

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
C12M 3/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680022849.2

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101208603A

[22] 申请日 2006.4.14

[21] 申请号 200680022849.2

[30] 优先权

[32] 2005.4.28 [33] US [31] 11/119,360

[86] 国际申请 PCT/US2006/014136 2006.4.14

[87] 国际公布 WO2006/115844 英 2006.11.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.24

[71] 申请人 阿库米特里克斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 肖恩·麦克休 丹尼斯·德宾

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元

权利要求书 3 页 说明书 13 页

[54] 发明名称

用于在血小板功能测定中稳定花生四烯酸的方法和系统

[57] 摘要

本文提供的方法和系统利用可以室温保存的基于花生四烯酸的一次性使用测定设备快速确定由于使用阿司匹林导致的全血中血小板抑制的水平。所使用的冻干测定试剂含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸。相同冻干测定试剂内的抗氧化剂可降低花生四烯酸的氧化速度，但不干扰血小板的功能。在封装密封后，一次性使用测定设备封装内的氧吸收剂在短期内产生惰性环境。该测定设备的外罩具有多个通道和一个与多个通道的每一个偶连的共用血液样品入口。该测定设备还可以包括冻干测定试剂，其含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸。

1. 用于测量血小板功能的方法，包括：  
提供冻干测定试剂，其包含浓度足以激活血小板的花生四烯酸；  
利用相同冻干测定试剂内的抗氧化剂，其降低花生四烯酸的氧化速率，  
且不干扰血小板功能；  
利用氧吸收剂，其在一次性使用测定设备封装内具有足够的能力；和  
在一次性使用测定设备封装后，在短时期内产生惰性环境。
2. 根据权利要求1的方法，其中冻干测定试剂与涂布了 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒一起使用。
3. 根据权利要求1的方法，进一步包括：  
利用试剂，其包括涂布有可导致血小板特异凝集的化合物的颗粒。
4. 根据权利要求3的方法，其中所述化合物选自：血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。
5. 根据权利要求4的方法，其中 GPIIb/IIIa 受体配体选自：纤维蛋白原、单克隆抗体 10E5、单克隆抗体 c7E3、冯·威利布兰德因子、纤粘连蛋白、玻璃粘连蛋白、具有精氨酸甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的配体和其他模拟这一序列的肽或肽模拟物。
6. 根据权利要求3的方法，其中颗粒的尺寸为大约 0.1 微米-大约 20 微米。
7. 根据权利要求3的方法，其中颗粒的尺寸为大约 0.1 微米-大约 10 微米。
8. 根据权利要求3的方法，其中颗粒的尺寸为大约 1 微米至不超过 8 微米。
9. 根据权利要求3的方法，其中颗粒的密度为大约 0.7g/ml -大约 1.5g/ml。
10. 根据权利要求3的方法，其中颗粒是功能化的或可功能化的以共价结合。
11. 根据权利要求3的方法，其中所述化合物涂布在颗粒上。
12. 根据权利要求11的方法，其中所述化合物通过共价结合涂布在颗粒上。

13. 根据权利要求3的方法，其中在化合物分子与颗粒的结合中，控制化合物分子与颗粒的比例。
14. 根据权利要求3的方法，其中所述颗粒具有吸附阻断区。
15. 根据权利要求3的方法，其中所述颗粒包含指示物。
16. 根据权利要求15的方法，其中所述指示物是用于检测目的的部分。
17. 根据权利要求3的方法，其中所述颗粒包含至少一种在红外区吸收的染料。
18. 根据权利要求1的方法，其中所述样品至少部分是溶液。
19. 根据权利要求1的方法，其中所述样品是包含血小板的体液。
20. 根据权利要求19的方法，其中分析的样品量为大约30 $\mu$ l至5000 $\mu$ l至300 $\mu$ l。
21. 根据权利要求19的方法，其中所述样品用介质处理。
22. 根据权利要求21的方法，其中所述介质是水介质。
23. 根据权利要求22的方法，其中极性共溶剂与水介质一起使用。
24. 根据权利要求21的方法，其中所述介质包含至少一种缓冲液。
25. 根据权利要求24的方法，其中所述介质的pH为大约2-大约11。
26. 根据权利要求24的方法，其中所述介质的pH为大约4-大约9。
27. 根据权利要求21的方法，其中所述介质的体积为大约25-大约500微升。
28. 根据权利要求21的方法，其中所述介质的体积为大约75-大约250微升。
29. 根据权利要求21的方法，进一步包括：  
孵育所述样品和介质，以使颗粒凝集。
30. 根据权利要求29的方法，进一步包括：  
测量颗粒的凝集以测定血小板功能活性。
31. 根据权利要求29的方法，其中所述样品和介质在至少25 $^{\circ}$ C的温度下孵育。
32. 根据权利要求29的方法，其中所述样品和介质在大约30-40 $^{\circ}$ C的温度下孵育。
33. 根据权利要求30的方法，进一步包括：  
将测得的颗粒凝集与已知血小板功能活性的标准进行比较。

