

(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

F I

G 0 1 N 33/86 (2006.01)

G 0 1 N 33/86

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 37/00

1 0 1

G 0 1 N 35/10 (2006.01)

G 0 1 N 35/10

A

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 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 0 2

1 3 9 ケンブリッジ, マサチューセッツ

・アヴェニュー・7 7

(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 5 5

(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に少なくとも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に少なくとも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れ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

10

20

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。

【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、1 mL 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 X I I I 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。

【請求項 6】

第 1 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 に記載の方法。

【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（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（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 1 に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 の凝固因子が、0 . 1 n g / m L ～ 1 0 μ g / m L 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、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／もしくはフォトリックセンサーを使用する検出、

10

20

30

40

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照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。

【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、血液試料のそれぞれ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ぞれおよび第2の系列のチャネルのそれぞれが同一の形状を有する、請求項14に記載の方法。

20

【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

50

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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 2 3】

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 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

血液試料において第 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 X a 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 2 5】

血液試料において第 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 2 6】

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 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

血液試料において第 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 2 8】

血液試料において第 X a 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 X a 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 X a 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 I I a 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 I I a 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 X a 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 X a 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 X a 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 2 9】

血液試料において第 I I a 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

10

20

30

40

50

法：

血液試料の複数の第 1 のポーションに第 X a 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 X a 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 I I a 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 I I a 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 I I a 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 X a 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 I I a 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 I I a 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。

10

【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】

20

【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 P41 EB002503、P30 ES002109 および P50 GM021700 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。

30

【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す得る、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、いずれも初歩的なものであり、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

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DOAC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、DOAC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。

【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DOAC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ン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。

【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（PRP）および乏血小板血漿（PPP）の両方を含む。

【0008】

[0009]本明細書で使用される「凝固因子」という用語は、凝固カスケードに關与する任意の因子（固有の外因性および共通経路）を意味し、第Ⅰ因子～第ⅩⅢⅢ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（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィブロンネクチン、アンチトロンビンⅢⅢ、ヘパリンコファクターⅢⅢ、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、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Ⅹa因子または第ⅢⅢa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ⅢⅢ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。

【0009】

10

20

30

40

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、FIIa阻害剤、FXIIa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（リバーロキサバン）、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。

【0011】

20

【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照標準を含む、参照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、参照標準は、患者に対して個別化される。

【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、基材に一連のチャンネルを含み、それぞれのチャンネルは、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。一連のチャンネルは、（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ンネルを含み、それぞれのチャンネルが、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。複数のチャンネルの血塊形成区域は、いくつかの実施形態において、凝固性を諸チャン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に、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）を受け取るための複数の試料注入ポートをさらに含んでもよく、それぞれの試料注入ポートは、複数のチャンネルの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、複数のチャンネルまたは一連のチャンネルを有する流体

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、それぞれのチャンネルは、独立した排出ポートを有し、それぞれの排出ポートは、複数のチャンネルの 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ンネル中の区域は、チャン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、複数のチャン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] それぞれのチャンネルは、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、それぞれのチャンネルは、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 】

30

[0020] マイクロ流体デバイスのチャンネルは、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、複数のチャンネルの第 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、複数のチャンネルの第 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、複数のチャンネルの 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、陰性対照チャンネルである。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ンネルを含まない。

【 0 0 1 9 】

[0021] 1 つまたは複数のチャン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、チャン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、または試料と同時に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 の群のチャン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 の群のチャンネルに加えて陰性対照チャンネルも含み得る）、複数のチャンネルの第 1 の群におけるそれぞれのチャンネルは、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ⅠⅠa因子、第Ⅰa因子、第ⅠⅠ因子、第ⅠⅠa因子、第ⅠⅠⅠ因子および第ⅠⅠⅠa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。

10

【0021】

[0023]第2の凝固因子は、第1の凝固因子から凝固カ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ⅠⅠ因子）、トロンビン（第ⅠⅠa因子）または両方であり得る。第2の凝固因子は、例えば、第Ⅰ因子、第Ⅰa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も挙げられる。

20

30

【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。

40

【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、血塊が経時的に形成されるとき、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

50

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ケ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IIa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Xa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Xa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】

50

【 0 0 3 3 】

【図 1】[0036]図 1 A 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 1 B 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 1 C 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 1 D 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 2 A】[0037]図 2 A 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 2 B】[0038]図 2 B は、図 2 A のデバイスの中央部分の拡大図である。図 2 B は、血塊形成区域の例示的な形状を図示する。

10

【図 3】[0039]図 3 A は、実施形態の例による、4 つのチャン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 3 A 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 3 B は、実施形態の例による、4 つのチャン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 3 B は、図 3 A のデバイスを使用した血塊形成の蛍光画像である。図 3 C は、実施形態の例による、4 つのチャン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 3 C は、血塊形成区域の拡大図を示す蛍光画像である。

【図 4 A】[0040]図 4 A は、実施形態の例による、F X a のグラジエントを利用する並行マイクロ流体チャン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 4 A は、抗凝固薬を含有しない。

20

【図 4 B】図 4 B は、実施形態の例による、F X a のグラジエントを利用する並行マイクロ流体チャン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 4 B は、未分画ヘパリンを含有する。

【図 5】[0041]図 5 A 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 5 B 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。

30

【図 7 A】[0043]図 7 A は、F X a 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 7 B】[0044]図 7 B は、F X a 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 7 C】[0045]図 7 C は、F X a のグラジエントを使用するエン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 7 D】[0046]図 7 D は、F I I a 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、F X a 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。

40

【図 1 0】[0049]図 1 0 は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、F I I a 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 1 1】[0050]図 1 1 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 F I I a および F X a 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 1 2】[0051]図 1 2 は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、F X a 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 1 3】[0052]図 1 3 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 F X I I a および F X I a 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 1 4】[0053]図 1 4 は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、さまざまな

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 1 5】[0054]図 1 5 は、凝固因子のグラジエントを利用することによる、フィブリノーゲンまたは F X I I I（例えば、F X I I I 欠乏）で問題を検出する方法を図示する図である。

【図 1 6 A】[0055]図 1 6 A 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。

【図 1 6 B】図 1 6 B 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。

【図 1 6 C】図 1 6 C 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。

10

【図 1 7】[0056]図 1 7 は、患者の記述統計量の表 1 を示す（実施例 1 7）。

【図 1 8 A】[0057]図 1 8 A は、F X a 阻害剤（F X a - I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（P T）（図 1 8 A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（I N R）（図 1 8 B）の測定を図示する。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、F X a 阻害剤（F X a - I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（P T）（図 1 8 A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（I N R）（図 1 8 B）の測定を図示する。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、F X a 阻害剤（F X a - I）抗凝固に対する、プロトロンビン時間（P T）（図 1 8 A）の感受性および特異性ならびに国際標準化比（I N R）（図 1 8 B）の測定を図示する。

20

【図 1 9 A】[0058]図 1 9 A 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 1 9 B】図 1 9 B 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 1 9 C】図 1 9 C 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 1 9 D】図 1 9 D 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 1 9 E】図 1 9 E 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 1 9 F】図 1 9 F 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 1 9 G】図 1 9 G 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 2 0 A】[0059]図 2 0 A 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。

30

【図 2 0 B】図 2 0 B 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 2 0 C】図 2 0 C 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 2 0 D】図 2 0 D 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 2 0 E】図 2 0 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 2 1 A】[0060]図 2 1 A は、機能的薬物濃度計算の例を図示する。

【図 2 1 B】図 2 1 B は、機能的薬物濃度計算の例を図示する。

40

【図 2 2】[0061]図 2 2 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 2 3】[0062]図 2 3 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 2 4 A】[0063]図 2 4 A は、活性化プロトロンビン複合体濃縮物（a P C C）の添加後の F X a - I による F X a 阻害の減少の検出を図示する。

