



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101720432 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200880020722.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.20

G01N 27/02(2006.01)

G01R 27/08(2006.01)

(30) 优先权数据

60/945,290 2007.06.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/067750 2008.06.20

(87) PCT申请的公布数据

W02008/157795 EN 2008.12.24

(71) 申请人 MEC 戴内米克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伊曼纽尔·C·埃姆帕克

威尔玛·曼甘

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

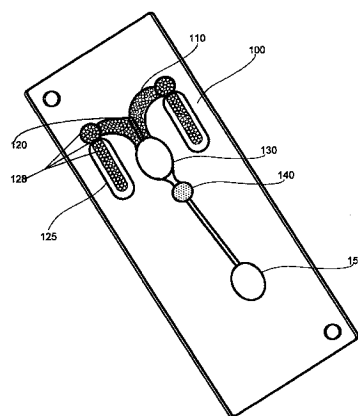
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

测量凝血的方法和装置

(57) 摘要

本发明提供了执行分析以测定血液样品凝结所需时间的装置和方法。装置包含涂有一种或多种凝血剂的反应室。将一滴血液或等同物放置在加样端口上,稀释,并与反应室中的凝血剂接触。稀释后的血样可以通过反应室前后移动,直到血液凝结。凝血过程形成的纤维蛋白架阻止了血样流入反应室。凝血时间是从样品进入反应室到反应室中的波形发生变化、或样品的运动或流动停止时的总时间,可以通过浊度来测量。



1. 一种盒,其含有两个反应室、血液储存槽、参比端口和加样端口,其中两个反应室通过毛细管通道与血液储存槽流体连通,血液储存槽通过毛细管通道与参比端口流体连通,参比端口通过毛细管通道与加样端口流体连通,并且其中储存槽包括用于移动毛细管通道内样品的薄膜。

2. 权利要求 1 的盒,其中基材选自塑料、玻璃、尼龙、金属及其组合。

3. 权利要求 2 的盒,其中基材是塑料。

4. 权利要求 1 的盒,其中反应室含有凝血剂。

5. 权利要求 4 的盒,其中凝血剂用于选自下面的分析:凝血酶原时间 (PT)、部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)、活化的部分促凝血酶原激酶时间 (APTT)、凝血酶凝血时间 (TCT)、纤维蛋白原、肝素管理测试 (HMT)、鱼精蛋白响应时间 (PRT)、肝素响应时间 (HRT)、低分子量肝素 (LMWH)、低范围肝素管理测试 (LHMT)、蛇静脉酶凝血时间 (ECT) 及其组合。

6. 权利要求 5 的盒,其中分析是 PT。

7. 权利要求 5 的盒,其中分析是 APTT。

8. 一种用于测定凝血时间的方法,所述方法包括:

提供包含两个反应室、血液储存槽、参比端口和加样端口的盒,其中两个反应室通过毛细管通道与血液储存槽流体连通,血液储存槽通过毛细管通道与参比端口流体连通,参比端口通过毛细管通道与加样端口流体连通;

将样品放置在加样端口中;

将用于分析的凝血剂放置在至少一个反应室中;

将稀释剂经样品端口移动到混合孔中,并将样品与稀释剂混合以提供稀释的样品;

将样品移动到反应室中;以及

测定样品凝结的时间。

9. 权利要求 8 的方法,其中基材选自塑料、玻璃、尼龙、金属及其组合。

10. 权利要求 9 的方法,其中基材是塑料。

11. 权利要求 9 的方法,其中样品是血液或血浆。

12. 权利要求 8 的方法,其中反应室含有凝血剂。

13. 权利要求 12 的方法,其中凝血剂用于选自下面的分析:凝血酶原时间 (PT)、部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)、活化的部分促凝血酶原激酶时间 (APTT)、凝血酶凝血时间 (TCT)、纤维蛋白原、肝素管理测试 (HMT)、鱼精蛋白响应时间 (PRT)、肝素响应时间 (HRT)、低分子量肝素 (LMWH)、低范围肝素管理测试 (LHMT)、蛇静脉酶凝血时间 (ECT) 及其组合。

