

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7214712号
(P7214712)

(45)発行日 令和5年1月30日(2023.1.30)

(24)登録日 令和5年1月20日(2023.1.20)

(51)国際特許分類

G 01 N	33/86 (2006.01)	F I	G 01 N	33/86	
G 01 N	37/00 (2006.01)		G 01 N	37/00	1 0 1
G 01 N	35/10 (2006.01)		G 01 N	35/10	A
C 12 Q	1/37 (2006.01)		C 12 Q	1/37	
C 12 M	1/34 (2006.01)		C 12 M	1/34	B

請求項の数 31 (全50頁)

(21)出願番号	特願2020-504364(P2020-504364)
(86)(22)出願日	平成30年7月26日(2018.7.26)
(65)公表番号	特表2020-529593(P2020-529593)
	A)
(43)公表日	令和2年10月8日(2020.10.8)
(86)国際出願番号	PCT/US2018/043973
(87)国際公開番号	WO2019/023508
(87)国際公開日	平成31年1月31日(2019.1.31)
審査請求日	令和3年7月14日(2021.7.14)
(31)優先権主張番号	62/699,665
(32)優先日	平成30年7月17日(2018.7.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/538,618
(32)優先日	平成29年7月28日(2017.7.28)
	最終頁に続く

(73)特許権者	596060697
	マサチューセッツ インスティテュート
	オブ テクノロジー
	アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02
	139ケンブリッジ、マサチューセッツ
	・アヴェニュー・77
(73)特許権者	592017633
	ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
	ション
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
	ストン フルーツ ストリート 55
(74)代理人	100118902
	弁理士 山本 修
(74)代理人	100106208
	弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血漿および全血中の抗凝固薬の検出のための方法ならびにデバイス

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液試料中の凝固を評価する方法であって、

第1の凝固因子を血液試料の少なくとも2つのポーションに添加するステップであって、それぞれのポーションが、第1の凝固因子の濃度が、血液試料のポーションの間で少な
くとも2倍異なるような、異なる濃度で第1の凝固因子を受け取るステップ；

第2の凝固因子を血液試料の少なくとも2つのさらなるポーションに添加するステップであって、それぞれのさらなるポーションが、第2の凝固因子の濃度が、血液試料のさら
なるポーションの間で少な
くとも2倍異なるような、異なる濃度で第2の凝固因子を受け取り、ここで第2の凝固因子は凝固経路における第1の凝固因子の上流で作用する凝固因子であるステップであって、ここで

第1の凝固因子が活性型であるか、

第2の凝固因子が活性型であるか、あるいは

第1の凝固因子および第2の凝固因子の両方が活性型である、ステップ；

血液試料のそれぞれのポーションおよびそれぞのさらなるポーションについて、血塊形成時間を測定するステップ；および

前記血塊形成時間を互いにおよび正常化された血塊形成時間と比較し、血液試料が凝固経路における凝固阻害または凝固欠損を有するか否かを決定するステップであって、ここで
血液試料の少なくとも2つのポーションに第1の凝固因子を添加することが、正常化され
た血塊形成時間を達成せず、かつ、第1の凝固因子の濃度依存性の様式で血塊形成時間を

減少させない場合に、血液試料が、第1の凝固因子が凝固経路において作用するところの下流に凝固阻害もしくは凝固欠損を有すると決定されるか；

血液試料の少なくとも2つのポーションに第1の凝固因子を添加することが、第1の凝固因子の濃度依存性の様式で血塊形成時間を減少させ、かつ、血液試料の少なくとも2つのさらなるポーションに第2の凝固因子を添加することが、正常化された血塊形成時間を達成しない場合に、血液試料が、第1の凝固因子が凝固経路において作用する点で凝固阻害もしくは凝固欠損を有すると決定されるか；

血液試料の少なくとも2つのさらなるポーションに第2の凝固因子を添加することが、第2の凝固因子の濃度依存性の様式で血塊形成時間を減少させ、かつ、血液試料の少なくとも2つのポーションに第1の凝固因子を添加することが、正常化された血塊形成時間を達成する場合に、血液試料が、第2の凝固因子が凝固経路において作用する点で凝固阻害もしくは凝固欠損を有すると決定されるか；あるいは

血液試料の少なくとも2つのさらなるポーションに第2の凝固因子を添加することが、正常化された血塊形成時間を達成し、かつ、血液試料の少なくとも2つのポーションに第1の凝固因子を添加することが、正常化された血塊形成時間を達成する場合に、血液試料が、第2の凝固因子が凝固経路において作用するところの上流に凝固阻害もしくは凝固欠損を有すると決定される、ステップ

を含む方法。

【請求項2】

血液試料が、全血または血漿である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

血液試料が、全血であり、血液試料のそれぞれのポーションおよびそれぞれのさらなるポーションが、1mL未満である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

第1の凝固因子が、内因性経路の因子、外因性経路の因子、および共通経路の因子から選択され、第2の凝固因子が、内因性経路の因子、外因性経路の因子、および共通経路の因子から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

第1および第2の凝固因子が、第I因子～第XIII因子、およびそれらの活性型から選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

第1の凝固因子が第IIa因子であり、第2の凝固因子が第Xa因子である、請求項5に記載の方法。

30

【請求項7】

第1および第2の凝固因子の少なくとも1つが、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノーゲン（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィプロネクチン、アンチトロンビンIII、ヘパリンコファクターII、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZPI）、プラスミノーゲンもしくはその活性型、アルファ2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1（PAI1）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2（PAI2）、組織因子経路阻害剤（TFPI）またはがんプロコアグラントである、請求項1に記載の方法。

40

【請求項8】

第1の凝固因子が、0.1ng/mL～10μg/mLの範囲の濃度で血液試料のそれぞれのポーションに添加される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

血塊形成時間が：電気インピーダンス、ビーズの添加ならびにビーズの流量および／もしくは数の定量化、流速および／もしくは圧力の変化、トロンボエラストグラフィー、蛍光フィブリノーゲンを使用する蛍光検出、濁度、赤外分光法、画像センサー、光吸収、蛍光マーカー検出、音響センサーおよび／もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、

50

フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出の1つまたは複数によって測定される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記血塊形成時間を1つまたは複数の異常参考範囲と比較するステップをさらに含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

血液試料の少なくとも2つのポーションが、マイクロ流体デバイスの第1の系列のチャネルを流れ、血液試料のそれぞれのポーションが別個のチャネルを流れ、ここで第1の系列のチャネルが、血塊形成を引き起こし、および／または局所化させるように構成された、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項12】

チャネルが、同一の形状を有するマイクロチャネルである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

第1の系列のチャネルが、異なる量の第1の凝固因子でコーティングされているか、または異なる量の第1の凝固因子を含有する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

第1の系列のチャネルが、第1の系列のチャネルにわたる漸増量で第1の凝固因子でコーティングされているか、または第1の系列のチャネルにわたる漸増量で第1の凝固因子を含有する、請求項11または12に記載の方法。 20

【請求項15】

血液試料の少なくとも2つのさらなるポーションが、マイクロ流体デバイスの第2の系列のチャネルを流れ、血液試料のさらなるポーションが別個のチャネルを流れ、ここで第2の系列のチャネルが、第2の系列のチャネルにわたる漸増量で第2の凝固因子でコーティングされているか、または第2の系列のチャネルにわたる漸増量で第2の凝固因子を含有し、ここで第1の系列のチャネルのそれおよび第2の系列のチャネルのそれが同一の形状を有する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

第1の凝固因子が懸濁液もしくは溶液中にあるかまたは凍結乾燥されていて、第2の凝固因子が懸濁液もしくは溶液中にあるかまたは凍結乾燥されている、請求項15に記載の方法。 30

【請求項17】

第1の系列のチャネルのそれぞれにおける血塊形成の程度が、1つまたは複数の定められた時点で測定される、請求項11～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

血液試料が、抗凝固剤による治療を受けている対象からの血液試料である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

抗凝固剤が、FXa阻害剤、FIIa阻害剤、FXI阻害剤、FXIa阻害剤、FXII阻害剤およびFXIIfa阻害剤から選択される因子特異的阻害剤である、請求項18に記載の方法。 40

【請求項20】

抗凝固剤が、第IIa因子および／または第Xa因子の阻害をもたらす、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

凝固阻害もしくは凝固欠損の下流またはその点で作用する選択された凝固因子の活性型を、血液試料の参照ポーションに添加するステップ、および、血液試料の参照ポーションについて血塊形成時間を測定するステップによって、正常化された血塊形成時間が決定される、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

血液試料において第Xa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方

法：

血液試料の複数の第1のポーションに第1の凝固因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第1の凝固因子を受け取り、ここで第1の凝固因子が、凝固経路における第Xa因子の下流である点において作用する、ステップ；

血液試料の複数の第2のポーションに第2の凝固因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第2の凝固因子を受け取り、ここで第2の凝固因子が、凝固経路における第Xa因子の上流である点において作用する、ステップ；

血液試料の複数の第3のポーションに第Xa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第3のポーションが異なる濃度で第Xa因子を受け取るステップ；

血液試料のそれぞれの第1のポーション、それぞれの第2のポーション、およびそれぞれの第3のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の少なくとも1つの第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の少なくとも1つの第1のポーションについて測定された血塊形成時間よりも長く、かつ、血液試料の複数の第3のポーションについて測定された血塊形成時間が、第Xa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

【請求項23】

血液試料の、凝固因子が提供されていない第4のポーションにおいて、血塊形成時間を測定するステップをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

血液試料において第Xa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方法：

血液試料の複数の第1のポーションに第1の凝固因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第1の凝固因子を受け取り、ここで第1の凝固因子が、凝固経路における第Xa因子の下流である点において作用する、ステップ；

血液試料の複数の第2のポーションに第Xa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第Xa因子を受け取る、ステップ；

血液試料のそれぞれの第1のポーションにおいて、および血液試料のそれぞれの第2のポーションにおいて、血塊形成時間を測定するステップ、および凝固因子が提供されていなかった血液試料の第3のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の少なくとも1つの第1のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の第3のポーションについて測定された血塊形成時間よりも短く、かつ、血液試料の複数の第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、第Xa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

【請求項25】

血液試料において第IIa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方法：

血液試料の複数の第1のポーションに第1の凝固因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第1の凝固因子を受け取り、ここで第1の凝固因子が、凝固経路における第IIa因子の上流である点において作用する、ステップ；

血液試料の複数の第2のポーションに第IIa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第IIa因子を受け取る、ステップ；

10

20

30

40

50

血液試料のそれぞれの第1のポーションにおいて、および血液試料のそれぞれの第2のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに、複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の少なくとも1つの第1のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の少なくとも1つの第2のポーションについて測定された血塊形成時間よりも長く、かつ、血液試料の複数の第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、第IIa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

【請求項26】

10

血液試料の、凝固因子が提供されていない第3のポーションにおいて、血塊形成時間を測定するステップをさらに含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

血液試料において第IIa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方法：

血液試料の複数の第1のポーションに第1の凝固因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第1の凝固因子を受け取り、ここで第1の凝固因子が、凝固経路における第IIa因子の上流である点において作用する、ステップ；

血液試料の複数の第2のポーションに第IIa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第IIa因子を受け取る、ステップ；

血液試料のそれぞれの第1のポーションにおいて、および血液試料のそれぞれの第2のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ、および、血液試料の、凝固因子が提供されていない第3のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに、複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の少なくとも1つの第1のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の少なくとも1つの第2のポーションについて測定された血塊形成時間よりも長く、血液試料の少なくとも1つの第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の第3のポーションについて測定された血塊形成時間より短く、かつ血液試料の第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、第IIa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

20

【請求項28】

30

血液試料において第Xa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方法：

血液試料の複数の第1のポーションに第Xa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第Xa因子を受け取る、ステップ；

血液試料の複数の第2のポーションに第IIa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第IIa因子を受け取る、ステップ；

血液試料のそれぞれの第1のポーションにおいて、および血液試料のそれぞれの第2のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ、および凝固因子が提供されていなかった血液試料の第3のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の少なくとも1つの第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、血液試料の第3のポーションについて測定された血塊形成時間よりも短く、かつ、血液試料の複数の第1のポーションについて測定された血塊形成時間が、第Xa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第Xa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

40

【請求項29】

血液試料において第IIa因子の機能を評価する方法であって、以下のステップを含む方

50

法：

血液試料の複数の第1のポーションに第Xa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第1のポーションが異なる濃度で第Xa因子を受け取る、ステップ；
血液試料の複数の第2のポーションに第IIa因子を提供するステップであって、血液試料のそれぞれの第2のポーションが異なる濃度で第IIa因子を受け取る、ステップ；
血液試料のそれぞれの第1のポーションにおいて、および血液試料のそれぞれの第2のポーションにおいて血塊形成時間を測定するステップ；ならびに
複数の前記血塊形成時間を互いに比較して、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有するか否かを検出するステップであって、ここで、血液試料の複数の第1のポーションについて測定された血塊形成時間が、第Xa因子の濃度依存性の様式で減少せず、かつ、血液試料の複数の第2のポーションについて測定された血塊形成時間が、第IIa因子の濃度依存性の様式で減少する場合に、血液試料が第IIa因子の機能の阻害または欠損を有すると検出される、ステップ。

【請求項30】

血液試料の、凝固因子が提供されていない第3のポーションにおいて、血塊形成時間を測定するステップをさらに含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

血塊形成時間を測定するステップが、1つまたは複数の定められた時点で血塊形成時間を測定するステップを含む、請求項22～30のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

[0001]本出願は、2017年7月28日に出願された米国仮出願第62/538,618号、および2018年7月17日に出願された米国仮出願第62/699,665号の利益を主張し、その全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

政府の援助

[0002]本発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号P41EB002503、P30ES002109およびP50GM021700の政府の援助で行われた。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

[0003]凝固系は、出血および血栓症の間の繊細なバランスである。このバランスの崩壊を引き起こし得、かつ重症で、さらに生命を脅かす出血または凝固イベントを有する患者をもたらし得る、がん、自己免疫疾患、感染症、外傷、外科手術、心臓疾患および薬物を含む多くの疾患状態がある。抗凝固医薬は、血栓性疾患について一般に処方される。ヘパリンなどの従来の抗凝固医薬は、凝固カスケードの複数の因子を間接的に阻害する。より最近の直接経口抗凝固薬(DOAC)の導入は、凝固経路の標的化阻害を可能にする。

【0003】

[0004]抗凝固薬治療の最大のリスクは、出血のリスクの増加であり、したがって、従来、抗凝固医薬を摂取した患者は、その患者らが適した用量を受けていることを確実にするために注意深く監視される。患者の出血および凝固を評価するために利用可能な現在の臨床検査は、いずれも初步的なものであり、プロトロンビン時間(PT)および活性化トロンボプラスチン時間(aPTT)などの非常に曖昧な情報を提供するか、またはより詳細であるが高価な機械、長時間のトレーニングおよび注意深い取り扱いが必要である。後者のカテゴリーには、トロンボエラストグラフィー(TEG)、トロンボエラストメトリー(TEM)、回転トロンボエラストメトリー(ROTEM)、血小板凝集測定およびフローサイトメトリーが含まれる。現在、DOACのための特異的な検査は利用可能ではない。提案されているほとんどのDOACアッセイは、薬物それ自体の絶対濃度を測定し、したがって、臨床的判断を裏付ける限定された機能的情報を提供する薬物動態アッセイであ

10

20

30

40

50

る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

[0005]限定されないが応急手当の状況を含む、高リスクの重度の出血または凝固の患者をより良好に管理するために、患者の試料中のD O A Cの検出を含む、凝固における機能障害を検出、特徴付けおよび／または定量化することができる凝集検査が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

[0006]抗凝固剤または凝固異常を検出するための方法およびデバイスを含む、凝固を評価するための方法およびデバイスを記載する。凝固異常は、血塊形成の異常（例えば、血栓症）および血塊分解の異常（例えば、線維素溶解）を含む。さまざまな実施形態において、本発明の方法およびデバイスは、1つまたは複数の凝固因子のグラジエントに対して試料の凝固を測定する。これらの反応は、D O A Cまたは従来の抗凝固医薬の存在を含む、試料の凝固機能障害を正確にプロファイリングするために評価することができる。さまざまな実施形態において、本発明は、最小限の訓練を受けた職員によって使用され得る便利なマイクロ流体デバイスを用いるポイントオブケア検査またはベッドサイド検査を提供する。

10

【0006】

[0007]いくつかの態様において、本発明は、血液試料における凝固を評価するための方法を提供する。本方法は、凝固因子を血液試料の複数のポーション（例えば、アリコート）に添加するステップであって、それぞれのポーションが異なる濃度で凝固因子を受けるステップ、および異なる濃度に対して血塊形成または血塊形成時間を測定するステップを含む。1つまたは複数の凝固因子の異なる濃度に対して凝固を評価することによって、凝固に対するD O A Cまたは他の薬物の影響を含む、血液凝固機能を正確にプロファイリングすることができる。いくつかの実施形態において、遺伝的凝固異常の存在または非存在が決定される。本明細書に記載の方法は、1つまたは複数のチャネルが血塊の形成および局在化を引き起こすように構成され得る、記載のマイクロ流体デバイスを使用して行ってもよい。

20

【0007】

[0008]本明細書で使用される場合、他に記載がない限り、「血液試料」は、全血試料または血漿試料を指す。血漿という用語は、多血小板血漿（P R P）および乏血小板血漿（P P P）の両方を含む。

30

【0008】

[0009]本明細書で使用される「凝固因子」という用語は、凝固カスケードに関与する任意の因子（固有の外因性および共通経路）を意味し、第I因子～第X I I I 因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノーゲン（H M W K）（フィッツジェラルド因子）、フィブロネクチン、アンチトロンビンI I I 、ヘパリンコファクターI I 、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（Z P I）、プラスミノーゲン、アルファ2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1（P A I 1）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2（P A I 2）、組織因子経路阻害剤（T F P I）またはがんプロコアグランクトを含む。凝固因子は、活性型または不活性（例えば、前駆体）型であり得る。例えば、試料中の凝固因子阻害剤の存在を検出するために、凝固因子は、活性型（例えば、第X a因子または第I I a因子）でなければならない。他の実施形態において、遺伝的凝固異常の検出のために、凝固因子は、不活性型（例えば、第X因子または第I I因子）であってもよい。さらに、凝固因子は、ヒト、動物（例えば、ウシ、ブタなど）由来であり得、または合成もしくは組換えタンパク質であり得る。

40

【0009】

50

[0010]いくつかの実施形態において、本発明は、抗凝固剤を検出する方法を提供する。抗凝固剤は、血液の凝固を予防または低減し、凝固時間を長くする物質である。抗凝固剤としては、限定されるものではないが、因子特異的阻害剤（例えば、FXa阻害剤、FI
Ia阻害剤、FXIa阻害剤、FXIIa阻害剤）、ヘパリンおよびビタミンKアンタゴニスト（例えば、ワルファリン）が挙げられる。いくつかの実施形態において、抗凝固剤としては、Janssen Pharmaceuticals, Inc. 製のXARELTO（リバーコキサバン）、Bristol-Myers SquibbおよびPfizer Inc. 製のELIQUIS（アピキサバン）、Daiichi Sankyo, Inc. 製のSAVAYSA（エドキサバン）、Boehringer Ingelheim製のPRADAXA（ダビガトラン）、ならびにPortola Pharmaceuticals, Inc. 製のBEVYXXA（ベトリキサバン）などの、新規経口抗凝固薬（NOAC）としても公知の直接経口抗凝固薬（DOAC）が挙げられる。
10

【0010】

[0011]外因的に添加された凝固因子の濃度の増加に対して血塊形成（例えば、血塊形成時間）を測定することによって、治療剤の存在および／または治療剤による阻害点を決定することができる。例えば、凝固阻害剤に対して陽性である試料は、阻害剤の標的である凝固因子が試料に添加されるにつれて、凝固時間の濃度依存性の減少を示す。その一方で、阻害点の上流の凝固因子が添加されると（漸増量で）、凝固時間は、阻害点の下流の凝固因子の添加の際の凝固時間と比較して、長くなる。図9～13を参照のこと。
20

【0011】

[0012]いくつかの実施形態において、患者の試料についての結果を、正常および／もしくは異常な凝固についての標準、または特定の薬剤による抗凝固薬治療に対応する参考標準を含む、参考標準と比較することができる。いくつかの実施形態において、参考標準は、患者に対して個別化される。
30

