



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105188535 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480019680. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 01. 31

A61B 5/151(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/759, 742 2013. 02. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/014089 2014. 01. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/121041 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 基思·A·莫斯科维奇

弗兰克·L·市奈科特

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

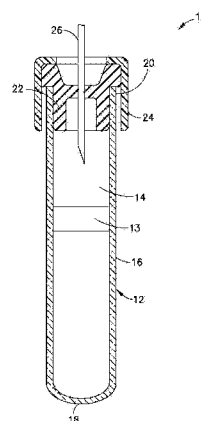
权利要求书2页 说明书9页 附图8页

(54) 发明名称

含有接触途径抑制添加剂的血液采集装置

(57) 摘要

公开的是用于采集血液的装置,其含有抗凝剂和添加剂,所述添加剂通过抑制用于凝血酶产生的接触途径来延迟凝血。添加剂是凝结接触途径抑制剂添加剂,其为因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂、激肽释放酶抑制剂和其组合中的至少一种,每一种的量有效介导或阻抑用于凝血酶生成的接触途径。还提供制作和使用这些装置的方法以及含有这些装置的试剂盒。



1. 用于采集和稳定血液或其组分的装置,其中所述装置具有第一端和第二端以及至少一个限定用于接受血液样品的储液器部分的内壁,其中所述储液器含有抗凝剂和添加剂,所述添加剂以有效抑制用于凝血酶生成的接触途径的量存在,所述添加剂包括因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂、激肽释放酶抑制剂和其组合中的至少一种。

2. 权利要求 1 所述的装置,其是无菌和真空的,并且还包含可被针穿透的封闭物。

3. 权利要求 2 所述的装置,其是管。

4. 权利要求 3 所述的装置,其还包括分离器。

5. 权利要求 1 所述的装置,其中所述添加剂包括因子 XI 抑制剂并且该抑制剂是抗人 FXI 抗体。

6. 权利要求 1 所述的装置,其中所述添加剂包括激肽释放酶抑制剂并且该激肽释放酶抑制剂是抑肽酶。

7. 权利要求 6 所述的装置,其中所述添加剂包括因子 XII 抑制剂并且该因子 XII 抑制剂是玉米胰蛋白酶抑制剂。

8. 权利要求 1 所述的装置,其中所述添加剂包括抑肽酶与选自抗人 FXI 抗体和玉米胰蛋白酶抑制剂的至少一种其它抑制剂的组合。

9. 权利要求 1 所述的装置,其中所述接触途径抑制剂添加剂为干燥的形式。

10. 权利要求 1 所述的装置,其中所述抗凝剂是柠檬酸钠。

11. 用于稳定血液的方法,其包括将血液或包含血液组分的组合物引入装置中,所述装置具有第一端和第二端以及至少一个限定用于接受所述血液或所述组合物的储液器部分的内壁,其中所述储液器含有抗凝剂和接触途径抑制剂添加剂,所述接触途径抑制剂添加剂包括因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂、激肽释放酶抑制剂和其组合中的至少一种,所述接触途径抑制剂添加剂以有效抑制用于凝血酶生成的所述接触途径的量存在。

12. 权利要求 9 所述的方法,其中所述组合物是抽取的血液样品。

13. 权利要求 11 所述的方法,其中所述组合物是富血小板血浆 (PRP)。

14. 权利要求 11 所述的方法,其中所述接触途径抑制剂添加剂包括因子 XI 抑制剂并且该因子 XI 抑制剂是人抗因子 XI 抗体。

15. 权利要求 11 所述的方法,其中所述接触途径抑制剂添加剂包括因子 XII 抑制剂并且该因子 XII 抑制剂是玉米胰蛋白酶抑制剂。

16. 权利要求 11 所述的方法,其中所述接触途径抑制剂添加剂包括因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂和激肽释放酶抑制剂的组合,其中所述激肽释放酶抑制剂被定位以在所述因子 XI 抑制剂和因子 XII 抑制剂上游接触所述血液或血液组合物。

17. 权利要求 16 所述的方法,其中所述激肽释放酶抑制剂是抑肽酶。

18. 处理用于体外分析的血液的方法,其包括将血液或包含血液组分的组合物引入装置中,所述装置具有第一端和第二端以及至少一个限定用于接受血液或包含血液组分的组合物的储液器部分的内壁,其中所述储液器含有抗凝剂和添加剂,所述添加剂抑制用于凝血酶生成的接触途径,所述添加剂包括因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂、激肽释放酶抑制剂和其组合中的至少一种,所述添加剂的浓度有效抑制用于凝血酶生成的接触途径,其中所述因子 XI 抑制剂是抗人 FXI 抗体和所述激肽释放酶抑制剂是抑肽酶。

19. 试剂盒,其包括至少一个用于采集血液或包含血液组分的组合物的装置,其中所述

装置具有第一端和第二端以及至少一个限定用于接受所述血液或所述组合物的储液器部分的内壁,其中所述储液器含有抗凝剂和添加剂,所述添加剂抑制用于凝血酶生成的接触途径,所述添加剂包括因子 XI 抑制剂、因子 XII 抑制剂、激肽释放酶抑制剂和其组合中的至少一种,所述添加剂的浓度有效抑制用于凝血酶生成的接触途径,其中所述因子 XI 抑制剂是抗人 FXI 抗体和所述激肽释放酶抑制剂是抑肽酶。

20. 权利要求 19 所述的试剂盒,其是无菌和真空的,并且还包括可被针穿透的封闭物。

21. 权利要求 20 所述的试剂盒,其是管。

22. 权利要求 21 所述的试剂盒,其还包括分离器。

23. 权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述添加剂包括因子 XI 抑制剂并且该抑制剂是抗人 FXI 抗体。

24. 权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述添加剂包括激肽释放酶抑制剂并且该激肽释放酶抑制剂是抑肽酶。

25. 权利要求 24 所述的试剂盒,其中所述抑制剂添加剂包括因子 XII 抑制剂并且该因子 XII 抑制剂是玉米胰蛋白酶抑制剂。

26. 权利要求所述 19 的试剂盒,其中所述添加剂包括抑肽酶与选自抗人 FXI 抗体和玉米胰蛋白酶抑制剂的至少一种其它抑制剂的组合。

27. 权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述接触途径抑制剂添加剂为干燥的形式。

28. 权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述抗凝剂是柠檬酸钠。

含有接触途径抑制添加剂的血液采集装置

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 该申请要求 2013 年 2 月 1 日提交的美国临时专利申请号 61/759,742 的权益。其公开内容在此通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 众所周知的是当被暴露在可活化最终形成纤维蛋白的凝结途径的条件下时,血液和血浆将凝固。通过凝血酶的活性,形成纤维蛋白本身,因此它是凝血酶生成的结果。凝血酶生成由两个酶促级联引发,这两个酶促级联涉及几个不同的因子(肽酶),它们最终汇集生成产生活性凝血酶的常见途径。导致凝血酶形成的两个级联是组织因子(TF)凝结途径(它也被称为外源性途径)和接触凝结途径(它也被称为内源性途径)。通过循环因子 VII 暴露于与血管损伤(静脉穿刺)一起出现的内皮和内皮下表达的组织因子(TF),组织因子(TF)途径被引发。随后从因子 VII 到因子 VIIa 的转化导致 TF-VIIa 复合体,TF-VIIa 复合体直接促进因子 X 转化为因子 Xa(因子 X 的活化形式),并且通过因子 IX 转化为因子 IXa(活化的 IXa),然后将 X 转化为 Xa。因子 Xa 的产生促进了凝血酶原转化为凝血酶。然后凝血酶可将纤维蛋白原转化为纤维蛋白。

[0005] 凝血酶也通过接触或内源性凝结途径来生成。当血液与外源表面,尤其带负电荷的表面接触时,接触或内源性凝结途径出现。体内接触途径活化剂的例子包括玻璃、二氧化硅、高岭土和延伸程度(extent)较小的塑料。包含因子 XII、因子 XI、高分子量激肽原(HMK)和前激肽释放酶的酶总体(ensemble)引发接触途径,它们组织在活化表面上,导致形成因子 XIIa(因子 XII 的活化形式)。激肽释放酶,作为前激肽释放酶的活化形式,可通过蛋白水解生成因子 XIIa,因子 XIIa 进而可通过蛋白水解将前激肽释放酶转化为激肽释放酶。这些相互作用的净影响是通过因子 XIIa 在血液中的扩增与蓄积和随后因子 XI 转化为因子 XIa,引发接触凝结途径。因子 XIa 然后催化因子 IX 转化为因子 IXa。从那开始,接触途径和组织因子(TF)途径遵循上述相同的过程(常见途径)。

[0006] 在血液采集的过程中,血液暴露于外源表面例如套管、管线和血液容器装置壁(例如真空的血液采集管)。这种接触活化了内源性(接触)凝结途径,这如上所述导致因子 XII 转化为活性因子 XII(XIIa)。如果任其发展,FXIIa 会将 FXI 转化为 FXIa,FXIa 然后将 FIX 转化为 FIXa。该级联最终导致活性凝血酶生成和纤维蛋白凝块形成。

[0007] 当血液样品被采集时,期望抑制凝块的形成。将螯合剂如柠檬酸钠添加至血液采集管以帮助减少凝血酶生成和纤维蛋白凝块形成。随着血液与柠檬酸钠混合,因子 XIa、因子 IXa 和因子 Xa 的钙依赖性活性被阻抑,阻止凝血酶生成,因此抑制凝块形成。