14. 权利要求 13 的方法,其中分析是 PT。

15. 权利要求 13 的方法,其中分析是 APTT。

16. 权利要求 8 的方法,其中样品凝结的时间通过光学方法测定。

17. 权利要求 8 的方法,其中样品凝结的时间通过浊度测量来测定。

18. 权利要求 8 的方法,其中储存槽包括用于移动毛细管通道内样品的薄膜。

19. 权利要求 8 的方法,还包括将稀释剂放置在储存槽中。

## 测量凝血的方法和装置

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2007 年 6 月 20 日提交的美国临时专利申请顺序号 60/945, 290 在 35U. S. C. § 119(e) 下的权益和优先权, 该临时专利申请在此以其全文引为参考。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及用于执行分析以测定样品中一种或多种分析物的存在、具体为测量凝血的微流体系统。

[0004] 发明背景

[0005] 凝血是一个复杂的过程, 涉及三种相互作用的组分: 血管, 凝血因子和血小板。存在两种已被很好认识的凝血途径: 外源性或促凝血酶原激酶控制的、以及内源性或凝血酶原 / 纤维蛋白原控制的凝血途径。外源性和内源性途径都导致凝血酶的产生, 这是一种催化纤维蛋白原向纤维蛋白转化的蛋白水解酶。可溶性血浆蛋白纤维蛋白原通过凝血酶的作用转化成不溶性纤维蛋白, 导致测试样品从液体变为凝结的形式。

[0006] 在临床分析测试中, 凝血分析测试测量纤维蛋白凝块形成所需的时间。有许多类型的凝血分析。它们包括凝血酶原时间 (PT)、部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)、活化的部分促凝血酶原激酶时间 (APTT)、纤维蛋白原分析、凝血酶凝血时间 (TCT)、活化凝血时间 (ACT) 和其它。两种最常用的凝血测试是 PT 和 APTT 分析。这两种测试都测量凝血时间, 以评估患者的基线止血状态或监测对抗凝剂疗法的反应, 以及凝血系统的总体功能和状态。

[0007] PT 测试用于评估外源性和共同途径凝血系统, 并用于监测长期抗凝剂疗法。长期抗凝剂疗法的常见药物是华法令异丙醇钠笼形包合物, 通常所知的商标名为 COUMADIN™, 由 Bristol Myers Squibb 销售。华法令及其类似物通过有效阻断维生素 K 依赖性凝血因子的生物合成, 来诱导抗凝作用。因为 PT 测试测量了凝血时间, 因此可以测定血液中抗凝剂的有效量。

[0008] 第二种常规使用的分析是 APTT 测试, 广泛用于监测肝素疗法, 以筛查包含在源性和共同凝血系统中的凝血因子的缺陷。肝素通过与被称为抗凝血酶 III 的血浆辅因子结合并形成复合物, 来发挥其抗凝作用。

[0009] 除了上述之外, FDA 已经批准了几种蛋白 C 分析进行临床应用, 它们广义上可以分成三种类型: 抗原性, 发色性 / 酰胺水解性, 和凝血测量。抗原性分析包括 ELISA、EIA 和 RIA 类型的测试。这些分析不确定蛋白是否具有功能, 因为抗体不针对与功能活性有关的表位。

[0010] 发色性 / 酰胺水解活分析依靠酶的活性位点裂解小的合成底物以释放出色彩鲜明的产物的能力。在活化的蛋白 C 对合成底物的活性与对天然生物学底物的活性之间可能存在差异。此外, 合成底物没有测试酶的其他功能特征 (即辅因子相互作用)。

[0011] 凝血测量分析需要在样品分析前产生标准曲线。样品需要首先稀释, 进行温育以活化蛋白 C, 然后启动凝血级联。使用凝血时间与蛋白 C 活性之间的标准曲线来内推未知样品的蛋白 C 活性。尽管在实验室程序中存在差异, 但当打开新的试剂批次、或当对照不在其规定的范围内时, 常规要对被测试的每组患者样品重复制作标准曲线。