34. 根据权利要求 30 的方法，其中以红外线透射过样品的增加检测颗粒的凝集。

35. 用于测量血小板功能的测定设备，包括：

外罩，其具有多个通道和一个共用血液样品引入口，其与多个通道的每一个偶连；和

多种试剂，每种试剂置于分离的通道内，该多种试剂包括冻干测定试剂和相同冻干测定试剂内的抗氧化剂，测定试剂含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸，抗氧化剂可降低花生四烯酸的氧化速率，且不干扰血小板的功能。

36. 根据权利要求 35 的设备，其中测定设备是一次性使用的。

37. 用于测量血小板功能的测定设备，包括：

含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸的冻干测定试剂；

相同冻干测定试剂内的抗氧化剂，其可降低花生四烯酸的氧化速率，且不干扰血小板的功能；

氧吸收剂，其在测定设备封装内具有足够的能力；和

封装，其产生测定设备的惰性环境。

38. 根据权利要求 37 的设备，其中测定设备是一次性使用的。

## 用于在血小板功能测定中稳定花生四烯酸的方法和系统

### 技术领域

本发明涉及用于稳定花生四烯酸(AA)的方法和系统，更特别地，涉及用于在一次性使用血小板功能测定中稳定 AA 的方法和系统。

### 背景技术

血小板在哺乳动物生理上的作用是非常多样的，但是它们的主要作用是促进止血。在许多情况下，希望评估血液凝结的能力，这是一个经常受血小板粘附和/或凝集的能力控制的参数。因此，人们关心的是评估血小板的粘附功能。例如，感兴趣的问题包括是否施用阻止或促进凝块形成的药物，或者是否在外科手术进行之前检测血小板的功能缺陷。同样感兴趣的是评估被测试作为新药或者用于患者作为批准临床治疗的血小板抑制剂的有效性。

血小板凝集在血栓症和急性冠状动脉疾病病理中发挥关键作用。有证据表明，在响应各种抗血小板药剂时，血小板功能存在显著的变异性。特别地，阿司匹林由于其在患有急性冠状动脉综合征(ACS)的患者中的抗血小板效果而被广泛使用。阿司匹林在 ACS 中的临床受益，部分是由于其能够通过环氧合酶 1(COX-1)的不可逆乙酰化，从而抑制血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)，其已知可导致血小板凝集。

血小板凝集是用于描述血小板彼此结合的术语。体外血小板凝集测定是用于评估血小板在体内形成产生初级止血栓的凝聚体的能力的实验室方法。在这一技术中，抗凝全血样品在多重条件下离心，同时产生富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP)样品。然后，向 PRP 添加凝集剂，与此同时，光学监视血小板的凝集，用 PPP 样品进行单独的光学测量。然后，使用 PPP 通道作为 100%凝集参照水平，与 PRP 通道进行比较，确定凝集百分比。

Helena Laboratories(Beaumont, TX)，实验室血小板凝集计系统制造商，提供的教育文献建议根据测试目的选择合适的凝集剂。为了评估阿司匹林

对血小板功能的影响, Helena Laboratories 声明, “花生四烯酸血小板凝集测定是监视阿司匹林治疗效果的唯一可行方法, 现在已广泛用于防止中风和心脏病发作。” Helena Laboratories, Evaluation of Platelet Function Wall Chart 586-25。花生四烯酸是存在于人类血小板颗粒和膜内的脂肪酸。Marcus AJ: Platelet lipids. 见 Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW: Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice, pg472. JB Lippencott 公司, Philadelphia, 1982。它从磷脂释放, 在环氧合酶 1(COX-1)的存在下, 结合氧, 形成内过氧化物前列腺素 G<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>)。随后, PGG<sub>2</sub> 迅速转变成前列腺素 H<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>), 其进一步变成血栓素 A<sub>2</sub>, 一种血小板凝集的潜在诱导物。摄入阿司匹林或含阿司匹林的化合物抑制 COX-1 介导的氧消耗, 从而阻止所有随后导致血小板凝集的事件发生。Bye A, Lewis Y, O’Grady J: Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. Br J Clin Pharmac 7; 283,1979。

