



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0034749
(43) 공개일자 2020년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/49 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/4905 (2013.01)
B01L 3/502746 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004767
(22) 출원일자(국제) 2018년07월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년02월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/043973
(87) 국제공개번호 WO 2019/023508
국제공개일자 2019년01월31일
(30) 우선권주장
62/538,618 2017년07월28일 미국(US)
62/699,665 2018년07월17일 미국(US)

(71) 출원인
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캄브리지 메사추세츠 애브
뉴 77
더 제너럴 하스피탈 코포레이션
미국, 메사추세츠 20114, 보스턴, 55 후르츠 스트
리트
(72) 발명자
프리드먼, 갈리트, 에이치.
미국 메사추세츠 02115 보스턴 커먼웰스 예비뉴
327
토너, 메메트
미국 메사추세츠 02129 찰스타운 피어 7, 36
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
인비전 특허법인

전체 청구항 수 : 총 96 항

(54) 발명의 명칭 **혈장 및 전혈에서 항응고제 탐지 방법 및 장치**

(57) 요약

본 발명은 항응고제(anticoagulant agent) 또는 응고 이상(coagulation abnormality)을 탐지하기 위한 방법 및 장치를 포함하는 응고의 평가 방법 및 장치에 대해 기재하고 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명의 방법 및 장치 들은 하나 이상의 응고 인자의 구배(gradient)에 대한 반응으로 샘플의 응고를 측정한다. 이들 반응들은 항응고 제 약물의 존재를 포함하여 상기 샘플의 응고 장애에 대한 정확한 프로파일링을 위해 평가될 수 있다. 다양한 실 시예에서, 본 발명은 최소한의 훈련을 거친 사람들에게 의해 사용될 수 있는 편리한 미세 유체 장치를 이용한 현장 치료(point-of-care) 또는 병상 검사(bedside testing)를 제공한다.

(52) CPC특허분류

B01L 3/502761 (2013.01)

G01N 33/86 (2013.01)

B01L 2300/165 (2013.01)

B01L 2400/0406 (2013.01)

B01L 2400/088 (2013.01)

(72) 발명자

툼킨스, 로널드, 지.

미국 매사추세츠 20114, 보스턴, 55 후르츠 스트리트

벤다푸디, 파반

미국 매사추세츠 20114, 보스턴, 55 후르츠 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

혈액 샘플의 부분들(portions)에 응고 인자(coagulant 인자)를 첨가하는 단계 (여기서 각 부분은 상이한 농도에 서 상기 응고 인자를 수용함); 상기 샘플의 각 부분에 대한 혈전(clot) 형성을 측정하는 단계; 및

상기 응고 인자의 농도에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계;를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고 (coagulation)를 평가하는 방법.

청구항 2

청구항 1 항에 있어서, 상기 샘플은 전혈 또는 혈장인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 3

청구항 2 항에 있어서, 상기 샘플은 전혈이고, 상기 샘플의 각 부분은 약 1 mL 미만인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 4

청구항 3 항에 있어서, 상기 샘플의 각 부분은 약 100 μ L 미만인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 5

청구항 4 항에 있어서, 상기 샘플의 각 부분은 약 50 μ L 이하인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 6

청구항 1 항에 있어서, 내인성 경로(intrinsic pathway), 외인성 경로(extrinsic pathway) 및 공통 경로(common pathway)의 인자들로부터 선택된 하나 이상의 응고 인자들의 농도 증가에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 7

청구항 6 항에 있어서, 적어도 2 개의 응고 인자들의 농도 증가에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 8

청구항 6 항에 있어서, 적어도 3 개의 응고 인자들 또는 적어도 4 개의 응고 인자들의 농도 증가에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 9

청구항 7 항에 있어서, 응고 인자들은 인자 I 내지 인자 XIII, 또는 이들의 활성화된 형태로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 10

청구항 9 항에 있어서, 상기 응고 인자들은 하나 이상의 인자 I 내지 인자 XIII의 활성화된 형태를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 11

청구항 10 항에 있어서, 적어도 인자 IIa 및 인자 Xa의 농도 증가에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계를

포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 12

청구항 11 항에 있어서, 인자 IIa, 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XIa, 인자 XII 및 인자 XIIa 중 적어도 4 개의 농도 증가에 대한 혈전 형성의 반응을 결정하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 13

청구항 6 항에 있어서, 적어도 1 개의 응고 인자는 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자, 프리칼리크레인(prekallikrein (플레처(Fletcher)) 인자, 고분자 키니노겐(high-molecular-weight kininogen; HMWK)(피츠 제럴드(Fitzgerald)) 인자, 피브로넥틴, 안티트롬빈(antithrombin) III, 헤파린 보조 인자(heparin co인자) II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (Z-related protease inhibitor; ZPI), 플라스미노겐(plasminogen), 알파 2-안티플라스민(alpha 2-antiplasmin), 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator; tPA), 유로키나제(urokinase), 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (plasminogen activator inhibitor-2; PAI2), 조직 인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor; TFPI), 또는 암 응고 촉진제(cancer procoagulant) 인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 14

청구항 1 항 내지 청구항 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응고 인자는 상기 샘플의 상기 부분들에 0.1 ng/mL 내지 10 µg/mL 의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 15

청구항 14 항에 있어서, 상기 응고 인자의 농도는 상기 샘플의 부분들 사이에 적어도 2 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 16

청구항 15 항에 있어서, 상기 응고 인자의 농도는 상기 샘플의 부분들 사이에 적어도 5 배 내지 20 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 17

청구항 14 항에 있어서, 상기 응고 인자를 적어도 4 개의 서로 다른 농도로 첨가하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 18

청구항 1 항 내지 청구항 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 혈전 형성 시간을 측정하는 단계를 포함하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 19

청구항 18 항에 있어서, 혈전 형성은 이미지 센서, 흡광도(light absorbance) 측정, 형광 탐지(fluorescence 탐지) 측정 또는 초음파 측정에 의한 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 20

청구항 1 항 내지 청구항 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 혈전 형성은 전기 임피던스(electrical impedance), 비드 추가(addition of beads) 및 비드 유량 및/또는 수의 정량(quantifying bead flow rate and/or number), 혈전 형성 부위의 유속 및/또는 압력, 혈전탄성묘사도(thromboelastography), 형광 피브리노겐을 이용한 형광 탐지, 탁도(turbidity), 적외선 분광법(infrared spectroscopy), 음향 및/또는 광자 센서(acoustic and/or photonic sensors)를 이용한 탐지, 유세포 분석 및 육안에 의한 응고 탐지(visual clotting detection)로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 21

청구항 20 항에 있어서, 혈전 형성은 이미징(imaging)에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 22

청구항 21 항에 있어서, 상기 이미징은 명시야(bright-field) 이미징인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 23

청구항 1 항 내지 청구항 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 혈전 생성 시간을 하나 이상의 기준 범위(reference ranges)와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법인 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 24

청구항 23 항에 있어서, 상기 기준 범위는 정상적 범위 및 비정상적 범위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 25

청구항 24 항에 있어서, 상기 비정상적 범위는 응고 캐스케이드 이상(coagulation cascade abnormality)으로 고통받는 개체들에 대한 응고 시간(clotting times)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 26

청구항 24 항에 있어서, 하나 이상의 기준 범위는 특정 양의 응고 억제제(coagulation inhibitor)를 포함하는 샘플에 대한 측정값을 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 27

청구항 1 항 내지 청구항 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부분들(portions)은 미세 유체 장치(microfluidic device)의 개별 채널을 통해 흐르며, 상기 채널들은 혈전 형성을 유발(trigger) 및/또는 국소화(localize)하도록 구성되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 28

청구항 27 항에 있어서, 상기 채널들은 혈전 형성 및/또는 국소화를 허용하기 위해 흐름의 방해물 유발하는 위치를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 29

청구항 27 항 및 청구항 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 동일한 기하학적 구조를 가진 마이크로 채널들임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 30

청구항 27 항 내지 청구항 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 상기 장치 상에 근접하게 위치한 혈전 형성 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 31

청구항 27 항 내지 청구항 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치의 각 채널에는 독립적인 샘플 투입 포트(input port)가 있는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 32

청구항 27 항 내지 청구항 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 각 채널 또는 채널 그룹은 공통(common) 샘플 투입 포트에 연결되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 33

청구항 27 항 내지 청구항 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 상이한 양으로 상기 응고 인자로 코팅되거나 상기 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 34

청구항 33 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 적어도 2 개 계열의 채널을 포함하고, 여기서 제 1 계열 채널들은 상기 제 1 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양의 제 1 응고 인자를 포함하고, 제 2 계열 채널들은 상기 제 2 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양으로 제 2 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 35

청구항 34 항에 있어서, 제 3 계열 채널들은 상기 제 3 계열 채널들의 각 채널에 상이한 양 또는 농도로 통합된(incorporated) 제 3 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 36

청구항 27 항 내지 청구항 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응고 인자는 상기 미세 유체 장치로 샘플을 투입하기 전에 상기 샘플에 첨가되거나, 또는 하나 이상의 상기 채널들의 포트(port)를 통해 상기 샘플에 첨가되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 37

청구항 27 항 내지 청구항 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들의 각 채널에서의 혈전 형성 정도는 고정된 시간(fixed time) 또는 시간들(times)에 측정되는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 38

청구항 1 항 내지 청구항 37 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 샘플에 갈습을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법인, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 39

청구항 1 항 내지 청구항 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 항응고제(anticoagulation agent)로 치료를 받는 대상으로부터 수득한 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 40

청구항 39 항에 있어서, 상기 항응고제는 FXa 억제제, FIIa 억제제, FXI 억제제, FXIa 억제제, FXII 억제제 및 FXIIa 억제제로부터 선택된 인자-특이적(인자-specific) 억제제인 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 41

청구항 40 항에 있어서, 상기 항응고제는 리바록사반(Rivaroxaban), 아픽사반(Apixaban), 에독사반(Edoxaban), 다비가트란(Dabigatran) 또는 베티릭사반(Betrixaban)인 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 42

청구항 39 항에 있어서, 상기 항응고제는 헤파린 또는 비타민 K 길항제인 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 43

청구항 1 항 내지 청구항 42 항 중 어느 한 항에 있어서,

응고 시간이 길어지고 상기 응고 인자의 농도 증가가 응고 시간을 정상화하지 못하는 경우, 상기 샘플은 응고 인자의 하류(downstream)에 응고 억제 또는 응고 결함(coagulation defect)이 있거나; 또는

응고 시간이 응고 인자의 농도 의존적으로 감소하는 경우, 상기 샘플은 상기 응고 인자의 응고 억제 또는 응고 결함을 갖는 것을 특징으로 하는,

혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 44

청구항 43 항에 있어서, 정상화된 응고 시간은 상기 억제 또는 결함의 하류(downstream)에, 활성화된 형태의 응고 인자를 첨가함으로써 결정되는 것임을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 45

청구항 1 항 내지 청구항 44 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응을 결정하는 단계는 상기 샘플에서 인자-특이적 억제제를 탐지하는 단계를 포함하며, 상기 샘플을 수득한 대상체에 역전제(reversal agent)를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 46

청구항 1 항 내지 청구항 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은

혈우병 A(인자 VIII 결핍), 혈우병 B(인자 IX 결핍), 혈우병 C(인자 XI 결핍), 인자 I(피브리노겐) 결핍, 인자 V 결핍, 인자 VII 결핍, 인자 X 결핍, 인자 XIII 결핍, 알파 2-안티트립신 결핍, 알파 1-안티트립신 피츠버그(안티트롬빈 III 피츠버그) 결핍, 인자 V 및 VIII 및 인자 II, VII, IX 및 X, 또는 혈소판 이상(Platelet abnormality)에서 임의로 선택된 복합 인자 결핍(Combined 인자 deficiencies)의 질병을 갖고 있거나 질병을 갖고 있는 것으로 의심되는 대상체로부터 수득한 것을 특징으로 하는, 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법.

청구항 47

응고 탐지용 미세 유체 장치(microfluidic device)에 있어서, 상기 장치는:

기관에 형성된 복수의 채널들을 포함하고, 여기서 각 채널은 혈전 형성을 유발(trigger) 및/또는 국소화(localize)하도록 구성되는 기하학적 구조를 가지는 혈전 형성 영역을 포함하며, 여기서 상기 복수의 채널들은 동일한 기하학적 구조를 가지는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 48

청구항 47 항에 있어서, 상기 채널들의 상기 혈전 형성 영역들은 상기 장치에 근접하게 위치된 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 49

청구항 48 항에 있어서, 상기 복수의 채널들의 상기 혈전 형성 영역들은 상기 장치의 중심 영역(central region)에 배열되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 50

청구항 47 항 내지 청구항 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치의 각 채널은 독립적인 샘플 투입 포트를 가지는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 51

청구항 50 항에 있어서, 각 채널은 독립적인 방출 포트를 가지며, 상기 투입 포트 및 방출 포트는 상기 장치의 주변에 교대적 패턴(alternating pattern)으로 임의 배열되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 52

청구항 47 항 내지 청구항 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 각 채널 또는 채널 그룹은 공통 샘플 투입 포트에 연

결되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 53

청구항 47 항 내지 청구항 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 하나 이상의 추가 시약을 수용하기 위하여 하나 이상의 추가 투입 포트를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 54

청구항 47 항 내지 청구항 53 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 상이한 양으로 상기 응고 인자로 코팅되거나 상기 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 55

청구항 54 항에 있어서, 상기 응고 인자는 내인성 경로(intrinsic pathway), 외인성 경로(extrinsic pathway) 및 공통 경로(common pathway)로부터 선택된 하나 이상의 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 56

청구항 55 항에 있어서, 상기 하나 이상의 응고 인자들은 인자 I 내지 XIII, 또는 이들의 활성화된 형태로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 57

청구항 56 항에 있어서, 상기 하나 이상의 응고 인자들은 상기 활성화된 형태인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 58

청구항 57 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 인자 IIa 이고 제 2의 응고 인자는 인자 Xa 인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 59

청구항 54 항에 있어서, 상기 응고 인자는 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자, 프리칼리크레인(prekallikrein (플레처(Fletcher)) 인자, 고분자 키니노젠(high-molecular-weight kininogen; HMWK)(피츠 제럴드(Fitzgerald)) 인자, 피브로넥틴, 안티트롬빈(antithrombin) III, 헤파린 보조 인자(heparin cofactor) II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (Z-related protease inhibitor; ZPI), 플라스미노젠(plasminogen), 알파 2-안티 플라스민(alpha 2-antiplasmin), 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator; tPA), 유로키나제(urokinase), 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (plasminogen activator inhibitor-2; PAI2), 조직 인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor; TFPI), 또는 암 응고 촉진제(cancer procoagulant) 인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 60

청구항 54 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 적어도 2 개 계열의 채널을 포함하고, 여기서 제 1 계열 채널들은 상기 제 1 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양의 제 1 응고 인자를 포함하고, 제 2 계열 채널들은 상기 제 2 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양으로 제 2 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 61

청구항 60 항에 있어서, 제 3 계열 채널들은 상기 제 3 계열 채널들의 각 채널에 상이한 양으로 통합된(incorporated) 제 3 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 62

청구항 61 항에 있어서, 상기 응고 인자들은 하나 이상의 인자 II, 인자 IIa, 인자 X, 인자 Xa 또는 이들의 조

합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 63

청구항 61 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 트롬빈(인자 IIa) 이고 다른 하나의 응고 인자는 인자 Xa인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 64

청구항 61 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 인자 IIa이고, 두 번째 응고 인자는 인자 Xa이고, 세 번째 응고 인자는 인자 XIa 또는 인자 XI이며, 네 번째 응고 인자는 인자 XIIa 또는 인자 XII인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 65

청구항 54 항 내지 청구항 64 항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 인자의 양은 그룹의 채널들 사이에 적어도 2 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 66

청구항 65 항에 있어서, 응고 인자의 양은 그룹의 채널들 사이에 적어도 5 배 내지 20 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 67

청구항 54 항 내지 청구항 66 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 채널은 응고 인자를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 68

청구항 54 항 내지 청구항 67 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 상기 채널들의 각 채널에서 고정된 시간(fixed time) 또는 시간들(times)에 혈전 형성을 측정하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 69

청구항 68 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 전기 임피던스(electrical impedance), 비드 추가(addition of beads) 및 비드 유량/수의 정량(quantifying bead flow rate/number), 혈전 형성 부위의 유속 및/또는 압력, 혈전탄성도(thromboelastography), 형광 피브리노겐을 이용한 형광 탐지, 탁도(turbidity), 적외선 분광법(infrared spectroscopy), 음향 및/또는 광자 센서(acoustic 및/또는 photonic sensors)를 이용한 탐지, 유체 포 분석 및 육안에 의한 응고 탐지(visual clotting detection)로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 혈전 형성을 측정하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 70

청구항 69 항에 있어서, 상기 장치는 상기 채널들에서 혈전 형성 측정을 위한 이미징 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 71

청구항 70 항에 있어서, 상기 이미징은 명시야(bright-field) 이미징인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 72

응고 탐지용 미세 유체 장치에 있어서, 상기 장치는:

기관에 형성된 복수의 채널들을 포함하고, 여기서 각 채널은 혈전 형성을 유발(trigger) 및/또는 국소화(localize)하도록 구성되는 기하학적 구조를 가지는 혈전 형성 영역을 포함하며, 여기서 상기 복수의 채널들은 상이한 양으로 상기 응고 인자로 코팅되거나 상기 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세

유체 장치.