【0012】

[0013]さまざまな実施形態において、凝固曲線を作図して、漸増濃度または量でのさまざまな凝固因子の添加に対する血塊形成の反応を特徴付けることができる。これらの凝固曲線は、決定される凝固阻害剤の特定および量を可能にして、それによって患者のケアをガイドする。いくつかの実施形態において、適した凝固阻害剤の反転剤は、次いで、必要に応じて治療的介入を反転させるために患者に投与される。
30

【0013】

[0014]いくつかの態様において、本発明は、試料中の凝固を評価するためのマイクロ流体デバイスを提供する。本デバイスは、外因的に添加された凝固因子の量もしくは濃度などの1つまたは複数の試薬に対して血塊形成を評価することを可能にするために、基材に一連のチャネルを含み、それぞれのチャネルは、血塊の形成を引き起こし、および／または局在化させる形状を有する区域を有する。一連のチャネルは、（同じ試料および試薬に曝露されたときに）同一の血塊形成性を引き起こすように、同じ形状をそれぞれ有する。1つまたは複数の凝固因子のグラジエントの存在中で血塊形成を評価することによって、本発明は、試料中のDOACの存在もしくは活性を含む、凝固の異常または機能障害の敏感で特異的な検出を可能にする。
40

【0014】

[0015]1つの実施形態において、凝固を検出するためのマイクロ流体デバイスは、基材に形成された複数のチャネルを含み、それぞれのチャネルが、血塊の形成を引き起こし、および／または局在化させるように構成された形状を有する血塊形成区域を含む。複数のチャネルの血塊形成区域は、いくつかの実施形態において、凝固性を諸チャネルにわたって同時に画像化または解析することができるよう、基材の中央領域に配置されてもよい。図1A～1B、2Bを参照のこと。本デバイスは、試料（例えば、全血または血漿）を受けるための複数の試料注入ポートをさらに含んでいてもよく、それぞれの試料注入ポートは、複数のチャネルの1つの第1端に接続されている。図1A～1Dを参照のこと。他の実施形態において、本デバイスは、複数のチャネルまたは一連のチャネルを有する流体
50

連通中に単一の試料注入ポートを有する。図 5 A を参照のこと。いくつかの実施形態において、それぞれのチャネルは、独立した排出ポートを有し、それぞれの排出ポートは、複数のチャネルの 1 つの第 2 端に接続されている。独立した試料注入ポートを利用する実施形態において、注入および排出ポートは、基材の周囲に交互パターンで配置することができる。図 1 A ~ 1 B、2 A を参照のこと。いくつかの実施形態において、注入および排出ポートは、交互パターン以外のパターンで配置される。

【 0 0 1 5 】

[0016]本明細書で使用される「中央領域」という用語は、基材の周囲に対して基材の中央に位置する領域を意味し、中心を外れて置かれる領域を含み得る。例えば、配置に応じて、中央領域は、中心を外れている可能性があり、凝血が開始するマイクロ流体チャネル中の区域は、チャネルの流れのパターンによって制御することができる。10

【 0 0 1 6 】

[0017]いくつかの実施形態において、複数のチャネルの血塊形成区域は、限定されないが、周囲などの中央ではない基材の領域に配置される。図 5 A ~ 5 B を参照のこと。

[0018]それぞれのチャネルは、凝固因子および / またはカルシウムなどの試薬を受けるための 1 つまたは複数の追加注入ポートをさらに含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、排出ポートあたり 2 つ以上の注入ポート（例えば、試料および 1 つまたは複数の試薬を導入するため）が存在する。例えば、1 つの実施形態において、試料のための 1 つの注入ポート、および試薬（例えば、凝固因子、および任意選択でカルシウム）のための 1 ~ 2 つの注入ポートが存在し得る。図 1 B を参照のこと。いくつかの実施形態において、試料のための 1 つの共通注入ポートが存在し、それぞれのチャネルは、試薬のためのさらなる注入ポート（例えば、1 または 2 つ）をさらに含む。20

【 0 0 1 7 】

[0019]マイクロ流体デバイスにおいて、それぞれの血塊形成区域は、血塊の形成を引き起こし、および / もしくは局在化させるための液体の流れにおける閉塞または混乱の区域を生じるように配置することができる。いくつかの実施形態において、それぞれの血塊形成区域は、血塊形成を引き起こし、および / または局在化させる流れの乱れの区域を生じるように配置することができる。血塊の形成および局在化を引き起こすための例示的な形状を、図 2 B、3 A、5 A および 5 B に図示する。

【 0 0 1 8 】

[0020]マイクロ流体デバイスのチャネルは、異なる量もしくは濃度の凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含むことができる。例えば、複数のチャネルの第 1 の群または系列は、第 1 の凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含むことができ、複数のチャネルの第 2 の群または系列は、第 2 の凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含むことができる。さらに、いくつかの実施形態において、複数のチャネルの 1 つは、例えば、凝固因子でコーティングされていなくてもよく、含んでいなくてもよい、陰性対照チャネルである。他の実施形態において、本デバイスは、このような陰性対照チャネルを含まない。30

【 0 0 1 9 】

[0021]1 つまたは複数のチャネルが凝固因子を含む場合において、凝固因子は、懸濁液もしくは溶液であってもよく、または凍結乾燥されていてもよく、かつ表面結合されていなくてもよい。凝固因子は、チャネルに事前に含めることができ（例えば、デバイスを製造するとき）、試料をデバイスに置く前に添加することができ、または試料と同時もしくは試料の後に注入ポート（または複数の注入ポート）を通してデバイスに入れることができる。40

【 0 0 2 0 】

[0022]第 1 および第 2 の群のチャネルを含むマイクロ流体デバイスの実施形態において（いずれにしても、このような実施形態は、第 1 および第 2 の群のチャネルに加えて陰性対照チャネルも含み得る）、複数のチャネルの第 1 の群におけるそれぞれのチャネルは、異なる量もしくは濃度の第 1 の凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含50

むことができ、複数のチャネルの第2の群におけるそれぞれのチャネルは、異なる量もしくは濃度の第2の凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体デバイスは、3つ、4つ、5つもしくはそれ以上の群などの複数のチャネルの3つ以上の群または系列を含有していてもよく、複数のチャネルのそれぞれの群または系列は、群または系列にわたる漸増量の異なる凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含む（例えば、4つの群のチャネルを含有するマイクロ流体デバイスであって、複数のチャネルのそれぞれの群は、第I I a因子、第X a因子、第X I因子、第X I a因子、第X I I因子および第X I I a因子から選択される異なる凝固因子でコーティング、含有、またはそうでなければ含むことができる）。凝固因子のグラジエントの機能として血塊形成または凝固時間を測定することによって、試料の凝固性を、凝固経路（図8に図示する）のいくつかの特定の点でプロファイリングすることができ、患者の凝固生理機能および／または任意の治療的介入の状態に関する詳細かつ特定の情報を臨床医に提供する。

【0021】

[0023]第2の凝固因子は、第1の凝固因子から凝固力スケードの上流にあり得る。例えば、第1の凝固因子は、例えば、プロトロンビン（第I I因子）、トロンビン（第I I a因子）または両方であり得る。第2の凝固因子は、例えば、第X因子、第X a因子または両方であり得る。

【0022】

[0024]マイクロ流体デバイスは、測定された血塊形成時間に基づいて凝固を評価するために、チャネルのそれぞれにおいて血塊形成時間を測定するように配置された検出デバイスをさらに含むことができる。例えば、検出デバイスは、血塊形成時間を測定するために、血塊形成区域を同時に画像化するように配置することができる。いくつかの実施形態において、チャネルのそれぞれにおける血塊形成の程度は、定められた時点（複数可）で定量化される。例えば、本明細書に記載の方法およびデバイスに関連する検出デバイスは、顕微鏡および画像センサーを含み得る。血塊形成区域のイメージングは、明視野イメージングを含み得る。本明細書に記載のデバイスおよびアッセイのために、凝固時間は、光吸収、蛍光測定、超音波などに基づく検出などの他の方法論で測定することもでき、検出デバイスは、これらの他の方法論の1つまたは複数を利用するように配置することができる。凝固を検出するための方法としては、限定されるものではないが、電気インピーダンスに基づく検出、ビーズの添加およびビーズの流量／数の量化、血塊形成部位の前および／もしくは後での流速ならびに／または圧力の測定、トロンボエラストグラフィー、蛍光検出（例えば、蛍光フィブリノーゲンによる）、濁度、磁気、流動力学（圧力または流速）、赤外光検出、赤外分光法、音響センサーおよび／もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出も挙げられる。

【0023】

[0025]いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、マイクロ流体デバイスを利用しないが、血塊の形成を誘導および測定するために適切な壁または容器を使用する。

【0024】

[0026]血塊形成時間に加えて、血塊形成の他の特性を考慮することができる。例えば、凝固について最も感受性の検出様式を決定するために、血塊形成時間に加えて血塊形成の定量的測定が有用であり得ると考えられる。例えば、サイズ、強度、密度および組成などの血塊の性質を、血塊を形成する時間に加えて評価することができる。このような性質は、血塊形成時間を検出するために使用される、同じまたは異なる検出モダリティを使用して評価してもよい。

【0025】

[0027]いくつかの実施形態において、血塊溶解を血塊形成に加えて評価することができる。例えば、患者が線維素溶解剤または血栓溶解剤に接している場合、これは、血塊が経時に形成されるとき、およびその崩壊の時に血塊を評価することができる。1つの実施形態において、本明細書に記載され、血塊形成を検出するために当技術分野において公知

の同じ方法は、経時的に血塊溶解を評価するために使用することができる。

【0026】

[0028]トロンボエラストグラフィー(TEG)の使用に関して本明細書に記載されるように、これは、血塊形成および線維素溶解の両方を評価することができる。これは、線維素溶解薬および血栓溶解薬の線維素溶解または血栓溶解の投与による問題に起因する凝固性低下である患者における凝固異常を検出するために有用であろう。例えば、C. Mauffreyら、「Strategies for the management of haemorrhage following pelvic fractures and associated trauma-induced coagulopathy」、Bone Joint J., 2014年; 96-B: 1143~54頁を参照のこと、この関連する教示は、参照によって本明細書に組み込まれる。10

【0027】

[0029]本明細書に記載の任意のデバイスおよび方法において、血液試料は、全血試料または血漿試料であり得る。全血の使用は、患者のベッドサイドで実施されるなど、ある特定の適用のために特に有用であり得る。

【0028】

[0030]開示のデバイスおよび方法は、哺乳動物(例えば、ヒト患者などのヒト、および非ヒト哺乳動物)、爬虫類、鳥類および魚類を含むすべての個体に適用することができ、とりわけ、研究および獣医学のために有用であり得る。個体は、例えば、成熟体(例えば、成人)または未成熟体(例えば、小児、幼児、新生児または早産児)であり得る。20

【0029】

[0031]開示のデバイスおよび方法は、診断目的だけでなく、研究機関における凝固カスクードを探索する研究および発見のためにも使用することができる。例えば、これは、例えば、出血性疾患(デングウイルス、ジカウイルス、エボラウイルスなど)の文脈において、基本的な創薬、疾患または障害の病態生理学の理解のため、および実験的処置の有害事象について監視するためにも、有用であり得る。

【0030】

[0032]開示のデバイスおよび方法は、患者の治療をガイドするために使用することができる。例えば、医師は、薬物および処置介入の両方(侵襲性および非侵襲性の両方)によるその後の処置を決定するために結果を使用することができる。例えば、患者がダビガトラン投与に起因する第I I a因子阻害に対して陽性であるという試験結果が出れば、次いで、ヘルスケア提供者は外科手術または他の介入手順の前にこの阻害剤に対する反転剤(イダルシズマブ)を投与することを選択してもよい。同様に、患者が第X a因子阻害に対して陽性であるという試験結果が出れば、次いで、ヘルスケア提供者はこの阻害剤に対する適した反転剤(凝固第X a因子(組換え)、不活性化-z h z o)を投与することを選択してもよい。ヘルスケア提供者は、同様に、これらの阻害剤、例えば、第4因子のプロトロンビンの複合体の濃縮物、または活性化プロトロンビン複合体の濃縮物の効果を克服する他の薬剤を投与することを選択してもよい。30

【0031】

[0033]本発明の他の態様および実施形態は、以下の図面および詳細な説明から明らかであろう。40

[0034]本特許または本出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラーの図面を伴う本特許または本出願公開の写しは、申請および必要な料金の支払により、特許庁によって提供される。

【0032】

[0035]前述は、参照文字が異なる図を通して同じ部分を指すような添付の図面において図示されるように、実施形態の例の以下のより詳細な記載から明らかであろう。図面は、必ずしも縮尺通りではなく、代わりに、実施形態を図示する際に判別されるように強調している。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0033】

【図1】[0036]図1Aは、本発明の実施形態の例による、複数の試料ポートを利用するマイクロ流体デバイスのレイアウトの略図である。図1Bは、本発明の実施形態の例に従って、複数の試料ポートを利用するマイクロ流体デバイスのレイアウトの略図である。図1Cは、本発明の実施形態の例に従って、複数の試料ポートを利用するマイクロ流体デバイスのレイアウトの略図である。図1Dは、本発明の実施形態の例に従って、複数の試料ポートを利用するマイクロ流体デバイスのレイアウトの略図である。

【図2A】[0037]図2Aは、実施形態の例による、循環マイクロ流体凝固デバイスの上面図である。

【図2B】[0038]図2Bは、図2Aのデバイスの中央部分の拡大図である。図2Bは、血塊形成区域の例示的な形状を図示する。

【図3】[0039]図3Aは、実施形態の例による、4つのチャネルを有するマイクロ流体デバイス内で血漿および蛍光標識化フィブリノーゲンを使用する血塊検出を図示する。図3Aは、マイクロ流体デバイスの例の中央部分の上面の明視野画像である。図3Bは、実施形態の例による、4つのチャネルを有するマイクロ流体デバイス内で血漿および蛍光標識化フィブリノーゲンを使用する血塊検出を図示する。図3Bは、図3Aのデバイスを使用した血塊形成の蛍光画像である。図3Cは、実施形態の例による、4つのチャネルを有するマイクロ流体デバイス内で血漿および蛍光標識化フィブリノーゲンを使用する血塊検出を図示する。図3Cは、血塊形成区域の拡大図を示す蛍光画像である。

【図4A】[0040]図4Aは、実施形態の例による、FXaのグラジエントを利用する並行マイクロ流体チャネルデバイスにおいて全血を使用する血塊検出を図示する明視野画像である。図4Aは、抗凝固薬を含有しない。

【図4B】図4Bは、実施形態の例による、FXaのグラジエントを利用する並行マイクロ流体チャネルデバイスにおいて全血を使用する血塊検出を図示する明視野画像である。図4Bは、未分画ヘパリンを含有する。

【図5】[0041]図5Aは、本発明の実施形態の例による、試料注入のための単一ポートを利用するマイクロ流体デバイス配置の略図である。図5Bは、本発明の実施形態の例による、試料注入のための単一ポートを利用するマイクロ流体デバイス配置の略図である。

【図6】[0042]図6は、本発明の実施形態の例による、アッセイまたは方法のフロー図である。

【図7A】[0043]図7Aは、FXaのグラジエントを使用するリバーロキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。

【図7B】[0044]図7Bは、FXaのグラジエントを使用するアピキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。

【図7C】[0045]図7Cは、FXaのグラジエントを使用するエドキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。

【図7D】[0046]図7Dは、FIImaのグラジエントを使用するダビガトランの検出を図示する実施例のデータのグラフである。

【図8】[0047]図8は、基本的な凝固カスケードを図示する図である。

【図9】[0048]図9は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、FXaの阻害/欠乏/機能の異常を検出する方法を図示する図である。

【図10】[0049]図10は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、FIImaの阻害/欠乏/機能の異常を検出する方法を図示する図である。

【図11】[0050]図11は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、試料中のFIImaおよびFXaの阻害の間で検出および識別する方法を図示する図である。

【図12】[0051]図12は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、FXaの阻害/欠乏/機能の異常を間接的に検出する方法を図示する図である。

【図13】[0052]図13は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、試料中のFIImaおよびFXImaの阻害の間で検出および識別する方法を図示する図である。

【図14】[0053]図14は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、さまざま

10

20

30

40

50

種類の血友病の間で検出および識別する方法を図示する図である。

【図15】[0054]図15は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、フィブリノゲンまたはFXIII（例えば、FXIII欠乏）で問題を検出する方法を図示する図である。

【図16A】[0055]図16Aは、さまざまな濃度でのFXaおよびFIIf阻害剤についての凝固曲線スコア（CCS）を図示する。

【図16B】図16Bは、さまざまな濃度でのFXaおよびFIIf阻害剤についての凝固曲線スコア（CCS）を図示する。

【図16C】図16Cは、さまざまな濃度でのFXaおよびFIIf阻害剤についての凝固曲線スコア（CCS）を図示する。

【図17】[0056]図17は、患者の記述統計量の表1を示す（実施例17）。

【図18A】[0057]図18Aは、FXa阻害剤（FXa-I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（PT）（図18A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（INR）（図18B）の測定を図示する。

【図18B】図18Bは、FXa阻害剤（FXa-I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（PT）（図18A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（INR）（図18B）の測定を図示する。

【図18C】図18Cは、FXa阻害剤（FXa-I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（PT）（図18A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（INR）（図18B）の測定を図示する。

【図19A】[0058]図19Aは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19B】図19Bは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19C】図19Cは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19D】図19Dは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19E】図19Eは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19F】図19Fは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図19G】図19Gは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。

【図20A】[0059]図20Aは、患者の試料中のFXa-Iの検出についての、凝固曲線スコア（CCS）解析およびCCS利用の評価を図示する。

【図20B】図20Bは、患者の試料中のFXa-Iの検出についての、凝固曲線スコア（CCS）解析およびCCS利用の評価を図示する。

【図20C】図20Cは、患者の試料中のFXa-Iの検出についての、凝固曲線スコア（CCS）解析およびCCS利用の評価を図示する。

【図20D】図20Dは、患者の試料中のFXa-Iの検出についての、凝固曲線スコア（CCS）解析およびCCS利用の評価を図示する。

【図20E】図20Eは、患者の試料中のFXa-Iの検出についての、凝固曲線スコア（CCS）解析およびCCS利用の評価を図示する。

【図21A】[0060]図21Aは、機能的薬物濃度計算の例を図示する。

【図21B】図21Bは、機能的薬物濃度計算の例を図示する。

【図22】[0061]図22は、出血しているか、または高リスクの患者に対する現在の意思決定の実例を図示する。

【図23】[0062]図23は、出血しているか、または高リスクの患者に対する本発明の実施形態を使用する改善された意思決定の実例を図示する。

【図24A】[0063]図24Aは、活性化プロトロンビン複合体濃縮物（aPCC）の添加後のFXa-IによるFXa阻害の減少の検出を図示する。

【図24B】図24Bは、活性化プロトロンビン複合体濃縮物（aPCC）の添加後のFXa-IによるFXa阻害の減少の検出を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0034】

10

20

30

40

50

[0064]本発明は、一般に、血漿および／または全血中の凝固異常の検出ならびに抗凝固薬および血小板阻害剤の検出を含む、凝固の検出のための方法およびデバイスに関する。

[0065]後天的な凝固障害は、多くの医療的状況における病的状態および死亡率の主要な要素である。個体において、薬物（例えば、クロピドグレル、ヘパリン、ワルファリンもしくは他のビタミンKアンタゴニスト、ダビガトランまたは他の直接経口抗凝固薬など）、外傷、外科手術、敗血症、がん、臓器機能異常（例えば、肝臓）または先天性異常（例えば、血友病）に対する二次的な内出血のリスクが増加していることがある。このスペクトルの反対の端では、凝固に対する増加傾向は、自己免疫疾患、がん、アテローム性動脈硬化症、初期外傷および敗血症、臓器機能異常（例えば、腎臓）、不動、炎症、異物（例えば、ステントまたはプロステーシス）または先天性異常（例えば、第V因子ライデン血栓症）に起因し得る。薬物の開発（例えば、直接経口抗凝固薬またはD O A Cを含む抗凝固薬）において最近イノベーションがあったため、現在、応急手当の状況を含む、患者のための利益を完全に実現するために、止血／凝固の解析のためにイノベーションが必要である。具体的には、患者の出血および凝固を評価するために利用可能な現在の臨床検査は、いずれも初步的なものであり、プロトロンビン時間（P T）および活性化トロンボプラスチン時間（a P T T）などの非常に曖昧な情報を提供するか、またはより詳細であるが、トロンボエラストグラフィー（T E G）、トロンボエラストメトリー（T E M）、回転トロンボエラストメトリー（R O T E M）、血小板凝集測定およびフローサイトメトリーなどの、高価な機械、長時間のトレーニングおよび注意深い取り扱いが必要である。現在、D O A Cのための特異的な検査は利用可能ではない。提案されているほとんどのD O A Cアッセイは、薬物それ自体の絶対濃度を測定し、したがって、臨床的判断のための限定された機能的情報を提供する、薬物動態アッセイである。10
20