[0012] 在这些方法的使用中存在许多缺点。例如,试剂对热敏感,在使用前需要冷藏。一旦将干燥的试剂复溶,它必须在几小时内使用,否则将丢弃。此外,实验室设备由于所用的技术复杂而相对较大,昂贵,并且由于检测方法的复杂性,被设计成由经过训练的人员来使用。此外,通常也需要大血样。因此,对于精确、方便和廉价地检测和测定凝血时间的分析系统,存在着需求。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了用于执行分析以测定血样凝结所需时间的装置和方法。装置包含涂有一种或多种凝血剂的反应室。将一滴血液或等同物放置在加样端口上,并与反应室中的凝血剂接触。任选,样品可以被稀释。接触可以通过任何方式,例如通过将盒沿着 x、y 和 z 轴倾斜。血样可以通过反应室前后移动,直到血液凝结。凝血过程形成的纤维蛋白丛(fibrin stands),阻止了血液样品的流动。凝结时间是从样品进入反应室到样品的运动或流动停止、或毛细管中产生的波幅从最初的无凝血状态发生改变时的总时间。

[0015] 在参考了下面的详细描述后,本发明的这些以及其它方面将变得了然。此外,在本文中提出的各种参考文献更详细地描述了某些程序或组合物,因此以其全文引为参考。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1 显示了用后即可丢弃条的透视图,其具有一组互连反应室和在一个室中的可移动元件。

[0018] 详细描述

[0019] 所有在本文中引用的出版物、专利和专利申请,不论是在上文还是下文中的,在此以其全文引为参考。

[0020] 除非另有指明,在本申请、包括说明书和权利要求书中使用的下列术语,具有下面给出的定义。必须指出,当用在说明书和随附的权利要求书中时,不带数量的指称物包括了复数形式,除非上下文明确有另外的表示。

[0021] 本文中使用的术语“对象”包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于哺乳动物纲的任何成员:人类,非人类灵长动物例如黑猩猩,以及其它猿和猴物种;农场动物例如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物例如兔、狗和猫;实验室动物包括啮齿动物,例如大鼠、小鼠和豚鼠等。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟、鱼等。该术语不指定具体的年龄或性别。

[0022] 本文使用的“固体支持物”是指固体表面,例如塑料板、磁珠、乳胶珠、微孔板的孔、玻璃板、尼龙、琼脂糖、丙烯酰胺等。

[0023] 本发明涉及测量凝血时间的方法和微流体装置。典型的微流体装置显示在图 1 中。装置含有盒 100,盒 100 具有涂有一种或多种凝血剂例如组织因子或其它凝血剂的反应室 110 和 120。反应室 110 和 120 可以通过一个或多个毛细管通道与血液储存槽 (blood reservoir) 130、不凝血参比端口 140 和加样端口 150 流体连通。将一滴血液或等同物放置在加样端口 150 上。任选,可以将稀释剂放置在储存槽 150 中,由此血样与稀释剂的混合可以任选提供稀释的血样。然后可以将血样与凝血剂在反应室 110 和 / 或 120 中接触。接触可以通过任何方式,例如通过机械移动储存槽 130 的薄膜,使得毛细管复合体中的样品可以以给定的频率和幅度,与薄膜致动器同步移位,或者通过将盒沿着 x、y 和 z 轴倾斜。血样可以通过反应室 110 和 120 前后移动,直到血液凝结。凝血过程形成的纤维蛋白架阻止了

血液样品的流动,也改变了由薄膜动作产生的波形的幅度。凝血时间是从样品进入反应室 110 和 120 到波形的幅度改变、和 / 或样品的运动或流动停止时的总时间。

[0024] 盒 100 可以是长方形、圆形、椭圆形或任何形状,并可以由适合的材料制成,所述材料根据其性质进行选择,例如良好的导热性、适于光透射的透明性、易于焊接的机械性质、允许均匀涂层和试剂稳定性的表面性质、以及对液体介质中性以防止对分析的干扰。为此,适合的塑料包括具有高的自由表面能和低的水吸附性的塑料,包括 PETG、聚酯 (Mylar®)、聚碳酸酯(Lexan®)、聚氯乙烯、聚苯乙烯、SAN、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯 (ABS),特别是由 Borg Warner 在商标名 Cicolac 下提供的 ABS,等等。可选地或等价地,可商购的模制盒可用于实施本发明。