청구항 73

청구항 72 항에 있어서, 상기 응고 인자는 내인성 경로(intrinsic pathway), 외인성 경로(extrinsic pathway) 및 공통 경로(common pathway)로부터 선택된 하나 이상의 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 74

청구항 73 항에 있어서, 상기 하나 이상의 응고 인자들은 인자 I 내지 XIII, 또는 이들의 활성화된 형태로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 75

청구항 74 항에 있어서, 상기 하나 이상의 응고 인자들은 상기 활성화된 형태인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 76

청구항 75 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 인자 IIa 이고 제 2의 응고 인자는 인자 Xa 인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 77

청구항 72 항에 있어서, 상기 응고 인자는 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자, 프리칼리크레인(prekallikrein (플레처(Fletcher)) 인자, 고분자 키니노겐(high-molecular-weight kininogen; HMWK)(피츠 제럴드(Fitzgerald)) 인자, 피브로넥틴, 안티트롬빈(antithrombin) III, 헤파린 보조 인자(heparin cofactor) II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제(Z-related protease inhibitor; ZPI), 플라스미노겐(plasminogen), 알파 2-안티 플라스민(alpha 2-antiplasmin), 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator; tPA), 유로키나제(urokinase), 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (plasminogen activator inhibitor-2; PAI2), 조직 인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor; TFPI), 또는 암 응고 촉진제(cancer procoagulant) 인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 78

청구항 72 항 내지 청구항 77 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들의 상기 혈전 형성 영역들은 상기 장치에 근접하게 위치된 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 79

청구항 78 항에 있어서, 상기 복수의 채널들의 상기 혈전 형성 영역들은 상기 기관의 중심 영역(central region)에 배열되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 80

청구항 72 항 내지 청구항 79 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치의 각 채널은 독립적인 샘플 투입 포트를 가지는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 81

청구항 80 항에 있어서, 각 채널은 독립적인 방출 포트를 가지며, 상기 투입 포트 및 방출 포트는 상기 장치의 주변에 교대적 패턴(alternating pattern)으로 임의 배열되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 82

청구항 72 항 내지 청구항 79 항 중 어느 한 항에 있어서, 각 채널 또는 채널 그룹은 공통 샘플 투입 포트에 연

결되는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 83

청구항 72 항 내지 청구항 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 하나 이상의 추가 시약을 수용하기 위하여 하나 이상의 추가 투입 포트를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 84

청구항 72 항 내지 청구항 83 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널들은 동일한 기하학적 구조를 가지는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 85

청구항 72 항 내지 청구항 84 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 적어도 2 개 계열의 채널을 포함하고, 여기서 제 1 계열 채널들은 상기 제 1 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양의 제 1 응고 인자를 포함하고, 제 2 계열 채널들은 상기 제 2 계열 채널들의 채널들에 걸쳐 증가하는 양으로 제 2 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 86

청구항 85 항에 있어서, 제 3 계열 채널들은 상기 제 3 계열 채널들의 각 채널에 상이한 양 또는 농도로 통합된(incorporated) 제 3 응고 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 87

청구항 72 항 내지 청구항 86 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 응고 인자들은 하나 이상의 인자 II, 인자 IIa, 인자 X, 인자 Xa 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 88

청구항 87 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 트롬빈(인자 IIa) 이고 다른 하나의 응고 인자는 인자 Xa인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 89

청구항 87 항에 있어서, 하나의 응고 인자는 인자 IIa이고, 두 번째 응고 인자는 인자 Xa이고, 세 번째 응고 인자는 인자 XIa 또는 인자 XI이며, 네 번째 응고 인자는 인자 XIIa 또는 인자 XII인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 90

청구항 72 항 내지 청구항 89 항 중 어느 한 항에 있어서, 응고 인자의 양은 그룹(group) 또는 계열(series)의 채널들 사이에 적어도 2 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 91

청구항 90 항에 있어서, 응고 인자의 양은 그룹(group) 또는 계열(series)의 채널들 사이에 적어도 5 배 내지 20 배의 차이가 있는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 92

청구항 72 항 내지 청구항 91 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 채널은 응고 인자를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 93

청구항 72 항 내지 청구항 92 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 상기 채널들의 각 채널에서 고정된 시간(fixed time) 또는 시간들(times)에 혈전 형성을 측정하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 94

청구항 93 항에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 전기 임피던스(electrical impedance), 비드 추가(addition of beads) 및 비드 유량/수의 정량(quantifying bead flow rate/number), 혈전 형성 부위의 유속 및/또는 압력, 혈전탄성도사도(thromboelastography), 형광 피브리노겐을 이용한 형광 탐지, 탁도(turbidity), 적외선 분광법(infrared spectroscopy), 음향 및/또는 광자 센서(acoustic 및/또는 photonic sensors)를 이용한 탐지, 유세포 분석 및 육안에 의한 응고 탐지(visual clotting detection)로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 혈전 형성을 측정하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 95

청구항 94 항에 있어서, 상기 장치는 상기 채널들에서 혈전 형성 측정을 위한 이미징 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

청구항 96

청구항 95 항에 있어서, 상기 이미징은 명시야(bright-field) 이미징인 것을 특징으로 하는, 응고 탐지용 미세 유체 장치.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] [0001] 본 출원은 2017년 7월 28일에 출원된 미국 가출원 제 62/538,618호 및 2018년 7월 17일에 출원된 미국 가출원 제 62/699,665호의 이익을 주장하며, 이들의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0002] 정부 지원(GOVERNMENT SUPPORT)
- [0003] [0002] 본 발명은 미국국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 부여된 허여 번호 P41 EB002503, P30 ES002109 및 P50 GM021700 하에 미국 정부의 지원을 받아 완성되었고, 미국정부는 본 발명에 대하여 특정 권리를 소유하게 된다.
- [0004] [0003] 응고 시스템은 출혈(hemorrhage)과 혈전증(thrombosis) 사이의 미묘한 균형이다. 암, 자가 면역 질환, 감염, 외상, 수술, 심장병 및 약물을 포함하여 많은 질병 상태들은 상기 균형을 방해하여 환자가 중증, 심지어는 생명을 위협하는 출혈 또는 응고 사태를 초래할 수 있다. 항응고제 약물은 일반적으로 혈전 장애증(thrombotic disorders)에 처방된다. 헤파린과 같은 기존 항응고제 약물들은 응고 캐스케이드(clotting cascade)의 여러 요인들을 간접적으로 억제한다. 보다 최근의 직접 경구용 항응고제들(direct oral anticoagulants; DOACs)의 도입은 응고 경로의 표적화된 억제를 가능하게 한다.
- [0005] [0004] 항응고 요법의 가장 큰 위험은 출혈 위험성이 증가되는 것이며, 따라서, 통상적으로, 항응고제 약물을 복용하는 환자들은 적절한 복용량을 투여받게 하기 위하여 주의 깊게 모니터링된다. 환자의 출혈과 응고를 평가하기 위해 현재 이용할 수 있는 임상 검사는 기초적 수준의 것으로서, 프로트롬빈 시간(PT) 및 활성화된 트롬보플라스틴 시간(aPTT)과 같은 정확도가 떨어지는 정보를 제공하거나, 또는 정보는 더 자세하지만 고가의 장비, 오랜 교육 시간 및 조심스러운 조작이 필요하다. 후자에 속한 것으로는 혈전 탄성도 검사(thromboelastography; TEG), 혈전 탄성 측정(thromboelastometry; TEM), 회전 혈전 탄성 측정(rotational thromboelastometry; ROTEM), 혈소판 응집 및 유세포 분석이 포함된다. 현재 직접 경구용 항응고제들(DOACs)에 대한 특정 검사는 사용이 가능하지 않은 상태다. 현재까지 제시된 대부분의 DOAC 분석들은 약물 자체의 절대 농도를 측정하는 약동학적 분석이므로, 임상적 의사 결정(clinical decision-making)을 지원하는 데 있어서 제한된 기능적 정보만을 제공하고 있다.
- [0006] [0005] 긴급 치료 환경(urgent care setting)을 포함하되 이에 국한되지 않는 심한 출혈이나 응고 위험이 높은 환자들을 더 잘 관리하기 위해서는, 환자들의 샘플에 있는 DOAC 탐지를 포함한, 응고상의 장애 탐지, 특성 파악 및/또는 정량화할 수 있는 응고 검사(Coagulation tests)가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] [0006] 이하, 항응고제(anticoagulant agent) 또는 응고 이상(coagulation abnormality)을 탐지하기 위한 방법 및 장치를 포함하는 응고의 평가 방법 및 장치에 대해 기재한다. 응고 이상은 혈전 형성 이상(abnormality of clot formation)(예; 혈전증(thrombosis)) 및 혈전 분해 이상(abnormality of clot degradation)(예: 섬유소 용해(fibrinolysis))을 포함한다. 다양한 구체예에서, 본 발명의 방법 및 장치들은 하나 이상의 응고 인자들의 구배(gradient)에 대한 반응으로 샘플의 응고(coagulation)를 측정한다. 이들 반응들은 직접 경구용 항응고제들(DOACs) 또는 통상적인 항응고제 약물의 존재를 포함하여 샘플의 응고 장애에 대한 정확한 프로파일링을 위해 평가될 수 있다. 다양한 실시예에서, 본 발명은 최소한의 훈련을 거친 사람들에게 의해 사용될 수 있는 편리한 미세 유체 장치를 이용한 현장 치료(point-of-care) 또는 병상 검사(bedside testing)를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0008] [0007] 일부 양태에 있어서, 본 발명은 혈액 샘플에서 응고(coagulation)를 평가하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 응고 인자(coagulant 인자)를 혈액 샘플의 복수의 부분들(portions)(예, 분취량(aliquots))에 첨가하는 단계(여기서 각 부분은 상이한 농도에서 상기 응고 인자를 수용함); 상이한 농도에 대한 반응으로 혈전 형성(clot formation) 및 혈전 형성 시간들(clot formation times)을 측정하는 단계를 포함한다. 상이한 농도에 반응하는 하나 이상의 응고 인자들의 응고를 평가함으로써, 직접 경구용 항응고제들(DOACs) 또는 다른 약물들의 응고에 대한 영향을 포함한, 혈액 응고 기능을 정확하게 프로파일링 할 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 유전적 응고 이상의 유무가 결정된다. 본원에 기재된 바와 같은 방법은 기재된 바와 같은 미세 유체 장치(microfluidic device)를 사용하여 수행될 수 있으며, 여기서 하나 이상의 채널은 혈전(clot)의 형성 및 국소화를 유발하도록 구성될 수 있다.
- [0009] [0008] 달리 기재되지 않는 한, 본원에서, 용어 “혈액 샘플”은 전혈 샘플 또는 혈장 샘플을 의미한다. 상기 용어 혈장은 혈소판이 풍부한 혈장(platelet-rich-plasma; PRP)와 혈소판이 부족한 혈장(platelet-poor-plasma; PPP)을 모두 포함한다.
- [0010] [0009] 본원에서, 용어 “응고 인자”는 응고 캐스케이드(coagulation cascade; 내인성(trinsic), 외인성(extrinsic) 및 공통(common) 경로들(pathways))에 관계된 하기 인자들을 포함한 임의의 인자를 의미한다: 인자 I 내지 인자 XIII, 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자, 프리칼리크레인(prekallikrein (플레처(Fletcher)) 인자, 고분자 키니노겐(high-molecular-weight kininogen; HMWK)(피츠 제럴드(Fitzgerald)) 인자, 피브로넥틴, 안티트롬빈(antithrombin) III, 헤파린 보조 인자(heparin cofactor) II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제(Z-related protease inhibitor; ZPI), 플라스미노젠(plasminogen), 알파 2-안티 플라스민(alpha 2-antiplasmin), 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator; tPA), 유로키나제(urokinase), 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2(plasminogen activator inhibitor-2; PAI2), 조직 인자 경로 억제제(tissue factor pathway inhibitor; TFPI), 및 암 응고 촉진제(cancer procoagulant). 상기 응고 인자(들)는 활성화되거나 또는 비활성화된(예, 전구체) 형태일 수 있다. 예를 들어, 어느 한 샘플에서 응고 인자 억제제의 존재 여부를 탐지하기 위해서는, 상기 응고 인자가 활성화된 형태(예, 인자 Xa 또는 인자 IIa)이어야 한다. 다른 실시예에 있어서, 유전적 응고 이상을 탐지하기 위해서는, 응고 인자는 불활성화된 형태일 수 있다(예, 인자 X 또는 인자 II). 또한, 상기 응고 인자(들)는 인간, 동물(예: 소, 돼지 및 기타 동물)로부터 유래되거나 합성 또는 재조합된 단백질을 포함한다.
- [0011] [0010] 일부 실시예에 있어서, 본 발명은 항응고제를 탐지하는 방법을 제공한다. 항응고제는 혈액 응고를 방지하거나 감소시켜 응고 시간을 연장시키는 물질이다. 항응고제에는 인자-특이적 억제제(예: FXa 억제제, FIIa 억제제, FXIa 억제제, FXIIa 억제제), 헤파린 및 비타민 K 길항제(예, 와파린(warfarin))들을 포함하나 이들에 제한되지는 않는다. 일부 실시예에 있어서, 이들 항응고제는 신규 경구용 항응고제(Novel Oral Anticoagulants; NOACs)로도 알려진 직접 경구용 항응고제(Direct Oral Anticoagulants; DOACs)(예: Janssen Pharmaceuticals, Inc.의 XARELTO(리바록사반), Bristol-Myers Squibb 및 Pfizer Inc.의 ELIQUIS(아픽사반), Daiichi Sankyo, Inc.의 SAVAYSA(에독사반), Boehringer Ingelheim의 PRADAXA(다비가트란), 및 Portola Pharmaceuticals, Inc.의 BEVYXXA(베트릭사반)을 포함한다.

- [0012] [0011] 외인성 첨가 응고 인자들의 농도 증가에 따른 혈전 형성(예, 혈전 형성 시간들)을 측정함으로써, 치료제에 의한 억제 지점(point of inhibition)의 존재 유무가 결정될 수 있다. 예를 들어, 응고 억제제에 양성인 샘플은 상기 억제제에 의해 표적화된 응고 인자가 상기 샘플에 첨가되면, 응고 시간의 농도-의존적 감소를 나타내게 된다. 한편, 상기 억제 지점의 상류에 응고 인자가 (증가되는 양으로) 첨가되면, 응고 인자를 상기 억제 지점의 하류에 첨가할 때의 응고 시간과는 달리, 상기 응고 시간은 연장된 상태로 유지될 것이다. 참조 도 9-13.
- [0013] [0012] 일부 실시예에 있어서, 환자 샘플에 대한 결과는 정상 및/또는 비정상 응고에 대한 표준 또는 특정 제제(agents)에 의한 항응고제 요법에 상응하는 기준 표준을 포함하는, 기준 표준과 비교될 수 있다. 일부 실시예에서, 기준 표준은 환자에 대해 개인화(personalized)될 수 있다.
- [0014] [0013] 다양한 실시예에 있어서, 응고 곡선은 다양한 응고 인자들을 증가하는 농도 또는 양으로 첨가함에 따른 혈전 형성의 반응 특성을 파악하도록 구성될 수 있다. 이들 응고 곡선은 응고 억제제를 식별하고 그 양을 결정할 수 있게 함으로써 환자 치료를 가이드한다. 일부 실시예에 있어서, 이어서, 필요에 따라 적절한 응고 억제제 역전제를 상기 환자에게 투여하여 치료적 개입(therapeutic intervention)을 역전시킨다.
- [0015] [0014] 일부 양태에 있어서, 본 발명은 샘플에서 응고를 평가하기 위한 미세 유체 장치(microfluidic device)를 제공한다. 상기 장치는 기관에 일련의 채널들을 포함하고 있으며, 각 채널은 외인적으로(exogenously) 첨가된 응고 인자의 양 또는 농도와 같은 하나 이상의 시약에 반응하는 혈전 형성의 평가를 허용하기 위해, 혈전 형성을 유발(trigger) 및/또는 국소화(localize)하는 기하학적 구조를 가지는 영역을 포함한다. 상기 일련의 채널들은 (동일한 샘플 및 시약들에 노출된 경우) 동일한 혈전 생성 특성을 유발할 수 있도록 각각 동일한 기하학적 구조를 가진다. 하나 이상의 응고 인자의 구배(gradient) 하에서 혈전 형성을 평가함으로써, 본 발명은 샘플에서 DOAC의 존재 유무 또는 활성을 포함한, 응고 이상(abnormalities) 또는 손상(impairments)의 민감하고 특이적인 탐지를 허용한다.
- [0016] [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 응고 탐지용 미세 유체 장치는 기관에 형성된 복수의 채널들을 포함하고, 여기서 각 채널은 혈전 형성을 유발(trigger) 및/또는 국소화(localize)하도록 구성되는 기하학적 구조를 가지는 혈전 형성 영역을 포함한다. 일부 실시예에 있어서, 상기 복수의 채널의 혈전 형성 영역들은 응고 특성들이 채널들에 걸쳐 동시에 이미지화되거나 분석될 수 있도록 기관의 중심 영역에 배열될 수 있다. 도 1A-1B, 2B 참조. 상기 장치는 샘플(예, 전혈 또는 혈장)을 수용하기 위하여 복수의 샘플 투입 포트를 추가로 포함할 수 있고, 각각의 샘플 투입 포트는 복수의 채널 중 하나의 제 1 단부에 연결된다. 도 1A-1D 참조. 다른 실시예에 있어서, 상기 장치는 상기 복수의 채널 또는 일련의 채널과 유체 연통(fluid communication)하는 단일 샘플 투입 포트를 가진다. 도 5A 참조. 일부 실시예에 있어서, 각각의 채널은 독립적인 방출 포트를 가지며, 각각의 방출 포트는 복수의 채널 중 하나의 제 2 단부에 연결된다. 독립적인 샘플 투입 포트들을 이용하는 실시예들에 있어서, 상기 투입 및 방출 포트들은 기관의 주변에 교대적 패턴(alternating pattern)으로 배열될 수 있다. 도 1A-1B, 2A 참조. 일부 실시예에 있어서, 상기 투입 및 방출 포트들은 교대적 패턴 이외의 패턴으로 배열될 수 있다.
- [0017] [0016] 본원에 사용된 용어 "중심 영역(central region)"은 상기 기관의 주변에 대해 기관의 중심에 위치하는 영역을 의미하며, 중심을 벗어난 지역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 구성에 따라, 상기 중심 영역은 중심을 벗어나 있을 수 있으며, 응고가 시작되는 상기 미세 유체 채널들의 영역은 상기 채널들의 흐름 패턴에 의해 조절될 수 있다.
- [0018] [0017] 일부 실시예에 있어서, 상기 복수의 채널의 혈전 형성 영역은 상기 주변과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 중심이 아닌 기관의 영역에 배치된다. 도 5A-5B 참조.
- [0019] [0018] 각각의 채널은 응고 인자(들) 및/또는 칼슘과 같은 시약을 수용하기 위한 하나 이상의 추가 투입 포트들을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 방출 포트 당 하나 이상의 투입 포트(예, 샘플 및 하나 이상의 시약 도입용)가 존재한다. 예를 들어, 일 실시예에 있어서, 상기 샘플에 대하여 1 개의 투입 포트가 그리고 상기 시약들(예, 응고 인자 및 선택적으로 칼슘)에 대하여 1 내지 2 개의 투입 포트가 존재할 수 있다. 참조 도 1B. 일부 실시예에 있어서, 상기 샘플에 대하여 1 개의 공통(common) 투입 포트가 존재하며, 각 채널은 상기 시약들에 대하여 추가의 투입 포트들(예, 1 또는 2 개)을 포함한다.
- [0020] [0019] 상기 미세 유체 장치에서, 각 혈전 형성 영역은 혈전의 형성을 유발 및/또는 국소화하기 위해 유체 흐름에서 정체(stasis) 또는 방해(disruption) 영역을 생성하도록 구성될 수 있다. 혈전의 형성 유발 및 국소화를 위한 예시적인 기하학적 구조들이 도 2B, 3A, 5A 및 5B에 도시되어 있다.
- [0021] [0020] 상기 미세 유체 장치의 채널들은 상이한 양 또는 농도의 응고 인자로 코팅되거나, 함유하거나 또는 포함

할 수 있다. 예를 들어, 제 1 그룹 또는 일련의 복수의 채널들은 제 1 응고 인자로 코팅되거나, 이를 함유하거나, 제 1 응고 인자를 포함할 수 있고, 제 2 그룹 또는 일련의 복수의 채널들은 제 2 응고 인자로 코팅되거나, 이를 함유하거나, 제 2 응고 인자를 포함할 수 있다. 또한, 일부 실시예에 있어서, 복수의 채널 중 하나는 음성 대조군 채널(negative control channel)이며, 예를 들어 코팅되지 않을 수 있으며, 응고 인자를 포함하지 않을 수 있다. 다른 실시예에 있어서, 상기 장치는 이러한 음성 대조군 채널을 포함하지 않는다.

[0022] [0021] 하나 이상의 채널이 응고 인자(들)를 포함하는 경우, 상기 응고 인자(들)는 현탁액 또는 용액에 있거나, 동결 건조되고, 표면 결합(surface-bound)되지 않을 수 있다. 상기 응고 인자(들)는 상기 채널(들)(예, 상기 장치를 제조 시)에 미리 포함할 수 있고, 상기 샘플을 상기 장치에 위치시키기 전에 첨가하거나, 또는 상기 샘플과 동시에 또는 상기 샘플 투입 후 투입 포트(또는 다수의 투입 포트들)를 통해 장치에 투입할 수 있다.