【図 2 4 B】図 2 4 B は、活性化プロトロンビン複合体濃縮物（a P C C）の添加後の F X a - I による F X a 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】

【0 0 3 4】

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DOAC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、いずれも初歩的なものであり、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、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、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]DOAC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、胃腸（GI）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。

【 0 0 3 7 】

[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。

【 0 0 3 8 】

[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、または子癇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。

【 0 0 3 9 】

[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。

【 0 0 4 0 】

[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。

【 0 0 4 1 】

[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）、SAVAYSA（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す得る。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1 mL未満、もしくは約500 μ L未満、もしくは約100 μ L未満、もしくは約50 μ L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。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

[0073]直接経口抗凝固薬（DOAC）の市場は、現在、凝固経路内の特異的な因子、例えば、第Ⅱa因子または第Ⅹa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。DOAC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。

【0043】

[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いてもよい。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

20

【0044】

[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。

【0045】

[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間隔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

【0046】

[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。

【0047】

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。

【0048】

[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、 $0.1 \text{ ng/mL} \sim 10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 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

10

b) 凝固カスケードのこの特定の点での凝固機能の障害。

【0050】

[0081]このアッセイの利用の例は以下が挙げられる。

a) 第ⅠⅠa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、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10 \text{ pg/mL}$ の範囲；例えば、図7D、10、11、16を参照のこと）での第ⅠⅠa因子の添加による第ⅠⅠa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、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10 \text{ pg/mL}$ 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。

20

【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、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10 \text{ pg/mL}$ 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、ならびにさまざまな濃度（例えば、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10 \text{ pg/mL}$ 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ⅩⅠⅠ因子または第ⅩⅠⅠa因子阻害の評価。

30

【0054】

e) さまざまな濃度（例えば、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10 \text{ pg/mL}$ の範囲；例えば、図4Bおよび12を参照のこと）での第ⅠⅠa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、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL} \sim 1 \text{ pg/mL}$ 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、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）を含む）の検出および評価。

40

【0056】

g) 以下を含む、障害/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ⅤⅠⅠⅠ因子および/もしくは第ⅤⅠⅠⅠa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ⅠⅠ因子/第ⅤⅠⅠ因子/第ⅠⅩ因子/第Ⅹ因子、および/または第ⅠⅠa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）

50

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

例えば、図 9 ~ 1 3 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、流体力学（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 / もしくはフォトリ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ッツバーグ（アンチトロンビン I I I ピッツバーグ）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）

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、フラビウイルス、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。

【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、基材に一連のチャンネルを含み、それぞれのチャンネルは、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。一連のチャンネルのそれぞれは、(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。

【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もよい:

- 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ン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) 次に、試料を、血塊の形成がチャン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 (別個のチャンネル中)、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 0.75 ng/mL ~ 約 750 ng/mL の範囲であり得る;
- g) 複数の因子を、等分された試料に添加して (別個のチャンネル中)、機能的異常である凝固カスケードの部分特定をすることができる。DOACの特定において第IIa因子および第Xa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IIa因子および第Xa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

10

20

30

40

50

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ンネルを含むことができ、それぞれのチャンネルは、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、複数のチャン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、複数のチャンネルの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、複数のチャンネルの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、すべてのチャンネルまたは一連のチャン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。

10

【 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（P D M 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、P D M S上のP D M S、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）。

20

【 0 0 6 7 】

[0095]本デバイスは、約50 μ mの直径、約11 μ mの高さ、および100 + μ mの幅を有するマイクロ流体チャンネルを含むことができる。他のチャン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、それぞれのチャンネルのために、備えることができる。あるいは、デバイスは、すべてのチャンネルのために、またはチャンネルの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 】

30

[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ン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くてもよい。凝固因子は、チャン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、または試料と同時に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 】

40

[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、またはチャン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ン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。

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カー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、チャネルを通し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、F X a 阻害剤、F I I a 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（注入口ポート）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、この単一デバイス中の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して進む。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ない、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口ポートポート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。

【００８０】

[00111]図１Ｃは、基材１５中のチャネル２０の注入口ポート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口ポートは、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。

【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（注入口ポート）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。

【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、注入口ポート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口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、すべての注入口チャネルの「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、ウィッキング毛细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。

【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

10

20

30

40

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る。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 2 B 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を含むわけではない。

【 0 0 8 4 】

[00115]図 2 B 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攪乱物を、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、流れの攪乱物にぶつかり、攪乱物の周囲を流れるように強制される。攪乱物は、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 2 B に図示されるような別の方法で成型されてもよい。攪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、攪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。

【 0 0 8 5 】

[00116]いくつかの実施形態において、攪乱物は、凹面を含むことができる（例えば、図 3 A）。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 つもしくは複数の攪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、チャネルのそれぞ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。

【 0 0 8 6 】

[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。

【 0 0 8 7 】

a) 試料、アゴニスト、+ / - カルシウム、+ / - 血塊検出剤を一緒に添加する。

i. カルシウムは 0.2 mM 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、0.2 mM でなくてもよい）。

【 0 0 8 8 】

ii. 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。

【 0 0 8 9 】

i. 例えば、図 1 A ~ 1 D, 2 A および 2 B 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。

【 0 0 9 0 】

i. 室温。

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

10

20

30

40

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。）。

【 0 0 9 1 】

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 3 A ~ 3 C は、実施形態の例による、4 つのチャンネル 3 2 0 と血塊形成 / 局在化区域 2 2 5 を有するマイクロ流体デバイス 3 1 0 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 3 2 5 が同じ形状を有する以外は、図 2 A および 2 B 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 3 2 5 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 3 A 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 3 2 5 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。

【 0 0 9 2 】

[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 μ L の血漿 + 0.6 μ L のアゴニスト（試料に対して 10 % 体積） + 0.6 μ L のカルシウム（2 mM のストック、試料に対して 10 % 体積） + 0.6 μ 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。

【 0 0 9 3 】

b) それぞれのチャンネルについて、事前に混合された試料のアリコートチャン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ンネルに吸い込まれる。

【 0 0 9 4 】

d) チャンネルは、37 °C 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 3 B における実施例は、1 時点（5 分）でマイクロ流体チャン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、250 ng / mL のアピキサバンを含有する。さまざまな濃度（0.75 ng / mL の FXa、7.5 ng / mL の FXa、および 75 ng / 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 3 B の右側のチャンネルにおいて見える、より高い濃度の FXa（7.5 ng / mL の FXa、および 75 ng / mL の FXa）は、図 3 B の左側のチャンネルにおいて見える、より低い濃度（0.75 ng / 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 3 C は、架橋フィブリン血塊を図示する 1 つのチャンネルの血塊形成区域の拡大図である。

【 0 0 9 5 】

[00123]実施例 4

[00124]図 4 A および 4 B は、実施形態の例による、並行マイクロ流体チャンネルデバイス 4 1 0 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。マイクロ流体チャンネル 4 2 0 は、さまざまな濃度（7.5 ng / mL、75 ng / mL、750 ng / 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。マイクロ流体チャンネルは、使用前に緩衝液で洗浄して、マイクロ流体チャンネル内に結合した 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、チャン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 4 A の試料（指刺しの血液）は、陰性

対照を含むすべての４つのチャン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、チャンネル中の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、アンチトロンビンⅠⅠⅠ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）それぞれチャンネルは、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ン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ンネル５２０の円形配列を含むデバイス５１０を図示し、それぞれのチャンネルは、血塊促進および／または局在化区域５２５を有する。チャンネル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で複数の対称チャンネル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。

【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ン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、それぞれのチャンネルで測定され、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、チャン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。

【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も有用である。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。

【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ン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ンネルであって、それぞれのチャンネルが、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、複数のチャンネルの血塊形成区域は、基材の中央領域に配置され

る、チャンネル；複数の注入ポートであって、それぞれの注入ポートが、複数のチャンネルの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、複数のチャンネルの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FIIa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、機能的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FIIa)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(0 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(FXa)濃度(ng/mL；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]0 ng/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7.5 ng/mLに至るまで、検出された。