【0035】

[0066]D O A Cの使用の増加とともに、研究および再検討は、これらの新しい薬物が急性の生命を脅かす出血イベントについてのリスクは低いが、胃腸（G I）出血のより高い割合と関連する可能性があることを見出している。加えて、これらの新しい薬物は、肝臓および／もしくは腎臓機能が減少した患者、または同時に複数の薬物に接している患者において、高齢者の集団において一般的であるように、異なる薬物動態学的性質を有することが見出されている。これらの場合において、抗凝固剤の組み合わせおよび投薬量を個別化するのを助けるために医師に機能臨床情報を提供することは、患者に非常に有益であり、その後の関連する有害事象を減少させる可能性があるだろう。本発明の実施形態は、個体内で、凝固、線維素溶解および血小板機能を評価する凝固パネルにおいて使用することができる。本明細書に記載のマイクロ流体技術および進歩的なアッセイは、いくつかの実施形態において、特別注文の凝固パネルのために提供され、それによって、臨床医は、患者の凝固機能をベッドサイドで決定することができる。これらの実施形態は、応急手当の状況を含む、患者のケアにおける圧倒的な改善を提供する。30

【0036】

[0067]迅速で分かりやすいこれらのアッセイに加えて、これらはまた、カスタマイズ可能であり得、それぞれの顧客および／またはエンドユーザーのセグメントのための臨床的に関連する凝固および血小板機能の検査の選択を可能にする。アッセイの実施形態は、ベッドサイドのプラットフォームにおいて適用され得るので、さまざまな処置に対する患者の傾向を監視するために利用することもできる（病院、抗凝固クリニック、自宅を含む）。本発明の態様において、因子のグラジエントは、複数のチャネル、壁もしくは容器の複数の群に細分割され、および／またはその中で分配された後、試料に添加され、この方法は、試料内のさまざまな凝固異常の間で凝固機能／阻害ならびに特定および区別の評価を可能にする。これは、本発明の実施形態（例えば、凝固パネル、アッセイなど）が、摂取された投薬量／時間が知られていない不十分な医療コンプライアンスを有する患者、または医師、外科医もしくは他のヘルスケア提供者が、患者がそれらの身体にこれらの薬物のいずれかを有するか否かを知るために必要な意識不明の患者において、凝固を評価するために潜在的に有用であることを意味する。さらに、実施形態は、抗凝固薬の監視、および40
50

現在利用可能になっている反転試薬の投与をガイドするのを助けることができる。

【0037】

[0068]本発明の実施形態に基づく製品またはサービスに対する可能性のあるユーザーの例は、医療従事者、例えば、臨床医および獣医師から、医薬品の研究および開発における研究者までの範囲であり得る。

【0038】

[0069]本発明は、さまざまな状況で患者のケアに適用することができる。いくつかの実施形態において、患者は、外科手術についての予定があるか、または侵襲性手順の必要があり、本発明の方法およびデバイスは、出血のリスクを最小化する手順のための患者の準備を含む臨床的判断のために使用することができる。いくつかの実施形態において、患者は、凝固に影響を与える薬物が投与され、本発明の方法およびデバイスは、薬物の作用の早期評価のため、ならびに適した治療および用量の選択のために使用することができる。いくつかの実施形態において、患者は、薬物または血液製剤を受け、本発明の方法およびデバイスは、投与および用量をガイドするために使用することができる。いくつかの実施形態において、患者は、出血性ウイルスを得るリスクを有するか、もしくはリスクを有すると疑われ、またはリスクにある。いくつかの実施形態において、患者は、凝固を評価するために（抗凝固薬治療を投与するため、または先天性凝固異常を検出するためを含む）、少体積の血液のみが利用可能な新生児である。いくつかの実施形態において、患者は、妊娠中の母親であり、本方法および本デバイスは、先天性凝固異常を検出すること、または子癪前症および子癇などの凝固異常をもたらす状態の早期診断を可能にする。

10

【0039】

[0070]いくつかの実施形態において、患者または対象は、獣医学または動物の患者（例えば、イヌ、ネコまたはウマなど）である。いくつかの実施形態において、患者は、非ヒト哺乳動物である。獣医学患者および実験動物のコスト的制限ならびに研究の限られた血液体積は、使い易く、マイクロリットルの血液のみを必要とし、より低い一般費用を有する凝固診断法のための大きな必要性をもたらす。

20

【0040】

[0071]新規な凝固検査プラットフォームにおける大いなる関心に起因して、本明細書に記載の血液検査プラットフォーム（例えば、アッセイ、マイクロ流体デバイスおよび／またはそれらの組み合わせ）は、研究および製品開発のための極めて高い可能性を提供する。

30

【0041】

[0072]いくつかの実施形態において、患者は、ヘパリンまたはビタミンKアンタゴニスト（例えば、ワルファリン）などの抗凝固薬治療を受けている。いくつかの実施形態において、患者は、XARELTO（リバーロキサバン）、ELIQUIS（アピキサバン）、SAVAYS（エドキサバン）、PRADAXA（ダビガトラン）、またはBEVYXXA（ベトリキサバン）などの直接経口抗凝固薬（DOAC）による治療を受けている。いくつかの実施形態において、患者は、TFPIに対する抗体による治療を受けている。抗凝固薬は、救急看護および救命救急、外科手術、心臓病学およびがんを含む、多くの医療的状況において一般的に使用される。いくつかの新しい抗凝固薬が導入されているが、現在、患者が適切な用量に接しているかを確実に決定することができる検査はない。多すぎると抗凝固薬は、生命を脅かす出血を引き起こし得、少なすぎると抗凝固薬は、脳卒中および心発作のリスクの増加をもたらし得る。本発明の実施形態は、これらの新しい抗凝固薬を正確に監視し、これらの患者に対する安全性を改善することができるベッドサイド検査として使用することができ、またはこのベッドサイド検査に組み込むことができる。この検査は、最小限のトレーニングで、容易に解釈できる形式で実行することができる。実施形態において、これらのアッセイは、実験室で、結果が10分以内に読み取られる、約1mL未満、もしくは約500μL未満、もしくは約100μL未満、もしくは約50μL未満（1滴）の新鮮な全血またはクエン酸全血を必要とするデバイスで行うことができる。

40

【0042】

50

[0073]直接経口抗凝固薬（D O A C）の市場は、現在、凝固経路内の特異的な因子、例えば、第 I I a 因子または第 X a 因子を選択的に標的化する薬物で構成される。これらの薬物は非常に強力であるが、信頼性があるか、または使いやすい診断および監視検査の不足のため、特に、救命救急機関において、これらの薬物の使用および投与に関連するリスクの増加がある。D O A C の使用の最重要なリスクの 1 つは、胃腸出血である。これらの有害事象は、病的状態および死亡率をもたらすだけでなく、医療費の増加およびより長い入院期間をもたらす。

【 0 0 4 3 】

[0074]いくつかの実施形態において、本方法は、決定された血塊形成時間と、例えば、凝固カスケード異常を患っていない個体からの凝固因子 - 特定の血塊形成の参照範囲とを比較することによって、血液試料中の凝固異常を検出するステップ、および凝固カスケード内でそれが起こる場所を正確に示すステップを含む。いくつかの実施形態において、参照範囲は、正常な対象または複数の対象、例えば、凝固異常を患っていない個体に対して検出方法を使用して、確立することができる。いくつかの実施形態において、参照範囲は、検査血液試料が得られた同じ個体に基づいて確立することができる。例えば、参照範囲は、個体の医療処置の開始前に確立することができ、検査試料は、処置の開始後に同じ個体から得ることができる。試料は、検査試料が得られた個体の血縁（例えば、親、兄弟姉妹または子孫）から得ることもできる。参照範囲は、マイクロ流体デバイスの配置を含む、特定のアッセイの配置に合わせて、またはそれに応じてもよい。いくつかの実施形態において、それぞれの対象の凝固は、検査の時に「正常な」対照と、または特定の凝固因子もしくは因子の組み合わせのために予め決定された「正常な」参照範囲とを比較することができる。いくつかの実施形態において、アッセイのアプローチは、参照範囲の確立および / または検証を必要とする。

10

【 0 0 4 4 】

[0075]いくつかの実施形態において、参照範囲は、凝固カスケード異常を患っていない個体からのものなどの特定の凝固カスケード異常の対照または標準からのものである。いくつかの実施形態において、参照範囲は、急上昇または激減した試料 / 対照からのものであり、これは、商業的に利用可能であり得る。

20

【 0 0 4 5 】

[0076]血塊形成時間を、凝固異常を患う者からの参照範囲と比較することもできることが理解されるべきである。例えば、参照間隔では、異常を患っていない人々に対して「正常な」間隔の範囲があること、および異常を有すると確認された人々に対して「異常な」間隔の範囲があることが一般的である。時々、正常および異常ゾーンの中間のグレーゾーンがあり、これは、確定診断のためにその患者の試料に対してさらに徹底的な検査を行う必要があることを示す。

30

【 0 0 4 6 】

[0077]いくつかの実施形態において、本発明は、参照範囲または標準との比較を必要とせず、代わりに、凝固経路における阻害点が疑われる凝固因子の上流および下流を評価することによって、内部標準を提供する。

【 0 0 4 7 】

40

[0078]実施形態の例の説明は以下の通りである。

[0079]本明細書に記載の実施形態は、全血または血漿中の抗凝固薬および血小板阻害剤の検出、ならびに患者の凝固状態の評価のための迅速なアッセイ（いくつかの実施形態において、例えば、< 30 分、< 20 分、< 15 分、または < 10 分）を含む。これらのカスタマイズ可能な凝固パネルの入手可能性は、迅速なベッドサイド診断および薬物監視能を提供することによって、さまざまな凝固検査の環境内で満たされていない必要性を満たす。

【 0 0 4 8 】

[0080]実施形態において、本方法は、阻害されていると疑われる特定の凝固因子が、さまざまな濃度または量で血液試料（例えば、全血または血漿試料）に添加される、アッセ

50

イを含む。例えば、凝固因子は、2倍～100倍異なる量で試料の分割されたポーションに添加することができる。いくつかの実施形態において、凝固因子は、分割された諸ポーションにわたって5倍～20倍（例えば、約10倍）までの漸増濃度で試料の分割されたポーションに添加される。いくつかの実施形態において、試料の分割されたポーションに添加される凝固因子の濃度は、0.1ng/mL～10μg/mLの範囲であり得る。特定の濃度または量（例えば、グラジエントまたは異なる濃度の複数の試料）での凝固因子の添加は、以下の決定を可能にする。

【0049】

a) 凝固カスケードのこの特定の点での特定の異常の存在（例えば、抗凝固薬を介した薬物誘発性、自己免疫または血友病などの遺伝）；および

b) 凝固カスケードのこの特定の点での凝固機能の阻害。

【0050】

[0081]このアッセイの利用の例は以下が挙げられる。

a) 第ⅡⅠa因子（トロンビン）阻害剤の検出、およびさまざまな濃度（例えば、10μg/mL～10pg/mLの範囲；例えば、図7D、10、11、16を参照のこと）での第ⅡⅠa因子の添加による第ⅡⅠa因子阻害の評価。

【0051】

b) 第Xa因子阻害剤の検出、およびさまざまな濃度（例えば、10μg/mL～10pg/mLの範囲；例えば、図3、4A、7A～7C、9、11、16、19～21を参照のこと）での第Xa因子の添加による第Xa因子阻害の評価。

【0052】

c) 第XI因子または第XⅠa因子阻害剤の検出、およびさまざまな濃度（例えば、10μg/mL～10pg/mLの範囲；例えば、図13を参照のこと）での第XI因子もしくは第XⅠa因子、および／または第X因子もしくは第Xa因子の添加による第XI因子または第XⅠa因子阻害の評価。

【0053】

d) 第XII因子または第XⅠIa因子阻害剤の検出、ならびにさまざまの濃度（例えば、10μg/mL～10pg/mLの範囲；例えば、図13を参照のこと）での第XII因子もしくは第XⅠIa因子、および／または第XⅠ因子もしくは第Xa因子、および／または第X因子もしくは第Xa因子の添加による第XII因子または第XⅠIa因子阻害の評価。

【0054】

e) さまざまな濃度（例えば、10μg/mL～10pg/mLの範囲；例えば、図4Bおよび12を参照のこと）での第ⅡⅠa因子、第Xa因子またはこの因子の組み合わせの添加による、ヘパリン（分画された、低分子量のもの、または他のもの）を含むすべての種類の抗凝固剤の検出。

【0055】

f) さまざまな濃度（例えば、10μg/mL～1pg/mLの範囲）でのさまざまな凝固因子の添加による、線維素溶解（限定されないが、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）を含む）の検出および評価。

【0056】

g) 以下を含む、阻害／異常／非存在の因子の添加による、他の凝固異常の検出。

i . フィブリノーゲンの添加による無フィブリノーゲン血症／異常フィブリノーゲン血症

ii . 第V因子および／または第Va因子の添加による第V因子欠乏症

iii . 第VII因子および／もしくは第VIIa因子、第IX因子および／もしくは第IXa因子の添加による血友病AまたはB

iv . フォン・ヴィレブランド因子の添加によるフォン・ヴィレブランド因子病

v . 第ⅡⅠ因子／第VII因子／第IX因子／第X因子、および／または第ⅡⅠa因子／第VIIa因子／第IXa因子／第Xa因子の添加によるビタミンK依存性異常（ワルファリン、ビタミンK欠乏症、肝不全）

10

20

30

40

50

v i . A T I I I の添加によるアンチトロンビン欠乏症（腎臓疾患）

例えば、図 9 ~ 13 を参照のこと。

【 0 0 5 7 】

[0082]本明細書に記載の方法およびデバイスの実施形態は、電気インピーダンス、ビーズの添加およびビーズの流量 / 数の定量化、血塊形成部位の前および / もしくは後での流速ならびに / または圧力の測定、トロンボエラストグラフィー、蛍光検出（例えば、蛍光フィブリノーゲンによる）、濁度、磁気、流動力学（圧力または流速）、赤外光検出、赤外分光法、音響センサーおよび / もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出を含む、本明細書に記載のものなどのさまざまな凝固検出技術を使用して、凝固異常（例えば、血栓形成促進または抗血栓）を評価するために使用することができる。10

【 0 0 5 8 】

[0083]全血および血漿をさまざまな実施形態において使用することができる。

[0084]アッセイの実施形態は、同じ時に血小板および凝固系の機能を測定するために、A T P - ルシフェラーゼアッセイと組み合わせることができる。これは、十分な活性化の際の血小板の脱顆粒による、凝固カスケードおよび血小板機能の評価を提供することができる。血小板の活性化は、本明細書に列挙された凝固因子の添加により、または例えば、アデノシン二リン酸（A D P ）、アデノシン三リン酸（A T P ）、エピネフリン、コラーゲン、トロンビンおよびリストセチンなどの特定の血小板アゴニストの添加によって、起こり得る。この組み合わせ技術は、患者が、アスピリンまたはクロピドグレルなどの血小板阻害剤を摂取しているときに、血小板機能を評価するために使用することができる。これらのアゴニストは、凝固因子と組み合わせて、濃度グラジエントとして添加することができる。ルシフェラーゼは、典型的には、光吸収によって測定される。20

【 0 0 5 9 】

[0085]検出または分析することができる凝固異常としては、限定されるものではないが、先天性または遺伝性凝固障害および後天性凝固障害が挙げられる。

[0086]先天性または遺伝性凝固障害は、後天性変異、および、すなわち親から受け継がれる遺伝性凝固障害を含む。

【 0 0 6 0 】

[0087]先天性凝固障害は、出生時に存在し、子宮において発生する発育異常に起因する可能性がある。先天性凝固障害は、遺伝であってもよく、または遺伝でなくてもよい。いくつかの実施形態において、患者は、欠乏量の凝固因子の産生によって引き起こされ得るか、または凝固因子が凝固因子の機能を減少させる変異を有する遺伝子によってコードされる、凝固因子欠乏症を有していてもよく、または有する疑いがあってもよい。30

【 0 0 6 1 】

[0088]先天性および遺伝性凝固障害の例としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる。

- a) 血友病 A (第 V I I I 因子欠乏症)
- b) 血友病 B (第 I X 因子欠乏症)
- c) 血友病 C (第 X I 因子欠乏症)
- d) 第 I 因子（フィブリノーゲン）欠乏症
- e) 第 V 因子欠乏症
- f) 第 V I I 因子欠乏症
- g) 第 X 因子欠乏症
- h) 第 X I I I 因子欠乏症
- i) アルファ 2 - アンチトリプシン欠乏症
- j) アルファ 1 - アンチトリプシンピツツバーグ（アンチトロンビン I I I ピツツバーグ）欠乏症
- k) 複合因子欠乏症（例えば、第 V 因子および第 V I I I 因子、第 I I 因子、第 V I I 因子、第 I X 因子および第 X 因子）

10

20

30

40

50

1) 血小板異常（例えば、灰色血小板症候群、ベルナール・スーリエ症候群、フォン・ヴィレブランド病、グランツマン血小板無力症、ヘルマンスキー・パドラック症候群、クロピドグレルまたはアスピリン抵抗性）

[0089]後天性凝固障害の原因としては、限定されるものではないが、臓器（例えば、肝臓）の機能異常または不全、骨髄機能異常または不全、外傷（例えば、自動車事故）、外科手術、感染症（例えば、ラビウイルス、溶血性尿毒症症候群、敗血症など）、がん、不動、薬物（例えば、抗生物質、抗凝固薬、線維素溶解薬、血栓溶解薬、化学療法、体液など）、栄養補助食品／医薬品、毒性物、毒物注入（例えば、ヘビ、クモなど）、食物、自己免疫疾患（原発性、後天性または特発性のいずれか）、インプラント（例えば、外科的）、心血管イベント（例えば、脳卒中、心発作などを含む、身体のあらゆる場所の血液の血塊）、血管炎、輸血（例えば、全血、濃厚赤血球、血漿、血小板など）、移植（例えば、骨髄、腎臓、肝臓など）、妊娠（例、子癇前症、子癇、糖尿病など）、内分泌疾患（例えば、褐色細胞腫、クッシング、糖尿病など）、慢性炎症性疾患（例えば、過敏性腸症候群、過敏性の腸疾患、大腸炎など）、播種性血管内凝固および感染症が挙げられる。10

【0062】

[0090]凝固障害はまた、医原性（例えば、医療処置によって引き起こされる）であってもよく、または特発性の原因（例えば、化学療法または骨髄移植などのがん処置）を有していてもよい。

【0063】

[0091]いくつかの実施形態において、本発明は、マイクロ流体アプローチを利用する。マイクロ流体デバイスは、外因的に添加された凝固因子の量もしくは濃度などの1つまたは複数の試薬に対して血塊形成を評価することを可能にするために、基材に一連のチャネルを含み、それぞれのチャネルは、血塊の形成を引き起こし、および／または局在化させる形状を有する区域を有する。一連のチャネルのそれぞれは、（同じ試料および試薬に曝露されたときに）同一の血塊形成性を引き起こすように、同じ形状を有する。1つまたは複数の凝固因子のグラジエントの存在中で血塊形成を評価することによって、本発明は、上記に記載の凝固の異常または機能障害の敏感で特異的な検出を可能にする。20

【0064】

[0092]マイクロ流体デバイスを利用する実施形態は、以下の手順を含んでいてよい：

- a) 試料を患者から取得する；
- b) 1つまたは複数のアゴニスト（特異的因子）を、マイクロ流体デバイスの一連のチャネルにわたる漸増濃度でそれぞれのアンタゴニストを、本明細書に記載の患者の試料に添加する（マイクロ流体デバイスに入れる前、またはマイクロ流体デバイス内のいずれか）；
- c) 試料が抗凝固薬中に収集された場合、クエン酸ナトリウムまたはクエン酸デキストロースなどの+/-カルシウムを添加する；
- d) 次いで、試料を、血塊の形成がチャネル内の場所で引き起こされるマイクロ流体デバイスに流す；
- e) 凝固する時間を、その場所で測定および／または定量化し、次いで、記録する；

f) 複数の濃度の同じアゴニストを、等分された試料に添加して（別個のチャネル中）、凝固カスケード異常の存在および濃度を決定することができる；濃度は、（必ずしも必要ではないが）例えば、約0.75ng/mL～約750ng/mLの範囲であり得る；30

g) 複数の因子を、等分された試料に添加して（別個のチャネル中）、機能的異常である凝固カスケードの部分を特定することができる。D O A Cの特定において第I I a因子および第X a因子の使用などの上流および下流の因子を利用することによって、正常な凝固が回復する点を特定することができる。別の実施形態の例は、異常フィブリノーゲン血症または無フィブリノーゲン血症の特定である。全血試料のために、陰性対照レーン（アゴニストの添加なし）において凝固時間が長くなることがあり；凝固因子（第I I a因子および第X a因子など）の添加は、正常な凝固時間が回復しないが、試料へのフィブリノーゲンの添加は、この欠失／異常因子がデバイス上に置かれているので、凝固時間が回復40