[0023] [0022] 상기 제 1 및 제 2 그룹의 채널들을 포함하는 상기 미세 유체 장치의 실시 예들에 있어서(이러한 실시예들이 상기 제 1 및 제 2 그룹의 채널들 외에 음성 대조군 채널을 추가로 포함하는지의 여부), 상기 제 1 그룹의 복수의 채널의 각 채널은 상이한 양 또는 농도로 제 1 응고 인자로 코팅되거나, 이를 함유하거나 또는 기타 방법으로 제 1 응고 인자를 포함할 수 있고, 상기 제 2 그룹의 복수의 채널의 각 채널은 상이한 양 또는 농도로 제 2 응고 인자로 코팅되거나, 이를 함유하거나 또는 기타 방법으로 제 2 응고 인자를 포함할 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 미세 유체 장치는 2 개 이상의 그룹 또는 계열(series)(예, 3 개, 4 개, 5 개 이상)의 복수의 채널을 포함할 수 있고, 여기서 각 그룹 또는 계열(series)의 복수의 채널은 그룹 또는 계열에 걸쳐 증가하는 양으로 상이한 응고 인자를 코팅하거나, 함유하거나 또는 기타 방법으로 포함한다 (예, 4 개 그룹의 채널을 포함하는 미세 유체 장치로서, 상기 각 그룹의 복수의 채널은 인자 IIa, Xa, XI, XIa, XII 및 XIIa로부터 선택된 상이한 응고 인자로 코팅되거나, 함유하거나 또는 기타 방법으로 포함할 수 있다). 응고 인자 구배(gradients)의 함수로서 혈전 형성 또는 응고 시간을 측정함으로써, 샘플의 응고 특성을 응고 경로(들)의 여러 특정 지점에서 프로파일링할 수 있으며(도 8에 예시됨), 이로 인해, 임상에게 환자의 응고 생리(clotting physiology) 및/또는 치료적 개입(therapeutic intervention) 상태에 관한 상세하고 구체적인 정보를 제공할 수 있다.

[0024] [0023] 상기 제 2 응고 인자는 상기 응고 단계에서 상기 제 1 응고 인자의 상류에 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 제 1 응고 인자는, 예를 들어, 프로트롬빈(인자 II), 트롬빈(인자 IIa) 또는 둘 모두일 수 있다. 상기 제 2 응고 인자는, 예를 들어, 인자 X, 인자 Xa 또는 둘 모두일 수 있다.

[0025] [0024] 상기 미세 유체 장치는 측정된 혈전 형성 시간들을 토대로 응고를 평가하기 위해, 상기 채널들의 각 채널에서 혈전 형성 시간을 측정하도록 구성된 탐지 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 탐지 장치는 혈전 형성 시간들을 측정하기 위해 혈전 형성 영역들을 동시에 이미징하도록 구성될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 채널들의 각 채널에서 혈전 형성의 정도는 고정된 시간 또는 시간들에서 정량화된다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법 및 장치들과 관련된 탐지 장치는 현미경 및 이미지 센서를 포함할 수 있다. 혈전 형성 영역들을 이미징하는 방법으로서 명시야(bright-field) 이미징을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 장치 및 분석 방법들과 관련하여, 응고 시간들은 흡광도, 형광 측정, 초음파 등을 토대로 한 탐지와 같은 다른 방법들로도 측정할 수 있으며, 상기 탐지 장치는 이들 다른 방법론들 중 하나 이상을 사용하도록 구성될 수 있다. 응고를 탐지하는 방법들은 하기 방법들을 포함하지만 이들에 국한되지는 않는다: 전기 임피던스(electrical impedance), 비드 추가(addition of beads) 및 비드 유량/수의 정량(quantifying bead flow rate/number), 혈전 형성 부위의 혈전 형성 이전 및/또는 이후의 유속 및/또는 압력 측정, 혈전탄성모사도(thromboelastography), 형광 탐지(예, 형광 피브리노겐), 탁도(turbidity), 자성(magnetic), 유동 역학(압력 또는 유속), 적외선 탐지, 적외선 분광법(infrared spectroscopy)을 이용한 탐지, 음향 및/또는 광자 센서(acoustic 및/또는 photonic sensors)를 이용한 탐지, 유세포 분석 및 육안에 의한 응고 탐지(visual clotting 탐지).

[0026] [0025] 일부 실시예에 있어서, 본원에 기재된 방법은 미세 유체 장치를 사용하지는 않지만, 혈전 형성을 유도 및 측정하기에 적합한 웰 또는 용기를 사용한다.

[0027] [0026] 혈전 형성 시간들에 더하여, 기타 혈전 형성의 특성들이 고려될 수 있다. 혈전 형성 시간 외에, 예를 들어, 응고에 가장 민감한 탐지 모드를 결정하기 위해, 혈전 형성의 정성적 측정이 유용할 수 있을 것으로 생각된다. 예를 들어, 혈전을 형성하기 위한 시간 이외에, 크기, 강도, 밀도 및 조성과 같은 혈전의 특성들이 평가될 수 있다. 이러한 특성들은 혈전 형성 시간들을 탐지하기 위해 사용된 것과 동일하거나 상이한 탐지 방식을 이용하여 평가할 수 있다.

[0028] [0027] 일부 실시예에 있어서, 혈전 형성과 더불어 혈전 용해를 평가할 수 있다. 예를 들어, 환자에게 섬유소

용해제(fibrinolytic agent) 또는 혈전 용해제(thrombolytic agent)를 투여하는 경우, 시간 경과에 따른 혈전 형성 및 혈전 파괴(breakdown)를 평가할 수 있다. 일 실시예에 있어서, 혈전 형성을 탐지하기 위해 본원에 기재되고 당업계에 공지된 방법과 동일한 방법을 사용하여 시간 경과에 따른 혈전 용해(clot lysis)를 평가할 수 있다.

[0029] [0028] 혈전탄성도사도(thromboelastography)(TEG)의 사용과 관련하여 본원에 기재된 바와 같이, 혈전 형성 및 섬유소 용해(fibrinolysis) 둘 모두를 평가할 수 있다. 이는 섬유소 용해 및 혈소판 용해 약물의 섬유소 용해 또는 의원성 투여(iatrogenic administration)로 인해 저응혈성(hypocoagulable) 환자에서 응고 이상(clotting abnormalities)을 탐지하는데 유용할 것이다. 참조(예: C. Mauffrey, 등, “Strategies for the management of haemorrhage following pelvic fractures and associated trauma-induced coagulopathy,” Bone Joint J. 2014; 96-B:1143-54), 이와 관련하여 교시된 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0030] [0029] 본원에 기재된 임의의 장치 및 방법에서, 상기 혈액 샘플은 전혈 샘플 또는 혈장 샘플일 수 있다. 전혈의 사용은 환자의 병상에서 구현되는 것과 같은 특정 응용 분야에 특히 유용할 수 있다.

[0031] [0030] 개시된 장치 및 방법들은 특히 포유동물(예, 비인간 포유동물 뿐 아니라 인간 환자와 같은 인간), 파충류, 새, 물고기 등을 포함한 모든 개체들에 적용될 수 있으며, 연구 및 수의학(veterinary medicine)에 유용할 수 있다. 예를 들어, 각 개체는 성숙한 개체(예, 성인) 또는 미성숙한 개체(예, 어린이, 유아, 신생아 또는 조산아)일 수 있다.

[0032] [0031] 개시된 장치 및 방법들은 진단 목적 뿐만 아니라 연구 환경에서 응고 캐스케이드(coagulation cascade)를 탐색하기 위한 연구 및 발견에도 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들은 기본적인 약물 발견, 질병 또는 장애 병리 생리학(disorder pathophysiology), 예를 들어, 출혈성 질환의 맥락(헤파티트 바이러스, 지카 바이러스, 에볼라 바이러스 등)을 이해하고 또한 실험적 치료의 부작용을 모니터링하는 데 유용할 수 있다.

[0033] [0032] 상기 개시된 장치 및 방법들은 환자의 치료를 가이드하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 의사들은 상기 결과를 이용하여 약물 및 절차적 개입(procedural interventions)(침습적(invasive) 및 비침습적(non-invasive) 개입 모두)에 대한 후속 치료를 결정할 수 있다. 예를 들어, 환자가 다비가트란(dabigatran) 투여로 인한 인자 IIa의 억제에 대해 양성 반응을 보이는 경우, 의료 제공자는 수술 또는 기타 침습적 과정 이전에 이 억제제에 대한 역전제(idarucizumab)를 투여하는 것을 선택할 수 있다. 마찬가지로, 상기 환자가 인자 Xa 억제에 대해 양성 반응을 보이는 경우, 의료 제공자는 적절한 역전제(응고 인자 Xa(재조합형), 비활성-zhzo)의 투여를 선택할 수 있다. 의료 제공자는 이들 억제제의 영향을 극복하는 다른 약제(예, 4-인자 프로트롬빈 복합체 농축물 또는 활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물)를 투여하는 것을 선택할 수도 있다.

[0034] [0033] 본 발명의 다른 양태 및 실시예들은 하기 도면 및 상세한 설명으로부터 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] [0034] 본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면이 포함된 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 이에 대한 요청 및 관련 비용을 납부 시 특허청에서 제공하게 된다.

[0035] 전술한 사항은, 첨부 도면에서 동일한 참조 부호가 상이한 도면 전체에 걸쳐 동일한 부분을 나타내도록 도시된 바와 같이, 이하의 예시적 실시예들에 대한 보다 구체적인 설명으로부터 명백하게 될 것이다. 도면은 꼭 축척대로 도시된 것은 아니며, 대신에 실시예들을 도시하는 경우 강조된다.

[0036] 도 1A-1D는 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 다수의 샘플 포트들을 사용하는 미세 유체 장치 레이아웃의 개략도를 도시하고 있다.

[0037] 도 2A 는 예시적인 실시예에 따른 원형 미세 유체 응고 장치의 평면도이다.

[0038] 도 2B는 도 2A의 상기 장치의 중앙부의 확대도이다. 도 2B는 혈전 형성 영역들의 예시적인 기하학적 구조들을 도시하고 있다.

[0039] 도 3A-3C는 예시적인 실시예에 따른 4 개의 채널을 갖는 미세 유체 장치 내에서 혈장 및 형광-표지된 피브리노겐을 사용한 혈전 탐지를 도시하고 있다. 도 3A는 상기 실시예 미세 유체 장치의 중심 영역에 대한 명시야(bright-field) 이미지 평면도이다. 도 3B는 도 3A의 상기 장치를 이용한 혈전 형성의 형광 이미지이다. 도 3C는 혈전 형성 영역의 확대도를 나타내는 형광 이미지이다.

[0040] 도 4A 및 4B는 예시적인 실시예에 따른 FXa 구배-gradient)를 사용하는 평행 미세 유체 채널 장치에서

전혈을 사용한 전혈 탐지를 도시하는 명시야(bright-field) 이미지들이다. 도 4A는 항응고제를 포함하지 않는다. 도 4B는 미분획 헤파린을 포함한다.

[0041] 도 5A 및 5B는 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 샘플 투입용 단일 포트를 사용하는 미세 유체 장치 구성들의 개략도들이다.

[0042] 도 6은 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 분석 또는 방법의 흐름도이다.

[0043] 도 7A는 FXa 구배를 사용한 리바록사반의 탐지를 도시한 실시예 데이터의 그래프이다.

[0044] 도 7B는 FXa 구배를 사용한 아픽사반의 탐지를 도시한 실시예 데이터의 그래프이다.

[0045] 도 7C는 FXa 구배를 사용한 에독사반의 탐지를 도시한 실시예 데이터의 그래프이다.

[0046] 도 7D는 FIIa 구배를 사용한 다비가트란의 탐지를 도시한 실시예 데이터의 그래프이다.

[0047] 도 8은 기본 응고 캐스케이드(clotting cascade)를 도시한 도면이다.

[0048] 도 9는 응고 인자 구배를 이용하여 FXa의 억제/결핍/기능 이상을 탐지하는 방법을 도시한 도면이다.

[0049] 도 10은 응고 인자 구배를 이용하여 FIIa의 억제/결핍/기능 이상을 탐지하는 방법을 도시한 도면이다.

[0050] 도 11은 응고 인자 구배를 이용하여 샘플에서 FIIa 억제 및 FXa 억제를 탐지하고 이들 사이의 차이점을 구별하는 방법을 도시한 도면이다.

[0051] 도 12는 응고 인자 구배를 이용하여 간접적인 FXa의 억제/결핍/기능 이상을 탐지하는 방법을 도시한 도면이다.

[0052] 도 13은 응고 인자 구배를 이용하여 샘플에서 FXIIa 억제 및 FXIa 억제를 탐지하고 이들 사이의 차이점을 구별하는 방법을 도시한 도면이다.

[0053] 도 14는 응고 인자 구배를 이용하여 다양한 유형의 혈우병을 탐지하고 이들 사이의 차이점을 구별하는 방법을 도시한 도면이다.

[0054] 도 15는 응고 인자 구배를 이용하여 피브리노겐 또는 FXIII 관련 문제점들(예, FXIII 결핍)을 탐지하는 방법을 도시한 도면이다.

[0055] 도 16A-16C는 다양한 농도에서 FXa 억제제 및 FIIa 억제제에 대한 응고 곡선 점수(Clotting Curve Scores; CCS)를 도시한 도면들이다.

[0056] 도 17은 환자 기술 통계(patient descriptive statistics)의 표 1을 도시한 도면이다(실시예 17).

[0057] 도 18A-18C는 프로트롬빈 시간(PT)의 민감도 및 특이도 측정 결과(도 18A)와 FXa 억제제(FXa-I) 항응고를 위한 국제 정상화 비율(international normalization ratio; INR)(도 18B)을 도시한 도면들이다.

[0058] 도 19A-19G는 예시적인 응고 시간 데이터 및 비교 응고 곡선을 도시한 도면들이다.

[0059] 도 20A-20E는 환자 샘플에서 FXa-I의 탐지를 위한 응고 곡선 점수(Clotting Curve Scores; CCS) 분석 및 CCS 활용 평가를 도시한 도면들이다.

[0060] 도 21A 및 21B는 예시적인 기능성 약물 농도 계산을 도시한 도면들이다.

[0061] 도 22는 출혈이 있거나 고위험 환자에 대한 현재의 의사 결정 패러다임을 도시한 도면이다.

[0062] 도 23은 출혈이 있거나 고위험 환자를 위한 본 발명의 실시예(들)를 이용하여 개선된 의사 결정(decision-making) 패러다임을 도시한 도면이다.

[0063] 도 24A 및 24B는 활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물(activated prothrombin complex concentrate; aPCC)의 첨가 후 FXa-1에 의한 FXa 억제의 감소에 대한 탐지를 도시한 도면들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036]

[0064] 본 발명은 일반적으로 혈장 및/또는 전혈에서 응고 이상 탐지 및 항응고제 및 혈소판 억제제의 탐지를 포함하는, 응고 탐지용 방법 및 장치들에 관한 것이다.

- [0037] [0065] 후천성 응고 장애(Acquired coagulopathies)는 많은 의학적 환경에서 이환률(morbidity) 및 사망률(mortality)의 주요 원인이다. 개인은 약물(예; 클로피도그렐, 헤파린, 와파린 또는 기타 비타민 K 길항제, 다비가트란 또는 기타 직접 경구용 항응고제(DOAC) 등), 외상, 수술, 패혈증, 암, 장기 기능 장애(예; 간) 또는 선천성 이상(예; 혈우병)에 따른 2차적 내부 출혈 위험이 증가될 수 있다. 다른 시각에서 보면, 응고에 대한 증가된 성향은 자가 면역 질환, 암, 죽상 동맥 경화증, 조기 외상 및 패혈증, 장기 기능 장애(예; 신장), 부동성(immobility), 염증, 이물질(예; 스텐트(stent) 또는 보철(prosthesis)) 또는 선천성 이상(congenital abnormality)(예; 인자 V 레이든 혈전성향증(Factor V Leiden thrombophilia))으로 인한 것일 수 있다. 최근의 약물 개발 혁신(예; 직접 경구용 항응고제(DOACs)를 포함한 항응고제)과 더불어, 이제는 긴급 치료 환경을 포함하여 환자들의 혜택을 충실히 실현하기 위하여 지혈/응고 분석기(hemostasis/coagulation analyzers)에 대한 혁신이 필요한 때가 되었다. 구체적으로, 환자의 출혈과 응고를 평가하기 위해 이용할 수 있는 현재의 임상 검사는 기초적 수준이며 매우 모호한 정보(예; 프로트롬빈 시간(PT) 및 활성화된 트롬보 플라스틴 시간(aPTT))을 제공하거나 또는 더 자세한 하지만 고가의 장비, 긴 훈련 기간 및 조심스런 취급(예; 혈전 탄성묘사도(TEG), 혈전 탄성 측정(TEM), 회전 혈전 탄성 측정(ROTEM), 혈소판 응집 측정(platelet aggregometry) 및 유세포 분석(flow cytometry) 등)이 요구된다. 현재 DOAC에 대한 특정 검사는 사용할 수 없는 상태다. 제시된 대부분의 DOAC 분석은 약물 자체의 절대 농도를 측정하는 약동학적 분석이므로 따라서 임상상의 결정을 위한 제한된 기능 정보만을 제공하고 있는 형편이다.
- [0038] [0066] DOAC의 사용이 증가함에 따라, 연구 및 검토 결과에 따르면, 이들 신약은 생명을 위협하는 급성 출혈 사건에 대한 위험은 적긴 하지만, 잠재적으로 높은 위장관 출혈률과 관련이 있다. 또한, 노령층에서 일반적으로 나타나는 바와 같이, 이들 신약은 간 및/또는 신장 기능이 저하된 환자 또는 여러 약물을 동시에 복용하는 환자들에 있어서 그 약동학적 특성이 다른 것으로 밝혀졌다. 이러한 경우에 있어서, 항응고제의 조합 및 복용량을 개인적으로 적용하는 데 도움이 되도록 기능적 임상 정보를 의사에게 제공하면, 해당 환자에게 큰 도움이 될 뿐만 아니라 가능하게는 이후의 관련 부작용들을 감소시키는 데 큰 도움이 될 것이다. 본 발명의 실시예들은 개체 내에서 응고, 섬유소 분해(fibrinolysis) 및 혈소판 기능을 평가하는 응고 패널(clotting panels)에 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서 본원에 기재된 미세 유체 기술 및 진보된 분석은 임상상이 환자의 응고 기능 침상(coagulation function bedside)을 결정할 수 있도록 맞춤형 응고 패널(custom clotting panels)을 제공한다. 이들 실시예들은 환자 치료에 있어서 긴급 치료 환경을 포함한 광범위한 개선을 제공한다.
- [0039] [0067] 이러한 분석법들은 빠르고 해석이 용이할 뿐 아니라, 또한 맞춤형일 수 있으므로, 각 고객 및/또는 최종 사용자 세그먼트에 대해 임상 관련 응고 및 혈소판 기능 검사의 선택을 가능하게 한다. 상기 분석법의 실시예들은 침상 플랫폼(bedside platform)에 적용될 수 있기 때문에, 다양한 치료를 받는 환자들(병원, 항응고 클리닉 및 가정 포함)의 경향을 모니터링하는 데 이용될 수도 있다. 본 발명의 한 양태에서, 상기 인자(들)의 구매는, 복수의 채널, 웰, 또는 용기의 다수 그룹으로 세분화 및/또는 분배된 후 샘플에 추가되며, 상기 방법은 응고 기능/억제 평가 및 샘플 내 다양한 응고 이상의 식별(identification) 및 구별(differentiation)을 가능하게 한다. 이는 본 발명의 실시예들(예, 응고 패널, 분석법 등)이 복용량/시간을 알 수 없는 의학적 순응도가 열악한 환자들, 또는 의사, 외과 의사 또는 기타 의료 제공자가 이들의 환자의 시스템에 이러한 약물들 중 어느 한 약물이라도 투여되고 있는지 여부를 알아야 하는 무의식 상태의 환자들의 응고를 평가하는데 잠재적으로 유용하다는 것을 의미한다. 또한, 실시예들은 항응고를 모니터링하고 현재 사용 가능한 역전 시약(reversal reagents)의 투여를 가이드하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0040] [0068] 본 발명의 실시예들에 기초한 제품 또는 서비스의 잠재적 사용자들은, 예를 들면, 의료 종사자들(예; 임상의 및 수의사)에서 제약 연구 및 개발 연구원들을 포함할 수 있다.
- [0041] [0069] 본 발명은 다양한 환경에서 환자 치료에 적용될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 환자가 수술이 예정되어 있거나 침습적 절차(invasive procedure)가 필요한 경우, 본 발명의 방법 및 장치들은 출혈의 위험을 최소화하기 위하여 환자를 준비시키는 절차를 포함한 임상 의사 결정(clinical decision-making)에 사용될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 환자가 응고에 영향을 미치는 약물을 투여받는 경우, 본 발명의 방법 및 장치들은 약물 작용의 조기 평가 및 적절한 치료법 및 투여 용량의 선택에 사용될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 환자가 약물 또는 혈액 제제를 투여받는 경우, 본 발명의 방법 및 장치들은 투여 및 투여 용량을 가이드하는데 사용될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자는 출혈성 바이러스에 이미 감염되어 있거나 출혈성 바이러스 감염 위험이 의심된다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자가 신생아일 경우 (항응고제 요법 시행 또는 선천성 응고 이상 탐지를 포함한) 혈액 응고 평가에 단지 소량의 혈액만 제공된다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자가 임신부일 경우, 상기 방법 및 장치들은 선천성 응고 이상을 탐지하거나 전자간증(pre-eclampsia) 및 자간증(eclampsia)과

같은 응고 이상을 초래하는 증상(condition)의 조기 진단을 할 수 있다.