[0025] 盒 100 可以具有涂有一种或多种凝血剂例如组织因子的反应室 110 和 120。每个反应室可以优选暴露于大气。在本发明的一个方面,反应室 110 和 120 可以具有遍布的障碍物 128。障碍物 128 可以是任何形状,例如圆筒或柱形,在它们之间具有空隙,允许血样前后流动,直到凝结。在本发明的另一方面,反应室 110 和 120 不具有障碍物 128。

[0026] 血样可以通过传统方式从患者获得,例如静脉穿刺或扎手指。样品可以通过加样端口 150 施加到盒 100 上。在本发明的一个方面,从患者获得的血样在本发明的方法和装置中无需附加的操作即可使用。或者,从患者获得的血样可以被处理,以完全或部分地除去红细胞。红细胞可以通过任何已知的方法移除,例如离心、将样品与红细胞凝集剂反应、或通过使用红细胞过滤器。在实施方法中使用血浆,可以通过例如允许成像系统更好地监测血液中发生的物理变化,例如纤维蛋白原物理聚合成纤维蛋白,来提供更好的准确度和精确性。

[0027] 在凝结前,血液或血浆可以任选用稀释剂进行稀释。稀释剂可以简单地是水性溶液,或者它可以是非水性溶液,并任选可以包含各种添加剂,例如盐、蛋白、糖、糖类、金属离子例如钙、镁、镧系元素等。某些稀释剂的配方可以包括含有明胶的组合物和乳液。稀释剂典型是缓冲溶液,例如柠檬酸缓冲液。稀释剂可以放置在储存槽 130、加样端口 150 或不凝血孔 140 中。

[0028] 然后将未稀释的样品或稀释过的样品移动到反应室 110 和 120 中,以便进行凝血分析。在本发明的一个方面,样品可以使用压力来移动。例如,储存槽 130 可以是与薄膜组合的弯曲元件,或柔性的、可压缩的、可紧缩的、可膨胀的或可压力移动的层或元件。薄膜的位置要使得薄膜的一个表面暴露于环境,而薄膜的第二个表面限定出储存槽 130 的内腔部分,薄膜的移动引起内腔中压力的改变。压力的改变引起血样进出反应室 110 和 120、以及进出不凝血参比端口 140 和加样端口 150 的运动。优选,储存槽 130 的薄膜可以机械运动,使得毛细管复合体中的血样以给定的频率和幅度位移。

[0029] 本发明的凝血分析包括凝血酶原时间 (PT)、部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)、活化的部分促凝血酶原激酶时间 (APTT)、凝血酶凝血时间 (TCT)、纤维蛋白原、肝素管理测试 (HMT)、鱼精蛋白响应时间 (PRT)、肝素响应时间 (HRT)、低分子量肝素 (LMWH)、低范围肝素管理测试 (LHMT) 和蛇静脉酶 (ecarin) 凝血时间 (ECT),这些测试每种的试剂都如本领域中所述。可以将用于一种或多种分析的试剂放置在一个或两个反应室 110 和 120 中。试剂可以施加在反应室的所有表面上,或仅仅施加在障碍物 128 上。将用于分析的试剂放置在反应室 110 和 120 之一中,一个反应室用作活性对照,反应室 140 用作不凝血对照,因为该室

中将不发生凝血。或者,每个反应室 110 和 120 可以具有不同的凝血分析试剂。例如,反应室 110 可以具有用于 PT 分析的试剂,而反应室 120 可以具有用于 HRT 分析的试剂。