在体外向正常富血小板血浆添加花生四烯酸会导致氧消耗激增, 血栓素形成和血小板凝集。Moncada S, Vane JR: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. N Eng J Med 300:1142, 1979。然而, 当存在阿司匹林或含阿司匹林的化合物时, 这些反应消失。Ingerman CM, Smith S, Sedar A, Silver A, Silver MJ: Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency, Blood 52:332, 1978。

在临床环境下使用花生四烯酸的挑战是化合物的相对不稳定特性。当暴露于氧气时, 花生四烯酸会经历称作自然氧化的过程。自然氧化一般定义为通常在环境温度下发生的空气中的氧气与有机化合物之间的化学反应。自然氧化现象的普通实例是水果变褐、金属生锈和橡胶产品退化。自然氧化导致花生四烯酸迅速变黄和恶化。在一般实验室使用中, 花生四烯酸保存在-20℃的密封惰性安瓿中, 且一旦解冻, 建议在 24 小时内使用。Sigma-Aldrich 数据册 A9673 和 A8798。或者, 一些制造商将花生四烯酸的盐形式冻干, 但同样地, 材料必须保存在-20℃的密封惰性安瓿中, 且一旦打开立即使用。在临床环境中, 经常很少预先通知需要进行特殊的测试, 而且必须管理材料的解冻量和随后及时地使用材料既繁琐又费时。

花生四烯酸自然氧化的另一个方面与其用作血小板活化剂特别相关,

即花生四烯酸的体外自然氧化不一定产生与体内氧化相同的副产物，在一些情况下，会产生稳定的可模拟 TXA<sub>2</sub> 的副产物。在测定中使用以这种方式降解的花生四烯酸评估阿司匹林的效果，会错误地指示阿司匹林对血小板凝集没有作用。

自然氧化现象可通过完全排除氧气或其他氧化性物质加以防止，但是一般并不实际。相反，更有代表性的做法是使用抑制剂，其降低反应速度或延长诱导时间。然而，不可能完全防止自然氧化。能够抑制自然氧化的物质称作抑制剂或抗氧化剂。预防性抑制剂通过抑制初始反应的速度降低自然氧化速度。真正意义上的抗氧化剂是能够抑制传播步骤的物质，也就是说，它们干扰自然氧化链反应是因为它们在给出其电子后仍然处于稳定的构型。抗氧化剂一般用于食物储藏，防止食物腐臭、变褐色或产生黑斑。抗氧化剂还使对一些重要氨基酸的损坏及一些维生素的损失最小化。食物中两种常用类型的抗氧化剂是酸和酚类化合物。酸抗氧化剂的实例是抗坏血酸和柠檬酸，而酚类抗氧化剂化合物包括 BHA、BHT、TBHQ、维生素 E、卵磷脂、THBP、Gum 和甘氨酸。

由于难以保存和处理，目前还没有临床血小板功能分析仪使用花生四烯酸测量血小板对阿司匹林的响应。相反，诸如 Dade Behring PFA-100® 或 Plateletworks® 系统使用血小板活化剂例如二磷酸酰苷(ADP)、胶原和肾上腺素的组合。然而，这些系统对检测阿司匹林削弱血小板功能的灵敏度和特异性差，因为它们的活化激动剂对阿司匹林靶向的途径不特异。最初 Accumetrics's VerifyNow™ 阿司匹林测定使用阳离子没食子酸丙酯(cPG)作为血小板激动剂。cPG 通过导致从磷脂层释放血小板结合的花生四烯酸激活血小板，并且显示沿着阿司匹林靶向的途径敏感而特异地激活血小板。Steiskal 等人, Application of Cationic Propyl Gallate as Inducer of Thrombocyte Aggregation For Evaluation of Effectiveness of Antiaggregation Therapy。然而，使用 cPG 的限制在于，当在全血中对抗 PRP 使用时，血小板的激活不持久，这可能是由于红细胞对正电荷的影响造成的。

最近，美国专利号 5,763,199 开发和描述了一种快速血小板功能测定方法。该测定方法确定未稀释全血中的糖蛋白(GP)IIb/IIIa 受体阻断。当球珠与含有具有未阻断的已激活 GPIIb/IIIa 受体的血小板的全血接触时，导致涂布有 GPIIb/IIIa 配体如纤维蛋白原的小聚合体球珠凝集。没有凝集表明没有