する。

【 0 0 6 5 】

[0093]凝固を検出するためのマイクロ流体デバイスは、基材に形成された複数のチャネルを含むことができ、それぞれのチャネルは、血塊の形成を引き起こし、および／または局在化させるように構成された形状を有する血塊形成区域を含む。いくつかの実施形態において、複数のチャネルの血塊形成区域は、基材の中央領域に配置される。いくつかの実施形態において、本デバイスは、複数の試料注入ポートをさらに含み、それぞれの試料注入ポートは、複数のチャネルの1つの第1端に接続されている。いくつかの実施形態において、デバイスは、複数の排出ポートを含み、それぞれの排出ポートは、複数のチャネルの1つの第2端に接続されている。注入および排出ポートは、基材の周囲に交互パターンで配置されてもよい。いくつかの実施形態において、本デバイスは、すべてのチャネルまたは一連のチャネルを有する流体接続中に、共通の試料注入ポートを含む。

【 0 0 6 6 】

[0094]基材は、例えば、任意の種類のプラスチック、ポリジメチルシロキサン（PDM S）、シリコン、ガラス、または他の材料もしくは材料の組み合わせであり得る。実施形態において、本デバイスは、ガラスと結合した基材を含むが、ガラス上のガラス、PDM S上のPDMS、シリコン、任意の種類のプラスチックまたはそれらの組み合わせなどの他の基材を使用することができる。1つの実施形態において、基材はプラスチックである。基材は、血塊形成の検出を容易にするために（向かい合って、例えば、イメージング）、透明であり得る（がその必要はない）。

【 0 0 6 7 】

[0095]本デバイスは、約50 μmの直径、約11 μmの高さ、および100 + μmの幅を有するマイクロ流体チャネルを含むことができる。他のチャネルの寸法を利用することができる。

【 0 0 6 8 】

[0096]試料注入のための1つの入口ポートおよび1つの出口ポートを、それぞれのチャネルのために、備えることができる。あるいは、デバイスは、すべてのチャネルのために、またはチャネルの1つもしくは複数の群（または系列）のために、単一の試料ポートを備えることができる。

【 0 0 6 9 】

[0097]さまざまな実施形態において、アゴニスト（例えば、凝固因子）は、デバイスに注入する前に試料に添加されるか、またはアゴニストでデバイスがコーティングされるか、もしくはそうでなければ、試料の投入の前にアゴニストはデバイス内に事前に投入される。1つまたは複数のチャネルが凝固因子を含む場合において、凝固因子は、懸濁液、溶液であってもよく、または凍結乾燥されていてもよく、かつ表面結合されていてもよく、または表面結合されていないくともよい。凝固因子は、チャネルに事前に含めることができ（例えば、デバイスを製造する時点）、試料をデバイスに置く前に添加することができ、または試料と同時もしくは試料の後に注入ポート（または複数の注入ポート）を通してデバイスに入れることができる。

【 0 0 7 0 】

[0098]実施形態において、カルシウムは、デバイスに注入される前に試料に添加される。カルシウムは、追加ポートを通してデバイス内に添加することができ、またはチャネル内に事前に投入することができる。

【 0 0 7 1 】

[0099]実施形態において、488のコンジュゲート化フィブリノーゲンを試料に添加して、フィブリノーゲンの架橋の検出により血塊が形成されるのにかかる時間を検出する。

[00100]明視野において、血塊形成は、フィブリンの架橋を視覚化することによって、およびマイクロ流体チャネルを通る試料の流れの停止によって検出することもでき、これは、血塊に関連しない材料を洗い流す追加の洗い流しステップあり、またはなしで行うことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

[00101] 実施形態において、試料は、毛細管現象によりデバイスまたはマイクロ流体力アトリッジに投入される。試料はまた、例えば、真空、シリンジポンプまたはいくつかの実施形態において、重力を含む他の適切な手段の使用によって、チャネルを通って強制的に流すことができる。試料は、親水性にすることによってなど、マイクロ流体デバイス(例えば、基材)の表面の性質を変えるコーティングを使用することによって、毛細管現象または流れによって投入を促進することもできる。

【 0 0 7 3 】

[00102] 実施形態において、マイクロ流体チャネルの設計は、血液またはフィブリンの血塊の形成を引き起こし、および/または局在化させる流れの分離ならびに閉塞の1つの区域を生じさせるために、変更された形状の1つの区域(異なる角度の曲がり、および/または直径を含む)を含む。血塊の形成にかかる時間を、定量化および記録することができる。

10

【 0 0 7 4 】

[00103] 実施形態において、本デバイスは、血塊を形成するのにかかる時間を評価することによって、抗凝固剤、例えば、FXa阻害剤、FIIa阻害剤、ヘパリンおよびビタミンKアンタゴニスト(例えば、ワルファリン)の存在を検出し、その効果を評価するために使用される。

【 0 0 7 5 】

[00104] 測定された血塊形成時間は、試料中の抗凝固薬から生じる凝固阻害の量と相関する。このプロセスは、線維素溶解薬に適用することもできる。このプロセスは、本明細書に記載の異常な凝固時間の後天性または先天性の原因を含む、他の病状に適用することもできる。

20

【 0 0 7 6 】

[00105] 実施形態において、本デバイスは、例えば、約3~10分、特定の例において、約5分という比較的短時間で読み出しを提供する。

[00106] マイクロ流体デバイスおよびアッセイの例を、下記に記載し、図面に図示する。

【 実施例 】**【 0 0 7 7 】**

30

[00107] 実施例 1

[00108] 図1A~1Dは、本発明の実施形態の例による、マイクロ流体デバイスのレイアウトの略図である。

【 0 0 7 8 】

[00109] 図1Aは、基材15に形成された1つまたは複数の連続マイクロ流体チャネル(例えば、マイクロチャネル)20を有するマイクロ流体デバイス10の循環レイアウト(これは、中心点を有する任意の対称多角形でもあり得る)の上面図であり、それぞれのチャネルは、1つの注入口(注入ポート)30および排出口(排出ポート)35と接続されている。チャネルのポーション、例えば、チャネルの中央は、血塊形成を促進する、流れの分離もしくは混乱、または試料の流れの閉塞をもたらすために、特有の形状、例えば、血塊形成/局在化区域25を有することができる。これらは、使用される特定のアッセイに応じて、この單一デバイス中の2つ以上のこれらのマイクロ流体チャネルであってもよい。この設計は、3つ以上の試料、例えば、最大で10までの試料、または10超の試料などの複数の試料を同時に評価することを可能にし得る。典型的には、それぞれの試料(または試料のそれぞれのアリコート)は別個のチャネルを必要とする。図1Aにおいて、4つのチャネルが図示され、それぞれが、例えば、マイクロ流体デバイスの中央領域に位置する、マイクロ流体デバイス上に近接して位置する血塊形成/局在化区域25を有する。試料は、手動で、または電子ディスペンサーによって注入口を通してデバイスに入れることができ、圧力/真空の適用、毛細管現象によって、または、マイクロ流体チャネルが親水性材料でコーティングされるか、もしくはそれで作られている場合などに、化学的

40

50

相互作用により、マイクロ流体チャネルを通って進む。この実施例の設定において、アゴニスト + / - カルシウム + / - 血塊検出試薬は、メイン注入口に添加され、試料に事前に混合されなければならず、または注入口もしくはマイクロ流体チャネルにコーティングされなければならない（「+ / -」という用語は、本明細書で使用される場合、「あり、またはなし」を意味する）。すべての血塊形成 / 局在化区域は、例えば、2倍～10倍の範囲であってもよい倍率で、1つの単一イメージングフィールド（破線の円50は、血塊形成区域25を包含する）で調査されてもよい。

【0079】

[00110]図1Bは、それぞれのチャネル20についての複数の注入ポートポート30、40、42の例を有するが、図1Aと同様のレイアウトの上面図である。これは、アゴニスト + / - カルシウム + / - 血塊検出試薬を、マイクロ流体チャネル内の試料に添加することを可能にする。これらは、1つまたは複数の追加注入口40、42であり得、これらは、個々に、メインチャネル20もしくはメイン注入区域と直接接続することができ、または一部は、メインチャネルもしくは主要注入ポートに接続する少なくとも1つと互いに間接的に接続されていてもよい。

10

【0080】

[00111]図1Cは、基材15中のチャネル20の注入ポート30および排出ポート35を図示するマイクロ流体デバイスのレイアウトの側面図である。1つのチャネルのみが示されるが、図1Aに図示されるように、1つまたは複数のチャネルを備えていてもよい。加えて、1つまたは複数の注入ポートは、図1Bに図示されるように、それぞれのチャネルを備えていてもよい。図1Cに模式的に図示されるように、検出デバイス55は、血塊形成を測定するために、チャネルのそれぞれに備えられ得る。検出デバイス55は、血塊形成、例えば、血塊形成時間を検出するためのイメージングセンサーを含むことができる。イメージングは、本明細書に記載の明視野イメージングであり得る。検出デバイスは、本明細書に記載の任意の他の測定 / 検出の方法論を使用してもよい。

20

【0081】

[00112]図1Dは、さまざまなアッセイに利用することができる代替のレイアウトを有するマイクロ流体デバイス110の上面図である。これらは、試料注入およびチャネル120あたり1つの排出口（排出ポート）135を有する1つまたは複数の注入口（注入ポート）130であり得る。血塊形成を刺激する形状変化区域125が、それぞれのチャネル120に含まれる。チャネルは、例えば、2倍～10倍の範囲であってもよい倍率で、1つの視野内（破線の長方形150）で血塊形成 / 局在化区域125の可視化を可能にするために、平行の様式で配置される。それぞれのチャネルは、アゴニストおよび / もしくはカルシウム添加のための1つまたは複数の区域140および混合のための領域145を含むことができる。示される例において、チャネル120は、同一の形状を有する。

30

【0082】

[00113]図2Aおよび2Bは、実施形態の例による、循環マイクロ流体凝固デバイス210を図示する。示されるように、本デバイスは、4つのチャネル220を含み、それぞれのチャネルは、血塊形成を引き起こし、および / または局在化させるための形状を有する血塊形成 / 局在化区域225を含む。血塊形成区域225は、中央領域に配置される。それぞれのチャネル220は、注入ポート230および排出ポート235に接続されている。すべてのチャネルの注入および排出ポートは、デバイス210の周囲に交互パターンで配置される。中央の破線の円250は、すべての注入チャネルの「凝固区域」225を包含する一般的な視野を示す。図2Aに示されるチャネルの配置は、ウィッキング毛細管流動が生じる配置であるが、多くの他の配置が可能である。特定の配置は、配置がデバイスを製造するために特に有利であるか否かなどの1つまたは複数の基準に基づいて選択されてもよい。

40

【0083】

[00114]図2Bは、視野内の血塊形成 / 局在化区域225の例を図示する図2Aのデバイス210の中央部分の拡大図である。血塊形成区域は、定量化することができる血塊の

50

形成を促す配置を有することができる。血塊形成区域は、血塊形成のための、流れの分離、閉塞、流れの混乱またはそれらの組み合わせを引き起こすように設計された形状を有することができ、血塊形成のための流れの混乱を引き起こすように設計された形状を有していてもよい。例において、血塊形成区域は、使用することができるさまざまな形状を図示するために異なる形状を有する。典型的には、形状は、それぞれのチャネルにおいて同じ流れの状態を確保するために、それぞれのチャネルについて同じである。図2Bに図示される血塊形成区域の形状は、例であり、使用することができる形状のバリエーションのすべて含むわけではない。

【0084】

[00115]図2Bに図示されるように、それぞれの血塊形成区域は、血塊形成区域を通る試料の流れを、少なくとも1回、好ましくは複数回方向を強制的に変化させるように、配置することができる（例えば、成型される）。方向のそれぞれの変化は、例えば、約45度～約135度、約60度～約120度、約75度～約105度、または約90度の範囲であり得る。加えて、突起もしくは島などの1つまたは複数の流れの搅乱物を、流れを乱すために備えることができる。試料が血塊形成区域を通過しながら、それは、流れの搅乱物にぶつかり、搅乱物の周囲を流れるように強制される。搅乱物は、コーナーまたは鋭いエッジを含んでいてもよく、三角形、長方形、または図2Bに図示されるような別の方法で成型されてもよい。搅乱物および他の構造的特徴の組み合わせ、または他の構造的特徴だけで、他の試料から離れた領域に入る新しい試料と相互作用する円形のパターンで試料が流れる、循環領域を形成してもよい。流体の流れの観点から、搅乱物の背後の渦流はまた、渦領域の流体の流れおよび試料の交点（例えば、乱流の交点）で試料が他の試料と相互作用するように、凝固を促してもよい。

10

【0085】

[00116]いくつかの実施形態において、搅乱物は、凹面を含むことができる（例えば、図3A）。血塊形成／局在化空域は、チャネルの狭窄を含んでいてもよい。試料の流れの方向を変化させること、および／または直径、角度の変化、および／またはチャネルの形状、および／または1つもしくは複数の搅乱物の周囲で試料を強制的に流すことによって、血塊形成区域は、血塊形成を促進するために、流れの分離および試料の流れの閉塞を誘導する。典型的には、チャネルおよび血塊形成区域は、チャネルのそれについて同じ流れ特性を提供するために、対称パターンで配置される。

20

【0086】

[00117]実施例2

[00118]本発明の実施形態に従ってアッセイを行うための一般的なプロトコールは以下の通りである。

【0087】

a) 試料、アゴニスト、+/-カルシウム、+/-血塊検出剤と一緒に添加する。

i. カルシウムは0.2mMの最終濃度まで（この濃度は、3.2%の緩衝化クエン酸ナトリウムとともに使用するために特に適切である。別の抗凝固薬が使用される場合、カルシウムの濃度は、0.2mMでなくてもよい）。

30

【0088】

i i. 血塊検出剤は、蛍光標識されたフィブリノーゲン、磁石、ビーズ（蛍光または着色されていてもよい）を含むことができる。

b) マイクロ流体デバイスに投入する。

40

【0089】

i. 例えば、図1A～1D, 2Aおよび2Bの、注入投入配置および順序の例を参照のこと。

c) 温度制御。

【0090】

i. 室温。

i i. 37（体温）まで上昇させててもよい（体温は、典型的には37であるが、

50

アッセイ実行温度は、患者の実際の温度に従って変更することができる。例えば、患者が発熱している場合、アッセイ実行温度を上昇させることができる)。

【0091】

- d) 血塊検出を行い、血塊形成時間を測定する(例えば、4 ~ 12分)。
- e) それぞれの試料が血塊の形成を開始するときの時間を記録する。

[00119]実施例3

[00120]図3A ~ 3Cは、実施形態の例による、4つのチャネル320と血塊形成 / 局在化区域225を有するマイクロ流体デバイス310を用いて、血漿および蛍光標識化フィブリノーゲンを使用する血塊検出を図示する。マイクロ流体デバイスは、すべての血塊形成区域325が同じ形状を有する以外は、図2Aおよび2Bに示されるデバイスと同様である。それぞれの血塊形成 / 局在化区域325は、試料の流れを乱すための突起を含む。この実施例において、図3Aに示されるように、突起は、一般に、三角形の形状である。突起の2つの辺は直線状であり、1つの辺は凹状である。それぞれの血塊形成区域325は、流れの方向を4回変化させ、2回の90度の方向の変化を含む。

10

【0092】

[00121]1つの例において、血塊検出のプロセスは、以下の手順ステップを含むことができる。

a) 血漿試料を、 $6 \mu\text{L}$ の血漿 + $0.6 \mu\text{L}$ のアゴニスト(試料に対して10%体積) + $0.6 \mu\text{L}$ のカルシウム(2mM のストック、試料に対して10%体積) + $0.6 \mu\text{L}$ のフィブリノーゲン(これは、濃度を変えることができ、一般に、試料に対して<10%体積)を含むように事前に混合する。前述の値は、調整および変更することができ、同様の結果を得ることができる。

20

【0093】

b) それぞれのチャネルについて、事前に混合された試料のアリコートをチャネルの注入ポートに置く。

- c) 試料のアリコートは毛細管現象によってチャネルに吸い込まれる。

【0094】

- d) チャネルは、37で10分間画像化し、血塊を検出するための時間を記録する。

[00122]図3Bにおける実施例は、1時点(5分)でマイクロ流体チャネルの撮影された蛍光画像を示す。使用される血漿試料は、 250ng/mL のアピキサバンを含有する。さまざまな濃度(0.75ng/mL のFXa、 7.5ng/mL のFXa、および 75ng/mL のFXa)のアゴニストである第Xa因子(FXa)または緩衝液単独(陰性対照)を、カルシウムおよび488-コンジュゲート化フィブリノーゲンと一緒に血漿試料に添加した。蛍光フィブリノーゲンの架橋は、架橋フィブリン血塊の形成および存在を示す。図3Bの右側のチャネルにおいて見える、より高い濃度のFXa(7.5ng/mL のFXa、および 75ng/mL のFXa)は、図3Bの左側のチャネルにおいて見える、より低い濃度(0.75ng/mL のFXa)または陰性対照よりも早期に血塊形成をもたらす。図3Cは、架橋フィブリン血塊を図示する1つのチャネルの血塊形成区域の拡大図である。

30

【0095】

[00123]実施例4

[00124]図4Aおよび4Bは、実施形態の例による、並行マイクロ流体チャネルデバイス410において全血を使用する血塊検出を図示する蛍光画像である。マイクロ流体チャネル420は、さまざまな濃度(7.5ng/mL 、 75ng/mL 、 750ng/mL)のアゴニストである第Xa因子、または緩衝液単独(陰性対照)で事前にコーティングされた。蛍光画像は、1時点(10分)で撮影される。マイクロ流体チャネルは、使用の前に緩衝液で洗浄して、マイクロ流体チャネル内に結合したFXaのみを残した。新鮮な全血をそれぞれの注入ポートに置き、血液を毛細管現象によって吸い込んだ。血液を10分間流したままにし、次いで、チャネルを穏やかに緩衝液で洗浄した。評価された2つの試料の明視野画像を表す。抗凝固薬を含有しない図4Aの試料(指刺しの血液)は、陰性

40

50

対照を含むすべての4つのチャネルで血塊をもたらした。未分画ヘパリン（指刺しの血液に添加される）を含有する図4Bの試料は、チャネル中のFXaの濃度に応じて、血塊形成のグラジエントをもたらした。陰性対照では、ほとんどの細胞は接着しておらず、最小限の血塊形成を示した。未分画ヘパリンは、アンチトロンピンIIIA依存性の様式で、第IIa因子および第Xa因子を阻害し、これが、適した濃度でのこれらの因子の添加が、試料の凝固能の回復を助け得る理由である。

【0096】

[00125]実施例5

[00126]図5Aおよび5Bは、(1)それぞれチャネルは、血液／血漿を等条件に供する、ならびに(2)凝固検出を最適化および実施するそれぞれのチャネル内で凝固促進形状が存在するという特徴を含むマイクロ流体デバイス設計の追加の実施形態を図示する。
図5Aは、単一試料注入530を取り囲んで接続された対称チャネル520の円形配列を含むデバイス510を図示し、それぞれのチャネルは、血塊促進および／または局在化区域525を有する。チャネル520は、アゴニストおよび／もしくはカルシウム添加のための1つまたは複数の区域540および／または混合のための区域545を含んでいてもよく、または含んでいなくてもよい。図5Bは、アゴニスト／カルシウム添加のための1つまたは複数の区域540および／または混合のための区域545を有するか、または有さない血塊形成区域525で複数の対称チャネル520に分割された単一試料注入ポート530を有する円筒形設計を利用するデバイス512の代替の実施形態を図示する。デバイス510、512の両方とも、吸収フィルターを有するか、または有さない試料収集リザーバー560を含んでいてもよい。