- [0042] [0070] 일부 실시예에 있어서, 상기 환자 또는 대상체는 수의과 또는 동물 환자 (예; 개, 고양이 또는 말)일 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자는 사람이 아닌 포유동물일 수 있다. 수의과 환자 및 실험실 동물 연구에 있어서는, 제한된 비용 및 제한된 혈액량으로 인해, 사용이 용이하고 단지 마이크로 리터 수준의 혈액만으로 가능하며 간접 비용(overhead costs)이 보다 낮은 응고 진단법이 매우 필요하다.
- [0043] [0071] 본원에 기재된 신규한 응고 검사 플랫폼 및 혈액 검사 플랫폼(예; 분석, 미세 유체 장치 및/또는 이들의 조합)에 대한 지대한 관심은 연구 및 제품 개발을 위한 엄청난 잠재력을 제공한다
- [0044] [0072] 일부 실시예에 있어서, 상기 환자는 헤파린 또는 비타민 K 길항제(예를 들어, 와파린(warfarin))와 같은 항응고제 요법을 받고 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자는 XARELTO(리바록사반), ELIQUIS(아픽사반), SAVAYSA(에독사반), PRADAXA(다비가트란) 또는 BEVYXXA(베트릭사반)와 같은 직접 경구용 항응고제 (DOAC)로 치료를 받는다. 상기 환자는 조직 인자 경로 억제제(TFPI)에 대한 항체로 치료를 받는다. 항응고제 약물은 응급 및 중환자 치료, 수술, 심장질환 및 암을 포함한 많은 의료 환경에서 일반적으로 사용된다. 몇몇 신규 항응고제가 도입되었지만, 환자가 올바른 복용량을 투여받고 있는지 여부를 확인할 수 있는 신뢰성있는 검사 방법은 현재로서는 없는 상태다. 과도한 항응고는 생명을 위협하는 출혈을 유발할 수 있고 항응고가 너무 적으면 뇌졸중 및 심장 마비의 위험이 커질 수 있다. 본 발명의 실시예들은 이들 신규 항응고제들을 정확하게 모니터링하고 이들 환자의 안전성을 향상시킬 수 있는 병상 검사로 사용되거나 그와 병용될 수 있다. 이 검사는 최소한의 교육을 통해 쉽게 이해할 수 있는 형식으로 수행할 수 있다. 일 실시예에서, 이러한 분석은 실험실에서 약 1 mL 미만, 또는 약 500 μ L 미만, 또는 약 100 μ L 미만, 또는 약 50 μ L 미만(1 방울)의 신선하거나 또는 스트로산(citrated) 전혈을 필요로 하는 장치에서 수행될 수 있으며, 검사 결과는 10 분 이내에 판독될 수 있다.
- [0045] [0073] 현재 직접 경구용 항응고제(DOAC) 시장은 응고 경로 내의 특정 인자(예; 인자 IIa 또는 인자 Xa)를 선택적으로 표적화하는 약물로 구성된다. 이러한 약물들은 매우 강력하지만 신뢰할 수 있거나 사용이 용이한 진단 및 모니터링 검사가 부족하기 때문에 이러한 약물의 사용 및 투여와 관련된 위험(특히 위중한 치료 환경에서)이 높아진다. DOAC 사용의 주요 위험 중 하나는 위장관 출혈이다. 이러한 부작용은 이환율(morbidity)과 사망률(mortality)을 초래할뿐 아니라 의료 비용을 증가시키고 입원 시간을 연장시키게 된다.
- [0046] [0074] 일부 실시예에 있어서, 상기 방법은 결정된 혈전 형성 시간을 (예를 들어, 응고 캐스케이드 이상(coagulation cascade abnormality)을 겪지 않는 개인의) 응고 인자-특이적 혈전 형성 기준 범위와 비교함으로써 혈액 샘플에서 응고 이상을 탐지하고 응고 캐스케이드 내에서 발생하는 위치를 정확히 찾아내는 것을 포함한다. 일부 실시예에 있어서, 상기 기준 범위는 정상적인 대상체 또는 대상체들, 예를 들어, 응고 이상을 겪지 않는 개체들에 대한 기준법을 사용하여 설정할 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 기준 범위는 검사 혈액 샘플을 얻게 되는 개체와 동일한 개체를 토대로 확립될 수 있다. 예를 들어, 상기 기준 범위는 한 개체의 의학적 치료를 개시하기 전에 설정될 수 있으며, 검사 샘플은 치료의 개시 후 동일한 개체로부터 획득할 수 있다. 상기 샘플은 또한 상기 검사 샘플을 획득하는 개체의 친척(예를 들어, 부모, 형제 또는 자손)으로부터 획득할 수도 있다. 상기 기준 범위는 미세 유체 장치 구성을 포함 특정 분석 구성(assay configuration)에 맞추어 설정되거나 이에 의존될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 각 대상체의 응고는 검사 시간의 "정상" 대조군(control) 또는 특정 응고 인자 또는 이들 인자의 조합에 대한 이전에 결정된 "정상" 참조 범위와 비교할 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 분석 접근법은 기준 범위들의 확립 및/또는 검증 필요로 한다.
- [0047] [0075] 일부 실시예에 있어서, 참조 범위들은 응고 캐스케이드 이상을 겪지 않는 개체와 같은 특정 응고 캐스케이드 이상의 대조군들(controls) 또는 표준치(standards)로부터 온 것이다. 일부 실시예에 있어서, 상기 기준 범위들은 스파이크되거나(spiked) 고갈된 샘플들/대조군들(controls)에서 비롯되며 시중에서 구할 수 있다.
- [0048] [0076] 응고 이상으로 고통받는 사람의 혈전 형성 시간들을 기준 범위와 비교할 수도 있다는 점을 이해해야 한다. 예를 들어, 비정상적으로 고통받지 않는 사람들이 "정상" 간격 범위를 갖게 되고, 상기 이상을 갖고 있는 사람들이 "비정상" 간격 범위를 갖는 것이 일반적이다. 때로는 정상 및 비정상 영역 사이에 회색 영역(gray zone)이 있으며, 이는 명확한 진단을 위해 해당 환자 샘플에 대한 심층 검사가 추가로 수행되어야 함을 의미한다.
- [0049] [0077] 일부 실시예에 있어서, 본 발명은 기준 범위 또는 표준치와의 비교를 필요로하지 않으며, 대신에 상기 응고 경로(들)에서 의심되는 억제 지점(point of inhibition)의 상류 및 하류를 평가함으로써 내부 대조군(controls)을 제공한다.

- [0050] [0078] 이하, 예시적 실시예들을 기재한다.
- [0051] [0079] 본원에 기재된 실시예들은 전혈 또는 혈장에 있는 항응고제 및 혈소판 억제제들을 탐지하고 환자 응고 상태를 평가하기 위하여 신속한 분석법들(예를 들어, 일부 실시예에 있어서 <30 분, <20 분, <15 분 또는 <10 분)을 포함한다. 이들 맞춤형 응고 패널(customizable coagulation panels)의 가용성은 신속히 병상 진단(bedside diagnostics) 및 약물 모니터링 기능(capabilities)을 제공함으로써 다양한 응고 검사 환경 내에서 미충족된 요구를 충족시킨다.
- [0052] [0080] 일 실시예에서, 상기 방법은 억제될 것으로 의심되는 특정 응고 인자가 다양한 농도 또는 양으로 혈액 샘플(예를 들어, 전혈 또는 혈장 샘플)에 첨가되는 분석법을 포함한다. 예를 들어, 상기 응고 인자는 2 배에서 100 배까지 변하는 양으로 샘플의 분할된 부분들에 첨가될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 응고 인자는 분할된 부분들에 걸쳐 5 배 내지 20 배의 인자(예를 들어, 약 10 배의 인자)만큼 증가하는 농도로 샘플의 분할된 부분들에 첨가된다. 일부 실시예에 있어서, 상기 샘플의 상기 분할된 부분들에 첨가된 응고 인자의 농도는 0.1 ng/mL 내지 10 µg/mL의 범위일 수 있다. 특정 농도 또는 양으로 응고 인자를 첨가하면(예를 들어, 구배 또는 농도가 상이한 다수의 샘플) 하기 사항을 결정할 수 있다:
- [0053] a) 응고 캐스케이드의 상기 특정 지점에서 특정 이상의 존재 여부(예; 항응고제를 통한 약물 유도, 자가 면역 또는 혈우병과 같은 유전적 이상); 및
- [0054] b) 응고 캐스케이드의 상기 특정 지점에서 응고 기능의 억제 여부
- [0055] [0081] 상기 분석법의 유용성의 예는 하기와 같다:
- [0056] a) 인자 IIa(트롬빈) 억제제의 탐지 및 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위; 예; 도 7D, 10, 11, 16 참조)에서 인자 IIa의 첨가를 통한 인자 IIa 억제의 평가.
- [0057] b) 인자 Xa 억제제의 탐지 및 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위; 예; 도 3, 4A, 7A-7C, 9, 11, 16, 19-21 참조)에서 인자 Xa의 첨가를 통한 인자 Xa 억제의 평가.
- [0058] c) 인자 XI 또는 XIa 억제제의 탐지 및 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위; 예; 도 13 참조)에서 인자 XI 또는 XIa 및/또는 X 또는 Xa의 첨가를 통한 인자 XI 또는 XIa 억제의 평가.
- [0059] d) 인자 XII 또는 XIIa 억제제의 탐지 및 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위; 예; 도 13 참조)에서 인자 XII 또는 XIIa 및/또는 XI 또는 XIa 및/또는 X 또는 Xa의 첨가를 통한 인자 XII or XIIa 억제의 평가.
- [0060] e) 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위; 예; 도 4B 및 12 참조)에서 인자 IIa, Xa, 또는 이들의 조합을 첨가함으로써 (분획되거나, 저분자량, 또는 기타)헤파린을 포함하는 모든 유형의 항응고제 탐지.
- [0061] f) 응고 인자들을 다양한 농도(예; 10 µg/mL 내지 10 pg/mL 범위)에서 첨가함으로써 조직 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator; tPA))를 포함하나 이에 제한되지 않는 섬유소 용해제(fibrinolytics)를 탐지 및 평가.
- [0062] g) 하기를 포함한 억제되거나(inhibited)/비정상이거나(abnormal)/결손된(absent) 인자를 첨가함으로써 기타 응고 이상을 탐지:
- [0063] i. 피브리린 첨가를 통하여 무섬유소원혈증(Afibrinogenemia)/이상섬유소원혈증(dysfibrinogenemia) 탐지
- [0064] ii. 인자 V 및/또는 Va의 첨가를 통한 인자 V 결핍 탐지
- [0065] iii. 인자 VIII 및/또는 VIIIa, 인자 IX 및/또는 IXa의 첨가를 통한 혈우병 A 또는 B 탐지
- [0066] iv. 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자의 첨가를 통한 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자 질환 탐지
- [0067] v. 인자 II/VII/IX/X 및/또는 IIa/VIIa/IXa/Xa의 첨가를 통한 비타민 K-의존성 이상(와파린(warfarin), 비타민 K 결핍, 간부전(liver failure)) 탐지.
- [0068] vi. ATIII의 첨가를 통한 안티트롬빈 결핍(신장 질환) 탐지. 예; 도 9-13 참조.
- [0069] [0082] 본원에 기재된 방법 및 장치들의 실시예들은 하기 방법들을 포함한 본원에 기재된 다양한 응고 기술을 사용하여 응고 이상(예를 들어, 혈전성향성(prothrombotic) 또는 항혈전성(anti-thrombotic))을 평가할 수 있다: 전기 임피던스(electrical impedance), 비드 추가(addition of beads) 및 비드 유량/수의 정량(quantifying bead flow rate/number), 혈전 형성 부위의 혈전 형성 이전 및/또는 이후의 유속 및/또는 압력

측정, 혈전탄성모사도(thromboelastography), 형광 탐지(예, 형광 피브리노젠), 탁도(turbidity), 자성(magnetic), 유동 역학(압력 또는 유속), 적외선 탐지, 적외선 분광법(infrared spectroscopy)을 이용한 탐지, 음향 및/또는 광자 센서를 이용한 탐지, 유세포 분석 및 육안에 의한 응고 탐지(visual clotting 탐지).

[0070] [0083] 전혈 및 혈장은 다양한 실시예에서 사용될 수 있다.

[0071] [0084] 혈소판 및 응고 시스템 기능을 동시에 측정하기 위해 상기 분석 실시예들을 ATP-루시페라제 분석과 병합할 수 있다. 이로 인해, 충분한 활성화 시 혈소판의 탈과립화(degranulation)를 통해 혈소판 기능뿐 아니라 응고 캐스케이드의 평가를 제공할 수 있다. 혈소판의 활성화는 본원에 나열된 응고 인자들의 첨가 또는 특정 혈소판 작용제(예; 아데노신 디포스페이트(ADP), 아데노신 트리포스페이트(ATP), 에피네프린, 콜라겐, 트롬빈 및 리스토세틴(riostocetin))의 첨가를 통해 성취할 수 있다. 이러한 병합 기술은 환자가 아스피린 또는 클로피도그렐과 같은 혈소판 억제제를 복용하고 있을 경우에 혈소판 기능을 평가하는 데 사용할 수 있다. 이들 작용제는 응고 인자들과 함께 농도 구배로 첨가될 수 있다. 루시페라제는 통상적으로 흡광도에 의해 측정된다.

[0072] [0085] 탐지되거나 분석될 수있는 응고 이상은 선천성(congenital) 또는 유전성(hereditary) 응고 병증 및 후천성(acquired) 응고 병증(coagulopathies)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0073] [0086] 선천성 또는 유전성 응고 병증에는 후천성 돌연변이 및 유전성(hereditary) 응고 병증, 즉 부모로부터 유전된 유전성 응고 병증이 포함된다.

[0074] [0087] 선천성 응고 병증은 출생 시 존재하며 자궁에서(in utero) 발생하는 발달 이상에 기인한 것으로 추정된다. 선천성 응고 병증은 유전성이거나 유전성이 아닐 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 환자는, 상기 응고 인자 생산의 부족에 의하거나 상기 응고 인자가 상기 응고 인자의 기능을 저하시키는 돌연변이를 가진 유전자에 의해 암호화되는 경우 초래되는 응고 인자 결핍증을 갖고 있거나 갖고 있을 것으로 의심될 수 있다.

[0075] [0088] 선천성 및 유전성 응고 병증의 예로서 하기 병증을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다:

[0076] a) 혈우병 A(인자 VIII 결핍)

[0077] b) 혈우병 B(인자 IX 결핍)

[0078] c) 혈우병 C(인자 XI 결핍)

[0079] d) 인자 I(피브리노젠) 결핍

[0080] e) 인자 V 결핍

[0081] f) 인자 VII 결핍

[0082] g) 인자 X 결핍

[0083] h) 인자 XIII 결핍

[0084] i) 알파2-안티트립신 결핍

[0085] j) 알파1-안티트립신 피츠버그(안티트롬빈 III 피츠버그) 결핍

[0086] k) 조합 인자 결핍(예; 인자 V 및 VIII, 인자 II, VII, IX, 및 X)

[0087] l) 혈소판 이상(예; 회색 혈소판 증후군, Bernard-Soulier 증후군, 폰빌레브란트(von Willebrand) 질병, Glanzmann 혈전증, Hermansky-Pudlak 증후군, 클로피도그렐 또는 아스피린 내성).

[0088] [0089] 후천성 응고 병증의 원인은 장기(예; 간) 기능 장애 또는 부전(failure), 골수 기능 장애 또는 부전(failure), 외상(예; 자동차 사고), 수술, 감염(예; 플라 비 바이러스(flavivirus), 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome), 패혈증(sepsis) 등), 암, 부동성(immobility), 약물(예; 항생제, 항응고제, 섬유소 용해제(fibrinolytics), 혈전 용해제(thrombolytics), 화학 요법, 액체(fluids) 등), 기능성 식품(neutraceuticals)/제약, 독성, envenomation(독액 주입)(예; 뱀, 거미 등), 식품, 자가 면역 질환(1 차, 후천성(acquired) 또는 특발성(idiopathic)), 임플란트(예; 수술), 심혈관 질환(예; 뇌졸중, 심장 마비 등 신체의 임의 부위에서 혈전, 혈관염(vasculitis), 수혈(예; 전혈, 농축 적혈구(packed red blood cells), 혈장, 혈소판 등), 이식(예; 골수, 신장, 간 등), 임신(자간전증(pre-eclampsia), 자간증(eclampsia), 당뇨병 등), 내분비 질환(예; 갈색 세포종(pheochromocytoma), 쿠싱증(cushings), 당뇨병 등), 만성 염증성 질환(예; 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome), 과민성 장 질환(irritable bowel disease), 대장염(colitis) 등), 과중

성 혈관 내 응고(disseminated intravascular coagulation) 및 감염.