GPIIb/IIIa 受体激活和/或 GPIIb/IIIa 受体阻断。在优选实施方案中，添加血小板激动剂，如花生四烯酸，使测定能够足够快速和方便地在床边执行，并且若激活受体没有被阻断时，使小聚集体球珠在一个方便的、已知的时期内凝集。该测定方法包括能够将待测试血液从收集容器转移到测定设备，而无需打开收集容器。

需要有一种利用可以在室温保存多个月的一次性使用的基于花生四烯酸的测定设备用于快速确定由于阿司匹林使用导致的全血中血小板抑制水平的方法。

### 发明内容

因此，本发明的目的在于提供利用可以在室温下保存多个月的一次性使用的基于花生四烯酸的测定设备用于快速确定由于阿司匹林使用导致的全血中血小板抑制水平的方法和系统。

本发明的这些和其他目的在用于生产用于测量血小板功能的一次性使用测定设备的方法中实现。使用冻干的测定试剂，其含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸。相同冻干测定试剂内的抗氧化剂可降低花生四烯酸的氧化速度，但不干扰血小板的功能。在封装密封后，该一次性使用测定设备封装内具有足够能力的氧吸收剂以在短期内产生惰性环境。

在本发明的另一个实施方案中，用于测量血小板功能的测定设备的外罩具有多个通道和一个与多个通道的每一个偶连的共用血液样品引入口。包含多种试剂。每一种试剂位于分离的通道内。该多种试剂包括，含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸的冻干测定试剂，和相同冻干测定试剂内降低花生四烯酸氧化速度但不干扰血小板功能的抗氧化剂。

在本发明的另一个实施方案中，提供了用于测定血小板功能的测定设备，其包括含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸的冻干测定试剂。相同冻干测定试剂内的抗氧化剂可降低花生四烯酸的氧化速度，但不干扰血小板的功能。氧吸收剂在测定设备封装内具有足够的能力。封装可短期内在测定设备内产生惰性环境。

### 优选实施方案详细说明

在本发明的各种实施方案中，在测定环氧合酶-1(COX-1)拮抗剂，包括

但不仅限于，阿司匹林，对全血样品中的血小板凝集的抑制时，使用花生四烯酸的组合物作为活化剂。因此，前述的组合物可用于确定抗血小板疗法的效果，包括用阿司匹林对患者进行治疗。上述组合物可以和涂布有 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒和任何其他进行 COX-1 抑制剂如阿司匹林功效测定必需的试剂结合使用。

可使用的冻干试剂组合物包括前述的活化剂组合物和颗粒。在一个实施方案中，定容的待测样品，如全血，与冻干试剂机械混合。监视光透射变化，并计算血小板活性指数。在一个实施方案中，全血样品与前述的冻干试剂在试管或成套药筒中结合。可利用装置执行测定。该装置可以包括用于接收样品的槽(well)，槽包含冻干试剂和其他用于执行测定的试剂。额外的试剂可以是各种缓冲液和/或冻干稳定剂等。

在一个实施方案中，样品受到花生四烯酸(AA)拮抗剂的影响。例如，样品可能来自接受阿司匹林治疗的患者。在本发明的一个实施方案中，在测定介质中提供一种组合，其中该组合是样品和由 AA 与抗氧化剂稳定剂构成的组合物，抗氧化剂稳定剂包括但不限于，抗坏血酸等。AA 的终浓度可以是 0.5-10 mM，优选地，0.75-2 mM，且抗坏血酸的终浓度可以是 1-30 mM，且优选地，5-15 mM。

可利用的试剂包括涂布有化合物的颗粒，该化合物可导致血小板特异凝集，也就是，通过血小板上的受体与颗粒上的化合物之间的特异相互作用导致的血小板凝集。合适的化合物包括，仅作为举例而无限制，血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体，GPIIb/IIIa 受体配体可以是与血小板表面上的 GPIIb/IIIa 受体结合、络合或相互作用的有机小分子、多肽、蛋白质、单克隆抗体或核酸。当血小板表面上的 GPIIb/IIIa 受体与颗粒上的 GPIIb/IIIa 受体配体结合、络合或相互作用时，导致血小板介导的颗粒凝集。合适的 GPIIb/IIIa 配体包括纤维蛋白原、单克隆抗体 10E5(Coller, 等人, J. Clin. Invest. 72:325(1983)), 单克隆抗体 c7E3(The EPIC Investigators, N.E. Journal of Med., 330:956(1994)), 冯·威利布兰德因子，纤粘连蛋白，玻璃粘连蛋白，和其他具有精氨酸甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的配体或其他模拟这一序列的肽或肽模拟物(peptidomimetics)(Cook, 等人, Drugs of the Future 19:135(1994))。其他感兴趣的化合物包括凝血酶抑制剂、低分子量肝素等等。