[0008] 通过接触凝结途径阻止凝血酶生成的其它方法在本领域被熟知。在这些方法中的是抑制因子 XIIa 活性,这直接抑制因子 XIIa 介导的因子 XI 至因子 XIa 的转化。玉米胰蛋白酶抑制剂(CTI)是一种本领域中已知的抑制剂,它抑制因子 XIIa 介导的因子 XI 至因子 XIa 的转化。但是,使用 CTI 通过接触凝结途径抑制凝血酶生成存在几个问题。一个这样的问题是累积的因子 XIIa 通过激肽释放酶-激肽系统的参与的扩增。另一个问题是包含 CTI 的血液采集管不可以被灭菌,因此不能与某些临床应用结合使用。

[0009] 两种用于监测凝血酶生成和凝血的应用是血栓弹力描记术 (TEG) 和自动校正凝血酶曲线法 (CAT) 分析。TEG 是一个用于外科手术和麻醉学中的重要分析, 它评价血小板功能、凝块强度和纤维蛋白溶解, 其它测试例如 aPPT 则不能评价这些。通过获取患者的血液并且以 4° 至 45° 的角度缓缓转动 (例如每分钟 6 次), TEG 测量凝结。置于用于 TEG 的采集设备中的细线测量通过凝血酶生成的凝块形成。凝血酶通过接触途径生成可使 TEG 结果出现偏差, 这取决于测试中所使用的器皿或容器。

[0010] CAT 分析是用于研究带有凝结性过低或过高表型的患者的一种工具。在这个分析中, 凝血酶生成由组织因子 (TF)、磷脂和氯化钙 (CaCl_2) 诱导。因为该分析取决于通过 TF 导致的凝血酶形成, 基于接触途径的凝血酶生成将使 CAT 分析结果出现失真。

[0011] 因此, 仍需要这样的组合物和方法: 其选择性抑制用于 TEG 和 CAT 分析的采集血液样品中接触凝结途径的凝血酶生成。优选地, 这些组合物和方法不依赖于用于血液采集测试的实验室器皿或容器。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的一个方面涉及采集血液 (例如全血样品) 或含有血液组分的组合物 (例如血浆) 的装置, 该装置具有第一端和第二端和至少一个内壁, 该内壁限定了接受血液或其组分的储液器部分。储液器含添加剂或添加剂的组合, 其每一个以有效使血液或血液组分中接触凝结途径活化介导的凝血酶生成稳定的量抑制接触凝结途径活化。这些添加剂被称为接触途径抑制剂, 因为它们抑制导致凝血酶生成的接触凝血级联途径。尽管申请人不想拘泥于特定的原理, 但是申请人认为本文中考虑的添加剂阻滞因子 XIa (FXIa) 活性、因子 XIIa 活性或激肽释放酶活性或其任意组合中的至少一种。阻滞 FXIa 活性具有非常强的效果, 而无需同时的 FXII 抑制。在一个实施方式中, 接触途径抑制剂组合柠檬酸钠真空血液采集管的使用显著地延长了这些管中采集的血液的凝血时间。在一些实施方式中, 采集装置装有用针可穿透的封闭物 (例如用于将血液供应到储液器), 并且它是无菌和真空的。

[0014] 本发明的另一个方面涉及采集血液或含有血液组分的组合物 (例如血浆) 的方法, 其中至凝血的接触途径被抑制, 该方法包括将血液或组合物引入这样的装置, 该装置具有第一端和第二端和至少一个限定用于接受血液或组合物的储液器部分的内壁, 以及布置于储液器中的除柠檬酸盐之外的接触途径抑制添加剂 (本文中的添加剂)。在某些实施方式中, 添加剂为激肽释放酶抑制剂。在其它实施方式中, 添加剂包括下列中的至少一种: i) 因子 XI 抑制剂, 它是例如并且不限于抗人 FXI 抗体; ii) 因子 XII 抑制剂; 和 iii) 激肽释放酶抑制剂; 和 iv) i、ii 和 iii 的任意组合。因子 XII 抑制剂的例子包括但不限于玉米胰蛋白酶抑制剂。激肽释放酶抑制剂的例子包括但不限于抑肽酶。以有效阻抑通过接触凝结途径的凝血酶形成的量提供抑肽酶。这些量超过当在采集和保存血液的管中用作广义碱基丝氨酸蛋白酶抑制剂时存在的抑肽酶量。这些管典型地含有 [EDTA] 和本文描述的管中不存在的其它稳定剂。继采集和储藏之后, 血液或组合物可被利用, 例如用于诊断分析或治疗目的。激肽释放酶抑制剂 (例如抑肽酶) 的浓度是样品 (例如血液) 中的约 500 激肽释放酶剂单位 (KIU) 至约 5000KIU/mL。如果存在, 抗人因子 FXI 抗体的浓度是样品 (例如血液) 中的约 $2 \mu\text{g/mL}$ 至约 $14 \mu\text{g/mL}$ 。

[0015] 本发明的进一步方面涉及包括至少一个这样的装置 (并且优选多个这样的装置) 的包装或套件。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1 是其中放置本发明的添加剂的常规真空采集管的示意图。

[0018] 图 2A 是比较由不同材料制成的管的柠檬酸化天然凝血时间的表格。

[0019] 图 2B 是图 2A 所含有的数据的图表。

[0020] 图 3A 是比较对于来自不同材料的管的柠檬酸化血浆样品在 TF 存在和缺乏的情况下凝血酶生成分析性能的图表。

[0021] 图 3B 是凝血酶生成曲线的图表,图 3A 中的数值来自该图表。

[0022] 图 4A 是一组显示使用抑肽酶对因子 XIIa 上游的接触凝结途径的剂量依赖性抑制。

[0023] 图 4B 是显示使用自动校正凝血酶曲线法 (CAT) 分析的在没有组织因子 (TF) 情况下的凝血酶生成曲线的图表,其图示来自玻璃和塑料制品的接触途径贡献的严重程度,以及本文描述的添加剂提供的减缓。

[0024] 图 5A 是显示单克隆抗 FXI 抗体延长玻璃柠檬酸盐管中温育的样品的柠檬酸化天然全血凝血时间的剂量依赖性能力的图表。

[0025] 图 5B 是显示在缺乏 TF 的情况下抗因子 XI 抗体对因子 XIIa 上游的接触途径活化减缓的图表。

[0026] 图 6 是显示用抑肽酶和抗因子 XI 抗体对接触凝结途径选择性抑制,同时保留组织因子驱动的凝血酶生成和凝血酶活性的图。

[0027] 图 7 是显示用抑肽酶和利用抗因子 XI 抗体的因子 XI 抑制对激肽释放酶选择性抑制提供与利用 CTI 抑制因子 XIIa 的接触途径减缓等同的接触途径减缓的图表。

[0028] 详细描述

[0029] 广义上,本发明的采集装置可包含任意采集装置,包括管,例如试管或离心管;封闭系统血液采集装置,例如采集袋;注射器,尤其预填充注射器;导管;微量滴定器和其它多孔板;阵列;管系;实验室器皿,例如烧瓶、旋转瓶、滚瓶、小瓶、显微镜载玻片、显微镜载玻片组装件、盖玻片、薄膜和多孔基底和组装件;移液管和移液管头;组织和其它生物样品采集容器;和其它适用于保持生物样品的容器,以及涉及转移样品的容器和构件。几个这样的装置的例子和图示被公开在 Stevens 等共有的美国专利 7,309,468 中。该装置可以是真空和无菌的,并且包括可被针穿透的封闭物。可选地,该装置可以是用于采集血液的部分真空或非真空系统。真空系统的合适例子是封闭的管。手动注射器抽取是部分真空和非真空系统的合适例子。非真空系统也可包括自动抽取系统。

[0030] 图 1,其也图示在美国专利 7,309,468 中,显示了在本发明中有用的典型血液采集装置 10,它包括限定内室或储液器 14 的容器 12。在图示的实施方式中,容器 12 是中空管,它具有侧壁 16、封闭的底端 18 和开放的顶端 20。任选地,分离构件 13 提供在容器室 14 中。分离构件 13 用以例如通过离心辅助分离血液样品的组分。容器 12 被设定尺寸用于采集合适体积的血液。用于覆盖开放端 20 以封闭容器 12 的封闭物工具 22 在要求无菌产品的情况下是必需的。在一些实施方式中,管被配置有螺帽。更优选地,封闭物 22 形成能够有效地封闭容器 12 并且将生物样品保留在室 14 中的密封。封闭物 22 可以是多种形式其中之一,包括但不限于,橡胶封闭物、HEMOGUARD™封闭物、金属密封件、金属-结合的橡胶密封件以及不同聚合物和设计的密封件。保护性防护物 24 可覆盖在封闭物 22 上。

[0031] 容器 12 可以由适用于实验室器皿的任意材料制成, 包括例如塑料(例如聚烯烃、聚酰胺、聚酯、硅酮、聚氨酯、环氧树脂、丙烯酸树脂、聚丙烯酸酯、聚酯、聚砜、聚甲基丙烯酸酯、PEEK、聚酰亚胺和含氟聚合物), 以及玻璃制品, 包括石英玻璃。更优选地, 容器 12 是透明的。用于容器 12 的合适的透明热塑性材料的例子包括聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯和聚对苯二甲酸乙二酯。塑料材料可以是非透氧材料或可以含有非透氧或半透氧层。可选地, 容器 12 可由透水和透气塑料制成。