10

20

30

【0097】

[00127]実施例6

[00128]図6は、本発明の実施形態の例による、血液試料中の凝固を評価する方法のフロー図である。血液試料は、全血試料または血漿試料であり得る。本方法によれば、凝固因子は、血液試料の複数のアリコートに添加される。それぞれのアリコートは、異なる濃度で凝固因子を受けることができる。複数のアリコートは、マイクロ流体デバイスの複数のチャネルに適用することができる。あるいは、または加えて、凝固因子は、血液試料が適用されるデバイスの上または中に、事前にコーティングすることができる。血塊形成時間は、それぞれのチャネルで測定され、凝固は、測定された血塊形成時間に基づいて評価される。あるいは、または加えて、チャネルのそれぞれにおける血塊形成の程度（任意選択で、血塊溶解の程度）は、定められた時点（複数可）で測定され、凝固は、測定された血塊形成の程度（任意選択で、血塊溶解の程度）に基づいて評価される。

40

【0098】

[00129]任意選択で、図6に図示されるように、血塊形成時間は、参照値または参照範囲と比較することができる。1つの例において、血塊形成時間は、凝固カスケード異常を患っていない個体からの凝固因子特異的血塊形成の参照範囲と比較される。これは、例えば、血液試料中の凝固カスケード異常を検出するために有用である。別の例において、血塊形成時間は、凝固カスケード異常を患っていない個体からの試料について測定された血塊形成時間と比較される。これは、例えば、血液試料中の凝固カスケード異常を検出するために有用である。さらに別の例において、血塊形成時間は、既知の量の抗凝固剤を含有する試料について測定された血塊形成時間と比較される。これは、例えば、血液試料中の抗凝固剤を検出するために有用である。

50

【0099】

[00130]図6の方法における使用のためのマイクロ流体デバイスは、図1A～1D、2A～2B、3A～3C、4A～4Bおよび5A～5Bに図示されるデバイスなどの複数のチャネルを有する本明細書に記載の任意のマイクロ流体デバイスであり得る。実施形態において、本デバイスは、基材に形成された複数のチャネルであって、それぞれのチャネルが、血塊の形成を引き起こし、および／もしくは局在化させるように構成された形状を有する血塊形成区域を含み、複数のチャネルの血塊形成区域は、基材の中央領域に配置され

50

る、チャネル；複数の注入ポートであって、それぞれの注入ポートが、複数のチャネルの1つの第1端に接続されている、注入ポート；ならびに複数の排出ポートであって、それぞれの排出ポートが、複数のチャネルの1つの第2端に接続され、注入および排出ポートが、基材の周囲に交互パターンで配置される、排出ポートを含む。

【0100】

[00131]実施例7

[00132]図7A～7Dは、さまざまな濃度でのさまざまなFXaおよびFIXa阻害剤についての凝固曲線の例を図示する。次いで、それぞれの組み合わせが血塊を形成するのにかかる時間をプロットする。それぞれの濃度の阻害剤に対する凝固曲線は、試料中の抗凝固薬の存在および濃度に依存する。図面は、さまざまな濃度でアゴニストに曝露されたときに、4つの異なるDOACについての時間-凝固(time-to-clot)を図示する。時間-凝固は、阻害剤の濃度の増加につれて増加し、機能性抗凝固の増加を実証する。アゴニスト(図7A～7CについてFXa、および図7DについてFIXa)の濃度は、それぞれの図のX軸にプロットされる。

10

【0101】

[00133]図7Aは、リバーロキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。グラフは、阻害剤であるリバーロキサバンの異なる濃度(0ng/mL、250ng/mLおよび500ng/mL)についての凝固曲線を示す。それぞれの曲線は、アゴニスト(FXa)濃度(nmol/L; x軸)の関数としての平均凝固検出時間(分; y軸)を示す。グラフに示されるデータを以下に要約することができる。

20

【0102】

[00134]0ng/mLのリバーロキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が7.5ng/mLに至るまで、検出された。

[00135]250ng/mLのリバーロキサバンの濃度で、血塊形成時間は、500ng/mLよりも低いが、アゴニスト濃度が375ng/mLに至るまで、陰性対照よりも有意に長い。

30

【0103】

[00136]500ng/mLのリバーロキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、750ng/mLに至るまで、検出された。

[00137]図7Bは、アピキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。グラフは、アピキサバンの異なる濃度(0ng/mL、250ng/mLおよび500ng/mL)についての凝固曲線を示す。図7Aにおけるように、それぞれの曲線は、アゴニスト(FXa)濃度(nmol/L; x軸)の関数としての平均凝固検出時間(分; y軸)を示す。グラフに示されるデータを以下に要約することができる。

30

【0104】

[00138]0ng/mLのアピキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が7.5ng/mLに至るまで、検出された。

[00139]250ng/mLのアピキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が75ng/mLに至るまで、検出された。

40

【0105】

[00140]500ng/mLのアピキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が938ng/mLに至るまで、検出された。

[00141]図7Cは、エドキサバンの検出を図示する実施例のデータのグラフである。グラフは、エドキサバンの異なる濃度(0ng/mL、250ng/mLおよび500ng/mL)についての凝固曲線を示す。図7Aにおけるように、それぞれの曲線は、アゴニスト(FXa)濃度(nmol/L; x軸)の関数としての平均凝固検出時間(分; y軸)を示す。

40

【0106】

[00142]図7Dは、ダビガトランの検出を図示する実施例のデータのグラフである。図7Aおよび7Bにおけるように、図7Dのグラフは、阻害剤、ここではダビガトランの異

50

なる濃度(0 ng/mL、25 ng/mL、250 ng/mLおよび500 ng/mL)についての凝固曲線を示す。それぞれの曲線は、アゴニスト(FIIa)濃度(n g/mL; x軸)の関数としての平均凝固検出時間(分; y軸)を示す。図7Dのグラフに示されるデータを以下に要約することができる。

【0107】

[00143] <25 ng/mLのダビガトランの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が71 ng/mLに至るまで、検出された。

[00144] 250 ng/mLのダビガトランの濃度で、得られた血塊形成は、<2.5分で、アゴニスト濃度が710 ng/mLに至るまで、検出された。

【0108】

[00145] 500 ng/mLのダビガトランの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、710 ng/mLに至るまで、検出された。

[00146] 自動化を利用して、試料およびアッセイの間のばらつきを低減することができる。

10

【0109】

[00147] 実施例 8

[00148] FXa阻害剤の存在の検出およびそれらの相対濃度の推定に加えて、本明細書に記載のアッセイは、試料に添加される凝固因子の適した上流および下流を選択することによって、FXa阻害剤をFIIa阻害剤と区別することができる。

【0110】

[00149] 図8は、以下の実施例でさらに記載されるように、適した凝固因子の選択をガイドすることができる基本的な凝固カスケードを図示する。図8に示されるように、カスケードは、内因性経路および外因性経路を含み、この両方は、カスケードの共通経路を経て架橋フィブリン血塊を導き得る。内因性経路は、例えば、表面接触によって活性化され得る。外因性経路は、例えば、組織の外傷によって活性化され得る。

20

【0111】

[00150] 実施例 9

[00151] 図9は、第Xa因子(FXa)阻害/欠乏/機能の異常を検出する方法の実証を提示する模式図である。限定されないが、FXII、FXI、FIX、FVIIIを含む、上流の(活性化されていないか、または活性化された)凝固因子の添加は、例えば、下流の因子の添加と比較して、凝固時間の延長を実証する。あるいは、凝固時間の延長は、対照の凝固時間を参照して決定することができる。しかしながら、限定されないが、FI、FIIを含む、下流の(活性化されていないか、または活性化された)凝固因子の添加は、影響を受けていない(例えば、正常の)凝固時間を実証し、これは、対照としての機能を果たすことができる。FXaの添加は、上流の因子のより高い濃度でさえ、濃度依存性の方法で凝固時間の延長を実証し、凝固チームは、対照に達しない可能性がある。図示されるように、直接FXa阻害剤の例としては、リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバンおよびベトリキサバンが挙げられる。

30

【0112】

[00152] 実施例 10

[00153] 図10は、第IIa因子(FIIa)阻害/欠乏/機能の異常を検出する方法の実証を提示する模式図である。限定されないが、FXII、FXI、FIX、FX、FV、FVIIIを含む、上流の(活性化されていないか、または活性化された)凝固因子の添加は、凝固時間の延長を実証する。限定されないが、FIを含む、下流の(活性化されていないか、または活性化された)凝固因子の添加は、影響を受けていない凝固時間を実証する。FIIaの添加は、濃度依存性の方法で凝固時間の延長を実証する。図示されるように、直接FIIa阻害剤の例としては、ダビガトラン、ビバリルジンおよびアルガトロバンが挙げられる。

40

【0113】

[00154] 実施例 11

50

[00155]図11は、試料中のFⅪⅠaおよびFXa阻害の間で検出および区別する方法の実証を提示する模式図である。FXaおよびFⅪⅠa阻害剤の存在中で、限定されないが、FXII、FXI、FIX、FVIIIを含む、上流の（活性化されていないか、または活性化された）凝固因子の添加は、凝固時間の延長を実証する。試料へのFXaの添加は、FXaおよびFⅪⅠa阻害について、濃度依存性の方法で凝固時間の延長を実証する。試料へのFⅪⅠaの添加は、FⅪⅠa阻害の存在中、濃度依存性の方法で、凝固時間の延長を実証するが、FXa阻害の存在中で影響を受けていない凝固時間を実証する。

【0114】

[00156]実施例12

[00157]図12は、FXa阻害／欠乏／機能の異常を間接的に検出する方法の実証を提示する模式図である。限定されないが、FXII、FXI、FIX、FVIIIを含む、上流の（活性化されていないか、または活性化された）凝固因子の添加は、凝固時間の延長を実証する。限定されないが、FⅪ、FⅠを含む、下流の（活性化されていないか、または活性化された）凝固因子の添加は、存在する阻害剤の種類に応じた濃度依存性の方法で、正常な凝固時間または凝固時間のわずかな延長を実証する。FXaの添加は、濃度依存性の方法で凝固時間の延長を実証する。これは、アンチトロンビンⅢ（ATIII）のFXaへの親和性／結合を増加させる薬物の存在による二次的なFXa阻害に起因し、それによって、これを阻害する。実施形態は、ATIIIの検出、それによって、FXa、FⅪaまたは両方の間接的な阻害を検出することを含むことができる。FXaに対するATIIIの結合／親和性を増加させる薬物としては、ヘパリン、例えば、低分子量ヘパリン（LMWH）および未分画ヘパリン（UFH）、エノキサバリンならびにフオンダパリヌクスが挙げられる。

10

【0115】

[00158]実施例13

[00159]図13は、試料中のFⅪⅠaおよびFXa阻害の間で検出および区別する方法の実証を提示する模式図である。FXIⅠa阻害剤の存在中で、FXIⅠaの添加は、凝固時間の濃度依存性の延長をもたらす。限定されないが、FXI、FIX、FVIII、FX、FⅪ、FⅤを含む、下流に添加された因子の添加は、影響を受けていない凝固時間をもたらすだろう。FXIa阻害剤の存在中で、FXIⅠaの添加は、凝固時間の延長をもたらす。FXIaの添加は、凝固時間の濃度依存性の延長をもたらすだろう。限定されないが、FIX、FVIII、FX、FⅪ、FⅤを含む、下流に添加された因子の添加は、影響を受けていない凝固時間をもたらすだろう。このアプローチは、FXIⅠa阻害剤、FXIa阻害剤、FXa阻害剤およびFⅪⅠa阻害剤の検出および区別のための包括パネルを行うためにさまざまな組み合わせで使用することもできる。

20

【0116】

[00160]実施例14

[00161]図14は、さまざまな種類の血友病の間で検出および区別する方法の実証を提示する模式図である。血友病Cは、FXIⅠaの添加による凝固時間の延長、FXIの添加による濃度依存性の延長、およびFXIaまたは任意の他の下流の因子の添加による影響を受けていない凝固時間をもたらすだろう。血友病Bは、FXIⅠaおよびFXIaの添加による凝固時間の延長、FIXの添加による濃度依存性の延長、およびFIXaまたは任意の他の下流の因子の添加による影響を受けていない凝固時間をもたらすだろう。血友病Aは、FXIⅠaおよびFXIaの添加による凝固時間の延長、FVIIIの添加による濃度依存性の延長、およびFXaまたは任意の他の下流の因子の添加による影響を受けていない凝固時間をもたらすだろう。

30

【0117】

[00162]先天性障害のためには、実施形態は、検出のために非活性化因子を添加することができるが、非活性化因子は、対照としての機能を果たすことができる。

[00163]実施例15

[00164]図15は、フィブリノーゲン、すなわち、第Ⅰ因子（FⅠ）またはFXIⅠI

40

50

による問題を検出する方法の実証を提示する模式図である。無フィブリノーゲン血症または異常フィブリノーゲン血症は、F I の上流のすべての因子の添加による凝固時間の延長、F I の添加による濃度依存性の延長をもたらすだろう。F X I I I 欠乏症 / 異常は、F X I I I の上流のすべての因子の添加による経時的な血塊の強度および血塊の安定性の変化、F X I I I の添加による血塊の強度および時間の安定性における濃度依存性の変化をもたらすだろう。

【0118】

[00165]実施例16

[00166]図16A～16Cは、さまざまな濃度でのF X a およびF I I a 阻害剤についての凝固曲線スコア (C C S) を図示する。さまざまな濃度でのアゴニストのそれぞれの凝固時間の生データは、多変数統計モデリングに基づく単一の凝固曲線スコア (C C S) を計算するために使用される。次いで、このC C S は、特定の阻害剤についての陽性または陰性に患者を入れるための単一の整数として使用することができる。このC C S は、患者の試料中の薬物の機能的濃度を外挿するために使用することもできる。機能的濃度は、血液試料中の薬物に対する二次性の抗凝固の量を表す。図16Aは、2つのF X a 阻害剤 (アピキサバン、リバーロキサバン) および1つのF I I a 阻害剤 (ダビガトラン) のC C S が、アゴニストとしてF X a を使用する濃度に依存してどのように変わるかを示す。図16Bは、2つのF X a 阻害剤および1つのF I I a 阻害剤のC C S が、アゴニストとしてF I I a を使用する濃度に依存してどのように変わるかを示す。図16Cは、それぞれのアゴニストに対するC C S を、試料中の阻害剤の種類を特定するために使用し得る方法を実証する。

10

【0119】

[00167]実施例17

[00168]図17は、患者の記述統計量を提示する表1を示す。クエン酸血漿試料を、マサチューセッツ総合病院の救急診療部に入院する患者から収集した。すべての血漿試料は、臨床医が凝固検査 (P T / I N R 、 a P T T 、 D T T またはその他) を指示した。患者の試料を本明細書に記載のアッセイの実施形態を使用して評価した。患者の医療記録を抗凝固薬の投与歴について見直した。すべての患者の試料は、マサチューセッツ総合病院およびマサチューセッツ工科大学の両方で、施設内倫理委員会 (I R B) の承認と規制に従って収集した。

20

【0120】

[00169]実施例18

[00170]図18A～18Cは、プロトロンビン時間 (P T) および国際標準化比 (I N R) がF X a - I 抗凝固に対して感受性であるが特異的ではないことを図示する。R T およびI N R の両方を、対照患者およびF X a - I に接していることが確認された患者の間で比較した。異常なP T は、> 14秒として定義され、異常なI N R は、> 1.2として定義された。図18Aおよび18Bは、F X a - I に接した患者と総合対照とのP T およびI N R を比較するR O C 曲線を示す。図18Cは、評価されたP T およびI N R の結果を有する患者の記述統計量の表を示す。一元配置分散分析を使用して、リバーロキサバンおよびアピキサバンの両方を用いる正常ならびに異常な対照を比較した。有意性を $p < 0.05$ として定義した。結果は、異常な対照と比較した場合、F X a - I の患者と比較して有意性がないことを示す。

30

【0121】

[00171]実施例19

[00172]図19A～19Gは、実施例の凝固時間データおよび比較凝固曲線を図示する。凝固時間を、すべての患者群についてさまざまなアゴニスト濃度で比較して、凝固曲線を作図した。図19A～19Dは、異なる群の患者に関して、さまざまなアゴニスト濃度での凝固時間の平均および標準誤差バーを実証する散布図を示す。図19Eは、すべての患者群の平均凝固時間と標準誤差バーを示し、これは、比較のための单一グラフにおいて実証される。3つのF X a - I 群 (アピキサバン、リバーロキサバン、F X a - I) のす

40

50

べては、対照群と総 F X a - I、リバーロキサバンおよびアピキサバン群の間に有意な統計的差異がある複数の濃度があるので、主観的に、対照群とは非常に異なるように見える。図 19 F および 19 G は、正常対異常な P T または I N R を有する患者に分けた対照群の標準誤差バーによる凝固までの平均時間を示し、異なる対照群の間でこれらの試験に大きな差がないことを実証する。

【 0 1 2 2 】

[00173]実施例 2 0

[00174]図 20 A ~ 図 20 E は、患者の試料中の F X a - I の検出についての、凝固曲線スコア (C C S) 解析および C C S 利用の評価を図示する。図 20 A は、患者群の間の C C S 比較のための平均および標準誤差バーによる散布図を示す。C C S が 0 の点線は、患者の試料中で F X a 阻害が存在するか否かの決定のための選択されたカットオフを表す。図 20 B は、患者がそれらの系において F X a - I を有するか否かを決定するための C C S スコアを利用する R O C 曲線を示す。図 20 C は、異なる患者群についての C C S の記述統計量を提示する。図 20 D および 20 E は、F X a - I 検出の正確さの決定のための C C S を使用する評価を図示する。

10

【 0 1 2 3 】

[00175]実施例 2 1

[00176]図 21 A および 21 B は、機能的薬物濃度計算を図示する。制御された急上昇したリバーロキサバン試料のそれぞれについて計算された C C S スコアを使用して、最良フィット曲線を、図 21 A に示されるように、C C S を薬物濃度に変換する式に対してプロットした。次いで、この式を、それぞれの患者の試料について機能的濃度を誘導するために、評価された患者の試料についての C C S 値のそれぞれに適用した。これらの濃度を、それぞれの試料中の抗 X a 発色アッセイに由来するリバーロキサバン濃度と直接比較した。これらの 2 つの値を互いに対応してプロットすると、図 21 B に示されるように、抗 X a 濃度および D O A C 試験濃度の間で良好な相関 ($R^2 = 0.827$) を実証した。溶血、黄疸および脂肪血症の血漿試料が抗 X a 発色アッセイの濃度に負の影響を与えることが公知であるので、溶血試料がこの直接比較に含まれないことに留意されたい。

20

【 0 1 2 4 】

[00177]阻害の特定に加えて、図 21 A および 21 B の例に図示されるように、実施形態は、阻害の量を定量化するために使用することができる。

30

[00178]実施例 2 2

[00179]図 22 は、患者が直接経口抗凝固薬 (D O A C) に接している場合に、現在の意思決定を図示する。

【 0 1 2 5 】

[00180]患者が出血イベントについて高リスクであるか、または激しい出血を有する場合、凝固検査が指示される。これらの検査は、P T、I N R、a P T T、A C T、T E G 、または他の現在利用可能なポイントオブケア検査を含むことができる。現在利用可能な検査に対する異常な凝固の結果は、D O A C の存在について非特異的であり、医療従事者に、どの処置が患者に最も適しているかの推測をゆだねる。これらの検査の感度の欠如に起因して、凝固時間が正常である場合、医療従事者は、患者の試料中の D O A C の存在を見逃し、処置を進めて、患者における出血のリスクを増加させる。

40

【 0 1 2 6 】

[00181]実施例 2 3

[00182]図 23 は、患者が D O A C に接している場合、本発明の実施形態を使用する改善された意思決定を図示する。両矢印は、可能な反復手順を示す。例えば、従来の凝固検査が、患者が正常な凝固時間を持つことを示し、本発明の実施形態による D O A C 検査が異常な結果を示す場合、D O A C 反転剤を検査結果に基づいて選択することができ、患者に投与することができる。次いで、患者を、再検査することができ、依然として D O A C によって異常である場合、任意選択で、変更または異なる D O A C 反転剤を投与した後、再び、再検査することができる。従来の凝固検査が異常で、D O A C 検査も異常である

50

場合、次いで、医療従事者は、D O A C 反転剤または別の処置を選択してもよく、試薬の投与後に再検査してもよい。従来の凝固検査が異常であり、D O A C 検査がD O A C の存在について陰性である場合、次いで、医療従事者は、別の止血処置が必要であり得るかを決定するために必要な情報を有する。