附有化合物的颗粒至少为大约 0.1 微米，且不大于约 20 微米。在一个

实施方案中，颗粒为大约 0.1 微米-大约 10 微米。在另一个是实施方案中，颗粒至少大约 1 微米，且小于大约 8 微米。颗粒实际上可以是任何形状，但一般是具有均匀直径的球。颗粒可以具有任何密度，在一个实施方案中，密度接近水，一般从大约 0.7-大约 1.5g/ml。颗粒的表面可以具有或不具有电荷，可以是正或负电荷，优选地是负电荷。颗粒是功能化的或可功能化的，在其表面直接或间接地共价结合或附着这类成员。

颗粒可以是固体(例如由有机和无机聚合物或乳胶构成)、油滴(例如碳氢化合物、碳氟化合物、硅液(silicon fluid))、或囊泡(例如合成的，如磷脂，或天然的，如细胞和细胞器)。固体颗粒通常是聚合物，或者是加成聚合物或者是缩合聚合物，其容易分散在液体介质中。可悬浮颗粒的实例包括，但不仅限于，聚合物材料，如乳胶、脂双层、油滴、细胞和水凝胶。其他的颗粒组合物包括，但不仅限于，聚合物，如硝化纤维、醋酸纤维素、聚(氯乙烯)、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚对苯二甲酸乙酯、尼龙、聚丁酸乙烯酯、多糖如葡聚糖和修饰的葡聚糖等；它们或者单独使用，或者与其他材料联合使用。固体颗粒可以是聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、均聚物、和丙烯酸酯与甲基丙烯酸酯衍生物的共聚物，特别是酯和酰胺类、聚硅氧烷等。

该化合物涂布在颗粒上，经常通过共价结合至颗粒。这种共价结合可以通过众所周知的技术实现，一般可在文献中获得。见例如 "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, New York(1978)和 Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059(1970)。简而言之，如上所述，颗粒的表面可以是多功能的，或者能够被多功能化。可获得或可以加入大量种类的官能团。官能团包括羧酸、醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。将大量化合物连接到表面的方式是众所周知的，在文献中(见上文)有详细说明。侧链成员的结合可以通过键合直接结合，或者通过中间连接基团间接结合。连接基团的长度可以有很大差异，取决于侧链成员和颗粒的特性。

在将化合物分子结合到颗粒上时，化合物分子与颗粒的比例受到控制。在一个实施方案中，颗粒表面上功能化位点的数目通过调节引入颗粒表面上这些位点的数目加以控制。选择地，或者与前述结合地，化合物分子与颗粒的比例可以通过调节用于结合的反应介质中化合物的浓度加以控制。

本发明使用的颗粒试剂可以用足量的材料加以处理，以阻断颗粒上的

吸附面积。这些材料不影响颗粒的功能。阻断材料包括，但不仅限于，蛋白质，如牛血清白蛋白、牛血清丙种球蛋白等，多糖，如葡聚糖等。在另一个可以和上述联合使用的实施方案中，采用的颗粒中，用于结合的功能化位点的数目大大减少颗粒表面的吸附面积。

颗粒可以包括指示物，或者结合在其上面，或者整合在其中。指示物可以是任何可用于检测目的的部分。指示物经常是信号产生系统的一部分。指示物能够直接或间接地被检测。指示物可以是同位素或非同位素，通常是非同位素，且可以是染料、荧光分子、化学发光分子、催化剂如酶、编码催化剂的多聚核苷酸、启动子、辅酶、酶底物、放射性基团、有机小分子、可放大的多聚核苷酸序列等。

在本发明的一个特定实施方案中，颗粒包含一种或多种吸收红外线的染料。这些染料包括菌绿素、菌绿非汀(bacteriochlorophytin)、部聚甲炔(meropolymethine)染料、苯并轮烯(benzoannulenes)、插烯卟啉(vinylogous porphyrins)、聚甲炔染料、花青和部花青等。具体的染料包括铜(II)-四-叔丁基-四(二甲基氨基)-29H-31H-酞菁和氧钒基-四-叔丁基-四(二甲基氨基)-29H-31H-酞菁。所选的特殊染料具有如下特征之一：方便、可获得、稳定、与颗粒兼容等。这些染料可以通过聚合或被动吸收直接整合到颗粒中。染料可以单独(也就是顺次)或组合(也就是同时)装载。或者，染料可以和链接组分一起连接到球珠上，从而使它们不会从表面滤去。不考虑所用的装载方法，其条件使得颗粒表面关于适当条件下的凝集能力不受影响。