[0030] 例如,如果凝血分析是 PT,可以使用任何来源的促凝血酶原激酶。例如,促凝血酶原激酶可以从商业来源购买,或者它可以从人类胎盘、兔脑、牛脑、公牛脑和人脑中提取。也可以使用通过重组 DNA 技术生产的促凝血酶原激酶。典型的来源是兔脑。兔脑粉是可商购的,它可以按照标准技术如下进行分离:从例如新西兰白兔中取出剥离了相连的血管的全脑,将兔全脑在 Waring 混合器中、在过量丙酮中匀浆以产生浆液,并将浆液在真空下干燥,以产生在真空下、在 -20℃ 储存时稳定的兔脑粉末。粉末状牛脑、粉末状公牛脑、粉末状人脑、通过重组 DNA 技术生产的粉末状促凝血酶原激酶、以及粉末状人胎盘,可以以类似的方式或通过众所周知的技术方法来制备。

[0031] 然后可以将粉末状促凝血酶原激酶源,例如兔脑粉末或人胎盘粉末,在水性溶液中进行提取,以制备促凝血酶原激酶提取物。水性溶液可以是温暖的盐水溶液,任选含有金属离子螯合剂。金属离子螯合剂可以是柠檬酸、柠檬酸盐、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇双氨乙基醚四乙酸 (EGTA),及其盐。粉末状脑物质使用水性溶液提取,促凝血酶原激酶分离在上清液中。可以将上清液离心以分离促凝血酶原激酶,然后可以将分离的促凝血酶原激酶冷冻干燥。

[0032] 然后可以通过将上述过程制备的促凝血酶原激酶提取物与钙离子进行混合,来制备促凝血酶原激酶试剂。通过该过程制备的促凝血酶原激酶可以、但不是必须在最终试剂中包含金属离子螯合剂。可以使用任何来源的钙离子,例如氯化钙、酒石酸钙、葡萄糖酸钙、柠檬酸钙或乳酸钙等。这样制备的或从商业来源获得的促凝血酶原激酶试剂可以放置在反应室 110 和 120 中。

[0033] 在另一个实施例中,凝血分析可以是蛋白 C 激活剂分析,说明了使用了蛋白 C 激活剂分析的本发明方法和装置。该分析使用的试剂含有内源凝血途径或因子 X 的引发剂,蛋白 C 激活剂(例如凝血调节蛋白、Protac™、其它催化性或化学计量激活剂),钙离子,一种或多种在凝血级联中与钙结合位点相互作用的金属化合物、优选为一种或多种镧系金属化合物,以及任选的增量剂和 / 或稳定剂。

[0034] 蛋白 C 的浓度可以与凝血时间、凝块形成的速度、最终凝块的完整性(即凝块强度)或其任何组合相关联。分析可以针对标准对照血浆进行校正,以建立测量信号与蛋白 C 浓度之间的关系。如果需要,标准对照曲线可以在样品测量之前立即产生,或者可以是纸质的或电子储存的标准对照曲线。

[0035] 上面描述的全血或血浆样品可以原样使用,或可以在蛋白 C 缺乏的血浆中稀释,优选 1 份样品对 5 份该缺乏血浆,以降低干扰物质的浓度并补充任何可能由于遗传或临床病症而缺乏的凝血因子。此外,如果需要,可以向稀释样品中加入聚凝胺或另一种肝素拮抗剂。

[0036] 在本发明的蛋白 C 分析中,将样品定位于含有蛋白 C 分析试剂的反应室 110 和 120。该蛋白 C 分析试剂含有蛋白 C 激活剂、内源凝血途径或因子 X 的引发剂、钙离子、以及任选的一种或多种镧系金属化合物。

[0037] 在蛋白 C 分析中,反应以初始延迟时间开始,在此期间,据认为,凝血调节蛋白捕获凝血酶并活化蛋白 C,样品的凝结在大约至少 200 秒后、优选大约至少 250 秒后、更优选大

约至少 300 秒后开始。初始延迟时间可以在几秒到大约 5-7 分钟之间变化。

[0038] 在本发明的蛋白 C 分析中,内源凝血途径或因子 X 的引发剂可以是任何能够触发凝血级联的物质,例如 ThromboScreen™ Kontakt™,可以从 Pacific Hemostasis of Huntersville, N. C. 商购。也可以使用因子 X、凝血酶原时间 (PT) 和活化的部分促凝血酶原激酶时间 (APTT) 的其它凝结引发剂,包括从纯化的组分复溶的试剂。蛋白 C 激活剂优选为按照上面的描述制备或从商业来源获得的凝血调节蛋白。

