 3