[0032] 室 14 中的压力被选择以将预定体积的生物样品抽吸到室 14。优选地, 封闭物 22 由弹性材料制成, 该弹性材料能够维持大气压和小于大气的压力之间的内部压力差。封闭物 22 使得其能够被针 26 或其它插管穿透以将生物样品引入容器 12, 如本领域所已知的。优选地, 封闭物 22 是可重新密封的。适用于封闭物 22 的材料包括例如硅酮橡胶、天然橡胶、苯乙烯丁二烯橡胶、乙烯-丙烯共聚物和聚氯乙烯。

[0033] 容器 12 的合适的例子包括单壁管和多层管。合适的容器 12 的更具体的例子公开在美国专利 5,860,937 中。

[0034] 容器 12 也可含有分离器 13, 如凝胶、机械分离器或其它类型的分离构件(例如滤纸等)。分离器典型地用于血液血浆的制备, 特别是从人或动物全血中分离血浆。在一些实施方式中, 分离器具有白细胞和血小板之间中间并且可用于从全血样品的其它细胞成分中分离 PRP 的密度。凝胶期望地是触变性聚合凝胶制剂。凝胶可以是均聚物或共聚物, 并且可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、氧化顺式聚丁二烯、聚丁烯、环氧化大豆油和氯化烃的掺合物、二酸与丙二醇的共聚物、氢化环戊二烯和 α -烯烃与马来酸二烷基酯的共聚物。可用于本发明的机械分离器的例子描述在美国专利 6,516,953 ;6,406,671 ;6,409,528 和 6,497,325 中。

[0035] 容器 12 也可适于从全血样品的较重相离心分离淋巴细胞和单核细胞。在这些实施方式中, 这些装置也可包含液体密度梯度介质和在离心前防止液体密度梯度介质与血液样品混合的工具。合适的淋巴细胞/单核细胞采集管的例子公开在美国专利 5,053,134 中。

[0036] 在其它实施方式中, 该装置可包括整合在测试盒内的储液器, 该储液器能够保持 2 至 200 微升, 更优选 50-150 微升范围的全血体积。这些盒例如以商品名 **i-STAT®** Point of Care System 由 Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois) 出售, 并且可与能够与该盒连接的手持式分析仪一起使用。可与本发明一起使用的这些盒和手持式分析仪的例子分别包括 **i-STAT®** PT/INR 盒和 **i-STAT®** 1 手持式分析仪。

[0037] 在一些实施方式中, 该装置是注射器。注射器组装件可包括具有开放近端、远端和在近端和远端之间的用于接受血液的无菌中空室的圆筒; 位于开放近端的活塞; 固定至圆筒的针; 和室中的血小板稳定剂。

[0038] 本发明的装置可以依据本领域中已知的材料、试剂和工艺制作或组装。举例来说, 一种这样的方法涉及以有效稳定/抑制接触途径介导的凝血酶生成的量添加至少一种接触途径抑制剂(其如本文中所述可以是干燥、冻干或液体形式); 然后任选地, 将分离构件添加至装置和/或对装置进行抽真空和/或灭菌。

[0039] 如本文所使用的, 术语“血液”和“血液样品”指的是全血或其组分(例如组合物, 如含有血液组分的另一种机体组织或体液), 特别是其细胞组分, 包括例如红细胞浓缩物、

血小板浓缩物（例如富血小板血浆 (PRP)）、淋巴细胞浓缩物；或血浆和血清。因此，在其它实施方式中，样品可以是含有血细胞或未成熟血细胞的体液或组织，如骨髓。

[0040] 图 2A 和 2B 是利用 **Thrombelastograph®** (TEG) 5000 Hemostasis 分析仪比较由各种材料制成的管的再钙化凝血时间的表格和图表。使用商用的柠檬酸盐人全血的柠檬酸化天然 TEG 证明了与 363083 塑料柠檬酸盐管相比，BD **Vacutainer®** 369714 玻璃柠檬酸盐管具有显著更高的促凝血活性。简言之，BD **Vacutainer®** 369714 玻璃管和 363083 塑料柠檬酸盐管被清洗和干燥以去除柠檬酸盐添加剂。之后，使用柠檬酸化人全血的商用袋将这些管填充至容量。样品在室温下温育 15 分钟，轻微振荡样品以促进血液与管壁的表面材料相接触。最终，全血凝血时间使用组合的再钙化和 TEG 测量。这些结果清楚地显示相对于玻璃管，塑料柠檬酸盐管对预分析诱导的凝血时间加速提供减缓。尽管申请人不想拘泥于特定的原理，但申请人认为该差异是由于在硅化玻璃制品中更多的接触途径活化。而且，要重要指出的是，只有在缺乏强接触途径活化剂的条件下进行的高度敏感的凝结分析将对这些差异敏感。

[0041] 图 3A 和 3B 是使用自动校正凝血酶曲线法 (CAT) 分析比较取自各种材料制成的管的柠檬酸化血浆中的凝血酶生成的表格和图表。CAT 分析，不是测量凝结，而是组合使用在凝血酶存在下被切割的荧光底物以及用以提供再钙化血浆样品中凝血酶生成的定量测量的校准器。这个分析的主要用途是考查临床研究样品响应组织因子 (TF) 的凝血酶生成概况。组织因子不利用接触途径产生使该分析对接触活化难以置信地敏感的凝血酶。如图 3A 所示，在 1pM TF 的存在和缺乏的情况下来自硅化玻璃管的柠檬酸化血浆样品中的延迟时间和达峰值凝血酶生成的时间显著低于来自塑料管的那些。这些结果清楚地证明，用于常见血液容纳装置中的不同表面材料能给予可变的凝血酶生成速率。而且，与来自塑料管的那些相比，来自硅化玻璃的柠檬酸化血浆样品中的凝血酶峰值也较高，这表明凝血酶生成强度也易受接触凝结途径活化影响。图 3B 中所含的图表提供示例凝血酶生成曲线，其用于填入图 3A 中的数据表格。

[0042] 图 4A 证明了称为抑肽酶的已知激肽释放酶抑制剂，当与柠檬酸钠背景组合添加到血液时，可用于阻滞接触途径驱动的凝结。通过评估全血凝血时间 (TEG R 时间) 来进行滴定。在以每毫升血液 1000 个激肽释放酶抑制剂单位 (1000KIU) 作为低于仅提供平均凝血时间的浓度下测定最小有效剂量，该平均凝血时间等于或低于硅化玻璃的平均凝血时间。2000KIU/mL 的浓度对未涂布的玻璃中所含的血液给予了比硅化玻璃或塑料中储藏的血液更长的凝血时间。这些结果清楚地暗示了接触途径活化作为预分析诱导的凝血时间减小的潜在机制，以及证明了超越表面材料的减轻策略。

[0043] 图 4B 显示如全血滴定结果预测的，抑肽酶以剂量依赖方式成功地延迟并且减少了凝血酶生成。

[0044] 图 5A 显示抗因子 IX 抗体 (α -FXI) 滴定在硅化玻璃管中温育的全血中。通过评估全血凝血时间 (TEG R 时间) 来进行滴定。数据显示平台期出现在稍高于 5 μ g/mL，并且 7.5 μ g/mL 的浓度被选定用于进一步评估。

[0045] 图 5B 显示在缺乏 TF 的情况下的凝血酶生成曲线。在存在 7.5 μ g/mL α -FXI 的情况下，从塑料或硅化玻璃管中所含的血液终止凝血酶生成。这些结果阐明了玻璃和塑料制

品对接触途径的贡献严重程度和通过包含 7.5 μ g/mL 单克隆抗 FXI 抗体所提供的强有力的减轻。

[0046] 图 6 是通过从含有各种抑制剂的血浆进行匹配的 aPTT、PT 和 TT 分析来获得的。这些分析被本领域普通技术人员熟知并且不在此进行详述。由于 aPTT 分析利用有效的接触途径活化反应驱动凝结,抑肽酶如意料的展示了对 aPTT 的剂量依赖性影响。在 aPTT 结果中,抗 FIX 抗体 (7.5 μ g/mL) 显示了显著的延迟。由于玉米胰蛋白酶抑制剂 (CTI) 是目前可用于血液采集管中的因子 XIIa 抑制剂,玉米胰蛋白酶抑制剂 (CTI) 被包括作为对照。所有三种抑制剂实现了 aPTT 分析的等同抑制。而且,没有一个抑制剂产生延长的 PT 或 TT 分析,PT 或 TT 分析分别利用高剂量组织因子和外源性凝血酶产生凝血时间结果。该数据表明抑肽酶选择性地作用以抑制接触凝结途径活化,而不是起广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂的作用,因为它被用于其它血液采集应用中。

[0047] 图 7 提供了为了减缓接触途径对凝血酶生成的目的,对激肽释放酶、因子 XIIa 和因子 IX 抑制的比较。该数据提供了因子 XIIa 上游或下游的靶向接触途径抑制与直接因子 XIIa 阻滞一样有效的证据。但是,只有抑肽酶是灭菌稳定的,其中 CTI 不是。像 CTI 一样,抗 FIX 也是灭菌不稳定的。

[0048] 基于上面的结果,本发明考虑使用包括下列至少一种的添加剂:i) 因子 XI 抑制剂,其例如但不限于抗人 FXI 抗体;ii) 因子 XII 抑制剂;和 iii) 激肽释放酶抑制剂;和 iv) i、ii 和 iii 的任意组合。因子 XIIa 抑制剂的例子包含但不限于玉米胰蛋白酶抑制剂。激肽释放酶抑制剂的例子包含但不限于抑肽酶。