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

【0103】

[00136]500 ng/mLのリバーロキサバンの濃度で、血塊形成は、<2.5分で、750 ng/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(0 ng/mL、250 ng/mLおよび500 ng/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(ng/mL；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]0 ng/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7.5 ng/mLに至るまで、検出された。

[00139]250 ng/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75 ng/mLに至るまで、検出された。

【0105】

40

[00140]500 ng/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938 ng/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(0 ng/mL、250 ng/mLおよび500 ng/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(ng/mL；x軸)の関数としての平均凝固検出時間(分；y軸)を示す。

【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 n g / m L 、 2 5 n g / m L 、 2 5 0 n g / m L および 5 0 0 n g / m L) 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 (F I I a) 濃度 (n g / m L ; x 軸) の関数としての平均凝固検出時間 (分 ; y 軸) を示す。図 7 D 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。

【 0 1 0 7 】

[00143] < 2 5 n g / m L 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 7 1 n g / m L に至るまで、検出された。

[00144] 2 5 0 n g / m L 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 7 1 0 n g / m L に至るまで、検出された。

【 0 1 0 8 】

[00145] 5 0 0 n g / m L のダビガトランの濃度で、血塊形成は、< 2 . 5 分で、7 1 0 n g / m L 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。

【 0 1 0 9 】

[00147] 実施例 8

[00148] F X a 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、F X a 阻害剤を F I I a 阻害剤と区別することができる。

【 0 1 1 0 】

[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。

【 0 1 1 1 】

[00150] 実施例 9

[00151] 図 9 は、第 X a 因子 (F X a) 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、F X I I 、 F X I 、 F I X 、 F V I I I 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、F I I 、 F I 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。F X a 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 F X a 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。

【 0 1 1 2 】

[00152] 実施例 1 0

[00153] 図 1 0 は、第 I I a 因子 (F I I a) 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、F X I I 、 F X I 、 F I X 、 F X 、 F V 、 F V I I I 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、F I 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。F I I a 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 F I I a 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。

【 0 1 1 3 】

[00154] 実施例 1 1

10

20

30

40

50

[00155]図 1 1 は、試料中の F I I a および F X a 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。F X a および F I I a 阻害剤の存在中で、限定されないが、F X I I、F X I、F I X、F V I I I 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 F X a の添加は、F X a および F I I a 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 F I I a の添加は、F I I a 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、F X a 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。

【 0 1 1 4 】

[00156]実施例 1 2

[00157]図 1 2 は、F X a 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、F X I I、F X I、F I X、F V I I I 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、F I I、F I 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。F X a 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 I I I (A T I I I) の F X a 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 F X a 阻害に起因し、それによって、これを阻害する。実施形態は、A T I I I の検出、それによって、F X a、F I I a 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。F X a に対する A T I I I 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 (L M W H) および未分画ヘパリン (U F H)、エノキサパリンならびにフォンダパリヌクスが挙げられる。

【 0 1 1 5 】

[00158]実施例 1 3

[00159]図 1 3 は、試料中の F X I I a および F X I a 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。F X I I a 阻害剤の存在中で、F X I I a 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、F X I、F I X、F V I I I、F X、F I I、F V 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。F X I a 阻害剤の存在中で、F X I I a の添加は、凝固時間の延長をもたらす。F X I a 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、F I X、F V I I I、F X、F I I、F V 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、F X I I a 阻害剤、F X I a 阻害剤、F X a 阻害剤および F I I a 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。

【 0 1 1 6 】

[00160]実施例 1 4

[00161]図 1 4 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、F X I I a の添加による凝固時間の延長、F X I の添加による濃度依存性の延長、および F X I a 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、F X I I a および F X I a の添加による凝固時間の延長、F I X の添加による濃度依存性の延長、および F I X a 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、F X I I a および F X I a の添加による凝固時間の延長、F V I I I の添加による濃度依存性の延長、および F X a 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。

【 0 1 1 7 】

[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 1 5

[00164]図 1 5 は、フィブリノーゲン、すなわち、第 I 因子 (F I) または F X I I I

10

20

30

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。

【 0 1 1 8 】

[00165]実施例 1 6

[00166]図 1 6 A ~ 1 6 C 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 1 6 A 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 1 6 B 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 1 6 C 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。

【 0 1 1 9 】

[00167]実施例 1 7

[00168]図 1 7 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。

【 0 1 2 0 】

[00169]実施例 1 8

[00170]図 1 8 A ~ 1 8 C 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、> 1 4 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 1 8 A および 1 8 B 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 1 8 C 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 $p < 0 . 0 5$ 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。

【 0 1 2 1 】

[00171]実施例 1 9

[00172]図 1 9 A ~ 1 9 G 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 1 9 A ~ 1 9 D 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 1 9 E 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、比較のための単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

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 2 0 A ~ 図 2 0 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 2 0 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 障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 2 0 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 2 0 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 2 0 D および 2 0 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。

【 0 1 2 3 】

[00175]実施例 2 1

[00176]図 2 1 A および 2 1 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 2 1 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 つの値を互いに対してプロットすると、図 2 1 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。

【 0 1 2 4 】

[00177]障害の特定に加えて、図 2 1 A および 2 1 B の例に図示されるように、実施形態は、障害の量を定量化するために使用することができる。

[00178]実施例 2 2

[00179]図 2 2 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。

【 0 1 2 6 】

[00181]実施例 2 3

[00182]図 2 3 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有することを示し、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

場合、次いで、医療従事者は、DOAC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、DOAC検査がDOAC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zhzoなどの特異的FXa阻害剤の反転剤もある。図24Aは、7.5 ng/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、500 ng/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DOAC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。

【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包含さ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]

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。

[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1 mL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100 μ L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50 μ L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。

[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XIII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]

10

20

30

40

50

凝固因子が、第Ⅰ因子～第ⅩⅠⅠⅠ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ⅠⅠa因子および第Ⅹa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１０に記載の方法。

[態様 1 2]

第ⅠⅠa因子、第Ⅹa因子、第ⅩⅠ因子、第ⅩⅠa因子、第ⅩⅠⅠ因子および第ⅩⅠⅠa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１１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（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）、プラスミノノーゲン、アルファ2-抗プラスミン、組織プラスミノノーゲン活性化因子（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノノーゲン活性化因子阻害剤-1（PAI1）、プラスミノ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６に記載の方法。

[態様 1 4]

凝固因子が、0.1 ng/mL ~ 10 µg/mL の範囲の濃度で試料のポーションに添加される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。

[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１４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～２０倍の範囲で異なる、請求項１５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１４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１～１７のいずれか一項に記載の方法。

[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１８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／もしくはは数の定量化、血塊形成部位での流速および／もしくはは圧力、トロンボエラストグラフィ、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／もしくははフォトリ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１～１８のいずれか一項に記載の方法。

[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２０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２１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１～２２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２３に記載の方法。

10

20

30

40

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。

[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。

20

[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、F X a 阻害剤、F I I a 阻害剤、F X I 阻害剤、F X I a 阻害剤、F X I I 阻害剤およびF X I I a 阻害剤から選択される因子特異的阻害剤である、請求項 3 9 に記載の方法。

[態様 4 1]

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 4 0 に記載の方法。

[態様 4 2]

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 3 9 に記載の方法。

[態様 4 3]

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 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 4 4]

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 4 3 に記載の方法。

[態様 4 5]

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 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 4 6]

試料が、血友病 A (第 V I I I 因子欠乏症) 、血友病 B (第 I X 因子欠乏症) 、血友病 C (第 X I 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 V I I 因子欠乏症、第 X 因子欠乏症、第 X I I I 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ッツバーグ (アンチトロンビン I I I ピッツバーグ) 欠乏症、第 V 因子および第 V I I I 因子、ならびに第 I I 因子、第 V I I 因子、第 I X 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 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