染料能够吸收大约 750nm-900nm 的光线，特别是大约 750nm-850nm 的光线。对于具有高水平血红细胞的样品，光线为大约  $800\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ，其是氧合血红蛋白和还原血红蛋白的等消光点。与颗粒一起使用的染料的量随着染料在目的光范围内的消光系数、所需测定灵敏度、颗粒的尺寸、染料与颗粒结合的模式、染料与颗粒基质的兼容性等而变化。掺合的染料量可以为大约 1-20 重量百分比范围内，更通常地 5-15 重量百分比的范围内。合适的染料包括，但不仅限于，酞菁等。无金属的酞菁在大约 700nm( $\epsilon=162,000$ ) 吸收。金属络合物使吸收向更短或更长波长迁移，大多数金属使吸收向更短波长迁移，但是有一些，例如铅，使吸收波长大大长于无金属酞菁。

过渡金属与酞菁形成的络合物(金属酞菁和金属酞菁)的化学性质对光和热非常稳定。它们通过在合适金属的存在下邻苯二腈

(o-phthalodinitriles)的缩合形成的。除铜(Cu)和钒(V)之外,一些在形成金属酞菁时使用的金属是镁(Mg)、锌(Zn)和钴(Co)。

在本发明的一个具体实施方案中,采用具有平坦(flat)最大吸收的羧化微粒。这些微粒通过掺合多种在805nm附近具有不同最大吸收的染料制备的。这导致在780-820nm的宽阔波长范围内产生平坦的最大吸收光谱。

样品可以是任何合成的或天然的待分析溶液,其中样品受到COX-1拮抗剂,特别是阿司匹林的影响。术语样品包括来自宿主的生物组织,包括体液等。样品可以被直接检查,或者可以经过预处理。本发明特别应用于包含血小板的样品,包括体液,如全血、含血小板的血液组分如血浆等。在一个实施方案中,本发明特别应用于全血样品。样品的量取决于样品的本性。对于液体样品,例如抗凝全血,样品的量通常为大约30 $\mu$ l-5000 $\mu$ l,优选地大约100 $\mu$ l-300 $\mu$ l。术语“样品”包括直接来自患者的未处理样品,或者经过预处理并且在任何便利的液体介质,通常是水介质(例如柠檬酸钠)中制备的样品。

优选地,根据本发明用于执行测定的介质是水介质。介质中还可以使用其他的极性共溶剂,通常是1-6个,更通常是1-4个碳原子的氧合有机溶剂,包括醇、醚等。通常,这些共溶剂的存在量小于大约70重量百分比,更通常地,小于大约30重量百分比。而且,在根据本发明的方法中经常采用各种辅助材料。例如,在测定介质中通常存在缓冲液,以及测定介质和测定组分的稳定剂;表面活性剂,特别是非离子表面活性剂;结合增强剂,例如聚亚烷基二醇;等等。

介质的pH范围可以是大约2-大约11,优选地,大约4-大约9。可使用各种缓冲液获得期望的pH,并且在方法的时期内保持pH。缓冲液的实例包括HEPES、硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、Tris、巴比妥等。所用的特殊缓冲液对于方法而言并不是至关重要的,但是在某些环境下,一种缓冲液可能比其他的更优选。在一些环境下,HEPES是优选的,其浓度为大约0.05M至大约0.001M,但是一般浓度为大约0.01M。

测定介质的体积可以是大约25-大约500微升,通常为大约75-大约250微升。测定可以在任何合适的容器内执行。方便地,容器是试管或药筒,与用于执行测定和测量测定结果的装置一起使用。反应容器通常含有根据本发明的激活引发物,呈冻干的形式,与其他试剂如颗粒试剂等、稳定剂

等一起使用。

在颗粒凝集的条件下孵育样品和颗粒试剂的组合。通常采用适度的温度执行该方法。温度可以是恒定的或可以变化。通常，在反应步骤期间采用恒定的温度。所采用的温度可以是大约 10-大约 80°C，更通常地为大约 15-大约 45°C，优选地，温度至少为 25°C，更优选的范围是大约 30-大约 40°C，通常为大约 37°C。

确定颗粒的凝集程度，并且与样品中成员的存在和/或量相关。凝集的存在可以通过视觉观察颗粒的团集加以确定，其可指示凝集。优选地，如上所述，颗粒可被着色，以帮助视觉观察基质的凝集或团集。凝集的程度可以通过观察介质的光密度变化速度等以分光光度、比浊度、浊度等加以测量。