- [0089] [0090] 응고 병증은 또한 의원성(iatrogenic)(예를 들어, 의학적 치료에 의해 야기)이거나 특발성(idiopathic) 원인(예를 들어, 화학 요법과 같은 암 치료 또는 골수 이식)일 수 있다.
- [0090] [0091] 일부 실시예에 있어서, 본 발명은 미세 유체 접근법을 사용한다. 미세 유체 장치는 기관에 일련의 채널을 포함하고, 각 채널은 혈전의 형성을 유발 및/또는 국소화하기 위한 기하학적 구조를 갖는 영역을 가지며, (외인적으로(exogenously) 첨가된 응고 인자의 양 또는 농도와 같은) 하나 이상의 시약에 대한 반응으로 혈전 형성의 평가를 가능케 한다. 각 계열(series)의 각 채널은 (동일한 샘플 및 시약에 노출 시) 동일한 혈전 형성 특성을 유발(trigger)하기 위하여 동일한 기하학적 구조를 가진다. 하나 이상의 응고 인자들의 구배가 존재하는 곳에서 혈전 형성을 평가함으로써, 상기한 바와 같이, 본 발명은 응고 이상(coagulation abnormalities) 또는 손상(impairments)을 민감하고 특이적으로 탐지할 수 있게 한다.
- [0091] [0092] 미세 유체 장치를 사용하는 실시예에서는 하기 절차를 포함할 수 있다:
- [0092] a) 환자로부터 샘플을 수득한다;
- [0093] b) (미세 유체 장치에 또는 미세 유체 장치 내부에 투입 전) 하나 이상의 작용제(특정 인자(들))를 본원에 기재된 바와 같이 상기 환자 샘플에 첨가하고, 상기 미세 유체 장치에서 각 작용제를 일련의 채널에 걸쳐 농도를 증가시킨다;
- [0094] c) 상기 샘플이 항응고제(예; 시트르산 나트륨 또는 시트르산 텍스트로스)에 수집되면, +/- 칼슘을 첨가한다;
- [0095] d) 그런 다음, 상기 샘플을 상기 미세 유체 장치를 통해 흐르게 하여 여기서 채널 내의 위치에서 혈전 형성을 유발시킨다;
- [0096] e) 응고 소요 시간(time to clot)을 측정하고 해당 위치에서 정량화 후 기록한다;
- [0097] f) 동일한 작용제를 다수의 농도로 (개별 채널들 내부의) 분취된 샘플에 첨가하여 응고 캐스케이드 이상의 존재 여부 및 농도를 결정할 수 있다; 농도는, 예를 들어, 약 0.75 ng/mL 내지 약 750 ng/mL의 범위일 수 있다;
- [0098] g) 상기 (개별 채널들 내부의) 분취된 샘플에 다수의 인자를 추가하여 비정상적으로 기능하는 상기 응고 캐스케이드의 해당 부분을 식별한다. 상류 및 하류 인자를 이용(예; 직접 경구용 항응고제(DOACs)를 식별함에 있어서 인자 IIa 및 Xa의 사용)함으로써, 정상적인 응고가 회복되는 지점을 식별할 수 있다. 다른 예시적 실시예는 이상섬유소원혈증(dysfibrinogenemia) 또는 무섬유소원혈증 (afibrinogenemia)의 식별에 대한 것이다: 전혈 샘플을 사용 시 음성 대조군 레인에서 응고 시간을 연장할 수 있다(작용제가 무첨가); 응고 인자들(예; 인자 IIa 및 Xa)을 첨가해도 정상적인 응고 시간이 회복되지 않는 반면, 피브리노겐을 샘플에 첨가 시 이러한 결손(missing)/비정상적(abnormal) 인자가 상기 장치에서 교체되기 때문에 응고 시간이 회복된다.
- [0099] [0093] 응고 탐지용 미세 유체 장치는 기관에 형성된 복수의 채널을 포함할 수 있으며, 각 채널은 혈전 형성을 유발 및/또는 국소화하도록 구성된 기하학적 구조를 갖는 혈전 형성 영역을 포함한다. 일부 실시예에 있어서, 상기 복수의 채널의 혈전 형성 영역들은 상기 기관의 중심 영역에 배열된다. 일부 실시예에 있어서, 상기 장치는 복수의 샘플 투입 포트들을 추가로 포함하고, 각 샘플 투입 포트는 상기 복수의 채널 중 하나의 채널의 제 1 단부에 연결된다. 일부 실시예에 있어서, 상기 장치는 복수의 방출 포트를 포함하고, 각 방출 포트는 상기 복수의 채널 중 하나의 채널의 제 2 단부에 연결된다. 상기 입력 및 방출 포트들은 상기 기관의 주변에 교번 패턴으로 배열될 수 있다. 일부 실시예에 있어서, 상기 장치는 모든 채널 또는 일련의 채널과 유체 연통(fluid connection)되는 공통(common) 샘플 투입 포트를 포함한다.
- [0100] [0094] 기관은 예를 들어 임의의 유형의 플라스틱, 폴리디메틸실록산(PDMS), 실리콘, 유리, 또는 다른 물질 또는 물질의 조합일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 장치는 유리에 결합된 기관을 포함하지만, 유리상의 유리, PDMS상의 PDMS, 실리콘, 임의의 유형의 플라스틱, 또는 이들의 조합과 같은 다른 기관이 사용될 수 있다. 일 실시예에 있어서, 상기 기관은 플라스틱이다. 기관은 혈전 형성의 탐지(예, 이미징과 비교하여)를 도모하기 위하여 투명할 수 있지만 반드시 투명해야 하는 것은 아니다.
- [0101] [0095] 상기 장치는 직경이 약 50 μm , 높이가 약 11 μm , 길이가 100+ μm 인 미세 유체 채널들을 포함할 수 있다. 다른 채널 치수가 사용될 수도 있다.
- [0102] [0096] 상기 투입을 위해 각 채널마다 하나의 입구와 하나의 출구가 마련될 수 있다. 대안으로서, 상기 장치에는 모든 채널 또는 하나 이상의 그룹(또는 계열(seried))의 채널에 단일 샘플 포트를 마련될 수 있다.

- [0103] [0097] 다양한 실시예에 있어서, 상기 장치에 투입하기 전에 작용제(예; 응고 인자)를 상기 샘플에 첨가하거나, 상기 장치에 작용제를 코팅하거나 또는 샘플의 로딩 전에 장치 내에 미리 로딩한다. 하나 이상의 채널이 상기 응고 인자(들)을 포함하는 경우, 상기 응고 인자(들)는 현탁액, 용액에 존치되거나 또는 동결 건조될 수 있고 표면 결합(surface-bound)되거나 표면 결합되지 않을 수 있다. 상기 응고 인자(들)는 (예를 들어, 장치를 제조 시) 채널(들)에 미리 포함될 수 있고, 상기 샘플을 상기 장치에 넣기 전에 첨가되거나, 또는 상기 샘플과 동시에 또는 상기 샘플의 투입 이후에 투입 포트(또는 복수의 투입 포트들)를 통해 상기 장치에 투입될 수 있다.
- [0104] [0098] 일 실시예에서, 칼슘은 상기 장치에 투입하기 전에 상기 샘플에 추가된다. 칼슘은 상기 장치 내에서 추가 포트를 통해 첨가되거나 상기 채널 내에 사전에 로딩될 수 있다.
- [0105] [0099] 일 실시예에서, 488-컨쥬게이트된(conjugated) 피브리노겐을 상기 샘플에 첨가하여 피브리노겐의 가교 결합 탐지를 통하여 혈전 형성 소요 시간을 탐지한다.
- [0106] [00100] 명시야(bright-field)에서, 상기 피브린의 가교를 시각화하고 상기 미세 유체 채널을 통한 상기 샘플의 흐름을 정지시킴으로써 혈전 형성을 탐지할 수 있으며, 상기 탐지는 응고와 무관한 물질을 씻어 내기 위해 추가 세척 단계와 함께 또는 세척 단계 없이 수행될 수 있다.
- [0107] [00101] 일 실시예에서, 상기 샘플은 모세관 작용을 통해 상기 장치 또는 미세 유체 카트리지에 로딩된다. 상기 샘플은 또한 예를 들어 진공, 주사기 펌프 또는 기타 적절한 수단(일부 실시예에 있어서는 중력)을 사용하여 채널을 통해 강제로 흐르게 할 수 있다. 상기 샘플은 상기 미세 유체 장치의 표면(예; 기관) 특성을 친수성(hydrophilic)으로 만드는 것과 같은 변경하는 코팅을 사용하여 모세관 작용 또는 흐름에 의해 로딩하도록 권장할 수도 있다.
- [0108] [00102] 일 실시예에서, 상기 미세 유체 채널(들)의 설계는, 혈액 또는 피브린 응고의 형성을 유발 및/또는 국소화하기 위한 흐름 분리 및 정체(stasis)의 한 영역을 만들기 위해, (상이한 각도의 굽힘(bending) 및/또는 직경을 포함하는) 변경된 기하학적 구조의 한 영역을 포함한다. 상기 혈전 형성 소요 시간을 정량화하고 기록할 수 있다.
- [0109] [00103] 일 실시예에서, 상기 장치는 혈전 형성 소요 시간을 평가함으로써, 항응고제(예; 혈전 형성 소요 시간을 평가하여 FXa 억제제, FIIa 억제제, 헤파린 및 비타민 K 길항제(예; 와파린(warfarin))를 탐지하고 그 효과를 평가하는 데 사용된다.
- [0110] [00104] 상기 측정된 혈전 형성 시간은 상기 샘플 내의 항응고제의 결과인 응고 억제제의 양과 관련이 있다. 상기 과정은 섬유소 용해 약물(fibrinolytic drug)에도 적용될 수 있다. 상기 과정은 또한 본원에 기재된 바와 같이 비정상 응고 시간의 후천성(acquired) 또는 선천성(congenital) 원인을 포함한 기타 병리에도 적용될 수 있다.
- [0111] [00105] 일 실시예에서, 상기 장치는 비교적 짧은 시간, 예를 들어 약 3-10 분 그리고 특정 실시예에서는 약 5 분 내에 판독이 가능하다.
- [0112] [00106] 예시적인 미세 유체 장치 및 분석방법들은 하기에 기재하였고 또한 도면에 도시되어 있다.
- [0113] **실시예**
- [0114] [00107] 실시예 1
- [0115] [00108] 도 1A-1D는 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 미세 유체 장치의 개략도를 도시하고 있다.
- [0116] [00109] 도 1A는 기관(15)에 하나 이상의 연속적인 미세 유체 채널들(예; 마이크로 채널들)(20)을 갖는 미세 유체 장치(10)의 원형 레이아웃(중심점을 가지는 임의의 대칭 다각형일 수도 있음)의 평면도로서, 각 채널은 하나의 투입구(투입 포트)(30) 및 하나의 방출구(방출 포트)(35)에 연결된다. 상기 채널의 일부분, 예를 들어, 상기 채널의 중심은 혈전 생성의 촉진을 위한 샘플 흐름의 분리(separation) 또는 방해(disruption), 또는 샘플 흐름의 정체(stasis)를 유도하기 위하여 고유한 형상 (예를 들어, 혈전 형성/국소화 영역(25))을 가질 수 있다. 사용되는 특정 분석법에 따라 상기 단일 장치에 이러한 미세 유체 채널이 둘 이상 마련될 수 있다. 본 설계는 3 개 이상의 샘플(예; 최대 10 개의 샘플 또는 10 개 이상의 샘플)과 같은 다수의 샘플을 동시에 평가할 수 있게 되어 있다. 통상적으로 각 샘플(또는 샘플의 각 분취량(aliquot))에는 별도의 채널이 필요하다. 도 1A에는, 4 개의 채널이 도시되어 있으며, 각 채널은 상기 미세 유체 장치 상에 근접 위치한(예를 들어, 상기 미세 유체 장치의 중심 영역에 위치한) 혈전 형성/국소화 영역(25)을 가진다. 상기 샘플은 수동이나 또는 전자 디스펜서에 의해 주입구를 통해 상기 장치에 투입될 수 있으며, 마치 상기 미세 유체 채널이 친수성 물질로 코팅되거나 만

들어진 것처럼, 인가된 압력/진공, 모세관 작용 또는 화학적 상호 작용에 의해 상기 미세 유체 채널을 통과하게 된다. 본 예시적인 환경에서, 작용제들 +/- 칼슘 +/- 혈전 탐지 시약들은 상기 메인 투입구(main inlet)에 첨가되거나, 상기 샘플에 미리 혼합되거나, 상기 투입구 또는 상기 미세 유체 채널에 코팅되어야 한다. (본원에서 사용된 용어 "+/-"는 "포함하거나 포함하지 않는"을 의미한다.) 모든 혈전 형성/국소화 영역들은, 예를 들어 2X-10X 범위의 배율로, 하나의 단일 이미징 필드(혈전 형성 영역들 25를 포함하는 점선 원(50))에서 볼 수 있다.

[0117] [00110] 도 1B는 도 1A에서와 유사한 레이아웃의 평면도이지만, 각 채널(20)에 대한 다수의 투입구 포트들의 예시인(30),(40),(42)을 포함한다. 이로 인해, 상기 작용제 +/- 칼슘 +/- 혈전 탐지 시약들이 상기 미세 유체 채널 내에서 상기 샘플에 첨가되어진다. 하나 이상의 추가 투입구들(40),(42)이 마련될 수 있으며, 이들은 개별적으로 상기 메인 채널(20)이나 상기 메인 입력 영역에 직접 연결될 수 있고, 일부는 상기 메인 채널이나 상기 주요(primary) 투입 포트에 연결되어 서로 간접적으로 연결될 수 있다.

[0118] [00111] 도 1C는 기관(15)에서 채널(20)의 투입 포트(30) 및 방출 포트(35)를 나타내는 미세 유체 장치 레이아웃의 측면도이다. 비록 하나의 채널만 도시되어 있지만, 도 1A에 도시된 바와 같이 하나 이상의 채널이 마련될 수 있다. 또한, 도 1B에 도시된 바와 같이, 각 채널에 대해 하나 이상의 투입 포트들이 마련될 수 있다. 도 1C에 개략적으로 도시된 바와 같이, 상기 채널들의 각 채널에서 혈전 형성을 측정하기 위해 탐지 장치(55)가 마련될 수 있다. 상기 탐지 장치(55)는 예를 들어 혈전 형성 시간들과 같은 혈전 형성의 탐지를 위한 센서를 포함할 수 있다. 이미징은 본원에 기재된 바와 같이 명시야(bright-field) 이미징일 수 있다. 상기 탐지 장치로는 본원에 기재된 기타 측정/탐지 방법 중 어느 하나를 사용할 수 있다.

[0119] [00112] 도 1D는 다양한 분석에 이용될 수 있는 대안적인 레이아웃을 가지는 미세 유체 장치(110)의 평면도이다. 상기 미세 유체 장치(110)에는 샘플 투입 및 채널(120) 당 하나 이상의 투입구(투입 포트들)(130)와 하나의 방출구(방출 포트)(135)가 존재할 수 있다. 각 채널(120)에는 혈전 형성을 자극하기 위한 형상 변화 영역(125)이 포함된다. 상기 채널들은 하나의 시야(점선 사각형(150)) 내에서 혈전 형성/국소화 영역들(125)의 시각화를 허용하기 위해, 예를 들어 2X-10X 범위의 배율로, 평행한 방식으로 배열된다. 각 채널은 작용제 및/또는 칼슘 첨가를 위한 하나 이상의 영역(140) 및 혼합을 위한 영역(145)을 포함할 수 있다. 도시된 실시예에서, 상기 채널들(120)은 동일한 기하학적 구조를 갖는다.

[0120] [00113] 도 2A 및 도 2B는 예시적인 실시예에 따른 원형 미세 유체 응고 장치(210)를 도시하고 있다. 도시된 바와 같이, 상기 장치는 4 개의 채널(220)을 포함하고, 각 채널은 혈전 형성을 유발 및/또는 국소화하기 위한 기하학적 구조를 가지는 혈전 형성/국소화 영역(225)을 포함한다. 상기 혈전 형성 영역들(225)은 중심 영역에 배열된다. 각 채널(220)은 하나의 투입 포트(230) 및 하나의 방출 포트(235)에 연결된다. 모든 채널의 투입 및 방출 포트들은 상기 장치(210)의 주변에 교번 패턴으로 배열된다. 상기 중앙의 점선 원(250)은 모든 투입 채널의 "응고 영역"(225)을 포함하는 일반적인 시야를 나타낸다. 도 2A에 도시된 채널의 구성은 심지 모세관 유동(wicking capillary flow)이 발생하는 구성이지만, 다른 많은 구성도 가능하다. 특정 구성은 상기 장치를 제조하는 데 특별히 유리한지 여부와 같은 하나 이상의 기준에 기초하여 선택될 수 있다.

[0121] [00114] 도 2B는 시야 내의 혈전 형성/국소화 영역(225)의 실시예들을 도시하는 도 2A의 장치(210)의 중앙 부분의 확대도이다. 상기 혈전 형성 영역들은 정량화될 수 있는 혈전의 형성에 도움이 되는 구성을 가질 수 있다. 상기 혈전 형성 영역들은 혈전 형성을 위해 흐름 분리(flow separation), 정체(stasis), 흐름 방해(flow disturbances) 또는 이들의 조합을 야기하도록 설계된 형태들을 가질 수 있고, 혈전 형성에 대한 흐름 방해를 초래하도록 설계된 형태를 가질 수 있다. 본 실시예에서, 상기 혈전 형성 영역들은 사용가능한 다양한 형태들을 설명하기 위해 다른 모양들을 가진다. 통상적으로 각 채널에서 동일한 흐름 조건을 보장하기 위해 각 채널마다 상기 형태들이 동일하다. 도 2B에 도시된 혈전 형성 영역들의 형태들은 예시적일 수 있으며, 사용가능한 모든 형태 변형을 포함하지는 않는다.

[0122] [00115] 도 2B에 도시된 바와 같이, 각 혈전 형성 영역은 혈전 형성 영역을 통해 흘러가게 되어 있는 샘플이 적어도 한 번, 바람직하게는 여러 번 방향을 바꾸도록 구성(예를 들어, 형상화)될 수 있다. 방향의 각 변화는 예를 들어 약 45도 내지 약 135도, 약 60도 내지 약 120도, 약 75도 내지 약 105도, 또는 약 90 도의 범위 일 수 있다. 또한, 흐름을 방해하기 위해 돌출부(protrusions) 또는 섬(islands)과 같은 하나 이상의 흐름 방해물(flow disruptors)이 마련될 수 있다. 샘플이 혈전 형성 영역을 통과함에 따라 흐름 방해 요소(들)를 만나고 상기 방해물(들) 주위로 흐르게 된다. 방해물은 모서리들 또는 뾰족한 모서리들을 포함할 수 있으며, 도 2B에 도시된 바와 같이 삼각형, 직사각형 또는 기타 형태일 수 있다. 방해물들과 다른 구조적 특징들 또는 단지 다른

구조적 특징들의 조합은 순환 영역을 형성할 수 있으며, 여기서 원형 패턴의 샘플 흐름은 다른 샘플이 출발함에 따라 상기 영역에 투입되는 새로운 샘플과 상호 작용하게 된다. 유체 흐름 관점에서 볼 때, 방해물 후방에 있는 와류는 와류 영역에서의 유체 흐름 및 샘플의 교차점(예를 들어, 난류 교차점(turbulence intersections))에서 하나의 샘플이 다른 샘플과 상호 작용할 때 응고를 촉진할 수 있다.