[態様 4 7]

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ンネルを含み、それぞれのチャンネルが、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、複数のチャンネルが、同じ形状を有する、マイクロ流体デバイス。

[態様 4 8]

血塊形成区のチャンネルが、デバイスにおいて近位に位置する、請求項 4 7 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 4 9]

血塊形成区の複数のチャンネルが、デバイスの中央領域に配置される、請求項 4 8 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 5 0]

デバイスのそれぞれのチャンネルが、独立した試料注入ポートを有する、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 1]

それぞれのチャンネルが、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 5 0 に記載のマイクロ流体デバイス。

10

20

30

40

50

[態様 5 2]

それぞれのチャンネルまたはチャンネルの群が、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]

チャンネルが、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]

チャンネルが、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）（フィッツジェラルド因子）、フィブロンек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 つの系列のチャンネルを含み、第 1 の系列のチャンネルが、第 1 の系列のチャンネルの諸チャンネルにわたる漸増量で第 1 の凝固因子を含み、第 2 の系列のチャンネルが、第 2 の系列のチャンネルの諸チャン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 の系列のチャンネルが、第 3 の系列のチャン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、一群のチャン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

いず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、一群のチャンネルの間で 5 倍 ~ 2 0 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 つのチャンネルが、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、チャン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。

[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 / もしくはフォトリ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、チャン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]

チャン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。

[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ンネルを含み、それぞれのチャンネルが、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、複数のチャンネルが、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。

[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。

[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（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）、プラスミノノーゲン、アルファ 2 - 抗プラスミン、組織プラスミノノーゲン活性化因子（t P A）、ウロキナーゼ、プラスミノノーゲン活性化因子阻害剤 - 1（P A I 1）、プラスミノ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

10

20

30

40

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。

[態様 7 8]

血塊形成区のチャンネルが、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。

[態様 7 9]

血塊形成区の複数のチャンネルが、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。

[態様 8 0]

デバイスのそれぞれのチャンネルが、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

[態様 8 1]

それぞれのチャンネルが、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。

[態様 8 2]

それぞれのチャンネルまたはチャンネルの群が、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。

[態様 8 3]

チャンネルが、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。

[態様 8 4]

20

チャンネルが、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。

[態様 8 5]

マイクロ流体デバイスが、少なくとも 2 つの系列のチャンネルを含み、第 1 の系列のチャンネルが、第 1 の系列のチャンネルの諸チャンネルにわたる漸増量で第 1 の凝固因子を含み、第 2 の系列のチャンネルが、第 2 の系列のチャンネルの諸チャン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。

[態様 8 6]

第 3 の系列のチャンネルが、第 3 の系列のチャン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

[態様 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。

[態様 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。

[態様 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

[態様 9 0]

凝固因子の量が、一群または一列のチャン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。

[態様 9 1]

凝固因子の量が、一群または一列のチャンネルの間で 5 倍 ~ 2 0 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。

[態様 9 2]

少なくとも 1 つのチャンネルが、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

[態様 9 3]

マイクロ流体デバイスが、チャン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。

[態様 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スensor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、チャン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

[態様 9 5]

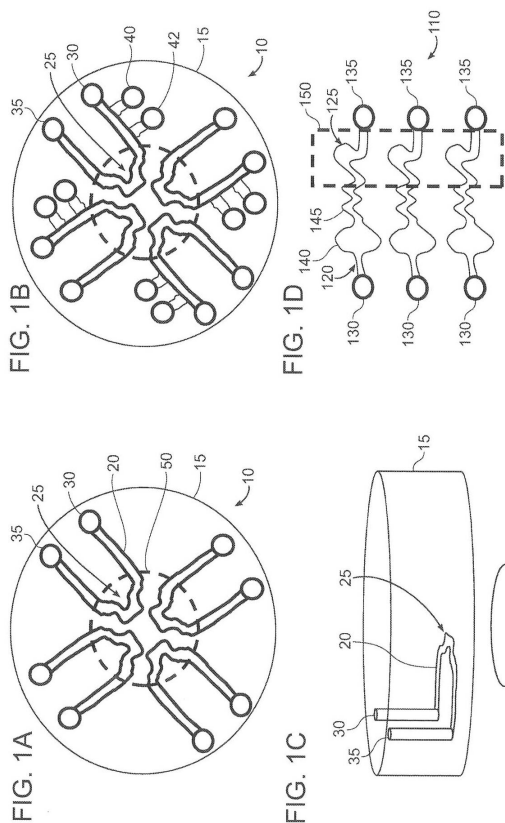
チャンネルにおいて血塊形成を測定するためのイメージング手段を含む、請求項 9 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

[態様 9 6]

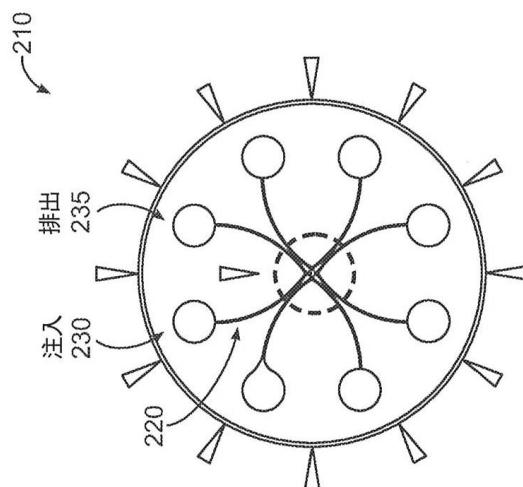
イメージングが、明視野イメージングである、請求項 9 5 に記載のマイクロ流体デバイス。

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 2 A 】



20

30

40

50

【図 2 B】

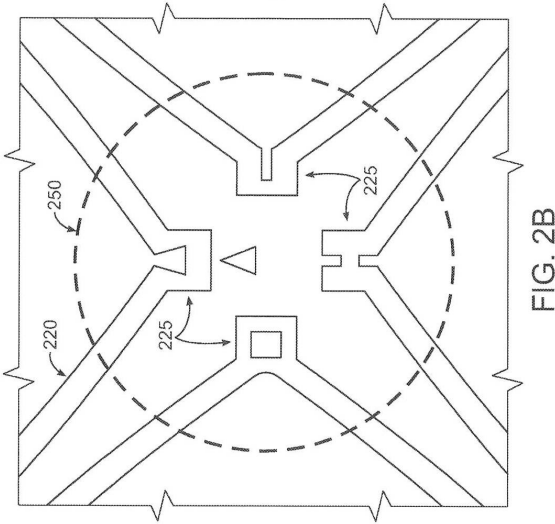
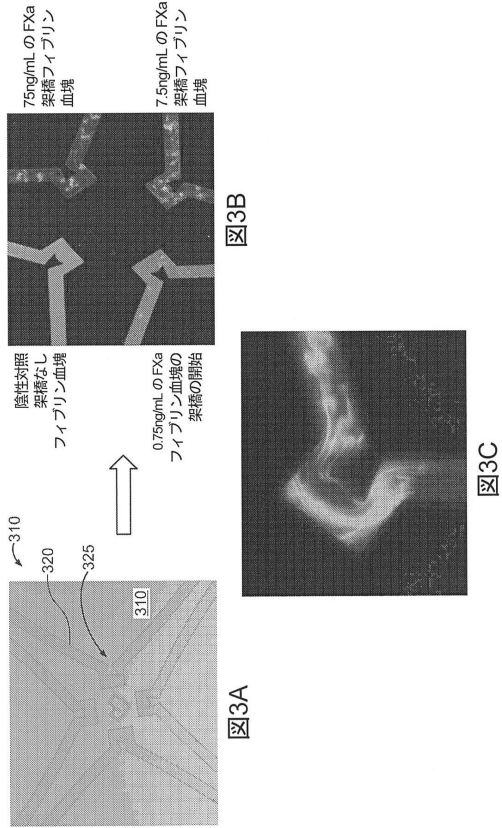