【0127】

[00183]実施例24

[00184]図24Aおよび24Bは、活性化プロトロンビン複合体濃縮物(aPCC; FEIBA)の添加後のFXa阻害の反転の検出を図示する。FEIBAは、患者においてFXa阻害剤を克服するために投与された活性化因子の組み合わせである。別の例は、不活性プロトロンビン複合体濃縮物であるケイセントラである。凝固因子Xa(組換え)、不活性化z h z oなどの特異的FXa阻害剤の反転剤もある。図24Aは、7.5ng/mLのFXaの添加の際に、予想されたエドキサバンの凝固時間を実証する。図24Bは、500ng/mLのエドキサバンがaPCCで処置された血漿試料による凝固時間の変化を示す。このデータは、本発明の実施形態による検査が、これらのD O A C の抗凝固効果の反転または克服を監視する有用性を有することを実証する。

10

【0128】

[00185]すべての特許、公開された出願および本明細書において引用された参考文献の教示は、それらの全体が参照によって組み込まれる。

[00186]実施形態の例を特に示し、記載したが、添付の特許請求の範囲に含まれる実施形態の範囲から逸脱することなく、形態および詳細にさまざまな変更を行ってもよいことは当業者に理解されよう。[態様1]

20

血液試料中の凝固を評価する方法であって、

凝固因子を血液試料のポーションに添加するステップであって、それぞれのポーションが異なる濃度で凝固因子を受け取るステップ；

試料のそれぞれのポーションについて、血塊形成を測定するステップ；および

凝固因子の濃度に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む方法。

[態様2]

試料が、全血または血漿である、請求項1に記載の方法。

30

[態様3]

試料が、全血であり、試料のそれぞれのポーションが、約1mL未満である、請求項2に記載の方法。

[態様4]

試料のそれぞれのポーションが、約100μL未満である、請求項3に記載の方法。

[態様5]

試料のそれぞれのポーションが、約50μL以下である、請求項4に記載の方法。

[態様6]

内因性経路、外因性経路および共通経路の因子から選択される1つまたは複数の凝固因子の濃度の増加に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む、請求項1に記載の方法。

40

[態様7]

少なくとも2つの凝固因子の濃度の増加に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む、請求項6に記載の方法。

[態様8]

少なくとも3つの凝固因子または少なくとも4つの凝固因子の濃度の増加に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む、請求項6に記載の方法。

[態様9]

凝固因子が、第I因子～第XII因子、またはそれらの活性型から選択される、請求項7に記載の方法。

[態様10]

50

凝固因子が、第 I 因子～第 X I I I 因子の 1 つまたは複数の活性型を含む、請求項 9 に記載の方法。

[態様 1 1]

少なくとも第 I I a 因子および第 X a 因子の濃度の増加に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

[態様 1 2]

第 I I a 因子、第 X a 因子、第 X I 因子、第 X I a 因子、第 X I I 因子および第 X I I a 因子のうちの少なくとも 4 つの濃度の増加に対する血塊形成の反応を決定するステップを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

[態様 1 3]

少なくとも 1 つの凝固因子が、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノーゲン（H MW K）（フィッツジェラルド因子）、フィプロネクチン、アンチトロンビン I I I 、ヘパリンコファクター I I 、プロテイン C 、プロテイン S 、プロテイン Z 、プロテイン Z 関連プロテアーゼ阻害剤（Z P I ）、プラスミノーゲン、アルファ 2 - 抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 1 （P A I 1 ）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 2 （P A I 2 ）、組織因子経路阻害剤（T F P I ）またはがんプロコアグラントである、請求項 6 に記載の方法。

10

[態様 1 4]

凝固因子が、0 . 1 n g / m L ~ 1 0 μ g / m L の範囲の濃度で試料のポーションに添加される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

[態様 1 5]

凝固因子の濃度が、試料のポーションの間で少なくとも 2 倍異なる、請求項 1 4 に記載の方法。

[態様 1 6]

凝固因子の濃度が、試料のポーションにわたって 5 倍 ~ 2 0 倍の範囲で異なる、請求項 1 5 に記載の方法。

[態様 1 7]

少なくとも 4 つの濃度の凝固因子を添加するステップを含む、請求項 1 4 に記載の方法。

[態様 1 8]

血塊形成時間を測定するステップを含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

[態様 1 9]

血塊形成が、画像センサー、光吸収の測定、蛍光検出の測定、または超音波によって測定される、請求項 1 8 に記載の方法。

[態様 2 0]

血塊形成が、電気インピーダンス、ビーズの添加ならびにビーズの流量および / もしくは数の定量化、血塊形成部位での流速および / もしくは圧力、トロンボエラストグラフィー、蛍光フィブリノーゲンを使用する蛍光検出、濁度、赤外分光法、音響センサーおよび / もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出の 1 つまたは複数によって測定される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

[態様 2 1]

血塊形成が、イメージングによって測定される、請求項 2 0 に記載の方法。

[態様 2 2]

イメージングが、明視野イメージングである、請求項 2 1 に記載の方法。

[態様 2 3]

血塊形成時間を 1 つまたは複数の参照範囲と比較するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 2 4]

参照範囲が、正常範囲および異常範囲を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

50

[態様 2 5]

異常範囲が、凝固カスケード異常を患う個体についての凝固時間を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

[態様 2 6]

1つまたは複数の参照範囲が、特定量の凝固阻害剤を含む試料についての測定値を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

[態様 2 7]

ポーションが、マイクロ流体デバイスの別個のチャネルを流れ、チャネルが、血塊形成を引き起こし、および / または局所化させるように構成された、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

[態様 2 8]

チャネルが、血塊形成および / または局所化を可能にする流れの乱れを引き起こす場所を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

[態様 2 9]

チャネルが、同一の形状を有するマイクロチャネルである、請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

[態様 3 0]

チャネルが、デバイスにおいて近位に位置する血塊形成区域を含む、請求項 2 7 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

[態様 3 1]

デバイスのそれぞれのチャネルが、独立した試料注入ポートを有する、請求項 2 7 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 2]

それぞれのチャネルまたはチャネルの群が、共通試料注入ポートに接続されている、請求項 2 7 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 3]

チャネルが、異なる量の凝固因子でコーティングされているか、または異なる量の凝固因子を含有する、請求項 2 7 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 4]

マイクロ流体デバイスが、少なくとも 2 つの系列のチャネルを含み、第 1 の系列のチャネルが、第 1 の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第 1 の凝固因子を含み、第 2 の系列のチャネルが、第 2 の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第 2 の凝固因子を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

30

[態様 3 5]

第 3 の系列のチャネルが、第 3 の系列のチャネルのそれぞれに異なる量または濃度で組み込まれた第 3 の凝固因子を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

[態様 3 6]

凝固因子が、試料をマイクロ流体デバイスに注入する前に試料に添加されるか、または 1 つもしくは複数のチャネルのポートを通して試料に添加される、請求項 2 7 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

[態様 3 7]

チャネルのそれそれぞれにおける血塊形成の程度が、定められた時点（複数可）で測定される、請求項 2 7 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 8]

カルシウムを試料に添加するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 3 9]

試料が、抗凝固剤による治療を受けている対象からの試料である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 4 0]

50

抗凝固剤が、FXa阻害剤、FIXIa阻害剤、FXI阻害剤、FXIa阻害剤、FXI阻害剤およびFXIIa阻害剤から選択される因子特異的阻害剤である、請求項39に記載の方法。

[態様41]

抗凝固剤が、リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン、ダビガトランまたはベトリキサバンである、請求項40に記載の方法。

[態様42]

抗凝固剤が、ヘパリンまたはビタミンKアンタゴニストである、請求項39に記載の方法。

[態様43]

凝固時間が長くなり、凝固因子の濃度の増加が凝固時間を正常化しない場合、試料が、凝固阻害もしくは凝固因子の下流に凝固欠損を有するか；または凝固時間における凝固因子の濃度依存性の減少がある場合、試料が、凝固阻害もしくは前記凝固因子の凝固欠損を有する、

請求項1～42のいずれか一項に記載の方法。

[態様44]

正常化された凝固時間が、前記阻害または欠損の下流の凝固因子の活性型の添加によって決定される、請求項43に記載の方法。

[態様45]

反応を決定するステップが、試料中の因子特異的阻害剤を検出するステップを含み、試料が得られた対象に反転剤を投与するステップをさらに含む、請求項1～44のいずれか一項に記載の方法。

[態様46]

試料が、血友病A（第VII因子欠乏症）、血友病B（第IX因子欠乏症）、血友病C（第XI因子欠乏症）、第I因子（フィブリノーゲン）欠乏症、第V因子欠乏症、第VII因子欠乏症、第X因子欠乏症、第XI因子欠乏症、アルファ2-アンチトリプシン欠乏症、アルファ1-アンチトリプシンピツツバーグ（アンチトロンビンIIIピツツバーグ）欠乏症、第V因子および第VII因子、ならびに第I因子、第VII因子、第IX因子および第X因子から選択されてもよい複合因子欠乏症、もしくは血小板異常を有するか、または有する疑いがある対象からの試料である、請求項1～38のいずれか一項に記載の方法。

[態様47]

凝固を検出するためのマイクロ流体デバイスであって、基材に形成された複数のチャネルを含み、それぞれのチャネルが、血塊の形成を引き起こし、および/または局在化させるように構成された形状を有する血塊形成区域を含み、複数のチャネルが、同じ形状を有する、

マイクロ流体デバイス。

[態様48]

血塊形成区のチャネルが、デバイスにおいて近位に位置する、請求項47に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様49]

血塊形成区の複数のチャネルが、デバイスの中央領域に配置される、請求項48に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様50]

デバイスのそれぞれのチャネルが、独立した試料注入ポートを有する、請求項47～49のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様51]

それぞれのチャネルが、独立した排出ポートを有し、注入および排出ポートが、デバイスの周囲に交互パターンで配置されていてもよい、請求項50に記載のマイクロ流体デバイス。

10

20

30

40

50

[態様 5 2]

それぞれのチャネルまたはチャネルの群が、共通試料注入ポートに接続されている、請求項 4 7 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 3]

チャネルが、1つまたは複数の追加試薬を受けるための1つまたは複数の追加注入ポートを含む、請求項 4 7 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 4]

チャネルが、異なる量の凝固因子でコーティングされているか、または異なる量の凝固因子を含有する、請求項 4 7 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 5]

凝固因子が、内因性経路、外因性経路および共通経路から選択される1つまたは複数の凝固因子を含む、請求項 5 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 6]

1つまたは複数の凝固因子が、第 I 因子～第 X I I I 因子、またはそれらの活性型から選択される、請求項 5 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 7]

1つまたは複数の凝固因子が、活性型である、請求項 5 6 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 8]

1つの凝固因子が、第 I I a 因子であり、第 2 の凝固因子が、第 X a 因子である、請求項 5 7 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 9]

凝固因子が、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノーゲン（H M W K）（フィットジエラルド因子）、フィブロネクチン、アンチトロンビン I I I 、ヘパリンコファクター I I 、プロテイン C 、プロテイン S 、プロテイン Z 、プロテイン Z 関連プロテアーゼ阻害剤（Z P I ）、プラスミノーゲン、アルファ 2 - 抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A ）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 1 （P A I 1 ）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 2 （P A I 2 ）、組織因子経路阻害剤（T F P I ）またはがんプロコアグラントである、請求項 5 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 0]

少なくとも2つの系列のチャネルを含み、第1の系列のチャネルが、第1の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第1の凝固因子を含み、第2の系列のチャネルが、第2の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第2の凝固因子を含む、請求項 5 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 1]

第3の系列のチャネルが、第3の系列のチャネルのそれぞれに異なる量で組み込まれた第3の凝固因子を含む、請求項 6 0 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 2]

凝固因子が、第 I I 因子、第 I I a 因子、第 X 因子、第 X a 因子もしくはそれらの組み合わせの1つまたは複数を含む、請求項 6 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 3]

1つの凝固因子が、トロンビン（第 I I a 因子）であり、別の凝固因子が、第 X a 因子である、請求項 6 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 4]

1つの凝固因子が、第 I I a 因子であり、第2の凝固因子が、第 X a 因子であり、第3の凝固因子が、第 X I a 因子または第 X I 因子であり、第4の凝固因子が、第 X I I a 因子または第 X I I 因子である、請求項 6 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 5]

凝固因子の量が、一群のチャネルの間で少なくとも2倍異なる、請求項 5 4 ~ 6 4 のい

10

20

30

40

50

すれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 6]

凝固因子の量が、一群のチャネルの間で 5 倍～20 倍の範囲で異なる、請求項 6 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 7]

少なくとも 1 つのチャネルが、凝固因子を含有しない、請求項 5 4 ～ 6 6 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 6 8]

マイクロ流体デバイスが、チャネルのそれぞれにおける血塊形成を、定められた時点(複数可)で測定する、請求項 5 4 ～ 6 7 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

10

[態様 6 9]

電気インピーダンス、ビーズの添加およびビーズの流量／数の定量化、血塊形成部位での流速および／もしくは圧力、トロンボエラストグラフィー、蛍光フィブリノーゲンを使用する蛍光検出、濁度、赤外分光法、音響センサーおよび／もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出の 1 つまたは複数によって、チャネルにおいて血塊形成を測定するように構成される、請求項 6 8 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 7 0]

チャネルにおいて血塊形成を測定するためのイメージング手段を含む、請求項 6 9 に記載のマイクロ流体デバイス。

20

[態様 7 1]

イメージングが、明視野イメージングである、請求項 7 0 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 7 2]

凝固を検出するためのマイクロ流体デバイスであって、
基材に形成された複数のチャネルを含み、それぞれのチャネルが、血塊の形成を引き起こし、および／または局在化させるように構成された形状を有する血塊形成区域を含み、
複数のチャネルが、異なる量の凝固因子でコーティングされているか、または異なる量の凝固因子を含有する、

マイクロ流体デバイス。

30

[態様 7 3]

凝固因子が、内因性経路、外因性経路および共通経路から選択される 1 つまたは複数の凝固因子を含む、請求項 7 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 7 4]

1 つまたは複数の凝固因子が、第 I 因子～第 X I I I 因子、またはそれらの活性型から選択される、請求項 7 3 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 7 5]

1 つまたは複数の凝固因子が、活性型である、請求項 7 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 7 6]

1 つの凝固因子が、第 I I a 因子であり、第 2 の凝固因子が、第 X a 因子である、請求項 7 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

40

[態様 7 7]

少なくとも 1 つの凝固因子が、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン(フレッチャー因子)、高分子量キニノーゲン(HMWK)(フィッツジェラルド因子)、フィブロネクチン、アンチトロンビン I I I 、ヘパリンコファクター I I 、プロテイン C 、プロテイン S 、プロテイン Z 、プロテイン Z 関連プロテアーゼ阻害剤(Z P I)、プラスミノーゲン、アルファ 2 - 抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子(t P A)、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 1 (P A I 1)、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 - 2 (P A I 2)、組織因子経路阻害剤(T F P I)またはがんプロコア

50

グラントである、請求項 7 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 7 8]

血塊形成区のチャネルが、デバイスにおいて近位に位置する、請求項 7 2 ~ 7 7 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 7 9]

血塊形成区の複数のチャネルが、基材の中央領域に配置される、請求項 7 8 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 0]

デバイスのそれぞれのチャネルが、独立した試料注入ポートを有する、請求項 7 2 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

10

[様様 8 1]

それぞれのチャネルが、独立した排出ポートを有し、注入および排出ポートが、基材の周囲に交互パターンで配置されていてもよい、請求項 8 0 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 2]

それぞれのチャネルまたはチャネルの群が、共通試料注入ポートに接続されている、請求項 7 2 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 3]

チャネルが、1つまたは複数の追加試薬を受けるための1つまたは複数の追加注入ポートを含む、請求項 7 2 ~ 8 2 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 4]

チャネルが、同一の形状を有する、請求項 7 2 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

20

[様様 8 5]

マイクロ流体デバイスが、少なくとも2つの系列のチャネルを含み、第1の系列のチャネルが、第1の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第1の凝固因子を含み、第2の系列のチャネルが、第2の系列のチャネルの諸チャネルにわたる漸増量で第2の凝固因子を含む、請求項 7 2 ~ 8 4 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 6]

第3の系列のチャネルが、第3の系列のチャネルのそれぞれに異なる量または濃度で組み込まれた第3の凝固因子を含む、請求項 8 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

30

[様様 8 7]

凝固因子が、第 I I 因子、第 I I a 因子、第 X 因子、第 X a 因子もしくはそれらの組み合わせの1つまたは複数を含む、請求項 7 2 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 8]

1つの凝固因子が、トロンビン(第 I I a 因子)であり、別の凝固因子が、第 X a 因子である、請求項 8 7 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 8 9]

1つの凝固因子が、第 I I a 因子であり、第2の凝固因子が、第 X a 因子であり、第3の凝固因子が、第 X I a 因子または第 X I 因子であり、第4の凝固因子が、第 X I I a 因子または第 X I I 因子である、請求項 8 7 に記載のマイクロ流体デバイス。

40

[様様 9 0]

凝固因子の量が、一群または一系列のチャネルの間で少なくとも2倍異なる、請求項 7 2 ~ 8 9 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 9 1]

凝固因子の量が、一群または一系列のチャネルの間で5倍~20倍の範囲で異なる、請求項 9 0 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様様 9 2]

少なくとも1つのチャネルが、凝固因子を含まない、請求項 7 2 ~ 9 1 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

50

[様 9 3]

マイクロ流体デバイスが、チャネルのそれぞれにおける血塊形成を、定められた時点（複数可）で測定する、請求項 7 2 ~ 9 2 のいずれか一項に記載のマイクロ流体デバイス。

[様 9 4]

電気インピーダンス、ビーズの添加およびビーズの流量／数の定量化、血塊形成部位での流速および／もしくは圧力、トロンボエラストグラフィー、蛍光フィブリノーゲンを使用する蛍光検出、濁度、赤外分光法、音響センサーおよび／もしくはフォトニックセンサーを使用する検出、フローサイトメトリー、ならびに視覚的な凝固検出の 1 つまたは複数によって、チャネルにおいて血塊形成を測定するように構成される、請求項 9 3 に記載のマイクロ流体デバイス。

10

[様 9 5]

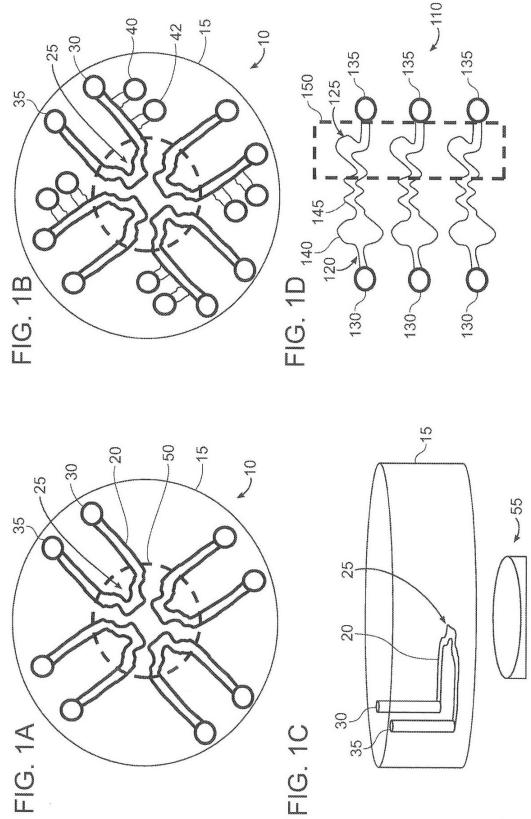
チャネルにおいて血塊形成を測定するためのイメージング手段を含む、請求項 9 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[様 9 6]

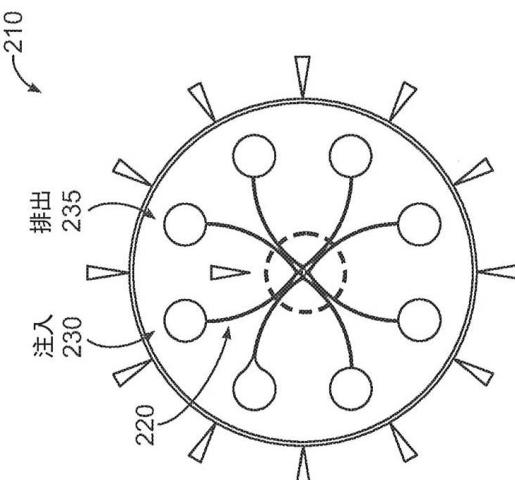
イメージングが、明視野イメージングである、請求項 9 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