- [0123] [00116] 일부 실시예에 있어서, 상기 방해물은 오목한 부분(concavity)(예; 도 3A)을 포함할 수 있다. 혈전 형성/국소화 영역은 채널이 좁아지는 부분(narrowing of the channel)을 포함할 수 있다. 샘플 흐름의 방향 및/또는 직경 및 각도 및/또는상기 채널의 모양의 변화 및/또는 상기 샘플이 하나 이상의 방해물 주위로 흐르게 함으로써, 상기 혈전 형성 영역들은 혈전 형성을 촉진하기 위해 흐름 분리 및 샘플 흐름의 정체를 야기한다. 통상적으로, 상기 채널들 및 혈전 형성 영역들은 이들 채널들의 각 채널에 대해 동일한 흐름 특성을 제공하기 위해 대칭 형태로 배열된다.
- [0124] [00117] 실시예 2
- [0125] [00118] 본 발명의 일 실시예에 따른 분석을 수행하기 위한 일반적인 프로토콜은 하기와 같다:
- [0126] a) 샘플, 작용제, +/- 칼슘, +/- 혈전 탐지제(clot detection agent)를 함께 첨가한다.
- [0127] i. 칼슘을 최종 농도 0.2 mM로 첨가(이 농도는 3.2% 완충 구연산 나트륨과 함께 사용하기에 특히 적합하다. 다른 항응고제를 사용하는 경우, 칼슘의 농도는 0.2 mM이 아닐 수 있다.)
- [0128] ii. 혈전 탐지제들(clot detection agents)은 형광 표지된 피브리노겐, 자석, 비드(형광 또는 착색될 수 있음)를 포함할 수 있다
- [0129] b) 미세 유체 장치에 로딩한다.
- [0130] i. 예; 투입 로딩 구성 및 순서 관련 실시예들은 도 1A-1D, 2A 및 2B 참조
- [0131] c) 온도 조절
- [0132] i. 실온
- [0133] ii. 최대 37°C까지 승온(체온) (체온은 일반적으로 37°C이지만, 분석 수행 온도는 상기 환자의 실제 온도에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 환자가 열이 있는 경우에는 분석 수행 온도를 높일 수 있다.)
- [0134] d) 혈전 발생을 수행하고 혈전 형성의 시간을 측정한다. (예; 4-12 분)
- [0135] e) 각 샘플의 혈전 형성 개시 시간을 기록한다.
- [0136] [00119] 실시예 3
- [0137] [00120] 도 3A-3C는 예시적인 실시예에 따른 혈전 형성/국소화 영역(225)을 갖는 4 개의 채널(320)을 갖는 미세 유체 장치(310)와 함께 혈장 및 형광 표지된 피브리노겐을 사용하여 수행하는 혈전 탐지를 도시하고 있다. 상기 미세 유체 장치는 모든 혈전 형성 영역들(325)이 동일한 형태를 갖는 것을 제외하고는 도 2A 및 2B에 도시된 장치와 유사하다. 각 혈전 형성/국소화 영역(325)은 샘플 흐름을 방해하는 돌출부를 포함한다. 본 실시예에서, 도 3A에 도시된 바와 같이, 상기 돌출부는 일반적으로 삼각형 형태이다. 상기 돌출부의 양면은 일직선이고 한쪽은 오목하다. 각 혈전 형성 영역(325)은 방향에 있어서 2 개의 90도 변화를 포함하여 흐름 방향을 4 번 변화시킨다.
- [0138] [00121] 일 실시예에서, 상기 혈전 탐지 과정은 하기 절차 단계를 포함할 수 있다:
- [0139] a) 혈장 샘플이 하기를 포함하도록 미리 혼합한다: 6 μ L 혈장 + 0.6 μ L 작용제(샘플 부피의 10%) + 0.6 μ L 칼슘(2 mM 스톡(stock), 샘플 부피의 10%) + 0.6 μ L 피브리노겐(이것은 농도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 샘플 부피의 <10%). 상기 값들은 조정 및 변경될 수 있으며 유사한 결과가 얻어진다.
- [0140] b) 각 채널에 대해, 상기 미리 혼합된 샘플의 분취량을 상기 채널의 상기 투입 포트에 투입한다.
- [0141] c) 상기 샘플 분취량은 모세관 작용에 의해 상기 채널로 유인된다.
- [0142] d) 상기 채널들을 37° C에서 10 분 동안 이미징하고 응고 탐지 시간을 기록한다.
- [0143] [00122] 도 3B의 실시예는 한 시점(5 분)에서 미세 유체 채널들의 형광 이미지를 도시하고 있다. 상기 사용된 혈장 샘플은 250 ng/mL의 아픽사반을 포함한다. 다양한 농도(0.75 ng/mL FXa, 7.5 ng/mL FXa 및 75 ng/mL FXa)

또는 완충제 단독(음성 대조군)의 작용제와 인자 Xa(FXa)를 칼슘 및 488-컨쥬게이트된 피브리노겐과 함께 혈장에 첨가한다. 상기 형광 피브리노겐의 가교는 가교된 피브린 혈전(fibrin clot)의 형성 및 존재를 나타낸다. 도 3B의 우측 채널에서 볼 수 있는 보다 높은 농도들의 FXa(7.5 ng/mL FXa 및 75 ng/mL FXa)는 보다 낮은 농도(0.75 ng/mL FXa) 또는 도 3B의 좌측 채널에서 볼 수 있는 음성 대조군보다 혈전 형성이 더 조기에 이루어진다. 도 3C는 가교된 피브린 혈전을 나타내는 하나의 채널의 혈전 형성 영역의 확대도이다.

[0144] [00123] 실시예 4

[0145] [00124] 도 4A 및 4B는 예시적인 실시예에 따른 병렬 미세 유체 채널 장치(410)에서 전혈을 사용한 혈전 탐지를 나타내는 형광 이미지들이다. 미세 유체 채널들(420)을 다양한 농도(7.5 ng/mL, 75 ng/mL, 750 ng/mL)의 작용제, 인자 Xa 또는 완충제 단독(음성 대조군)으로 미리 코팅하였다. 상기 형광 이미지들은 한 시점(10 분)에 촬영된다. 미세 유체 채널들은 미세 유체 채널 내에 결합된(bound) FXa 만을 남기기 위해 사용 전에 완충액으로 세척하였다. 신선한 전혈을 각 투입 포트에 넣고 모세관 작용에 의해 혈액을 유입하였다. 상기 혈액을 10 분 동안 흐르도록 방치후, 상기 채널을 완충액으로 가볍게 세척하였다. 두 샘플의 명시야(bright-field) 이미지가 도 4C에 표시되어 있다. 도 4A의 샘플은 항응고제(채혈(finger prick of blood))를 포함하지 않았으며, 이는 상기 음성 대조군을 포함하여 4 개 채널 모두에서 혈전을 생성하였다. 도 4B의 샘플은 미분화된 헤파린(손가락 채혈(finger prick of blood))을 포함하였고, 이는 상기 채널에서 FXa의 농도에 따라 혈전 형성의 구배를 야기하였다. 상기 음성 대조군에는 세포가 거의 부착되지 않았으며, 이는 최소 혈전 생성을 의미한다. 미분화된 헤파린은 항 트롬빈 III-의존적 방식으로 인자 IIa 및 Xa를 억제하며, 이것이 바로 이들 인자들을 적절한 농도로 첨가 시 상기 샘플의 응고 능력(clotting capability)을 회복하는 데 도움이 되는 이유이다.

[0146] [00125] 실시예 5

[0147] [00126] 도 5A 및 5B는 하기 특징들을 포함하는 미세 유체 장치 설계의 추가 실시예들을 예시한다: (1) 각 채널은 혈액/혈장을 동일한 조건에서 처리하고 (2) 혈전 탐지가 최적화되고 수행되는 각 채널 내에는 혈전-촉진 기하학적 구조(clot-promoting geometry)가 있다. 도 5A는 단일 샘플 투입구(530)를 둘러싸고 연결되는 대칭 채널들(520)의 원형 어레이를 포함하는 장치(510)를 도시하며, 여기서 각 채널은 혈전-촉진 및/또는 국소화 영역(525)을 갖는다. 상기 채널들(520)은 또한 작용제 및/또는 칼슘 첨가(540) 및/또는 혼합(545)을 위한 하나 이상의 영역을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 도 5B는 단일 샘플 투입 포트(530)를 갖는 원통형 디자인을 활용하는 장치(512)의 대안적인 실시예를 도시하고 있으며, 여기서 상기 단일 샘플 투입 포트(530)는 작용제/칼슘(540) 첨가 및/또는 혼합(545)을 위한 영역이 있거나 없는 혈전-형성 영역(525)을 갖는 다수의 대칭형 채널들(520)로 분할된다. 상기 두 장치(510, 512)는 또한 흡수성 필터가 있거나 없는 샘플 수집 저장소(560)를 포함할 수 있다.

[0148] [00127] 실시예 6

[0149] [00128] 도 6은 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 혈액 샘플에서 응고를 평가하는 방법의 흐름도이다. 상기 혈액 샘플은 전혈 샘플 또는 혈장 샘플 일 수 있다. 상기 방법에 따르면, 응고 인자는 상기 혈액 샘플의 복수의 분취량(aliquots)에 첨가된다. 각 분취량은 상이한 농도로 응고 인자를 수용할 수 있다. 복수의 분취량은 미세 유체 장치의 복수의 채널에 적용될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 응고 인자(들)는 혈액 샘플이 적용되는 장치 상에 또는 장치 내부에 미리 코팅될 수 있다. 각 채널에서 혈전 형성 시간들을 측정하고 상기 측정된 혈전 형성 시간들을 토대로 응고를 평가한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 각 채널에서 혈전 형성 정도(선택적으로, 혈전 용해도)는 고정된 시간 또는 시간들에 측정되며, 응고는 상기 측정된 혈전 형성 정도(선택적으로, 혈전 용해도)를 토대로 평가한다.

[0150] [00129] 선택적으로, 도 6에 도시된 바와 같이, 상기 혈전 형성 시간들은 기준치 또는 기준 범위들과 비교될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 혈전 형성 시간은 응고 캐스케이드 이상으로 고통받지 않는 개체들의 응고 인자 특이적 혈전 형성 기준 범위들과 비교된다. 이것은 예를 들어 상기 혈액 샘플에서 응고 캐스케이드 이상을 탐지하는 데 유용하다. 다른 실시예에서, 상기 혈전 형성 시간들은 응고 캐스케이드 이상으로 고통받지 않는 개체의 샘플에 대해 측정된 혈전 형성 시간들과 비교된다. 이것은 또한 예를 들어 상기 혈액 샘플에서 응고 캐스케이드 이상을 탐지하는 데 유용하다. 또 다른 실시예에서, 상기 혈전 형성 시간들은 공지된 양의 항응고제를 포함하는 샘플에 대해 측정된 혈전 형성 시간들과 비교된다. 이것은 예를 들어 상기 혈액 샘플의 항응고제를 탐지하는 데 유용하다.

[0151] [00130] 도 6의 상기 방법에 사용하기 위한 상기 미세 유체 장치는, 도 1A-1D, 2A-2B, 3A-3C, 4A-4B 및 5A-

5B에 도시된 장치와 같은, 복수 채널을 갖는, 본원에 기재된 임의의 미세 유체 장치일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 장치는 기관에 형성된 복수의 채널을 포함하고, 여기서 각 채널은 혈전 형성을 유발 및/또는 국소화하도록 구성된 기하학적 구조를 갖는 혈전 형성 영역(여기서 상기 복수의 채널의 혈전 형성 영역은 기관의 중심 영역에 배열됨); 복수의 투입 포트들(여기서 각 투입 포트는 상기 복수의 채널 중 하나의 채널의 제 1 단부에 연결됨); 그리고 복수의 방출 포트들(여기서 각 방출 포트는 복수의 채널 중 하나의 제 2 단부에 연결되고, 상기 투입 및 방출 포트들은 상기 기관의 주변에 교번 패턴으로 배열됨)을 포함한다.

- [0152] [00131] 실시예 7
- [0153] [00132] 도 7A-7D는 다양한 농도에서 다양한 FXa 및 FIIa 억제제에 대한 예시적인 응고 곡선들을 도시하고 있다. 각 조합에서 혈전 형성에 소요되는 시간이 플롯팅되어 있다. 상기 샘플에서 각 억제제 농도에 대한 응고 곡선은 상기 항응고제의 존재 여부 및 농도에 의존한다. 도면들은 다양한 농도의 작용제에 노출 시 4 개의 상이한 직접 경구용 항응고제(OrACs)에 대한 응고 시간을 도시하고 있다. 상기 억제제의 농도가 증가함에 따라 응고 시간이 증가하여 기능적 항응고가 증가하고 있음을 입증하고 있다. 상기 작용제(도 7A-7C의 경우 FXa, 그리고 도 7D의 경우 FIIa)의 농도는 각 도면에 대해 X-축 상에 플롯팅되어 있다.
- [0154] [00133] 도 7A는 리바록사반의 탐지를 도시하는 예시적인 데이터의 그래프이다. 상기 그래프는 다양한 농도(0 ng/mL, 250 ng/mL 및 500 ng/mL)의 억제제에 대한 응고 곡선을 보여주고 있다. 각 곡선은 작용제(FXa) 농도 (ng/mL; x-축)의 함수로 평균 혈전 탐지 시간(분; y-축)을 보여주고 있다. 상기 그래프에 표시된 데이터는 하기와 같이 요약할 수 있다:
- [0155] [00134] 리바록사반 농도가 0 ng/mL 일때, 작용제 농도가 7.5 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0156] [00135] 리바록사반 농도가 250 ng/mL 일때, 혈전 형성 시간은 음성 대조군과 대비하여 훨씬 더 길지만 작용제 농도를 7.5 ng/mL로 낮아질 때까지 리바록사반 농도가 500 ng/mL 일때 보다는 짧았다.
- [0157] [00136] 리바록사반 농도가 500 ng/mL 일때, 작용제 농도가 750 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0158] [00137] 도 7B는 아픽사반의 탐지를 나타내는 예시적인 데이터의 그래프이다. 상기 그래프는 각기 다른 농도(0 ng/mL, 250 ng/mL 및 500 ng/mL)의 아픽사반에 대한 응고 곡선을 보여준다. 도 7A에서와 같이, 각 곡선은 작용제(FXa) 농도(ng/mL; x-축)의 함수로서 평균 혈전 탐지 시간(분; y-축)을 보여준다. 상기 그래프에 표시된 데이터는 하기와 같이 요약할 수 있다:
- [0159] [00138] 아픽사반 농도가 0 ng/mL 일때, 작용제 농도가 7.5 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0160] [00139] 아픽사반 농도가 250 ng/mL 일때, 작용제 농도가 75 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0161] [00140] 아픽사반 농도가 500 ng/mL 일때, 작용제 농도가 938 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0162] [00141] 도 7C는 에독사반의 탐지를 나타내는 예시적인 데이터의 그래프이다. 상기 그래프는 각기 다른 농도(0 ng/mL, 250 ng/mL 및 500 ng/mL)의 에독사반에 대한 응고 곡선을 보여준다. 도 7A에서와 같이, 각 곡선은 작용제(FXa) 농도(ng/mL; x-축)의 함수로서 평균 혈전 탐지 시간(분; y-축)을 보여준다.
- [0163] [00142] 도 7D는 다비가트란의 탐지를 나타내는 예시적인 데이터의 그래프이다. 도 7A 및 7B에서와 같이, 도 7D의 그래프는 상이한 농도의 억제제에 대한 응고 곡선을 나타낸다(여기서 다비가트란 농도는 0 ng/mL, 25 ng/mL, 250 ng/mL 및 500 ng/mL임). 각 곡선은 작용제(FIIa) 농도(ng/mL; x-축)의 함수로서 평균 혈전 탐지 시간 (분; y-축)을 나타낸다. 도 7D의 그래프에 도시된 데이터는 하기와 같이 요약될 수 있다:
- [0164] [00143] 다비가트란 농도가 < 25 ng/mL 일때, 작용제 농도가 71 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0165] [00144] 다비가트란 농도가 250 ng/mL 일때, 작용제 농도가 710 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.

- [0166] [00145] 다비가트란 농도가 500 ng/mL 일때, 작용제 농도가 710 ng/mL로 낮아질 때까지 < 2.5 분 이내에 혈전 형성이 탐지되었다.
- [0167] [00146] 샘플과 분석법 사이의 변수(variation)을 줄이기 위해 자동화를 사용할 수 있다.
- [0168] [00147] 실시예 8
- [0169] [00148] FXa 억제제들의 존재 여부에 대한 탐지 및 이들의 상대 농도의 추정 외에도, 본원에 기재된 분석은 상기 샘플들에 첨가하기에 적절한 상류 및 하류의 응고 인자들을 선택함으로써 FXa 억제제들을 FIIa 억제제들과 구별할 수 있다.
- [0170] [00149] 도 8은 하기 실시예들에서 추가로 기재된 바와 같이 적절한 응고 인자들의 선택을 가이드할 수 있는 기본적인 응고 캐스케이드를 도시하고 있다. 도 8에 도시된 바와 같이, 상기 캐스케이드는 내인성 경로 및 외인성 경로를 포함하며, 이들 두 경로는 상기 캐스케이드의 공통 경로를 통해 가교된 피브린 혈전으로 이어질 수 있다. 상기 내인성 경로는 예를 들어 표면 접촉에 의해 활성화 될 수 있다. 상기 외인성 경로는 예를 들어 조직 외상(tissue trauma)에 의해 활성화 될 수 있다.
- [0171] [00150] 실시예 9
- [0172] [00151] 도 9는 탐지 인자 Xa(FXa)의 기능의 억제/결핍/이상을 탐지하는 방법을 보여 주는 개략도이다. FXII, FXI, FIX 및 FVIII를 포함하되 이에 제한되지 않는 상류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는, 예를 들어 하류 인자의 첨가와 비교하여 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. 대안적으로, 응고 시간의 연장은 대조군의 응고 시간을 참조하여 결정될 수 있다. 그러나, FII와 FI를 포함하되 이에 제한되지 않는 하류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 영향을 받지 않는(예; 정상) 응고 시간을 나타내며, 이는 대조군으로서 역할을 수행할 수 있다. 상기 FXa의 첨가는 농도-의존적 방식으로 응고 시간의 연장을 입증할 것이며, 상류의 높은 인자 농도에서도 응고 시간은 대조군 수치에 도달하지 못할 것으로 생각된다. 도시된 바와 같이, 직접적인 FXa 억제제의 예로서 리바록사반, 아픽사반, 에독사반, 및 베트릭사반을 포함한다.
- [0173] [00152] 실시예 10
- [0174] [00153] 도 10은 인자 IIa(FIIa)의 기능의 억제/결핍/이상을 탐지하는 방법을 보여주는 개략도이다. FXII, FXI, FIX, FX, FV 및 FVIII를 포함하되 이에 제한되지 않는 상류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. FI를 포함하되 이에 제한되지 않는 하류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 영향을 받지 않는 응고 시간을 입증할 것이다. FIIa의 첨가는 농도-의존적 방식으로 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. 도시된 바와 같이, 직접적인 FIIa 억제제의 예로서 다비가트란(Dabigatran), 비발리루딘(Bivalirudin) 및 아르코트라반(Argotran)을 포함한다.
- [0175] [00154] 실시예 11
- [0176] [00155] 도 11은 샘플에서 FIIa 및 FXa 억제 사이의 차이점을 탐지하는 방법을 보여주는 개략도이다. FIIa 및 FXa 억제제의 존재 하에, FXII, FXI, FIX 및 FVIII를 포함하되 이에 제한되지 않는 상류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. 상기 샘플에 대한 FXa의 첨가는 FXa 및 FIIa 억제에 대한 농도-의존적 방식으로 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. 상기 샘플에 대한 FIIa의 첨가는 FIIa 억제제의 존재 하에 농도-의존적 방식으로 응고 시간의 연장을 입증할 것이나, FXa 억제제의 존재 하에 영향을 받지 않는 응고 시간을 입증할 것이다.
- [0177] [00156] 실시예 12
- [0178] [00157] 도 12는 간접적 FXa의 기능의 억제/결핍/이상을 탐지하는 방법을 보여주는 개략도이다. FXII, FXI, FIX 및 FVIII를 포함하되 이에 제한되지 않는 상류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 응고 시간의 연장을 입증할 것이다. FII 및 FI를 포함하되 이에 제한되지 않는 하류(비활성 또는 활성화되지 않은) 응고 인자들의 첨가는 정상적인 응고 시간 또는 응고 시간의 약간의 연장을, 존재하는 억제제의 유형에 따라 농도-의존적 방식으로 입증할 것이다. 상기 FXa의 첨가는 응고 시간의 연장을 농도-의존적 방식으로 입증할 것이다. 이는 안티트롬빈 III (ATIII)의 FXa에 대한 친화력/결합을 증가시키는 약물의 존재를 통한 2 차 FXa 억제로 인한 것으로서, 이로써 상기 억제를 수행하게 된다. 실시예들은 ATIII의 억제를 포함하며, 그리하여 FXa, FIIa 또는 이들 모두의 간접 억제를 탐지할 수 있다. FXa에 대한 ATIII의 결합/친화력을 증가시키는 약물은 헤파린, 예를 들어, 저분자량 헤파린(LMWH) 및 미분획 헤파린(UFH), 에녹사파린(Enoxaparin) 및 폰다파리누스(Fondaparinu

x)를 포함한다.