[0039] 另一方面,本发明的装置和方法可用于细菌内毒素的凝结和 / 或发色测试。细菌内毒素主要是源自于革兰氏阴性细菌的细胞膜的脂多糖组分。这些测试大部分利用了来自美国鲎 (Limulus Polyphemus) 的鲎变形细胞裂解物 (LAL)。LAL 暴露于细菌内毒素或葡聚糖,触发了原始的凝血系统,导致将液体 LAL 转化成固化的凝胶凝块,类似于哺乳动物血浆凝结分析。该测试、以及利用可选的生物系统 (即东方鲎 (Tachyplesus) 变形细胞裂解物)、这些系统的纯化成分、重组蛋白单独或与其它凝血系统成分、结构蛋白、蛋白酶抑制剂或激活剂相组合作出的任何修改,也很适合用于本发明的装置和方法。该测试系统的用途包括但不限于定量肠胃外药物、灌洗流体、透析溶液、WFI、和医学装置以及 IVD 产品和加工材料中的内毒素水平。使用本发明的装置和方法对细菌内毒素进行的凝结和 / 或发色测试,在监测内毒素血症和败血症患者中也发现了用途。

[0040] 在本发明的一个方面,样品在反应室 110 和 120 中以及在不凝血参比端口 140 中位移的频率和 / 或幅度,可以作为时间的函数进行测量。参比端口 140 中的样品将不凝结,因为凝血药剂只放置在反应室 110 和 / 或 120 中。样品在反应室 110 和 120 中位移的频率和 / 或幅度,可以与样品在不凝血参比端口 140 中的频率和 / 或幅度进行比较。与不凝血参比端口 140 相比,样品在反应室 110 和 120 中位移的频率和 / 或幅度的变化,指示了样品在凝结时间点从液体向纤维状凝胶的转变。典型地,不凝血参比端口 140 可以保持向大气开放,以缓冲冲着凝血反应孔的力,由此允许在凝块一形成时就检测到它。没有不凝血通道吸收附加的力,捕获得较弱的凝块可能从柱上裂开,或导致其检测的延迟。

[0041] 凝结时间可以通过检测液体样品在与凝血试剂接触后物理变化的改变程度来检测。物理变化可以是任何变化,例如浊度 (包括吸光度)、粘度、介电常数等。优选,物理变化通过光学测量检测运动和或波的性质、或通过浊度 (或吸光值) 来检测。

[0042] 储存槽 130 上的膜或薄膜通常可以以给定的频率振动活动。薄膜的运动将血液样品全部通过光学路径 (沿着毛细管的长度) 移动,可以光学观察到正弦波。当凝胶形成 (在凝结点) 时,凝块中的纤维蛋白网缠绕在柱周围,具体反应孔中的运动停止。然而参比端口 140 中的运动继续,光学元件将参比端口 140 中波的运动针对反应室 110 和 120 中的进行匹配。在另一方面,反应室 110 可以用作具有固定凝血时间的对照,而反应室 120 可以用于可变的患者样品的测试区。

[0043] 反应孔可以相对于毛细管系统的其余部分制造得更深,以增加波形的尺寸。

[0044] 除了光学元件之外,可以使用其它方法来检测凝结的血液样品。例如,液体样品的浊度 (或吸光度) 可以容易地通过光学监测,可以使用可商购的装置例如 STAT IMUNO SYSTEM Quick Turbo II (由 A & T Corp. 制造)、自动化分析仪 Multiple Chemistry Unit 502X (由 A & T Corp. 制造)、自动化分析仪 Automatic Analyzer 7070 (由 Hitachi Ltd. 制造) 等,容易地检测浊度变化的程度。

[0045] 例如,浊度测量可以使用自动化分析仪Multiple Chemistry Unit502X来进行,其中可以选择 340 到 795nm 之间的两种波长作为测量波长。通过在数秒内进行的间歇测量,可以同时测量选定的两种波长。