[0049] 在优选的实施方式中,管包括除添加剂之外的作为抗凝剂的柠檬酸钠。但是,在存在过量的钙的情况下,如果柠檬酸钠是唯一的抗凝剂,柠檬酸盐的轻微螯合作用被克服并且凝结级联被重新启用。在存在凝块活化剂的情况下,该级联被加速。典型地,在再钙化之后,凝结分析利用强凝块活化剂(基于接触途径或组织因子的)产生快速和强的凝血反应。

[0050] 在用与基于组织因子的凝血酶生成分析组合使用的 BD Vacutainer 玻璃柠檬酸盐管的血液采集过程中,在视野中观察到加速的凝血酶生成。玻璃是高度促凝表面并且尽管用硅化涂布工艺稳定该表面活化的制造努力,但有数据证明相对于塑料柠檬酸盐管,明显更大量的接触途径活化发生在玻璃柠檬酸盐管中。虽然塑料柠檬酸盐管部分减轻涂布玻璃管中所见到的接触途径活化,但是它们没有全部减轻可在血液容纳装置中积累的活性 FXII 的淤积。玉米胰蛋白酶抑制剂 (CTI) 是广为已知的 FXIIa 抑制剂,它已显示出减小接触途径对凝血酶生成分析的功效,其的常见例子是来自 Diagnostica Stago 的 CAT 分析。这里我们显示了通过分别使用抑肽酶或单克隆抗 FXI 抗体来抑制激肽释放酶或 FXI,来自 BD Vacutainer®玻璃管和塑料柠檬酸盐管的接触途径对凝血酶生成概况贡献被强有力地减小。

[0051] 在本发明中适合与本文所述的添加剂一起使用的柠檬酸盐管的例子包括但不限于 Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ) (目录号 366392、366393、366415、367947、369714 指定的塑料管;目录号 363080 和 363083 指定的玻璃管) 出售的柠檬酸盐管。

[0052] 在一个实施方式中,在真空血液采集柠檬酸盐管中添加剂是抗 FXI 抗体,有或没

有其它相关抑制剂。抗 FXI 抗体的量被选定以提供有效期内的稳定性、可制造性和未溶血迹象。

[0053] 在其它的实施方式中, 抗人 FXI 抗体与玉米胰蛋白酶抑制剂 (因子 XII 抑制剂) 或抑肽酶 (激肽释放酶抑制剂) 或一些抑制剂的组合相组合。添加剂改善了接触途径阻滞并且可能降低实现有效阻滞所需的 FXIIa 抑制剂的量。在其它的实施方式中, 浓度为约 1000 至约 5000 KIU/mL 的抑肽酶单独地被用于接触途径抑制。

[0054] 存在于采集装置中的有效量的添加剂阻抑接触凝结途径介导的凝血酶生成。当样品凝血时间从无添加剂的凝血时间延长时, 凝血酶生成被阻抑。该装置中包括的具体添加剂以及量或浓度的选择取决于几个因素, 包括样品性质、每一试剂的效力和其在水中的溶解度、期望血液稳定的时间量、血液采集装置的体积、在样品中加入试剂造成的溶血的程度以及非特异性相互作用的性质和程度 (例如由于其它蛋白质如血清白蛋白在血液中的存在)。因此, 基于本发明的目的, 就浓度范围而言, 可以存在的添加剂 (一种或多种) 的量被更方便地表达 (由此可容易地计算出试剂的实际量)。

[0055] 本文描述的添加剂抑制接触凝结途径介导的凝血酶生成, 该凝血酶生成来自作为用于体外诊断程序的典型血液采集装置中采集、运输、储存的人造物所诱导。这样的抑制在本文中被描述为接触途径抑制。

[0056] 一些添加剂比其它的添加剂更有效, 并且因此将需要每毫升样品的较小浓度, 这取决于效用。

[0057] 熟练的技术人员将理解溶血的样品是在血液样品的采集、运输或储存的过程中对血细胞的损伤已经发生的明显视觉线索。虽然溶血对任意一个临床分析不一定是有害的, 但它对于一些测试是众所周知的干扰, 并且因此优选避免造成溶血。溶血可通过视觉比例测量 (例如轻微的或稍微的粉色, 中度或明显的红色, 或重度或深红色)。溶血也可通过对血红蛋白本身的红色的光谱测量法来测量, 并且可由释放到血清或血浆中的血红蛋白的浓度来报告 (例如, 使得小于释放的血红蛋白的约 20mg/dL 浓度, 或达到血红蛋白浓度不能视觉测量或通过光谱学测量的程度代表“较少的或可忽略的”溶血, 约 20mg/dL 至约 100mg/dL 代表轻微溶血, 约 100mg/dL 至约 300mg/dL 代表中度溶血, 或者大于约 300mg/dL 代表重度溶血)。

[0058] 接触凝结途径介导的凝血酶生成的抑制剂可以是任意适合的形式, 包括溶液, 悬浮液或其它液体、丸剂、片、胶囊剂、喷雾干燥材料、冷冻干燥材料、粉末、颗粒、凝胶、晶体或冻干材料。血液稳定剂优选引入到容器的储液器中, 以这样的方式优化该剂的有效期, 即防止将导致功效降低的血液稳定剂的降解。除布置于储液器中之外, 接触凝结途径介导的凝血酶生成的抑制剂可位于装置的任意表面上。接触凝结途径介导的凝血酶生成的抑制剂也可布置于内壁上、挡板和封闭这些装置的密封件上、或机械部件或其它置于这些装置中的插入物上。

[0059] 添加剂和抗凝剂可布置于储液器和 / 或装置的其它地方中, 条件是它们与样品接触以提供它们预期的效果。例如, 这些成分也可布置于内壁上、挡板和封闭这些装置的密封件上、或机械部件或其它置于这些装置中的插入物上。

[0060] 本发明的方法包括将血液或血液样品引入含有血液稳定剂的装置中。在一些实施方式中, 从患者直接提取血液样品, 进入到容器中, 而没有任何中间过程步骤。在其它实施

方式中,采集的样品被进一步处理以制备组合物,例如含有血液组分如 PRP 的富集组合物。

[0061] 为了促进本发明的使用,可以试剂盒的形式包装一种或多种装置。在一些实施方式中,试剂盒将包括例如安排在开放架或密封包装中的一种或多种装置。试剂盒也可含有一个或多个用于抽取和采集血液的构件,例如针、止血带、绷带、酒精和擦拭巾以及柳叶刀。试剂盒也可包括其它类型的血液采集装置,如其中已布置有已知血液稳定剂和 / 或抗凝剂的管,所述管的例子包括 EDTA 管(例如用于常规血液学计数)、肝素管(用于临床化学)、柠檬酸盐管(用于凝结测试)和其它专用管(用于蛋白组学、基因组学等)。本发明的试剂盒也可包括使用说明书。

[0062] 在一些其它的实施方式中,试剂盒包括第一采集装置,例如带有其中有分离构件的血浆分离管的血浆管,以及用于测试例如用于倾倒入另外分配采集的血浆的第二管。第一管中的分离构件可具有适当的密度以使富血小板血浆能够从血液的其它细胞成分中分离。第二测试管的尺寸可与第一管的尺寸相同或不同,这取决于期望的测试。这两个管可具有布置在其中的血小板稳定剂。试剂盒可进一步包括管对管转移装置,以防止倾倒入和其它不安全转移实践的需要,在这种情况下,第二管将处于减压下以抽入血浆。

[0063] 现将根据以下非限定性实施例对发明进行描述。

[0064] 实施例 1

[0065] 血栓弹力描记术 (TEG) 可用测试全血 (WB) 的凝结效率并且在外科手术和麻醉学中已经发现有重要的应用。在血浆中进行的 CAT 分析用于研究具有低凝血障碍和高凝血障碍的患者。这些分析相对于传统凝结测试是高度灵敏的,并且容易受接触活化的影响,其中在柠檬酸化样品中累积的因子 XIIa 可显著地增加下游凝血酶生成。因此,由不同的聚合容纳材料构成的血液采集管和目标内源性途径抑制剂的选用对 TEG 和 CAT 分析的选择输出的影响被考查。

[0066] 将柠檬酸化人 WB 单独或在靶向激肽释放酶(例如抑肽酶)或 FXIa(例如抗人因子 XI 抗体)的抑制剂的存在下从血液采集袋转移到涂布(硅化)玻璃或塑料血液采集管、或非涂布玻璃、聚丙烯 (PP)、聚苯乙烯 (PS) 或聚对苯二甲酸乙二酯 (PET) 锥底管中。在 15 分钟温育后,TEG R 值在加入 10mM CaCl_2 后被立即获得。通过 CAT 在存在和缺乏 1 皮摩尔组织因子 (TF) 的情况下并且通过活化的部分促凝血酶原激酶时间法 (APTT ;Stago Compact) 分析匹配的血浆样样本。通过 ANOVA 用图基事后检验和通过线性回归来分析数据。