FIG. 2B

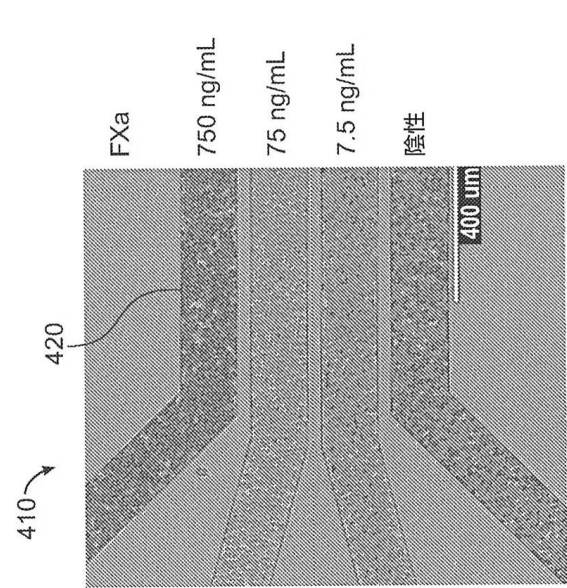
【図 3】



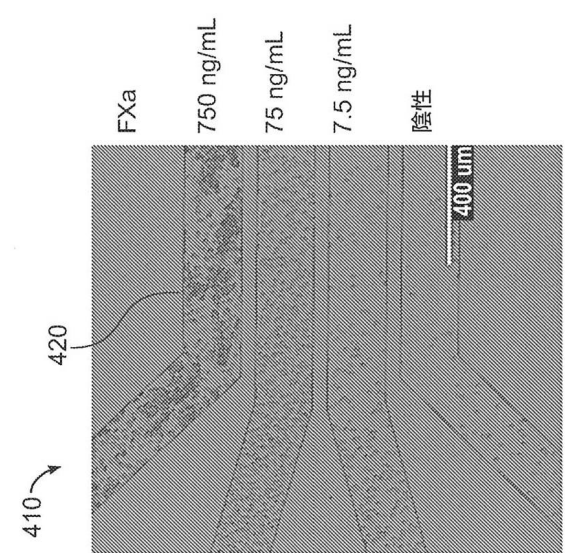
10

20

【図 4 A】



【図 4 B】



30

40

50

【図 5】

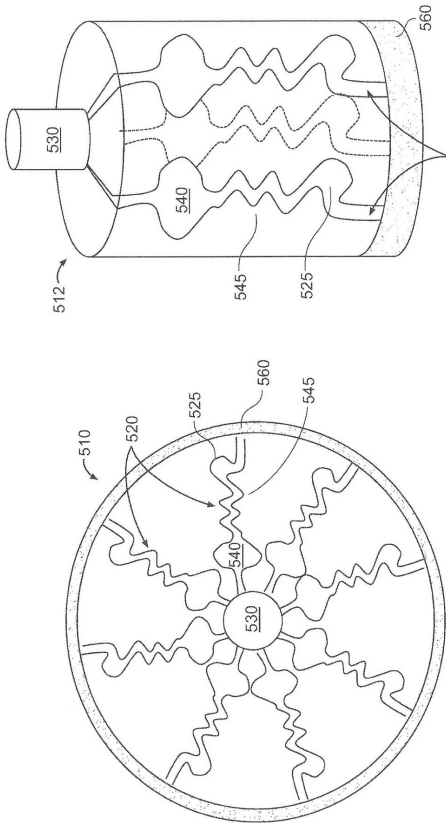
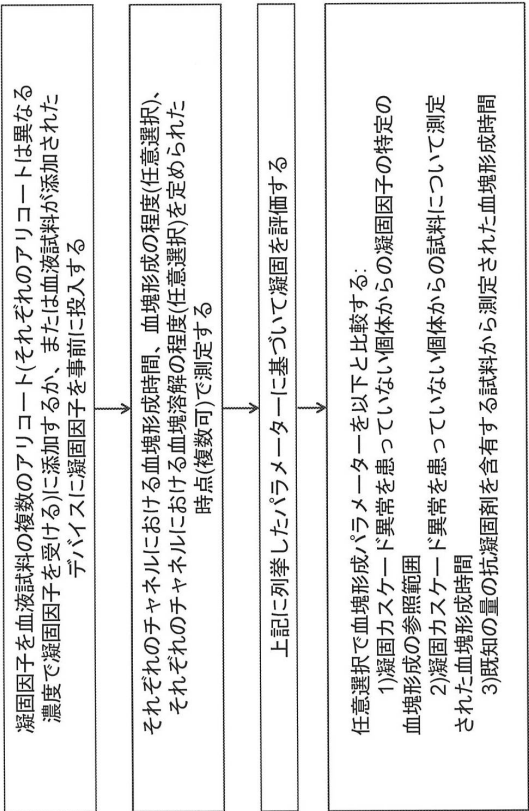


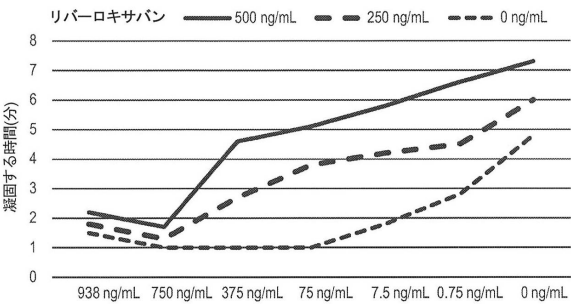
FIG. 5B

FIG. 5A

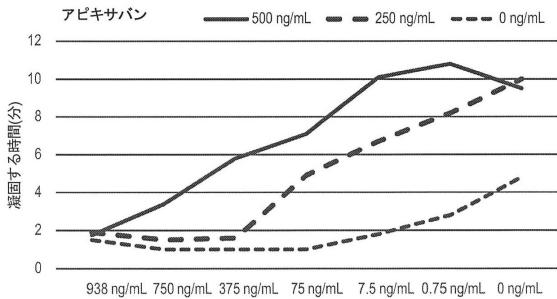
【図 6】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