在本发明的具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与涂布有纤维蛋白原的颗粒和由 AA 与抗坏血酸构成的组合物形成的测定介质一起保存在合适的容器内，例如反应试管。颗粒试剂的颗粒中掺合有一种或多种红外染料。将该组合置于凝集条件下。然后，用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，透射的水平与血小板的功能活性相关。

所选凝集介质具有~800nm 的高吸收。凝集介质吸收系数与全血吸收系数之间的比值在 800nm 下优选地大于大约 4:1。特殊测定的吸收比同时是测定样品中凝集介质吸收系数和凝集介质浓度的函数。

在样品与试剂组合之后，可对其加热至高于室温但低于会影响测定的温度，以保证温度控制不会对测定结果造成不利影响。理想地，温度至少为 25°C，优选地在 30-40°C 的范围内，更优选地大约 37°C。在试剂与样品组合及反应期间，通常温和地搅拌反应介质。搅拌足以实现和保持测定样品的均一性。从 0 时(混合时)开始读数的总时间可以从大约 10 秒-10 分钟，更通常地大约 30 秒-8 分钟，优选地大约 30 秒-3 分钟。数据可以用任何方便的方法进行分析，特别是使用能够操纵涉及校准物和/或控制子数据的算法。

凝集的水平指示测试样品中血小板的功能活性。凝集水平可以和已知血小板功能活性进行比较。通常，结果与校准物进行比较，其可以伴随执行，或者事先执行，或者提供作为标准曲线。

本发明的方法可以和血小板计数测定一起执行，例如美国专利申请系列号 09/177,884 中描述的，其于 1998 年 10 月 23 日提交(‘884 申请)，本文引用其相关公开作为参考。

上述测定可以优选地在设备内执行，该设备可以允许发生根据本发明的反应并测量其结果。该仪器能够根据被激活血小板结合纤维蛋白原的能力评估血小板的功能。因为被激活的血小板结合并凝集纤维蛋白原涂布的颗粒，光透射增加。一般地，测量测定结果的仪器能够测量凝集。优选地，该仪器测量由于凝集引起的光信号变化。合适的仪器包括，仅作为举例而无限意义，动力学分光光度计，Ultegra System®仪器(从 Accumetrics, San Diego, CA 商业获得)，并且用于正常样品快速测量血小板功能活性测量)等。

Ultegra® System 仪器是一种基于浊度分析的光学检测系统，根据光透射的增加测量血小板诱发的凝集。系统包括分析仪、一次性药筒和控制器。药筒包含基于微粒凝集技术的试剂。质量控制系统包括电子控制器、两种级别的测定“湿”控制器(WQC)、药筒内湿度传感器、封装内温度指示器、和用于使两个测定通道同时作用的测试器(test)。分析仪控制测定次序，建立测定温度，控制所需持续时间的试剂-样品混合，确定血小板功能程度，显示结果和执行自我诊断。为了用于本发明，系统的测试药筒包含冻干的制剂(其包括具有共价结合的 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒)、由 AA 与抗坏血酸构成的组合物和缓冲液。患者样品通常是柠檬酸化的全血，其通过分析仪自动从血液收集管分配到药筒内，无需使用者进行血液操作。通过颗粒的红外吸收特性监视相互作用。随着颗粒与颗粒的相互作用，通过 Ultegra™ 分析仪的光学系统测量颗粒的凝集。凝集根据红外线透射过样品的增加进行检测。分析反应动力学，并转换成“阿司匹林响应单位”，ARU。

在本发明的另一个实施方案中，提供了一个试剂盒，包括冻干制剂、AA 和抗坏血酸的组合物和缓冲液的封装组合，该冻干制剂包括具有共价结合纤维蛋白原的颗粒。冻干制剂可以放在反应容器中，例如分析仪器使用的药筒。对于 Ultegra® System，冻干制剂可以放置在分析仪使用的四槽药筒的外槽内。试剂盒还可以包括样品收集容器和/或用于执行本方法的设备。试剂的相对量可以有很大的变化，以便在试剂溶液中提供可大大优化测定灵敏度的浓度。

适当情况下，试剂可以放置在气密的封装内，以保持任何试剂的活性。

封装可以是例如用基本上不能透过湿气的材料制成的囊、袋等。这些材料包括，作为举例但无限制，塑料、铝箔等。而且，封装可以包含干燥剂袋和氧吸收剂，以保持干燥无氧的环境。氧吸收剂可以是如来自 MGC 的 Pharmakeep KC-20 或类似物。氧吸收剂应具有 1-50ml，理想地 20-30ml 的吸收能力。对于血液样品，试剂盒还包括用于穿刺人皮肤、消毒的或灭菌的垫等物件。试剂盒还可以包括校准物和标准物。