[0067] 塑料血液采集管实现了比未涂布玻璃 (6.3 ± 0.73) 或涂布玻璃管 (9.9 ± 0.58) 明显更高的 WB 凝血“R”时间 ($15.0 \pm 1.02\text{min}$), $p < 0.01$, 同时为所有其它塑料容器提供了等同的结果,其范围从 15 ± 1.0 至 $17.7 \pm 1.9\text{min}$, $p > 0.05$ 。APTT 分析对未涂布玻璃 ($29.5 \pm 1.6\text{s}$) 和 PP ($29.8 \pm 0.6\text{s}$) 管之间的差异不敏感。而且,在缺乏 ($22.2 \pm 4.4\text{nM}$ 对 $167.7 \pm 2\text{nM}$, $p < 0.05$) 和存在 ($16.7 \pm 3.4\text{nM}$ 对 $127.3 \pm 9\text{nM}$, $p < 0.05$) TF 的情况下,相对于涂布玻璃,塑料采集管中 CAT 峰值凝血酶水平显著较低。TEG WB CT 与 TF 引发的 CAT 延迟时间 ($R^2 = 0.8116$)、达峰值 TG 的时间 ($R^2 = 0.8308$) 和在缺乏内源性抑制剂情况下的峰值 TG ($R^2 = 0.8401$) 很好地相关联。激肽释放酶的靶向抑制也使未涂布玻璃样品中的 WB CT 从 4.9 ± 0.30 增加至 27.5 ± 8.30 , 这显著地高于在缺乏抑制剂情况下的涂布玻璃管 (9.4 ± 0.40) 或塑料管 (14.3 ± 2.60) ($p < 0.001$)。类似地,FXIa 的靶向抑制使涂布玻璃和塑料管中的 WB TEG CT 增加到 18min 以上,并且在缺乏 TF 的情况下终止 TG。

[0068] 对于 CAT 和 TEG, 塑料血液采集管提供了相对于涂布玻璃管的优势, 虽然 APTT 分析对这些聚合物差别不敏感。即使在未涂布玻璃中, 激肽释放酶的抑制使 WB CT 高过塑料的 WB CT, 这暗示接触途径抑制的额外益处超过那些聚合物介导的。在缺乏 TF 的情况下, 抑制 FXIa 停止 TG。

[0069] 实施例 2

[0070] 如图 4(A) 所示, 抑肽酶的不同浓度被用于测试以利用 TEG 确定对全血凝血时间的影响。温育在未涂布玻璃管中的柠檬酸化血液样品经受以 KIU (激肽释放酶抑制单位) /ml 测量的抑肽酶的不同浓度, 并且与没有抑肽酶但包含在硅化玻璃管或塑料管中的血液样品进行比较。该分析的结果显示 1000KIU/ml 和更高的抑肽酶浓度将未涂布玻璃管中的接触凝结途径减轻至这样的水平: 其等同于硅化玻璃管或塑料管中储藏的血液样品中的接触凝结途径的减轻。

[0071] 具有不同量的抑肽酶的样品的 CAT 分析显示即使在存在 CaCl_2 和 TF 的情况下, 随着每个样品的抑肽酶量增加, 凝血酶生成减少并延迟。该结果显示在硅化玻璃 (上图) 和塑料管 (下图) 的图 4(B) 中。这些测试的对照是多个在缺少抑肽酶的情况下含有相同柠檬酸化人全血的管。

[0072] 实施例 3

[0073] APTT 分析被用于显示抑肽酶以等同于通过 CTI 和抗因子 XI 抗体的抑制的方式减轻接触凝结途径。如图 6 所示, 增加量的抑肽酶延长生成凝血酶的时间, 该时间或等同于或大于在存在 CTI 和抗因子 XI 抗体的情况下生成凝血酶的时间。图 6 (下图) 显示在专门监测 TF 凝结途径的测试中使用相同的样品, 凝血酶生成未受抑肽酶、CTI 或抗因子 XI 抗体的影响。这验证了抑肽酶通过接触凝结途径而不是提供 TF 途径专门地抑制凝血酶生成。

[0074] 实施例 4

[0075] 图 7 证明了当使用 CAT 分析时, 适当量的抑肽酶可以等同于 CTI 和抗因子 XI 抗体的方式减轻凝血酶的接触凝结途径生成。抑肽酶相对于 CTI 和抗因子 XI 抗体的使用优势在于后两种抑制剂均不能存在于经过灭菌的管中。

[0076] 尽管参照具体的实施方式对本文中的发明进行了描述, 但要理解这些实施方式仅仅是说明了本文描述的原理和应用。因此要理解可对说明性实施方式做出许多修改并且其它安排可在不背离由所附权利要求限定的本文所述的各种实施方式的精神和范围的情况下设计。