20

30

40

50

【図 2 B】

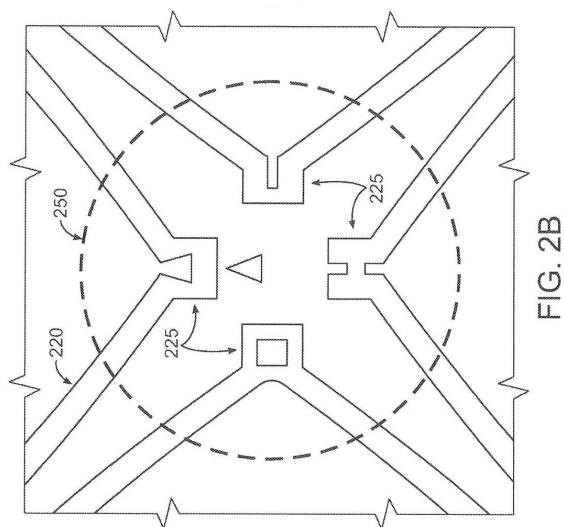


FIG. 2B

【図 3】

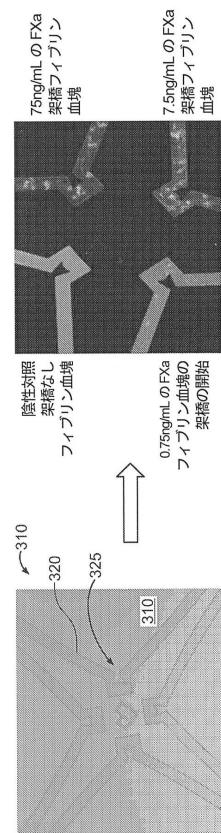


図3A

図3B

図3C

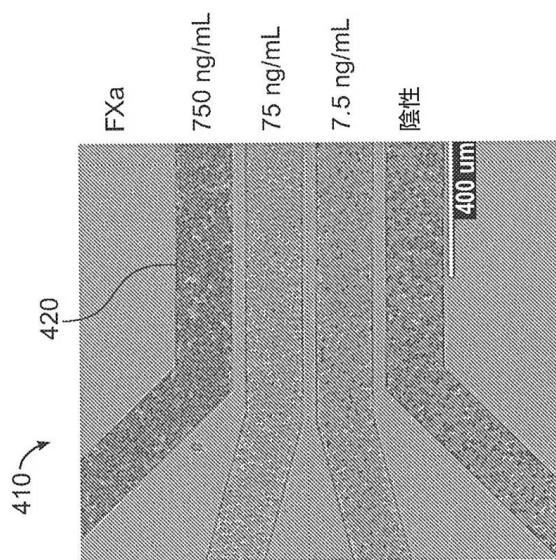
10

20

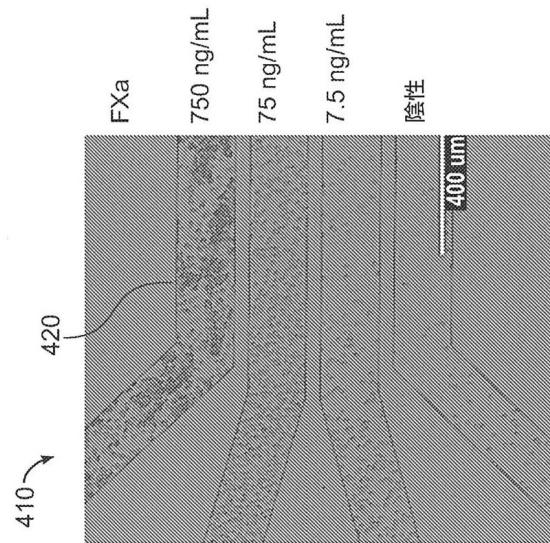
30

40

【図 4 A】

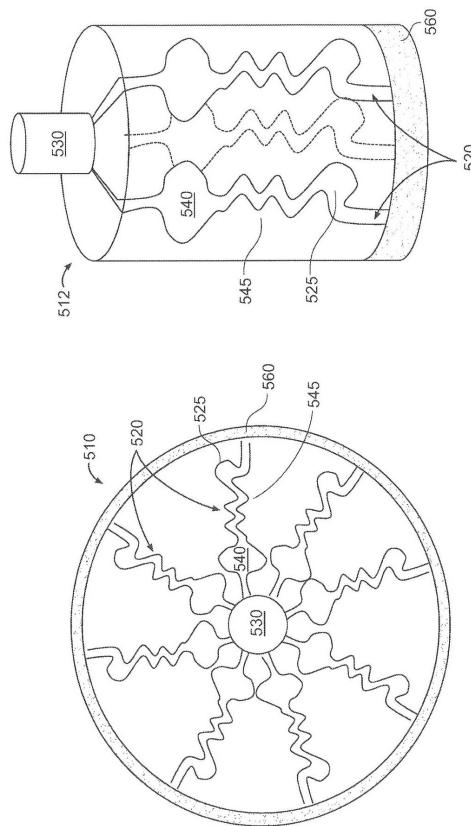


【図 4 B】

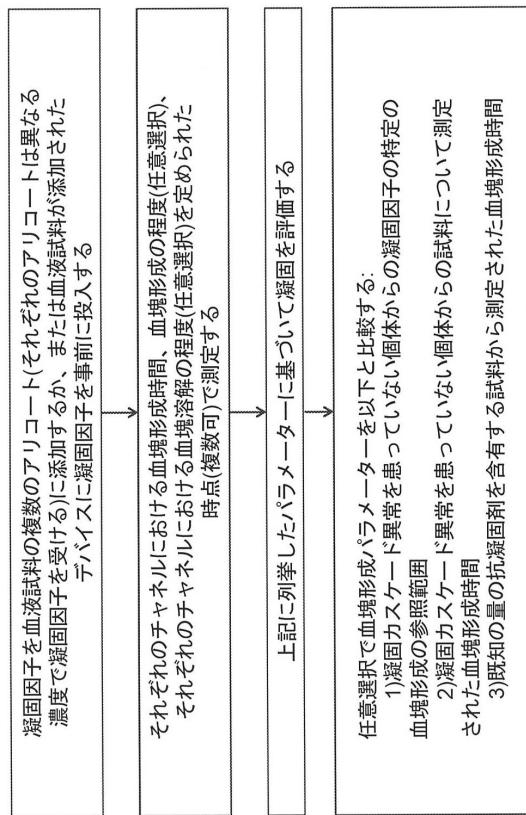


50

【図 5】

FIG. 5A
FIG. 5B

【図 6】

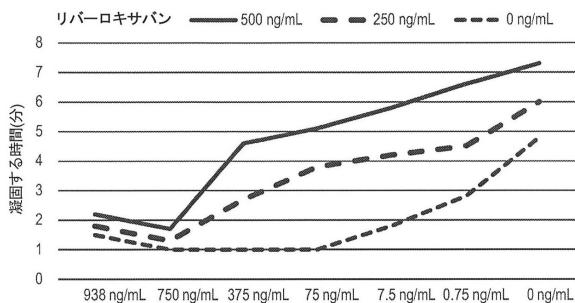


10

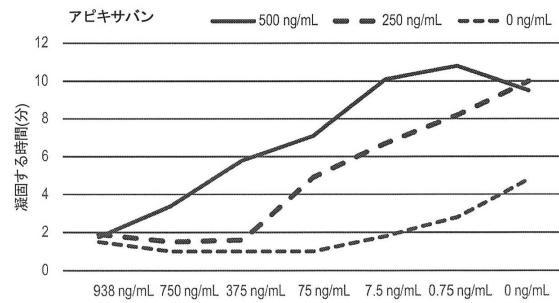
20

30

【図 7 A】



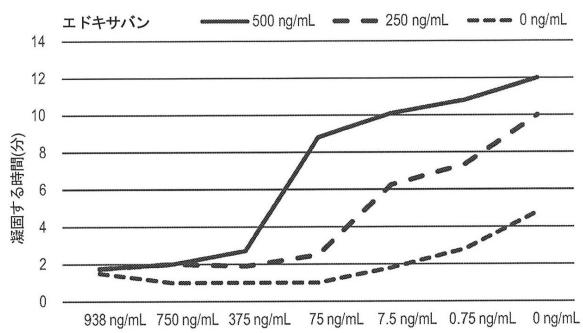
【図 7 B】



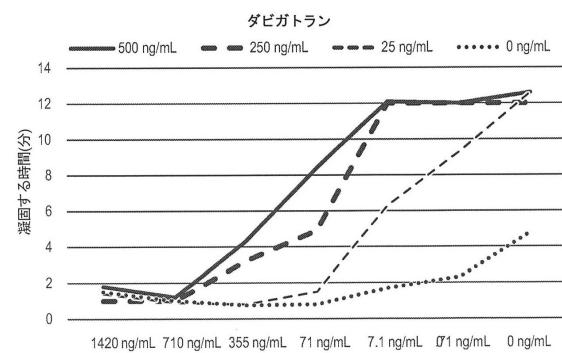
40

50

【図 7 C】

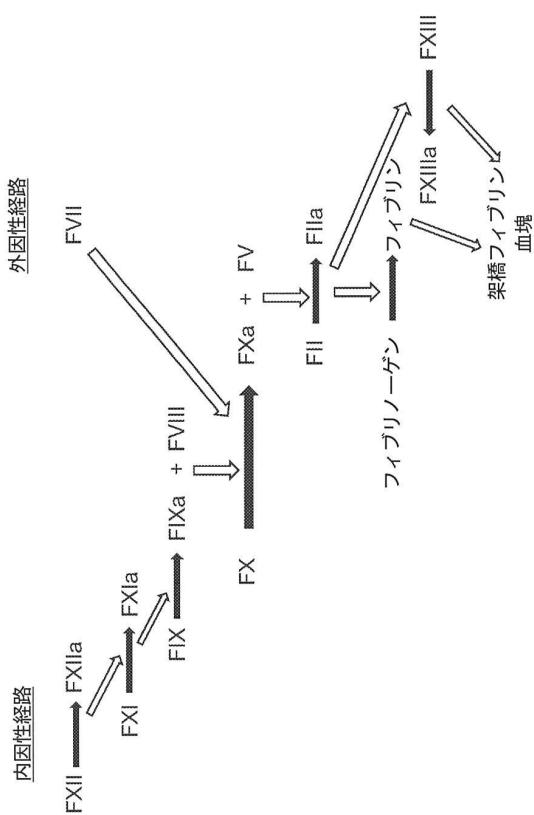


【図 7 D】

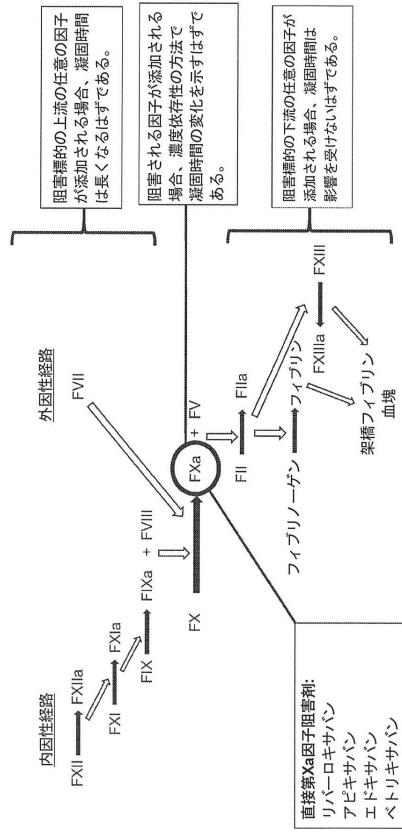


10

【図 8】



【図 9】



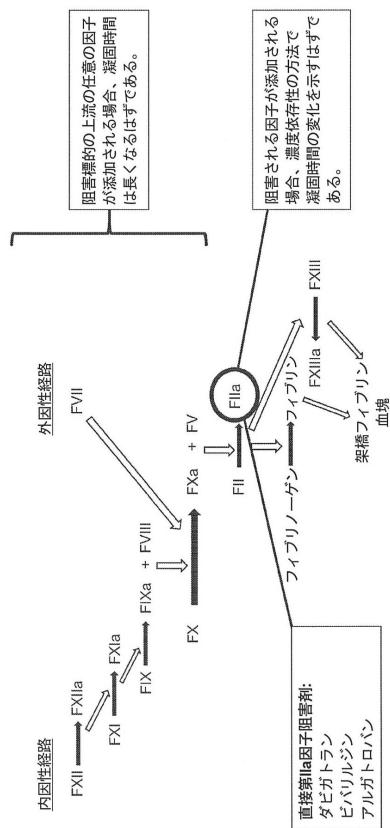
20

30

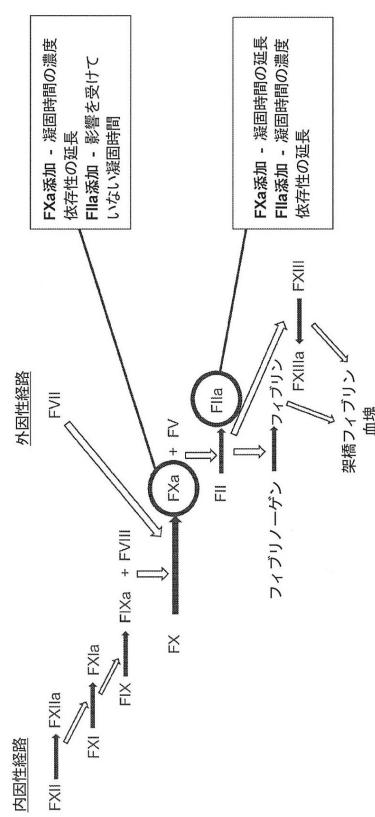
40

50

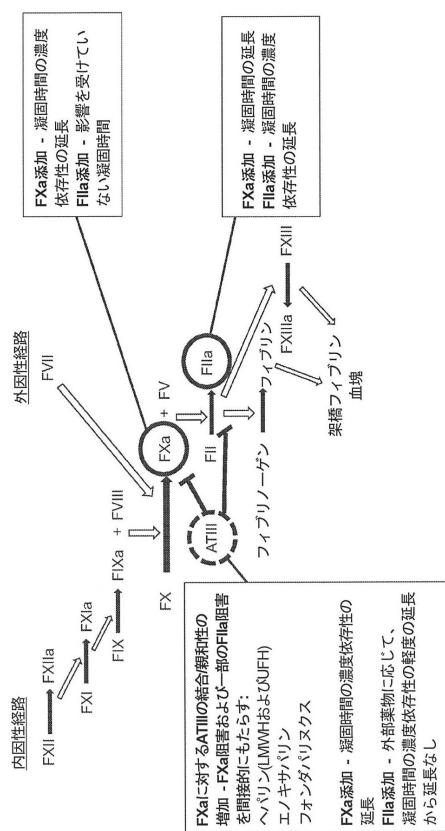
【図 10】



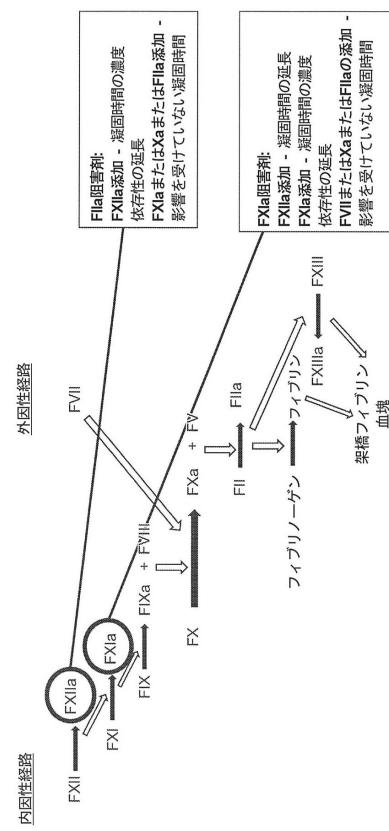
【図 11】



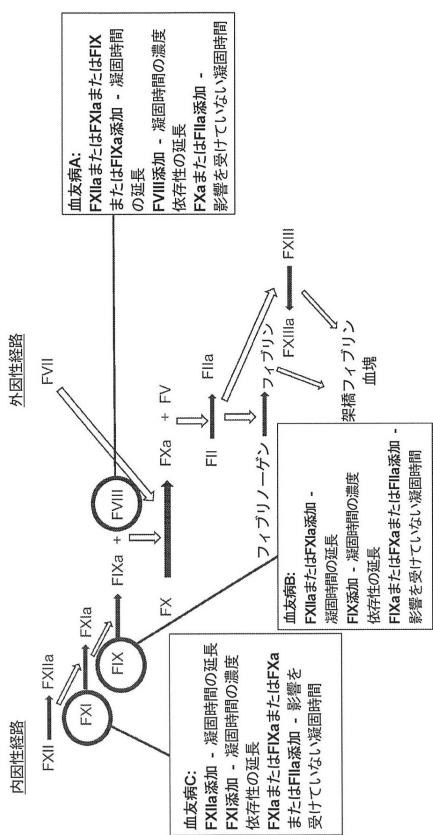
【図 12】



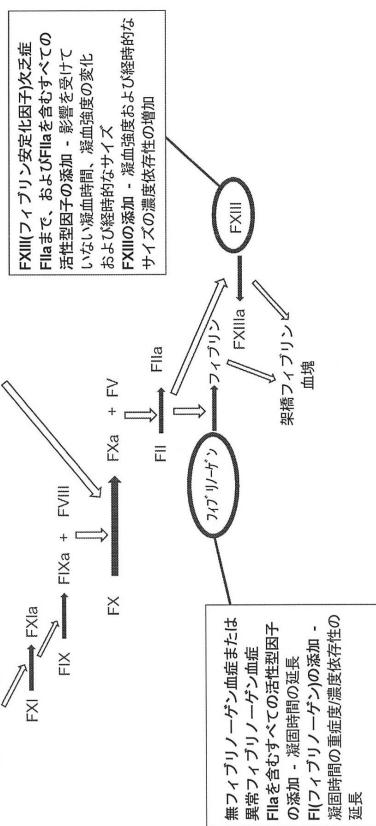
【図 13】



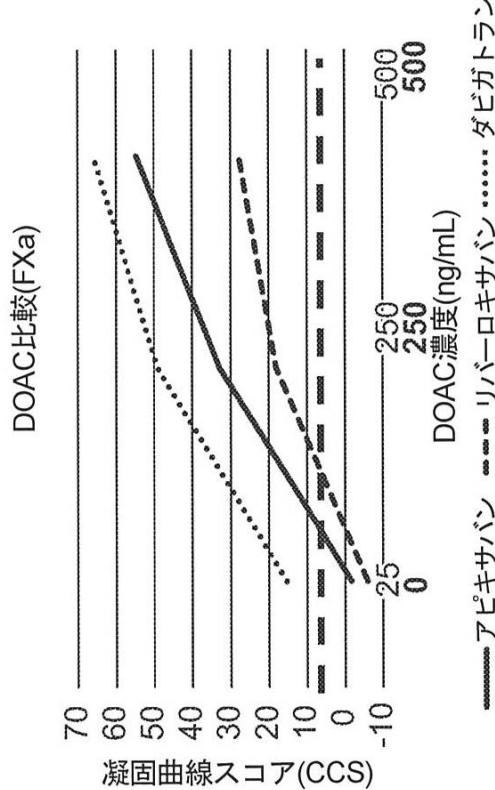
【図 14】



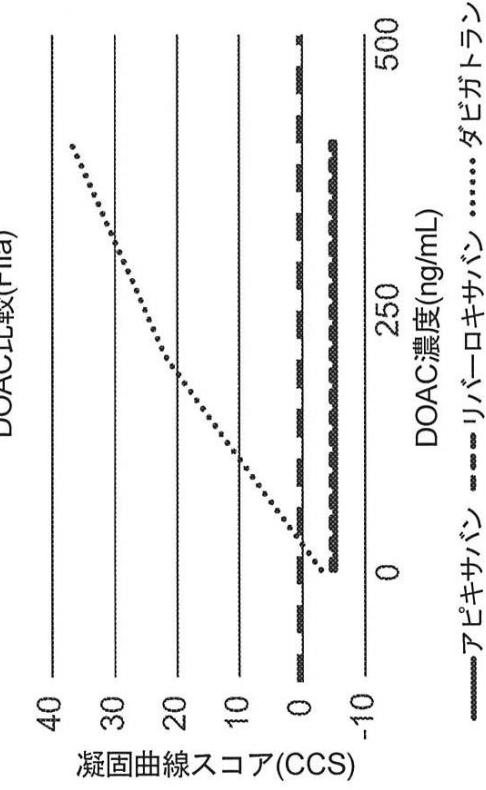
【図 15】



【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】

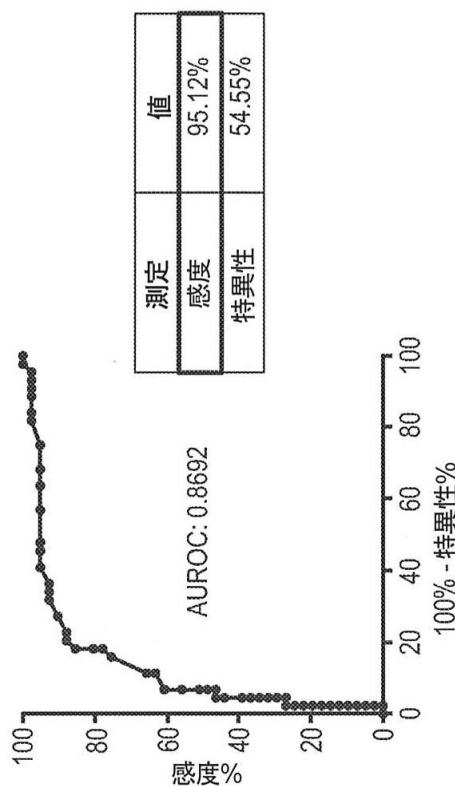
	FXa CCS	FIIa CCS	結果
陰性対照	-4.7	-4.7	陰性
アピキサバント(250ng/mL)	32.8	-4.7	FXa-I陽性
ダビガトラン(250ng/mL)	49	22	FIIa-I陽性