试剂盒可以包括执行本发明测定必需的试剂。在一个实施方案中，试剂盒包括血瓶和缓冲液，缓冲液将测试血液样品的 pH 和盐浓度保持在适合于涂布了血小板 GPIIb/IIIa 受体配体的固体表面和小聚合物球珠进行血小板介导的凝集的范围。缓冲液可以处于溶液中，或者只由缓冲组合物和盐构成，在向其添加已知量水可提供期望的缓冲液。任选地，试剂盒还可以包括抗凝剂。在一个实施方案中，缓冲液是 HEPES；抗凝剂是柠檬酸盐；GPIIb/IIIa 受体配体是纤维蛋白原；小聚合物球珠是聚丙烯腈或羧化聚苯乙烯，其中肽 GPIIb/IIIa 受体配体，如纤维蛋白原，通过肽的 N 端与球珠表面 N-羟基琥珀酰亚胺或羧基之间的共价键共价地结合在球珠表面，在进一步的实施方案中，试剂盒额外包括血小板活化剂，如 AA。

在本发明的一个实施方案中，提供了含有 AA 的一次性使用测定试剂，其可以在室温下保存达 3 个月或者更长。

### 实施例 1

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。化合物是抗血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。将组合置于凝集条件下。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 2

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集

的化合物的颗粒。化合物是血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体，GPIIb/IIIa 受体配体选自：纤维蛋白原、单克隆抗体 10E5、单克隆抗体 c7E3、冯·威利布兰德(von Willebrand)因子、纤粘连蛋白、玻璃粘连蛋白、具有精氨酸甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的配体和其他模拟这一序列的肽或肽模拟物。颗粒中掺入一种或多种红外染料。将组合置于凝集条件下。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 3

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。分析的样品量是大约 30 $\mu$ l 至 5000 $\mu$ l 至 300 $\mu$ l。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。化合物是抗血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。将组合置于凝集条件下。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 4

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。该化合物是血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。提供缓冲液，其 pH 为大约 2-大约 11。将组合置于凝集条件下。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 5

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。该化合物是抗血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。测定介质的体积为大约 25-大约 500 微升。将组合置于凝集条件下。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 6

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。该化合物是抗血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。将组合置于凝集条件下，在至少 25°C 的温度下进行孵育。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其中透射水平与血小板功能活性相关。

### 实施例 7

在本发明一个具体实施方案中，对来自经过阿司匹林治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。样品与试剂一起形成测定介质，整合在合适的容器内，例如反应试管，该试剂包括涂布有可导致特异血小板凝集的化合物的颗粒。化合物是抗血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体。颗粒中掺入一种或多种红外染料。将组合置于凝集条件下，在至少 25°C 的温度下进行孵育。使用 Ultergra® System 用红外区光线照射介质。确定测定混合物的红外线透射，其透射水平与血小板功能活性相关。根据红外线透射过样品的增加检测颗粒的凝集。

本发明实施方案的前述说明是出于举例和描述的目的提供的。其并不试图是详尽的，或将本发明限制在公开的确切形式。显然，本领域的技术人员可以显见各种修改和变化。本文意图，发明的范围由随后的权利要求及其等价物限定。

专利名称(译)	用于在血小板功能测定中稳定花生四烯酸的方法和系统		
公开(公告)号	<a href="#">CN101208603A</a>	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200680022849.2	申请日	2006-04-14
[标]发明人	肖恩麦克休 丹尼斯德宾		
发明人	肖恩·麦克休 丹尼斯·德宾		
IPC分类号	G01N33/53 C12M3/00		
CPC分类号	G01N33/88 G01N33/86		
优先权	11/119360 2005-04-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本文提供的方法和系统利用可以室温保存的基于花生四烯酸的一次性使用测定设备快速确定由于使用阿司匹林导致的全血中血小板抑制的水平。所使用的冻干测定试剂含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸。相同冻干测定试剂内的抗氧化剂可降低花生四烯酸的氧化速度，但不干扰血小板的功能。在封装密封后，一次性使用测定设备封装内的氧吸收剂在短期内产生惰性环境。该测定设备的外罩具有多个通道和一个与多个通道的每一个偶连的共用血液样品引入口。该测定设备还可以包括冻干测定试剂，其含有浓度足以最大激活血小板的花生四烯酸。