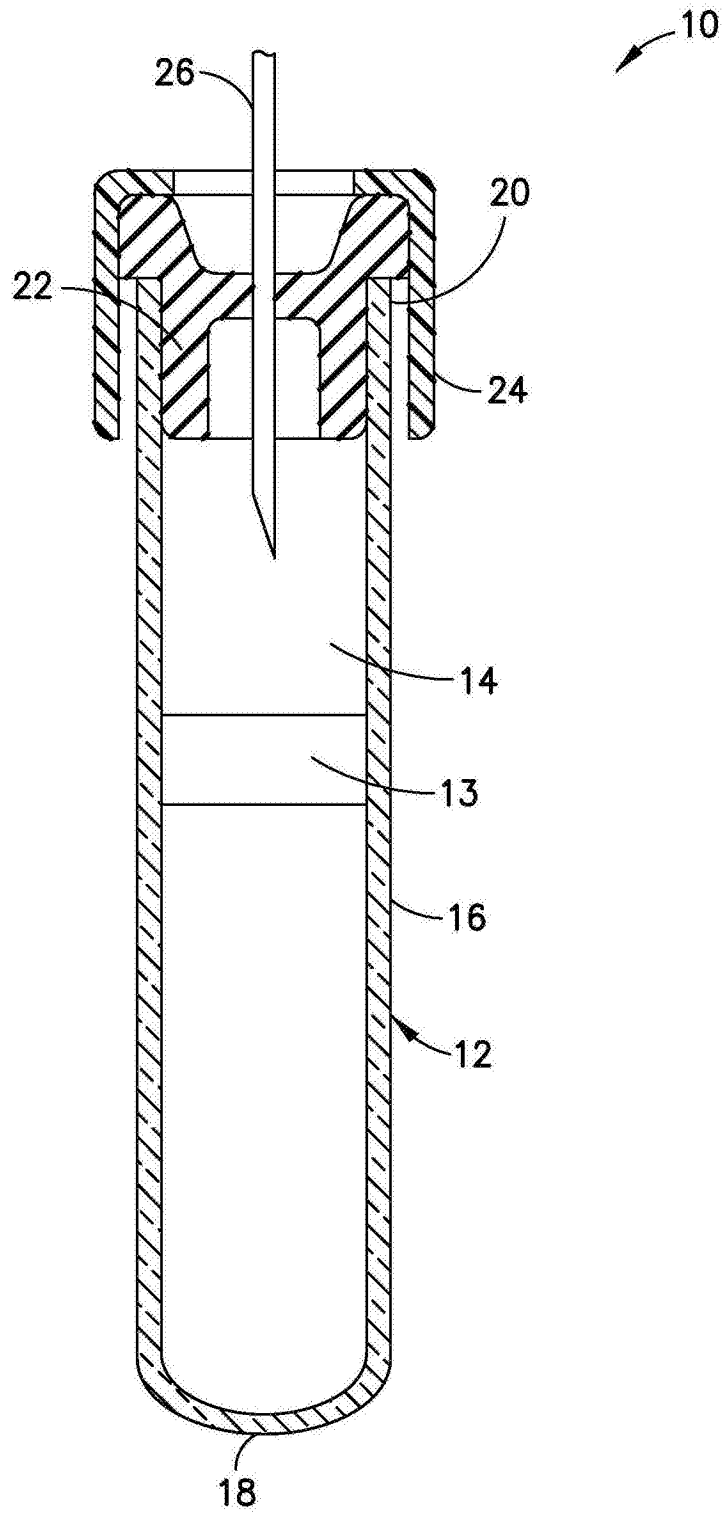


图 1

血液采集管	玻璃（未涂布）	玻璃（硅化）	塑料
TEG-WB CT（分钟）	6.3 ± 0.7	9.9 ± 0.6	15.0 ± 1.0

图 2A

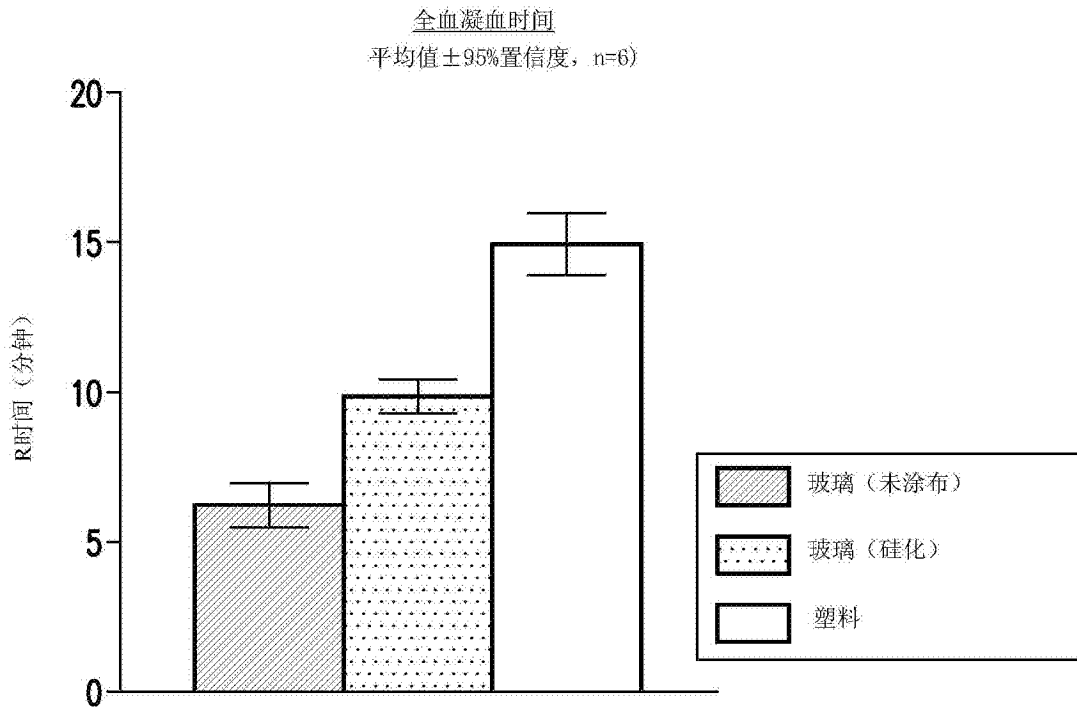


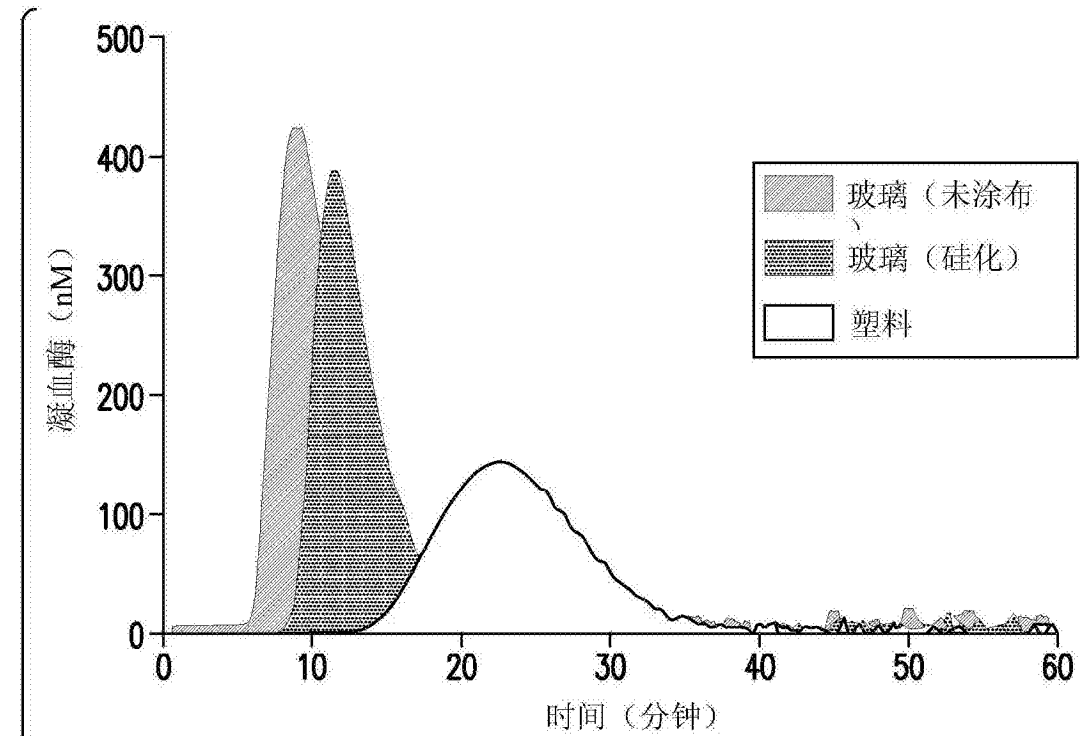
图 2B

血液采集管	玻璃（硅化）		塑料	
	-TF	+1pM TF	-TF	+1pM TF
延迟时间（分钟）	9.09 (± 1.12)	3.71 (± 0.16)	16.32 (± 4.01)	5.00 (± 0.27)
峰值（nM）	401.91 (± 23.55)	339.84 (± 23.37)	151.39 (± 15.06)	105.15 (± 7.90)
达峰值的时间（分钟）	11.50 (± 1.15)	6.38 (± 0.16)	23.15 (± 4.70)	11.31 (± 1.15)

图 3A

自动校正凝血酶曲线法
(平均值±95%置信度, n=6)

单独的再钙化



再钙化+1pM组织因子

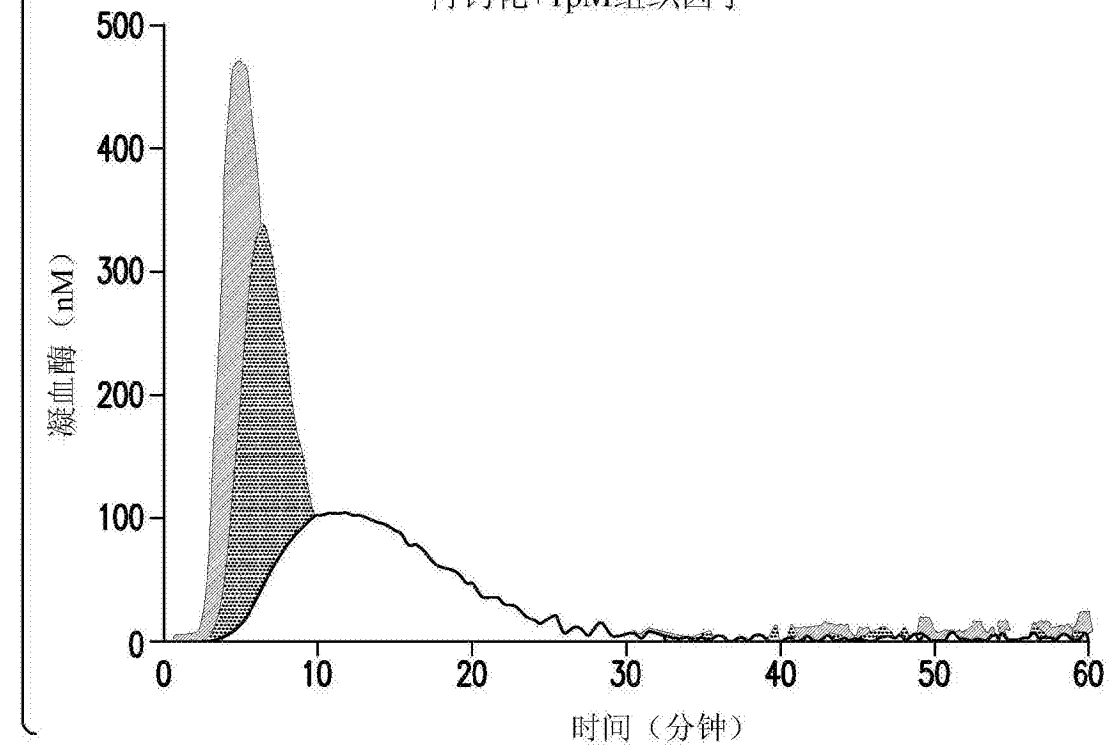


图 3B

柠檬酸化全血凝血时间

(平均值±SD)