[0046] 尽管已经参考优选实施方案和各种可替代实施方案对本发明进行了具体的显示和描述,但相关技术领域的专业人员将会理解,可以对其进行各种形式和细节上的改变而不背离本发明的精神和范围。所有在本申请中引用的已出版的专利和出版物,在此以其全文引为参考。

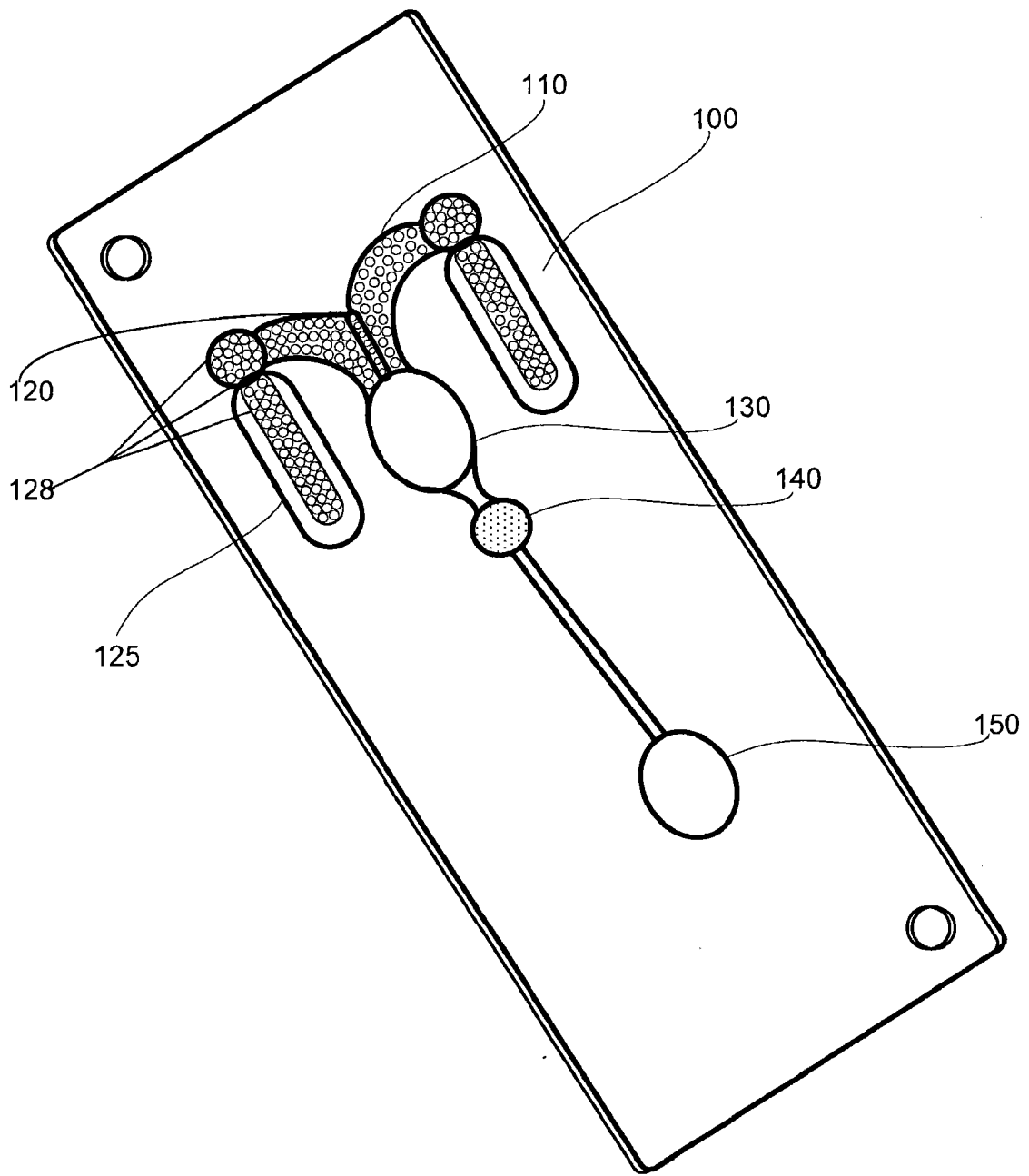


图 1