【図 17】

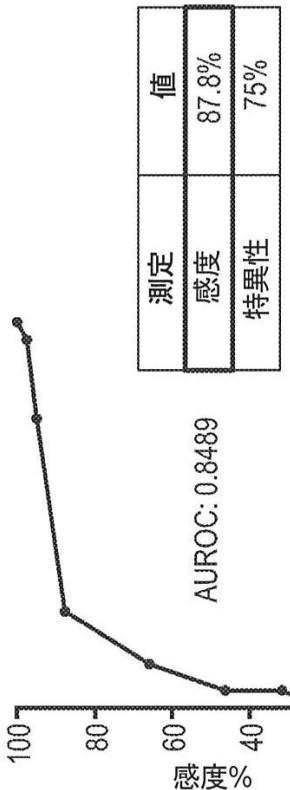
特性	対照	FXa阻害剤
合計(N=43)	正常(N=28)	リバーキサバン(N=23)
男性数(%)	18(37.5)	11(39.3)
性別差(平均±標準偏差)	71±15	72±12
血小板阻害剤数(%)	22(45.8)	15(53.6)
出血数(%)	1(2.1)	0(0)
凝血数(%)	2(4.2)	2(7.1)5
心臓疾患数(%)		0(0)6
その他数(%)		36(82)
		PE/DVT、がん(肺、乳房、肝臓、COPDの病歴)

- 正常なPT、INR、aPTTまたはDDimerを有する抗凝固薬に接していない患者
- 異常なPT、INR、aPTTまたはDDimerを有する抗凝固薬に接していない患者
- A Fib、SSS、CHFを含む心臓の状態に起因して開始されたFXa処置
- 非原発症の心臓の状態で開始されたFXa処置
- 採血の間の出入口の原因は、出血イベントに起因した。1人の患者は、DVTと診断された。
- 採血の間の入院の原因は、出血イベントに起因した。1人の患者は、DVTと診断された。
- 採血の間の入院の原因は、出血イベントに起因した。患者は鑑定出血を示した(子宮がんの術後)。
- 採血の間の入院の原因は、凝固イベントに起因した。患者はPEおよびDVTの病歴。

【図 18 A】



【図 18 B】



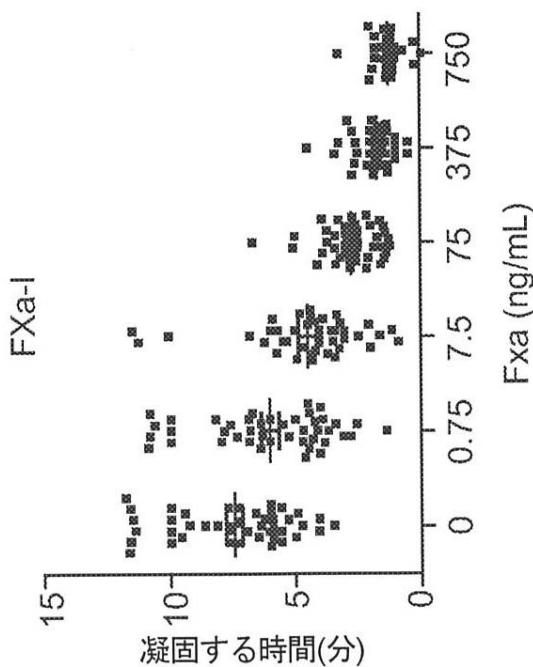
【図 18 C】

特性	対照	異常	合計	Fxa阻害剤
PT-平均土標準偏差(n)	14.4 ± 2.9 (44)	13.3 ± 0.4 (24)	15.9 ± 3.9 (20)	18.4 ± 4.1 (22)
INR-平均土標準偏差(n)	1.1 ± 0.3 (44)	1.1 ± 0.1 (39)	1.8 ± 0.8 (5)	1.5 ± 0.3 (41)
P値(P)>正常対照、異常対照				<0.001, 0.05
P値(NR)>正常対照、異常対照				<0.001, 0.76
				0.006, 0.17

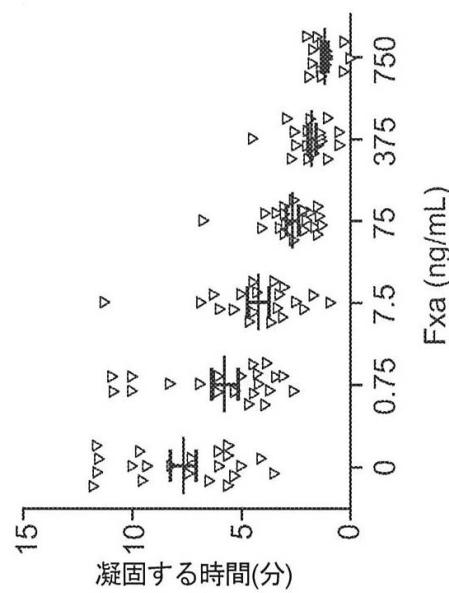
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 19 C】



10

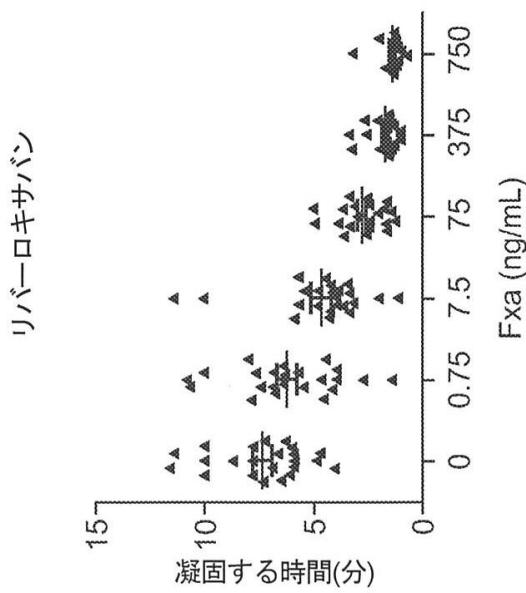
20

30

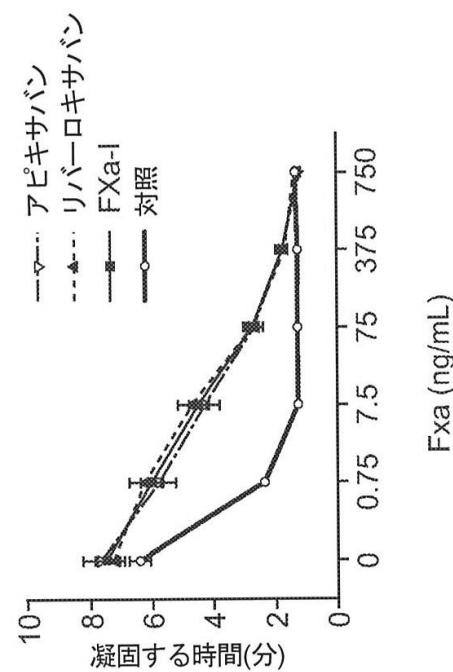
40

50

【図19D】



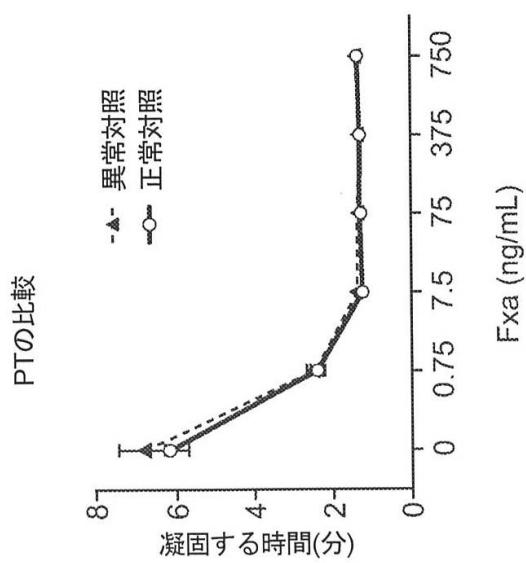
【図19E】



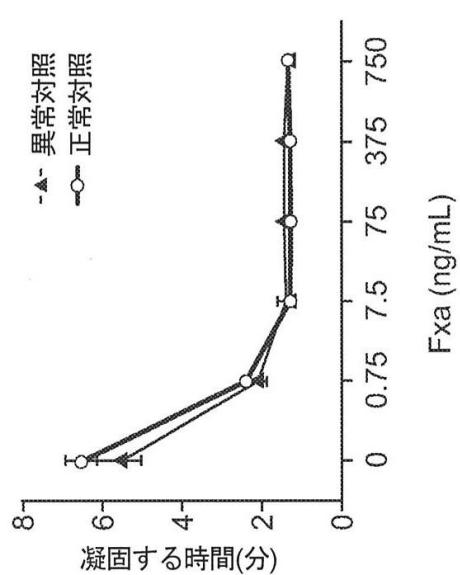
10

20

【 19F 】



【図19G】

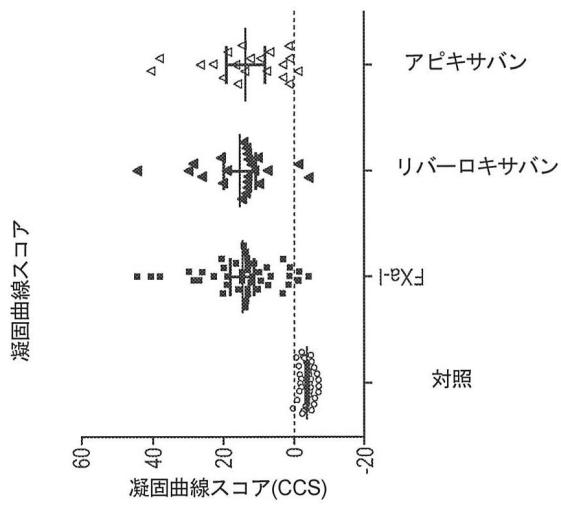


30

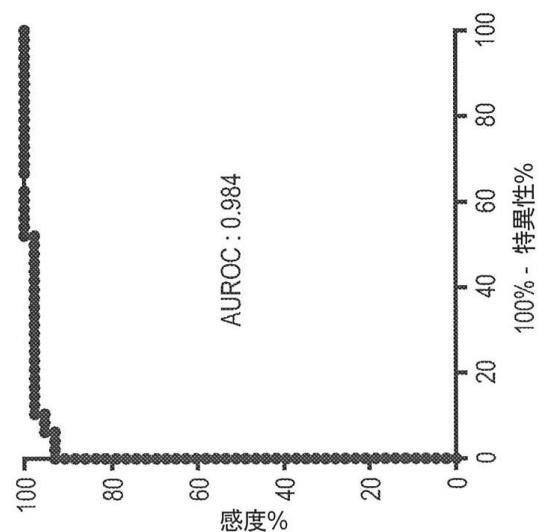
40

50

【図 20 A】



【図 20 B】



【図 20 C】

	対照	FXa-I	リバーコキサバン	アピキサバン
95% CI	-3.2 - -4.2	11.5 - 18.1	10.7 - 20.4	8.3 - 19.3

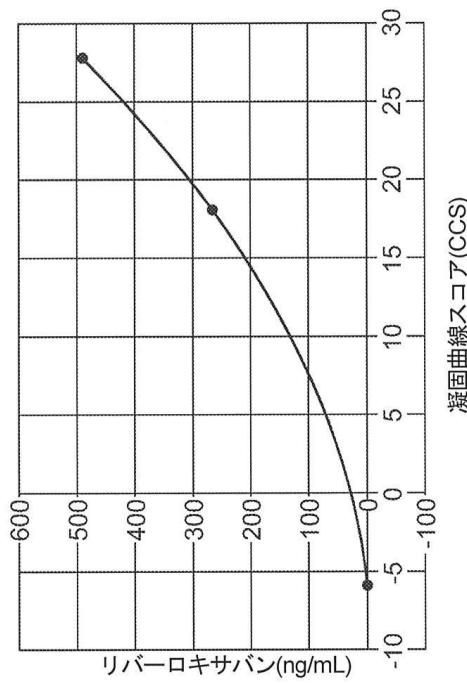
【図 20 D】

	陽性	陰性	合計
FXa-I	401	3	43
対照	1	47	48
合計	41	50	91

【図 20 E】

測定	値
感度	93.02%
特異性	97.92%
ヨーテンの指標	0.91

【図 21 A】



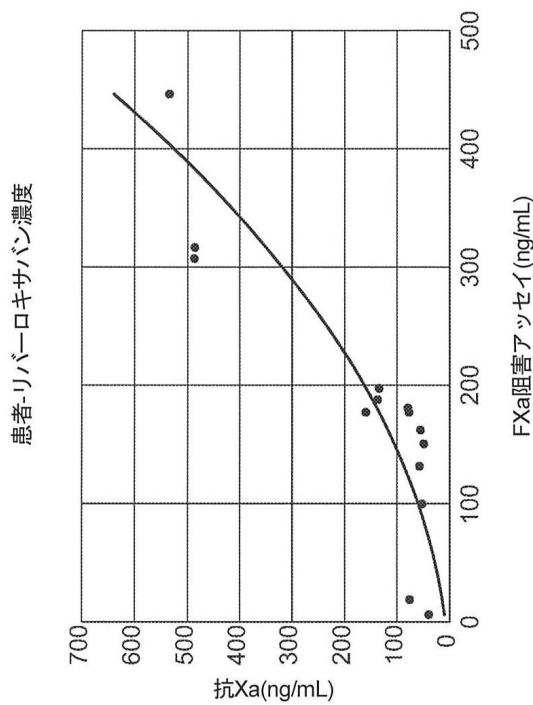
10

20

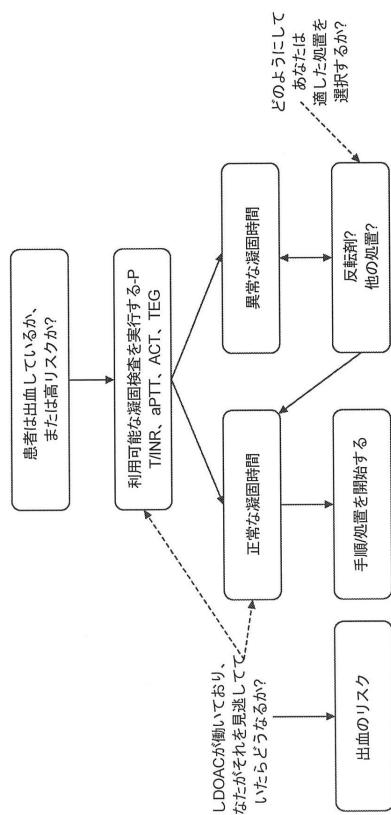
30

40

【図 21 B】

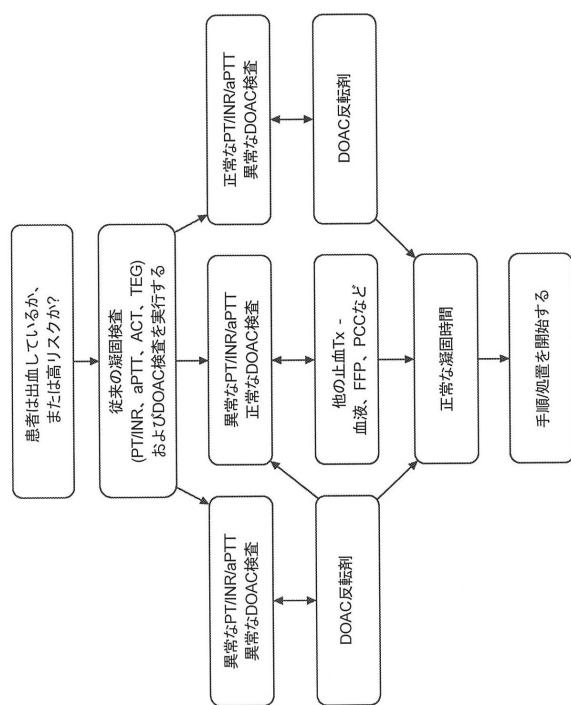


【図 22】

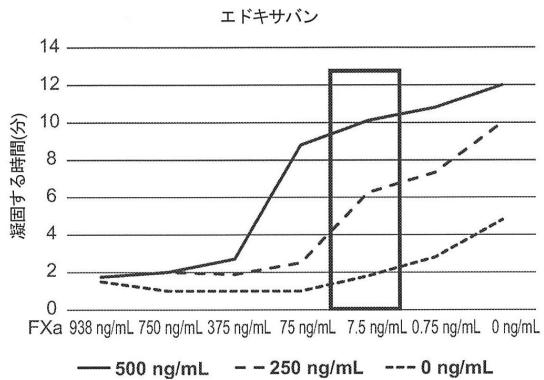


50

【図 2 3】



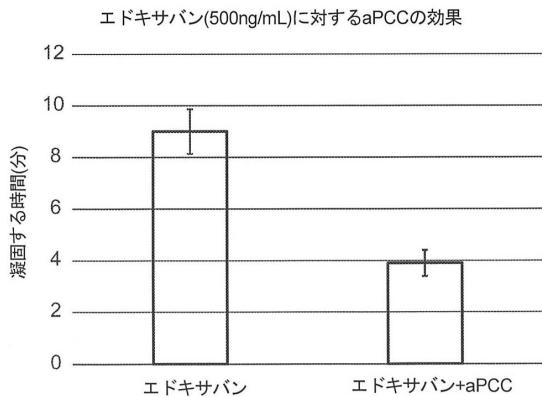
【図 2 4 A】



10

20

【図 2 4 B】



30

40

50

フロントページの続き

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74) 代理人 100120112

中西 基晴

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 フリードマン, ガリト・エイチ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02115, ボストン, コモンウェルス・アベニュー 327

(72) 発明者 トナー, メーメット

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02129, チャールズタウン, ピアース 7 36

(72) 発明者 トンプキンス, ロナルド・ジー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02114, ボストン, フルーツ・ストリート 55

(72) 発明者 ベンダブディ, パパン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02114, ボストン, フルーツ・ストリート 55

審査官 三木 隆

(56) 参考文献 特表 2016-534714 (JP, A)

米国特許出願公開第 2014 / 0038204 (US, A1)

米国特許出願公開第 2014 / 0038214 (US, A1)

米国特許出願公開第 2014 / 0236494 (US, A1)

特開 2014 - 038109 (JP, A)

米国特許出願公開第 2016 / 0069913 (US, A1)

S Nayak, Using a Systems Pharmacology Model of the Blood Coagulation Network to Predict the Effects of Various Therapies on Biomarkers, CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol., 2015年06月19日, Vol.4, Page.396-405

Abhishek Jain, A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function, Nat. Commun., 2016年01月06日, Vol.7, Page.10176

Shannon M. Bates, Coagulation Assays, Circulation, 2005年, Vol.112, Page.e53-e60

Jerome Duchemin, Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma, Thromb Haemost, 2008年03月12日, Vol.99, Page. 767-773

(58) 調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 01 N 33 / 86

G 01 N 37 / 00

G 01 N 35 / 10

C 12 Q 1 / 37

C 12 M 1 / 34