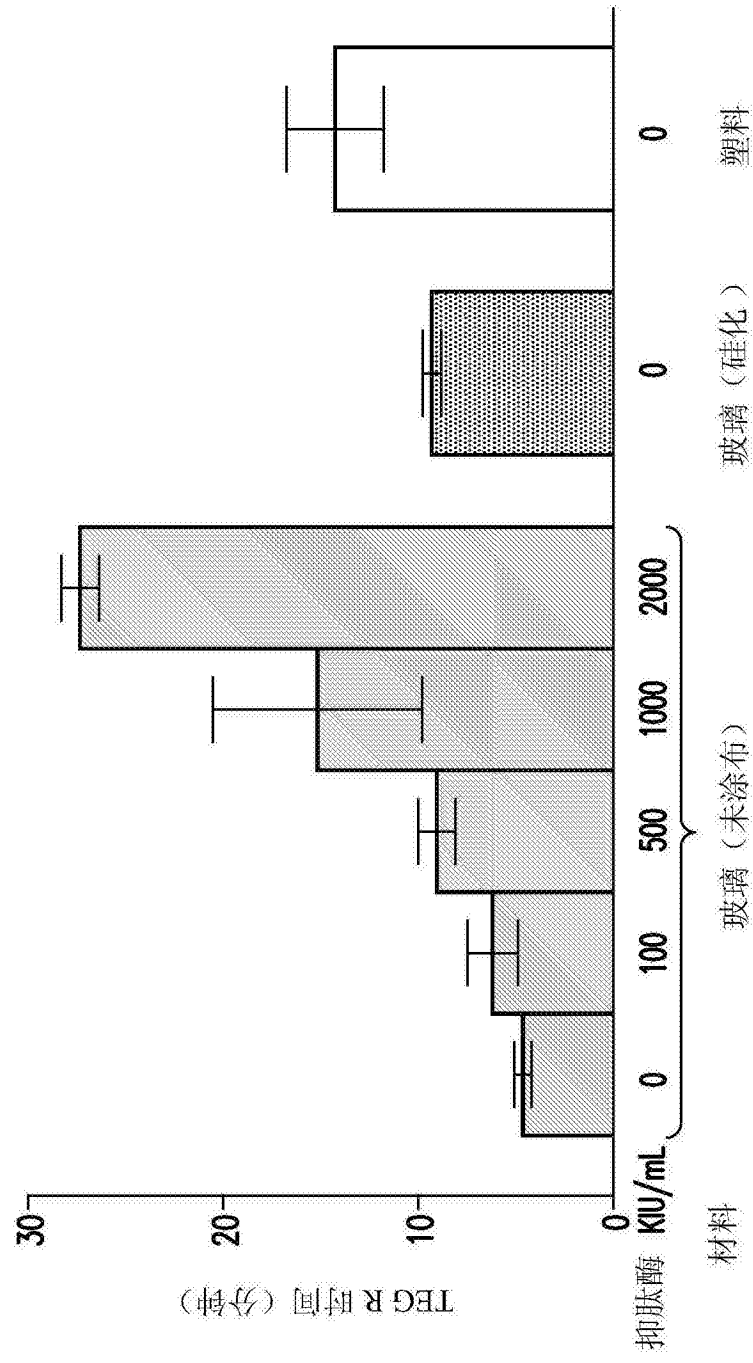
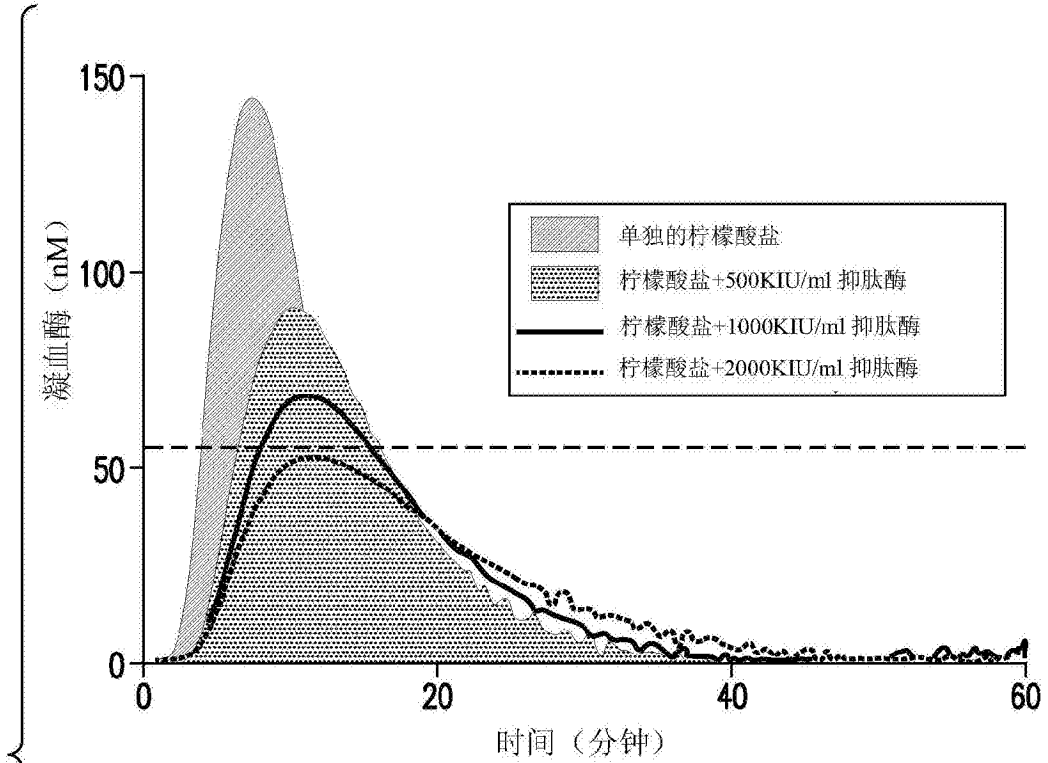


图 4A

自动校正凝血酶曲线法

(再钙化+1pM组织因子)