[0179] [00158] 실시예 13

[0180] [00159] 도 13은 샘플에서 FXIIa 및 FXIa 억제제를 탐지하고 이들 사이의 차이점을 구별하는 방법을 보여주는 개략도이다. FXIIa 억제제의 존재 하에, FXIIa의 첨가는 응고 시간의 농도-의존적 연장을 초래할 것이다. FXI, FIX, FVIII, FX, FII 및 FV를 포함하는 그러나 이에 제한되지 않는 인자들을 하류에 첨가하는 것은 응고 시간에 영향을 미치지 않을 것이다. FXIa 억제제의 존재 하에, FXIIa의 첨가는 상기 응고 시간의 연장을 초래할 것이다. FXIa의 첨가는 응고 시간의 농도-의존적 연장을 초래할 것이다. FIX, FVIII, FX, FII 및 FV를 포함하는 그러나 이에 제한되지 않는 인자들을 하류에 첨가하는 것은 응고 시간에 영향을 미치지 않을 것이다. 이 접근법은 FXIIa 억제제들, FXIa 억제제들, FXa 억제제, 및 FIIa 억제제들의 탐지 및 구별을 위한 포괄적인 패널을 수행하기 위해 다양한 조합으로 사용될 수도 있다.

[0181] [00160] 실시예 14

[0182] [00161] 도 14는 다양한 유형의 혈우병을 탐지하고 구별하는 방법을 보여주는 개략도이다. 혈우병 C는 FXIIa를 첨가하여 응고 시간의 연장, FXI의 첨가에 의한 농도-의존적 연장, 및 FXIa 또는 기타 하류 인자의 첨가에 의한 응고 시간의 무영향을 초래할 수 있다. 혈우병 B는 FXIIa 및 FXIa를 첨가하여 응고 시간의 연장, FIX의 첨가에 의한 농도-의존적 연장, 및 FIXa 또는 기타 하류 인자의 첨가에 의한 응고 시간의 무영향을 초래할 수 있다. 혈우병 A는 FXIIa 및 FXIa를 첨가하여 응고 시간의 연장, FVIII의 첨가에 의한 농도-의존적 연장, 및 FXa 또는 기타 하류 인자의 첨가에 의한 응고 시간의 무영향을 초래할 수 있다.

[0183] [00162] 선천성 장애의 경우, 실시예에서 탐지를 위해 활성화되지 않은 인자(들)를 추가할 수 있는 반면, 활성화되지 않은 인자(들)은 대조군으로 사용할 수 있다.

[0184] [00163] 실시예 15

[0185] [00164] 도 15는 피브리노겐(즉 인자 I(FI) 또는 FXIII)와 관련한 문제점을 탐지하는 방법을 보여주는 개략도이다. 무섬유소원혈증(Afibrinogenemia) 또는 이상섬유소원혈증(dysfibrinogenemia)은 FI 상류의 모든 인자들을 첨가하여 응고 시간을 연장, 그리고 FI의 첨가에 의한 농도-의존적 연장을 초래하게 될 것이다. FXIII 결핍/이상(abnormality)은 FXIII 상류의 모든 인자를 첨가함으로써 시간 경과에 따른 혈전 강도 및 혈전 안정성의 변화, FXIII의 첨가에 의한 시간 경과에 따른 혈전 강도 및 안정성의 농도-의존적 변화를 초래할 것이다.

[0186] [00165] 실시예 16

[0187] [00166] 도 16A-16C는 다양한 농도에서 FXa 및 FIIa 억제제에 대한 응고 곡선 점수(Clotting Curve Scores; CCS)를 도시하고 있다. 다양한 농도에서 각 작용제의 응고 시간에 대한 미가공 데이터를 사용하여 다변량 통계 모델링(multivariate statistical modeling)에 기초한 단일 응고 곡선 점수(CCS)를 계산한다. 그런 다음, 상기 응고 곡선 점수(CCS)는 환자를 특정 억제제에 대해 양성 또는 음성으로 처리하기 위해 단일 정수로 사용될 수 있다. 상기 CCS는 또한 상기 샘플에서 약물의 기능적 농도를 추정하는데 사용될 수 있다. 기능적 농도는 상기 혈액 샘플의 상기 약물에 대한 2 차적 항응고량을 나타낸다. 도 16A는 2 개의 FXa 억제제(아픽사반, 리바록사반) 및 1 개의 FIIa 억제제(다비가트란)의 응고 곡선 점수(CCS)가 FXa를 작용제로 사용하는 농도에 따라 어떻게 변하는지를 보여준다. 도 16B는 2 개의 FXa 억제제 및 1 개의 FIIa 억제제의 응고 곡선 점수(CCS)가 작용제로서 FIIa를 사용하는 농도에 따라 어떻게 변하는지를 보여준다. 도 16C는 각 작용제의 응고 곡선 점수(CCS)를 사용하여 상기 샘플의 억제제의 유형을 식별하는 방법을 보여준다.

[0188] [00167] 실시예 17

[0189] [00168] 도 17은 환자 기술 통계를 제공하는 표 1을 보여주고 있다. 매사추세츠 종합 병원 응급실에 입원한 환자들로부터 시트르화(citrated) 혈장 샘플들을 수집하였다. 모든 혈장 샘플은 임상외과가 지시한 응고 검사(PT/INR, aPTT, DTT 또는 기타)를 거쳤다. 환자 샘플들은 본원에 기재된 분석의 실시예를 이용하여 평가하였다. 항응고제들의 병력 관리를 위해 환자들의 의료 기록을 검토하였다. 모든 환자 샘플은 매사추세츠 종합 병원과 매사추세츠 공과 대학의 연구윤리심의위원회(Institutional Review Board; IB)의 승인 및 규정에 따라 수집되었다.

[0190] [00169] 실시예 18

[0191] [00170] 도 18A-18C는 프로트롬빈 시간(PT) 및 국제 정상화 비율(INR)이 민감하지만 FXa-I 항응고에 대해 특이

적이지 않음을 도시하고 있다. PT와 INR은 모두 대조군 환자들과 FXa-I에 있는 것으로 기록된 환자들 사이에서 비교되었다. 비정상 PT는 > 14 초로 정의되었고 비정상 INR은 > 1.2 로 정의되었다. 도 18A 및 18B는 FXa-I 환자에 대한 전체 대조군의 PT 및 INR을 비교한 ROC 곡선을 보여준다. 도 18C는 PT 및 INR 결과가 평가된 환자들 의 기술 통계표를 보여준다. 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하여 정상 및 비정상 대조군을 리바록사반 및 아픽사반 모두와 비교하였다. 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의되었다. 비정상 대조군과 비교할 때, 상기 결과는 FXa-I 환자들에 비해 유의성이 없음을 보여준다.

[0192] [00171] 실시예 19

[0193] [00172] 도 19A-19G는 예시적인 응고 시간 데이터 및 비교 응고 곡선을 도시하고 있다. 응고 시간들을 모든 상기 환자군들에 대한 다양한 작용제 농도에서 비교하여 응고 곡선들을 구축하였다. 도 19A-19D는 상이한 군의 환자들에 대한 다양한 작용제 농도에서 응고 시간의 평균 및 표준 오차 막대를 나타내는 산점도(scatter plots)를 보여주고 있다. 도 19E는 모든 환자 그룹의 표준 오차 막대를 사용한 평균 응고 시간을 보여 주며, 이는 비교를 위해 단일 그래프로 입증된다. 세 가지 FXa-I 그룹(아픽사반, 리바록사반, FXa-I) 모두는 다수의 농도가 있는 대조군과는 매우 다르게 나타나며, 여기서 대조군들과 FXa-I, 리바록사반 및 아픽사반 그룹 간에 유의한 통계적 차이가 있다. 도 19F 및 19G는 상기 대조군의 표준 오차 막대가 정상 대 비정상 PT 또는 INR 환자들로 나뉘어 응고까지의 평균 시간을 보여주며, 서로 다른 대조군들 사이에 이들 검사에서 큰 차이가 없음을 보여준다.

[0194] [00173] 실시예 20

[0195] [00174] 도 20A-20E는 환자 샘플들에서 FXa-I의 탐지를 위한 응고 곡선 점수(CCS) 분석 및 응고 곡선 점수(CCS) 활용의 평가를 도시하고 있다. 도 20A는 환자 그룹 간의 응고 곡선 점수(CCS)의 비교를 위한 평균 및 표준 오차 막대가 있는 산점도(scatter plot)를 보여준다. 응고 곡선 점수(CCS)에서 0의 점선은 상기 샘플에서 FXa 억제제의 유무 여부를 결정하기 위해 선택된 컷오프(cut-off)를 나타낸다. 도 20B는 환자가 그들의 시스템에 FXa-I를 가 지는지의 여부를 결정하기 위해 응고 곡선 점수(CCS)를 활용하는 ROC 곡선을 보여준다. 도 20C는 다른 환자 그룹들에 대한 응고 곡선 점수(CCS)의 기술 통계를 제공한다. 도 20D 및 20E는 FXa-I 탐지의 정확성을 결정하기 위해 CCS를 사용한 평가를 도시하고 있다.

[0196] [00175] 실시예 21

[0197] [00176] 도 21A 및 21B는 기능성 약물의 농도 계산을 도시하고 있다. 도 21A에 도시된 바와 같이, 각 제어된 스파이크된(spiked) 리바록사반 샘플에 대해 계산된 응고 곡선 점수(CCS)를 활용하여, CCS를 약물 농도로 전환시키는 방정식에 대해 최적선(best-fit line)을 플롯팅하였다. 이어서, 상기 방정식을 각 환자 샘플에 대한 기능적 농도를 유도하기 위해 평가된 상기 환자 샘플들에 대한 각 CCS 값에 적용하였다. 이들 농도를 각 샘플에서 항-Xa 발색성 분석-유도된 리바록사반 농도와 직접 비교하였다. 도 21B에 나타난 바와 같이, 이 두 값을 서로 플롯팅하면 항-Xa 농도와 직접 경구용 항응고제(DOAC) 검사 농도 사이에 상당한 상관 관계가 있음을 알 수 있다 ($R^2 = 0.827$). 용혈되거나(hemolyzed), 황달성(icteric) 및 지질성(lipemic) 샘플들은 항-Xa 발색성 분석 농도에 부정적인 영향을 끼치는 것이 공지된 사실이므로, 용혈된(hemolyzed) 샘플들은 상기 직접 비교에 포함하지 않았다.

[0198] [00177] 도 21A 및 21B의 실시예들에 도시된 바와 같이, 억제제를 식별하는 것 외에도, 억제량을 정량화하기 위해 실시예들이 사용될 수 있다.

[0199] [00178] 실시예 22

[0200] [00179] 도 22는 환자가 직접 경구용 항응고제(DOAC)를 투여받고 있는 경우, 현재 의사 결정(decision-making) 패러다임을 보여주고 있다.

[0201] [00180] 환자가 출혈 위험이 높거나 적극적 출혈 응고 검사들이 요청되는 경우, 이들 검사로서 PT, INR, aPTT, ACT, TEG 또는 기타 현재 이용가능한 현장 진료(point-of-care) 검사들을 포함할 수 있다. 현재 이용가능한 검사들의 응고 결과가 비정상적일 경우, 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 존재여부에 대한 감지가 비특이적이므로 보건 의료인들은 어느 치료가 환자에게 가장 적합한지를 추측할 수 밖에 없는 형편이다. 응고 시간들이 정상일 경우, 이들 검사의 민감도 부족으로 인해, 의료 종사자들은 상기 환자 샘플에서 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 존재 여부를 감지 못한 채 치료를 진행하게 되어 환자의 출혈 위험을 배가시킬 수 있다.

[0202] [00181] 실시예 23

[0203] [00182] 도 23은 환자가 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 투여를 받는 경우 본 발명의 실시예(들)를 이용하여 개

선된 의사 결정 패러다임을 도시하고 있다. 이중 화살표는 가능한 반복 절차들(iterative procedures)을 나타낸다. 예를 들어, 기존 응고 검사 결과 환자가 정상적인 응고 시간들을 가지고 있고 본 발명의 일 실시예에 따른 직접 경구용 항응고제(DOAC) 검사가 비정상적인 결과를 보이는 경우, 이들 검사 결과에 기초하여 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 역전제를 선택하여 상기 환자에게 투여할 수 있다. 상기 환자는 이어서, 재검사를 받을 수 있고, 직접 경구용 항응고제(DOAC)에 따라 여전히 비정상적인 경우, 임의로 수정되거나 상이한 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 역전제를 투여 후에 재검사 받을 수 있다. 기존의 응고 검사들이 비정상적이고 직접 경구용 항응고제(DOAC) 검사도 비정상인 경우, 의료 종사자는 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 역전제 또는 다른 치료법을 선택하고 시약을 투여 후 재검사 할 수 있다. 기존의 응고 검사가 비정상적이고 직접 경구용 항응고제(DOAC) 검사가 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 존재 여부에 대해 음성인 경우, 해당 의료 종사자는 다른 지혈 치료가 필요할 수 있음을 결정하는 데 필요한 정보를 가지고 있다.

[0204] [00183] 실시예 24

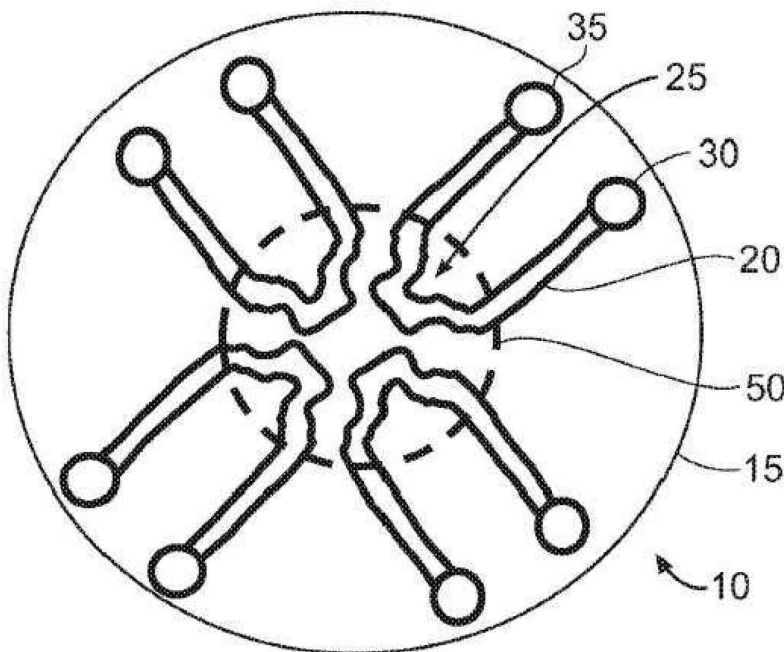
[0205] [00184] 도 24A 및 24B는 활성화된 프로트롬빈 복합 농축물(활성화된 트롬보플라스틴 시간(aPTT); 웨이바(FEIBA))을 첨가 후 FXa 억제제의 역전(reversal)의 탐지를 도시하고 있다. 웨이바(FEIBA)는 환자들에게서 FXa 억제제를 극복하기 위해 투여되는 활성화된 인자의 조합이다. 또 다른 예는 비활성 프로트롬빈 복합 농축물인 크센트라(Kcentra)이다. 응고 인자 Xa(재조합) 및 비활성화된-zhzo와 같은 특정 FXa 억제제의 역전제도 있다. 도 24A는 7.5 ng/mL의 FXa의 첨가 시 예상되는 예독사반의 응고 시간들을 보여주고 있다. 도 24B는 500 ng/mL의 예독사반을 포함한 혈장 샘플에 의한 응고 시간의 변화가 aPCC로 처리됨을 보여주고 있다. 이 데이터는 본 발명의 일 실시예에 따른 검사가 이들 직접 경구용 항응고제(DOAC)의 항응고 효과의 역전 또는 극복을 모니터링하는 유용성(utility)을 가지고 있음을 입증한다.