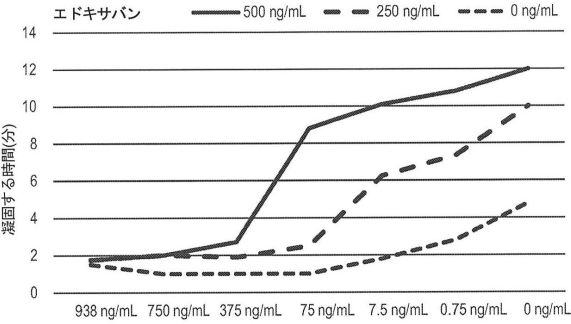
20

30

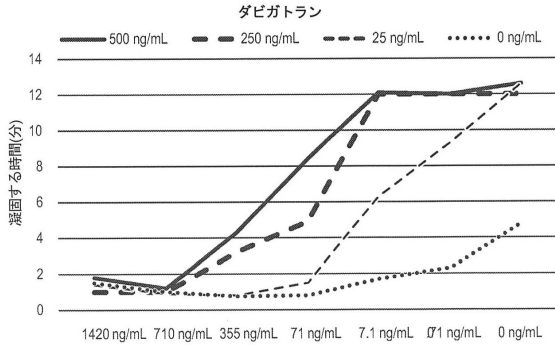
40

50

【図 7 C】

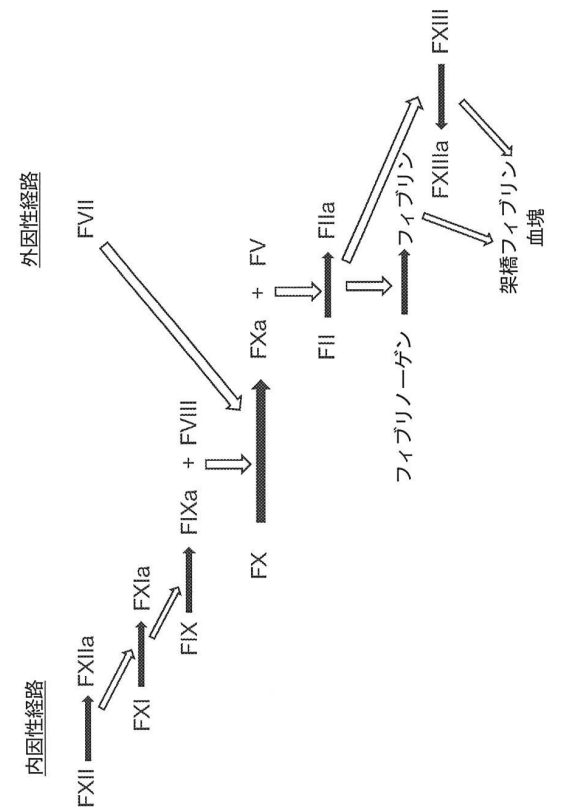


【図 7 D】

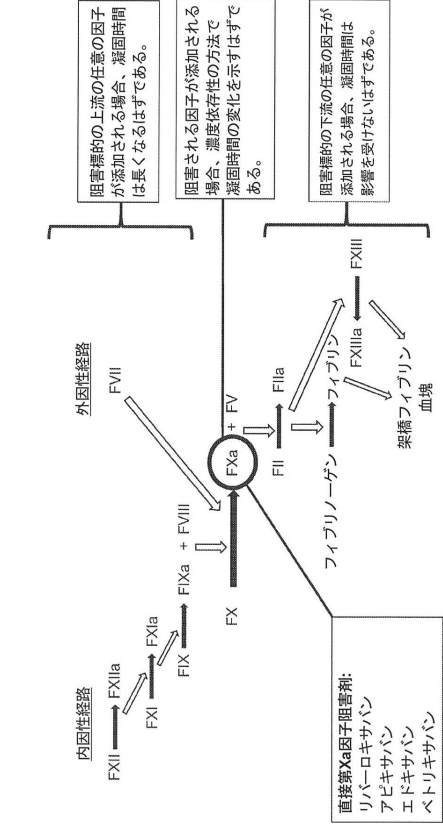


10

【図 8】



【図 9】



20

30

40

50

【図 1 6 C】

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

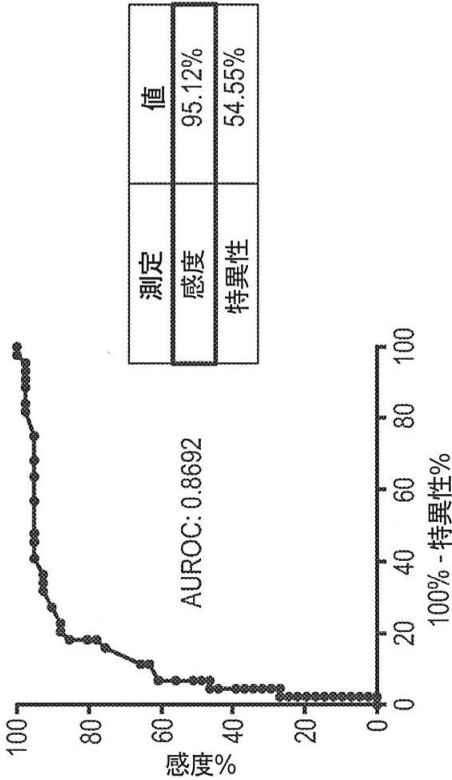
【図 1 7】

表1: 患者の記述統計学

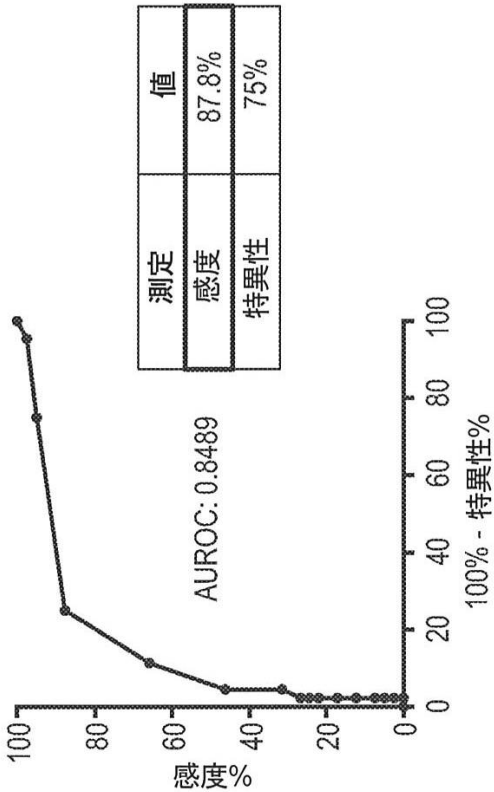
特性	合計 (N=48)	対照		FXa阻害剤	
		正常 ¹ (N=28)	異常 ² (N=20)	リバーロキサパン (N=23)	アピキサパン (N=21)
男性-数(%)	18 (37.5)	11 (39.3)	7 (35.0)	14 (67)	12 (65)
性別-年齢(平均±標準偏差)	71 ± 15	72 ± 12	68 ± 17	69 ± 19	70 ± 17
血小板阻害剤-数(%)	22 (45.8)	15 (53.6)	6 (30.0)	18 (41)	12 (57)
出血-数(%)	1 (2.1)	0 (0)	1 (5.0)	1 (2.3)	0 (0)
凝血-数(%)	2 (4.2)	2 (7.1) ⁵	0 (0) ⁶	1 (2.3)	0 (0)
心臓疾患 ³ -数(%)				36 (82)	19 (90)
その他 ⁴ -数(%)				PE/DVT、がん (肺、乳房、肝臓、 COPDの病歴)	PE/DVT、 がん(肺)、 COPDの病歴

1. 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
2. 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
3. AFB、SSS、CHFを含む心臓の状態に起因して開始されたFXa処置
4. 非原発性の心臓の状態に起因して開始されたFXa処置
5. 患者は直腸出血を示した。
6. 採血の間入院の原因は、出血イベントに起因した。1人の患者はPEと診断され、1人の患者は、DVTと診断された。
7. 採血の間入院の原因は、出血イベントに起因した。患者は腸出血を示した(子宮がんの病歴)。
8. 採血の間入院の原因は腸管イベントに起因した。患者はPEと診断された(PEおよびDVTの病歴)。