玻璃(硅化)±抑肽酶



塑料±抑肽酶

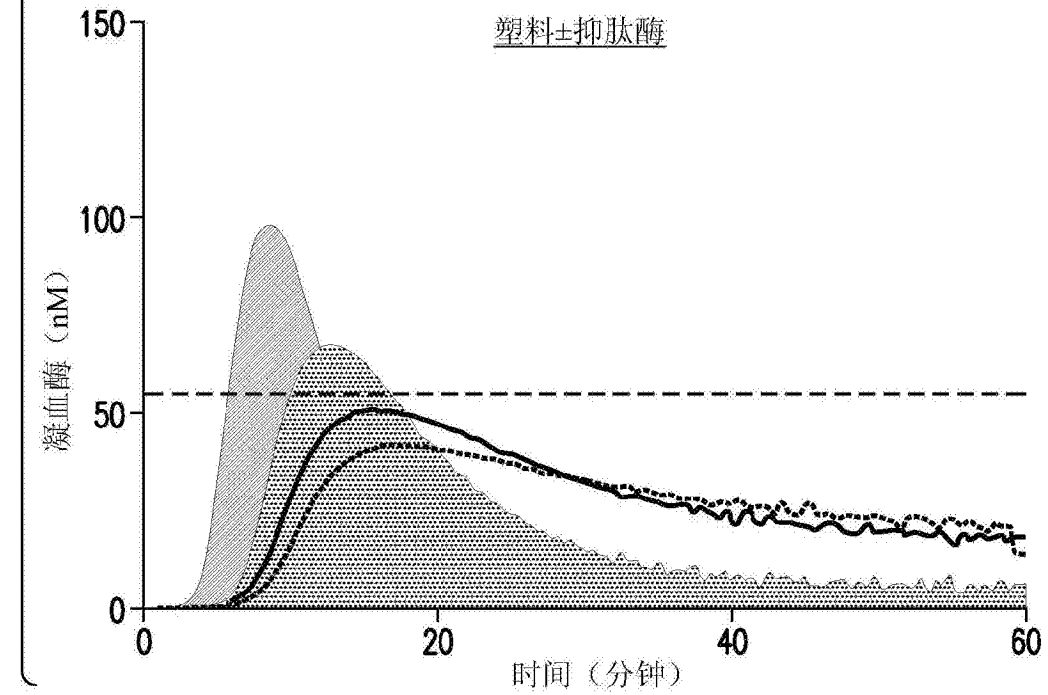


图 4B

柠檬酸化全血中的 α -FXI滴定

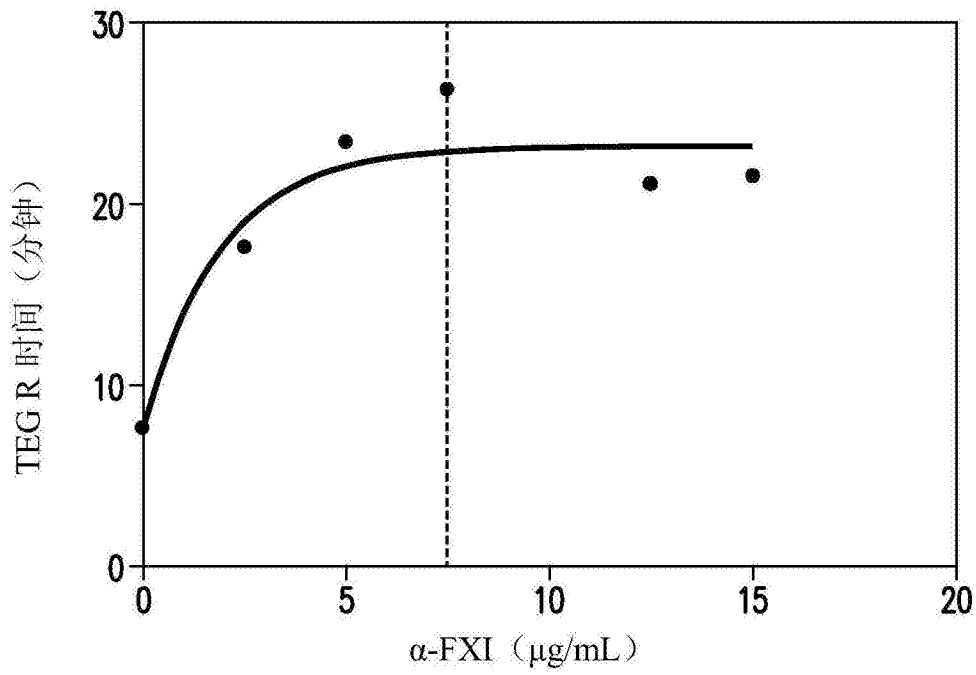


图 5A

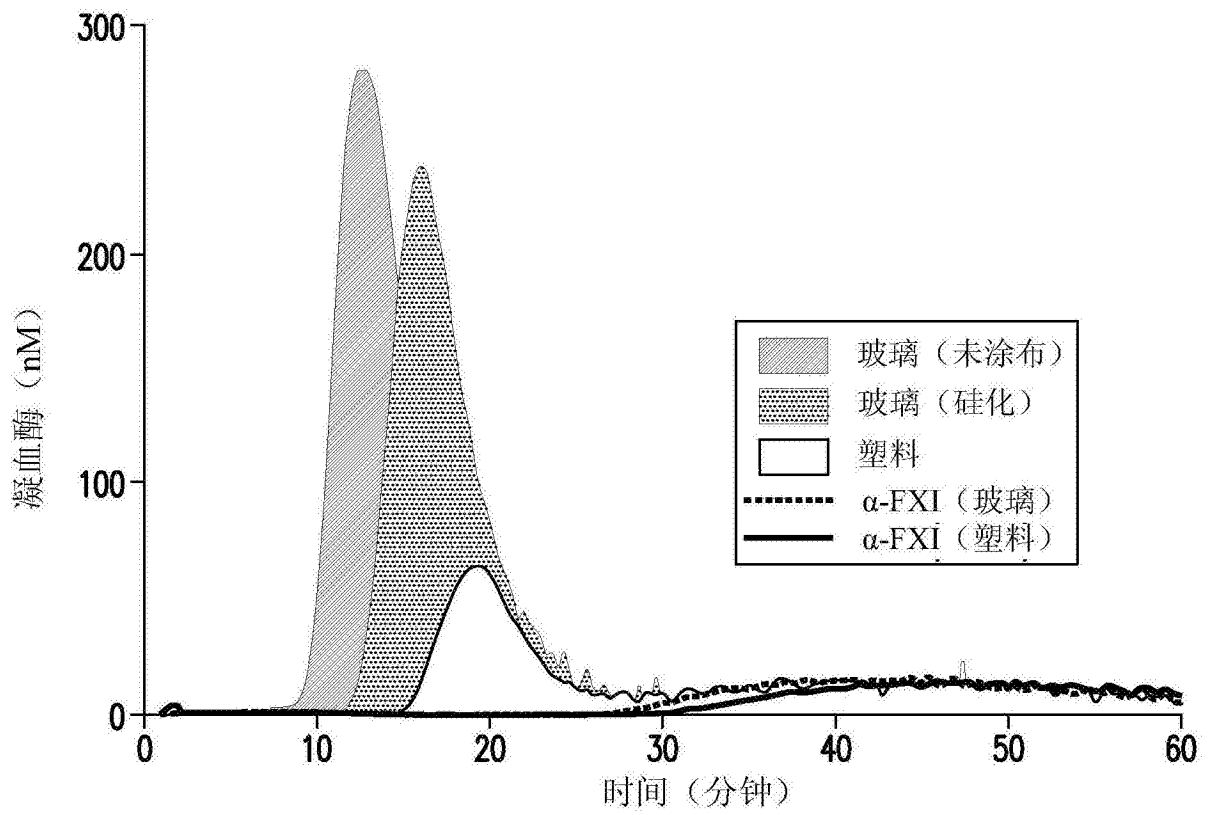


图 5B

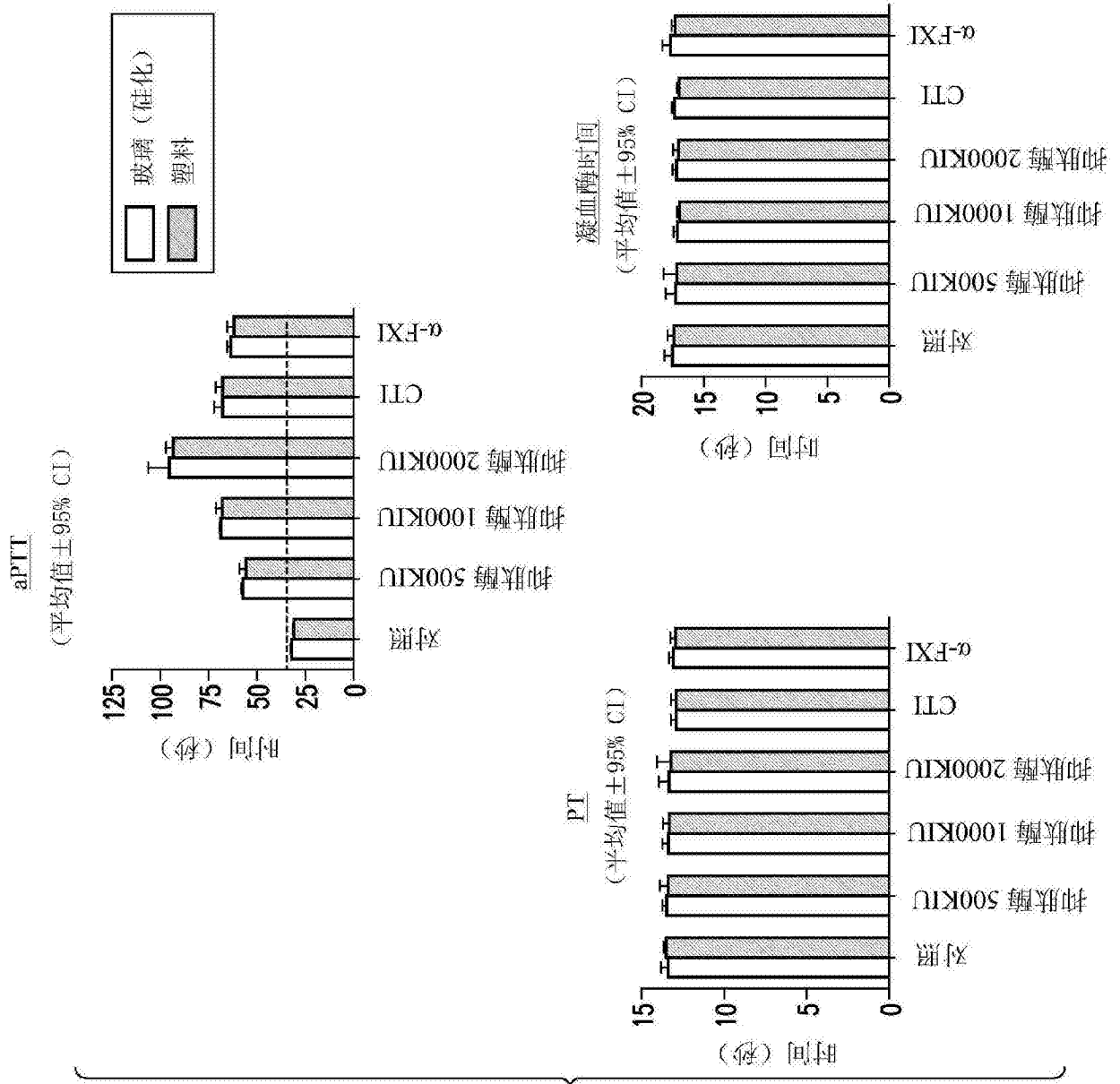


图 6

自动校正凝血酶曲线法
(再钙化+1pM组织因子)

玻璃(硅化)±抑制剂

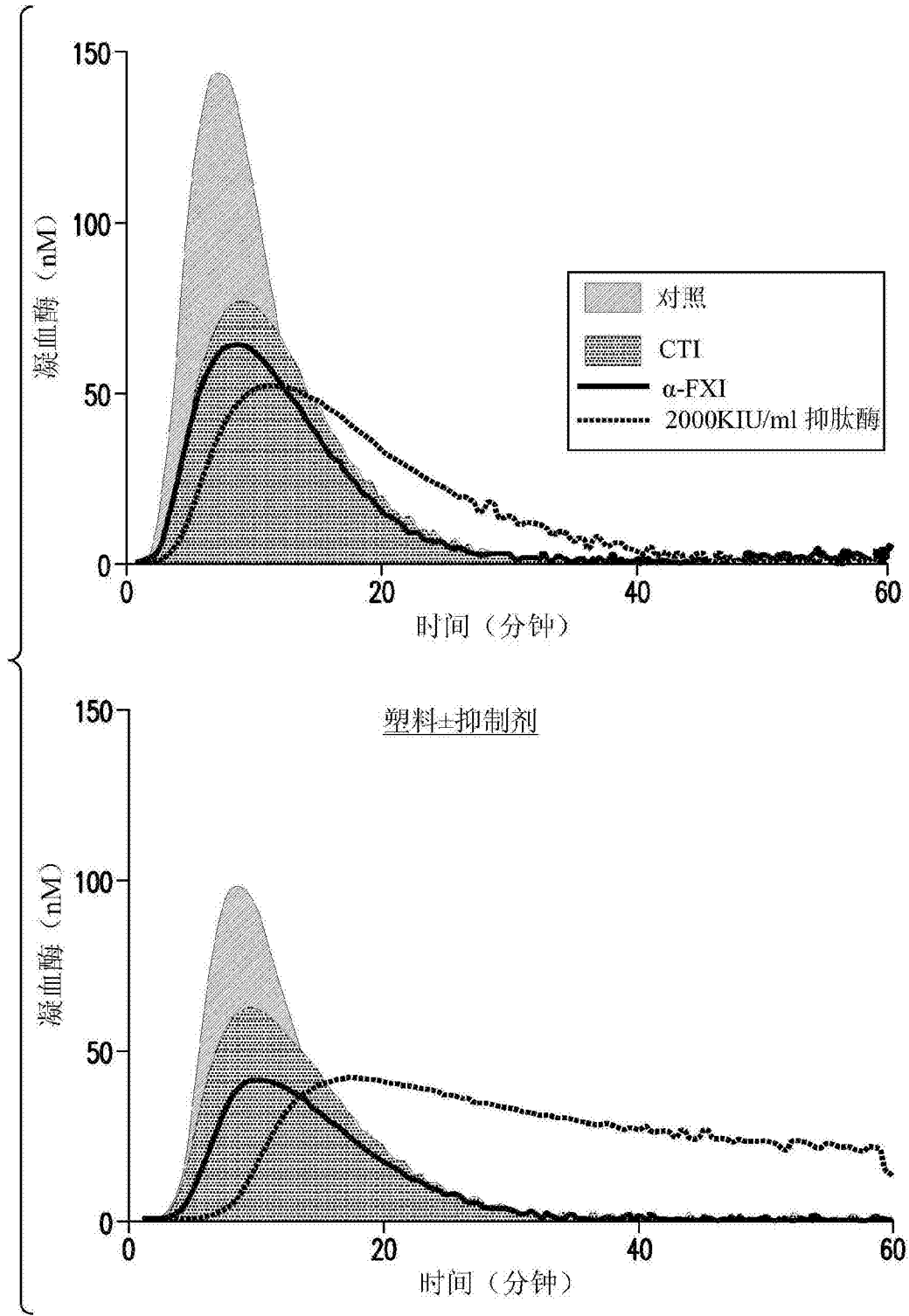


图 7