【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

20

30

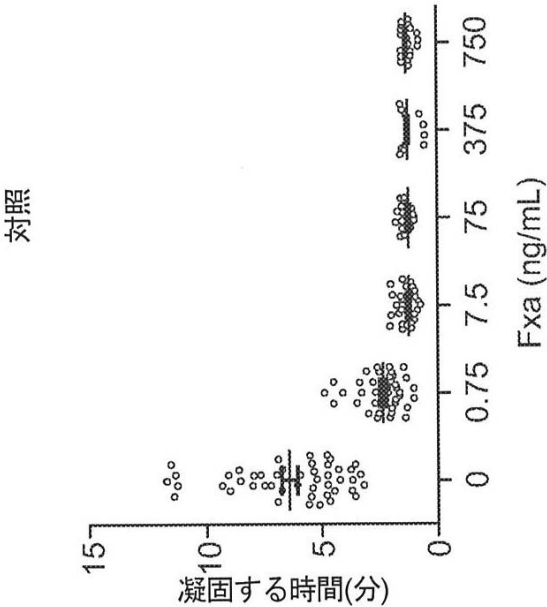
40

50

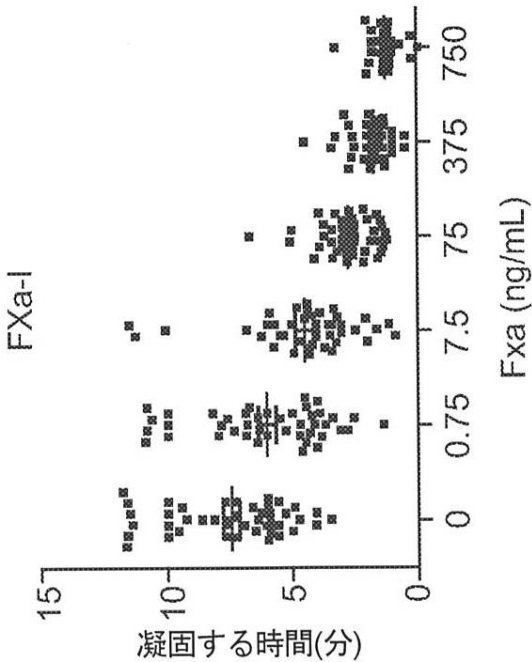
【図 18C】

特性	対照		FXa阻害剤	
	合計	正常	合計	リバーロキサパン
PT-平均±標準偏差(n)	14.4 ± 2.9 (44)	13.3 ± 0.4 (24)	異常 15.9 ± 3.9 (20)	アピキサパン 16.9 ± 2.5 (19)
INR-平均±標準偏差(n)	1.1 ± 0.3 (44)	1.1 ± 0.1 (39)	異常 1.8 ± 0.8 (6)	1.4 ± 0.2 (19)
P値(PT)-正常対照、異常対照			<0.001, 0.05	0.001, 0.74
P値(INR)-正常対照、異常対照			<0.001, 0.76	0.006, 0.17

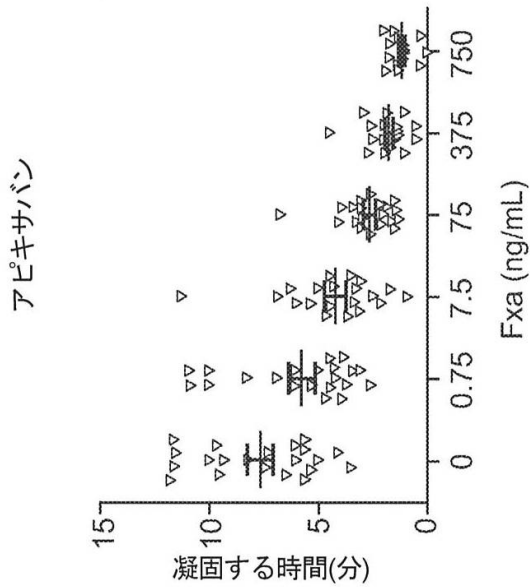
【図 19A】



【図 19B】



【図 19C】



10

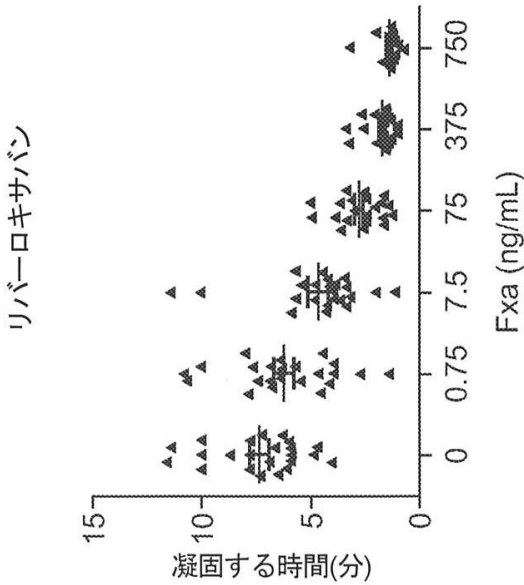
20

30

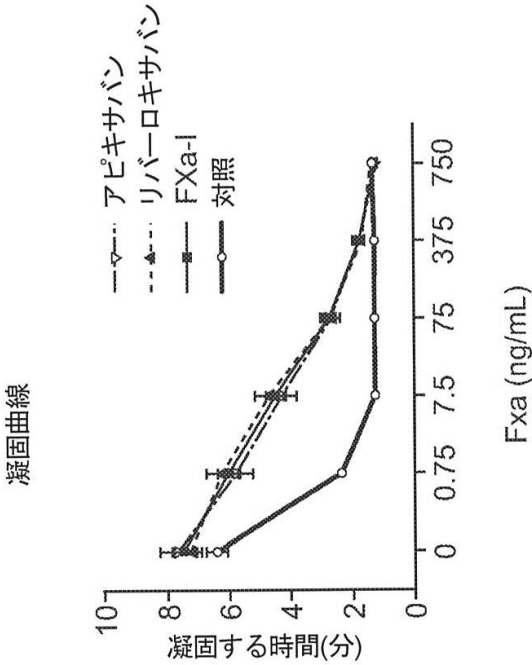
40

50

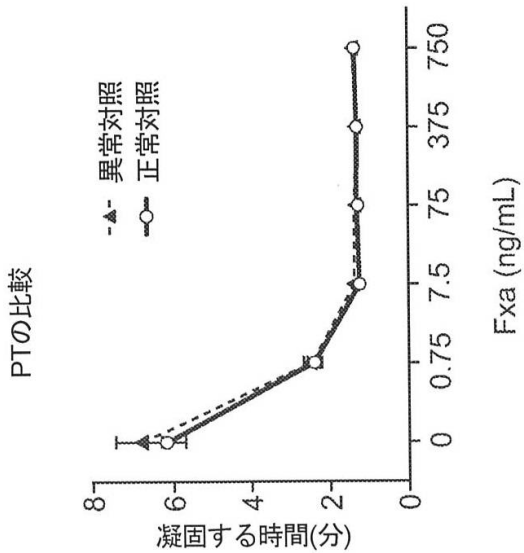
【図 19 D】



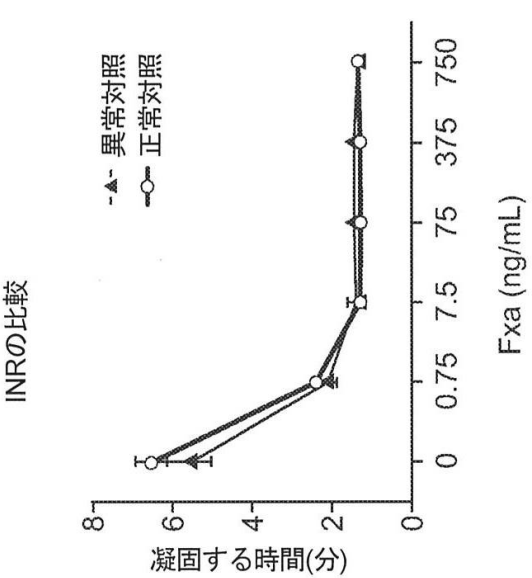
【図 19 E】



【図 19 F】



【図 19 G】



10

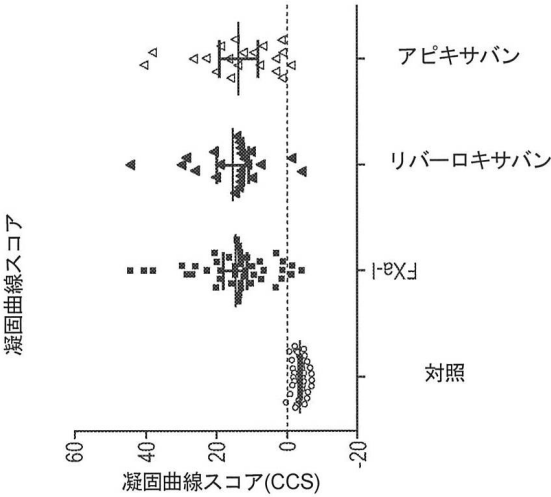
20

30

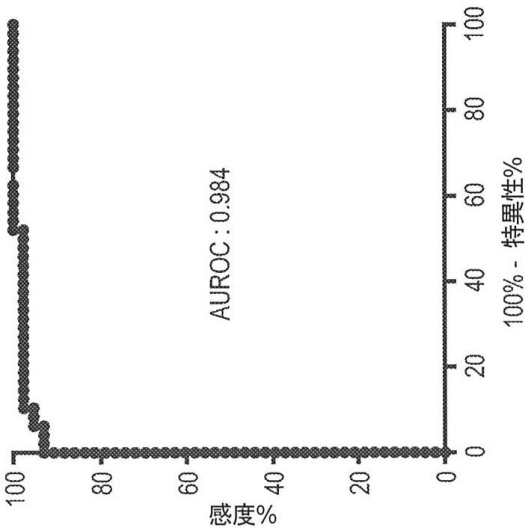
40

50

【図 20 A】



【図 20 B】



10

【図 20 C】

	対照	FXa-I	リバーロキサバン	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	40 ¹	3	43
対照	1	47	48
合計	41	50	91

20

30

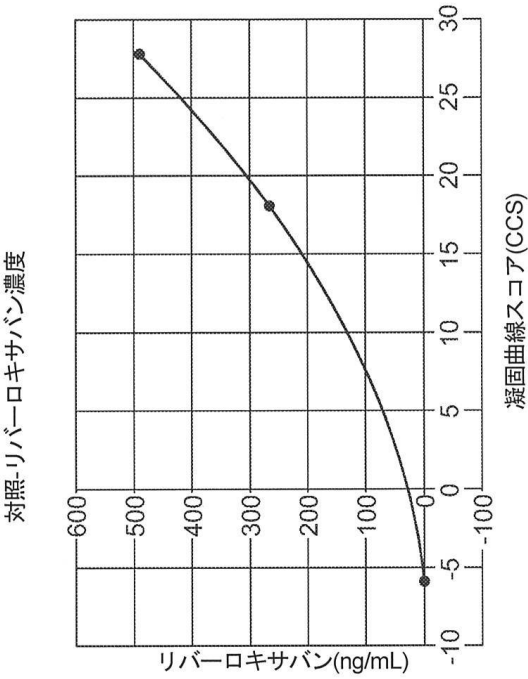
40

50

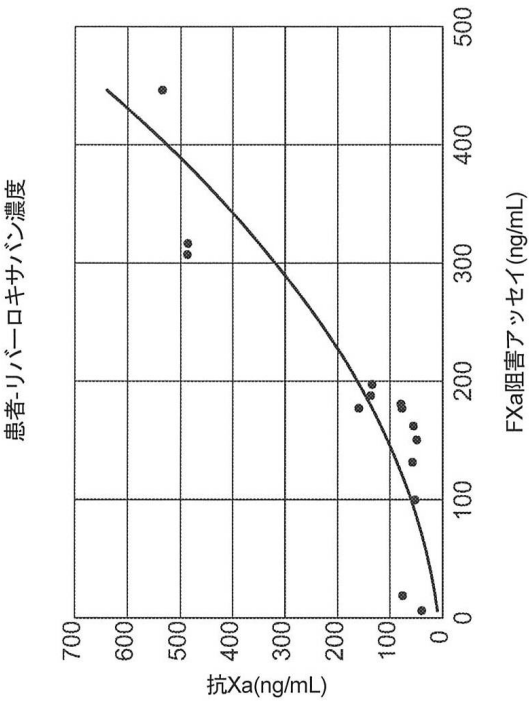
【図 2 0 E】

測定	値
感度	93.02%
特異性	97.92%
ヨーデンの指標	0.91

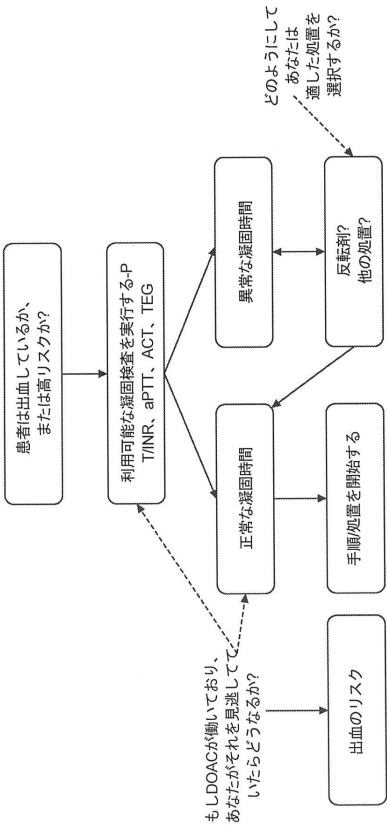
【図 2 1 A】



【図 2 1 B】



【図 2 2】



10

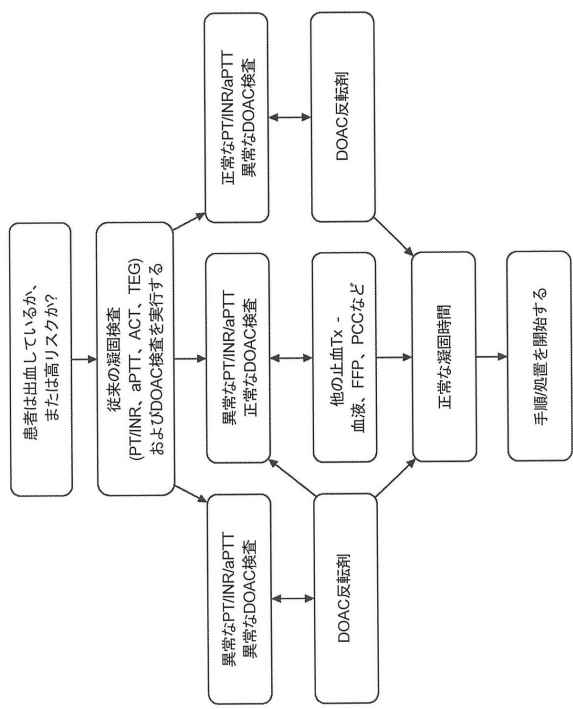
20

30

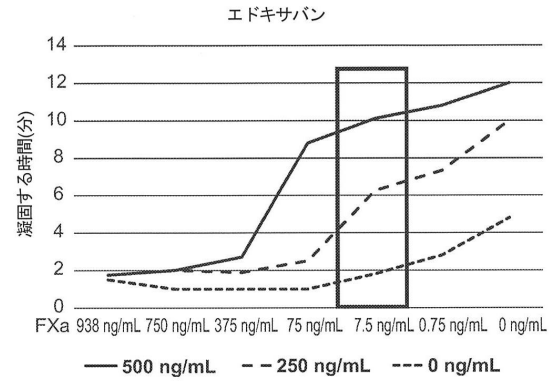
40

50

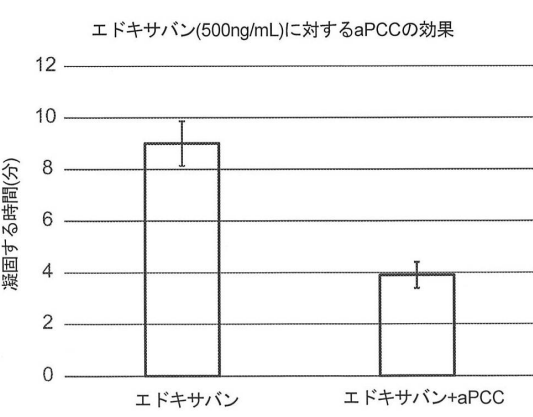
【図 2 3】



【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



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, パバン

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 0 1 N 3 3 / 8 6

G 0 1 N 3 7 / 0 0

G 0 1 N 3 5 / 1 0

C 1 2 Q 1 / 3 7

C 1 2 M 1 / 3 4