[0206] [00185] 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참고 문헌에서 교시하는 바는 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

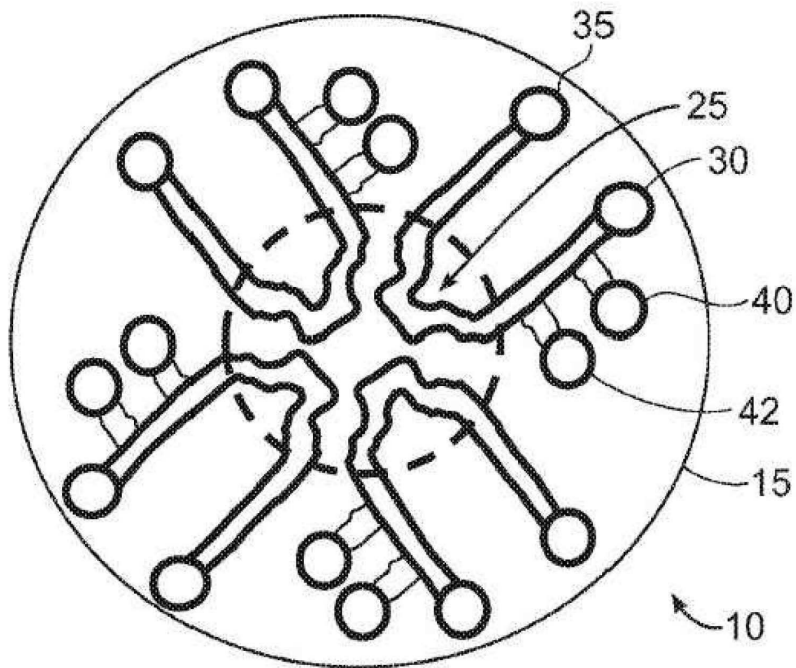
[0207] [00186] 본원에는 예시적인 실시예들이 특별히 도시 및 기재되었지만, 당업자는 첨부된 청구 범위에 의해 포함된 실시예들의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부 사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

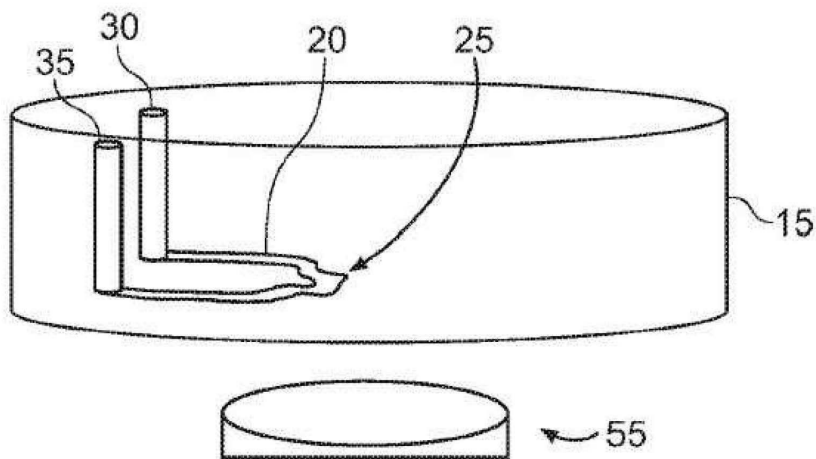
도면1a



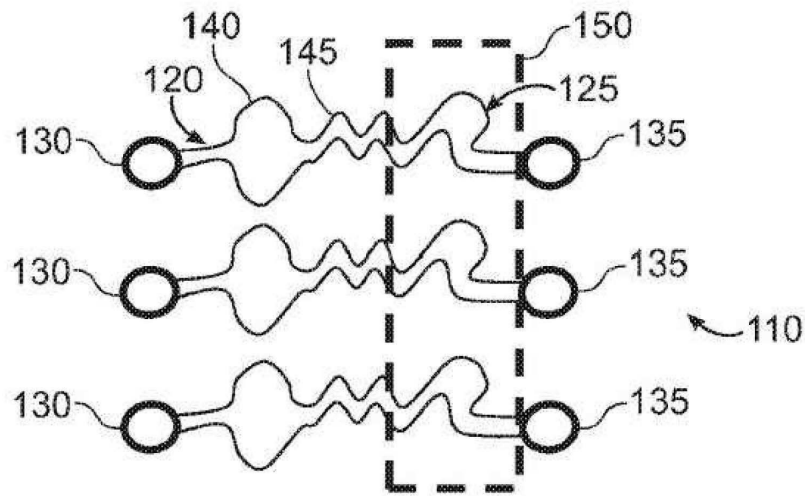
도면1b



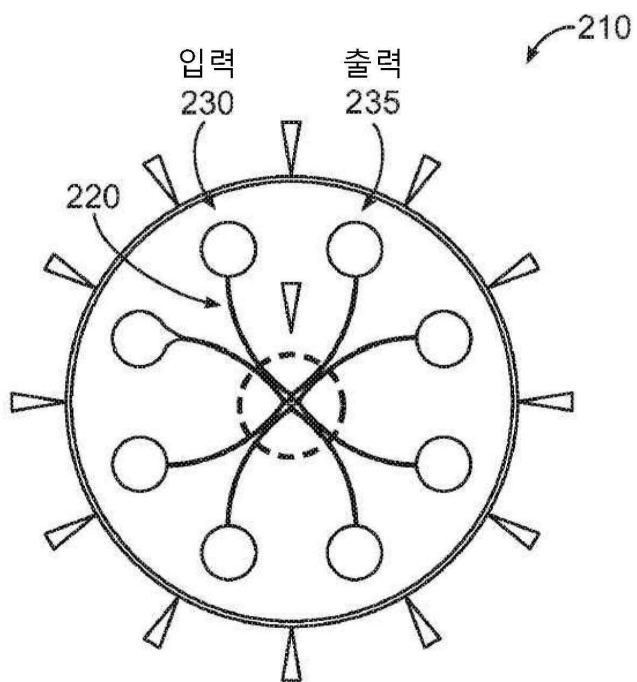
도면1c



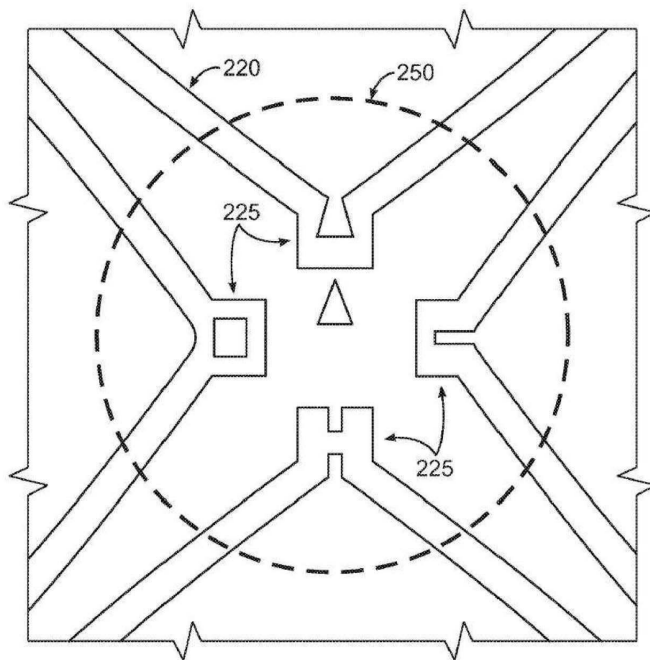
도면1d



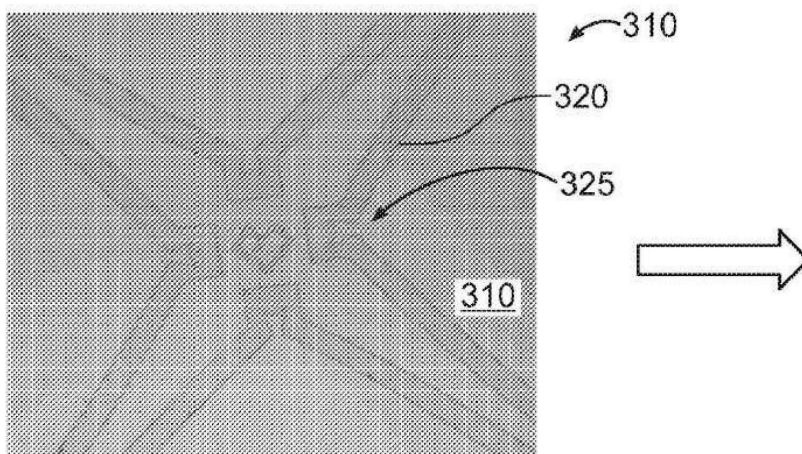
도면2a



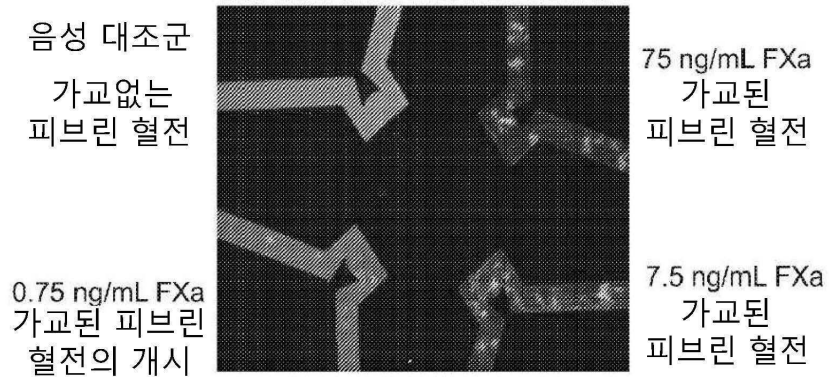
도면2b



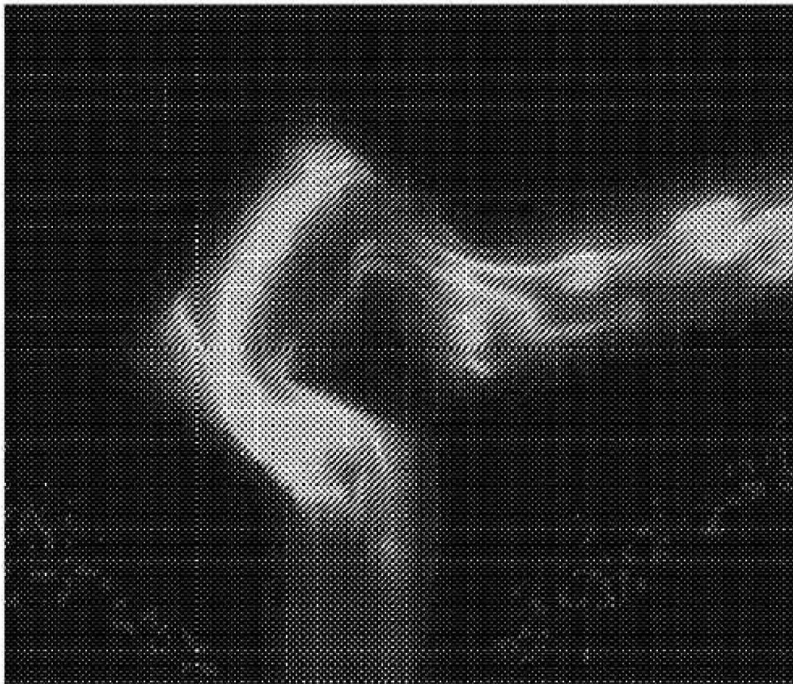
도면3a



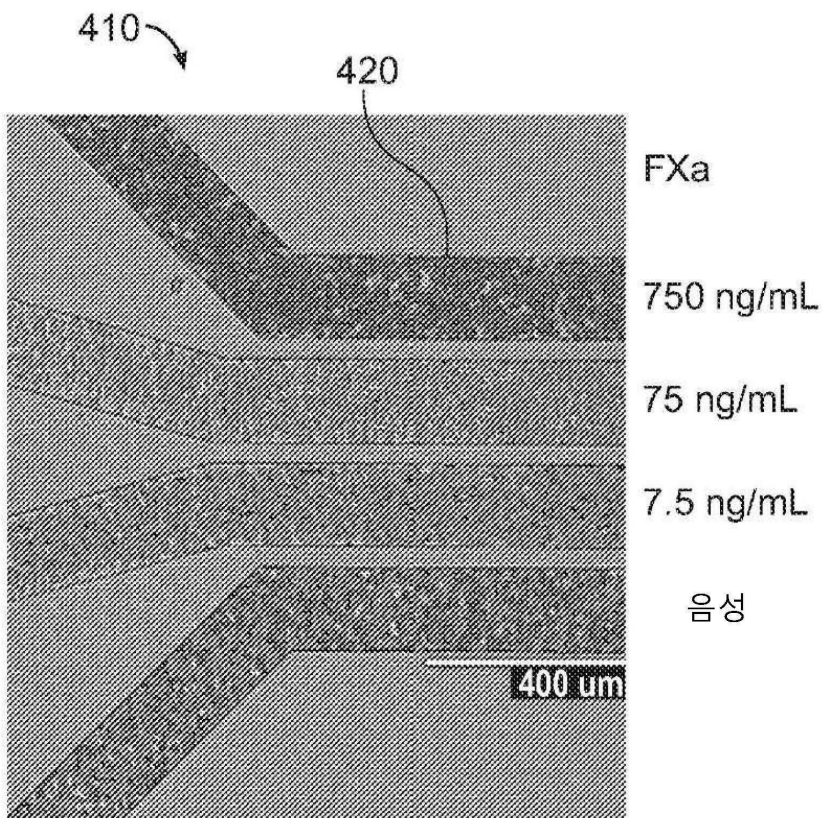
도면3b



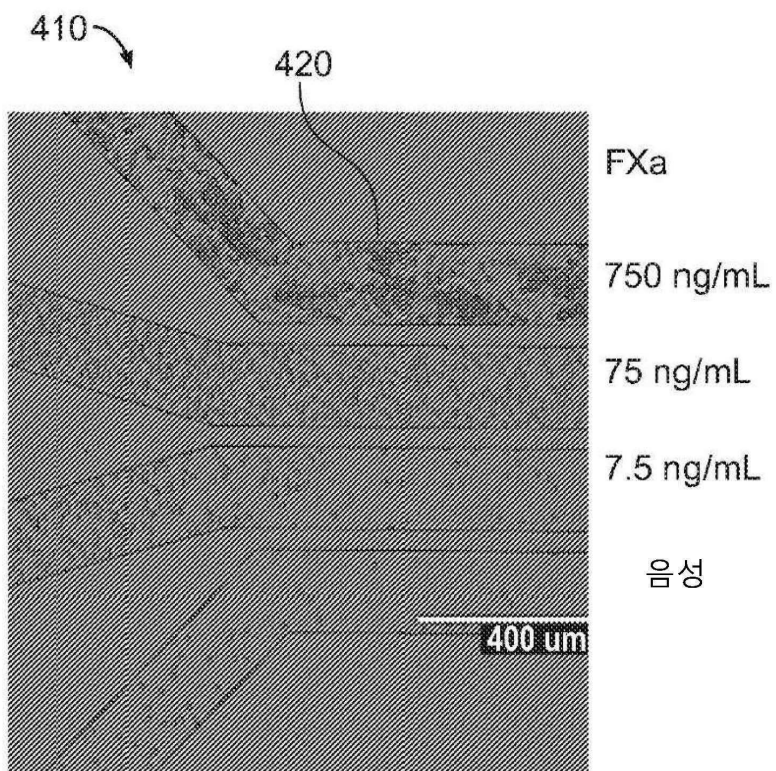
도면3c



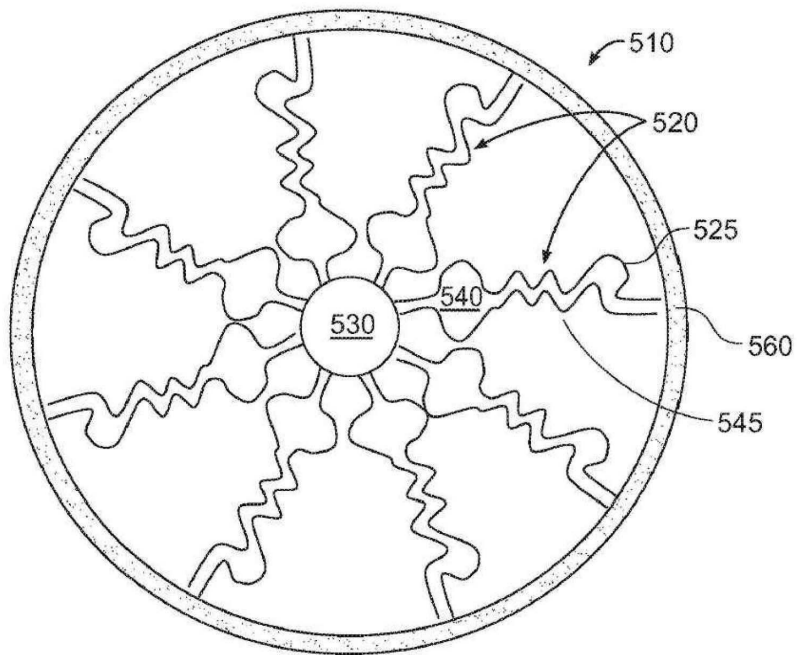
도면4a



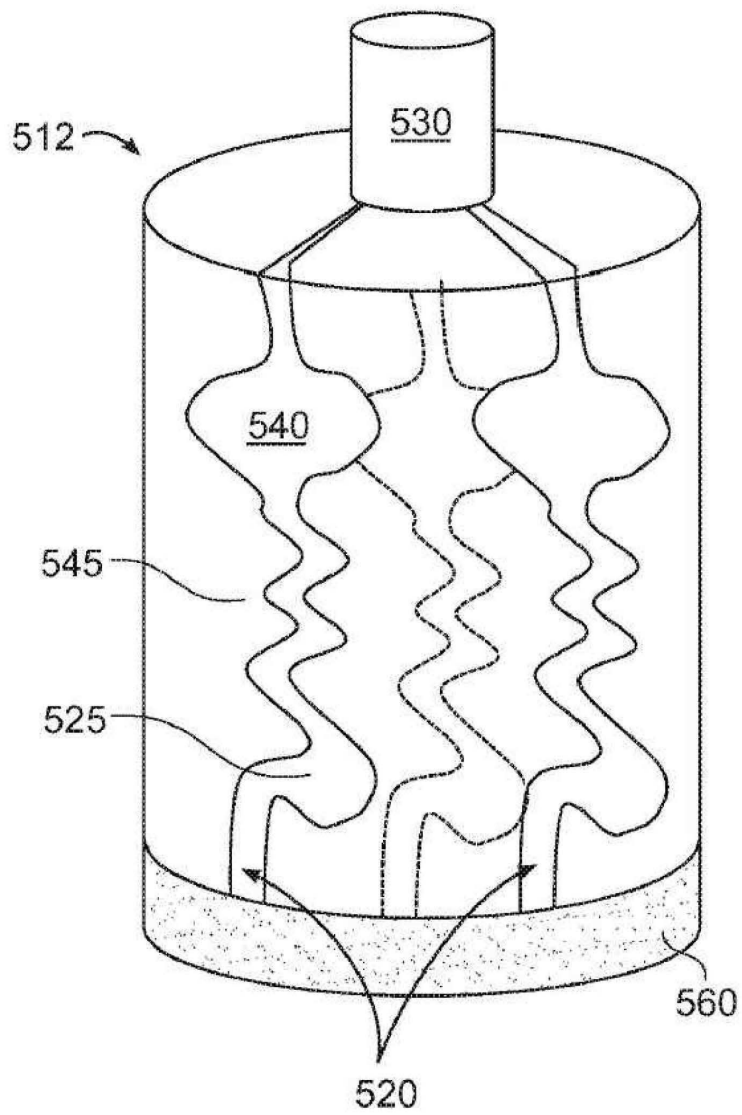
도면4b



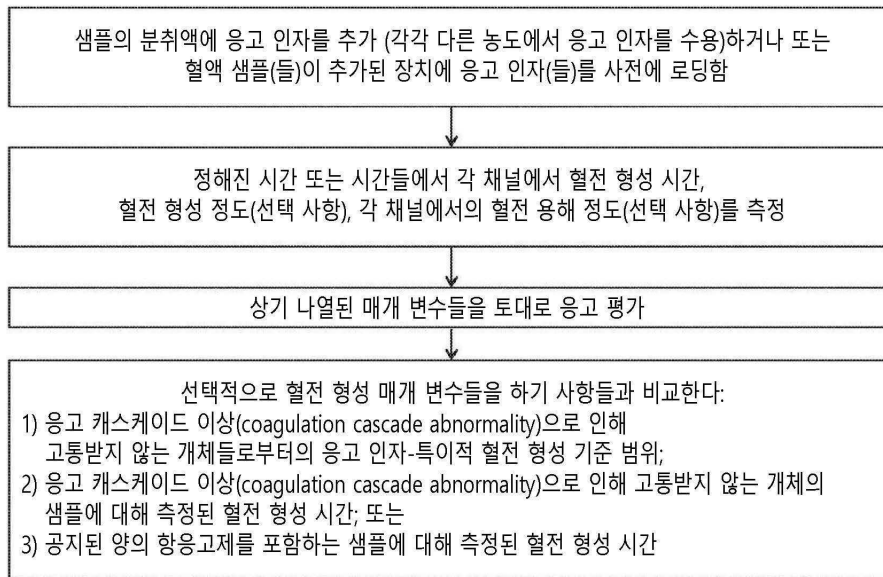
도면5a



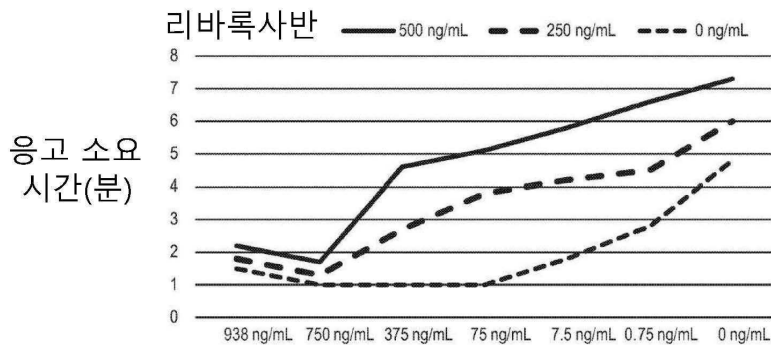
도면5b



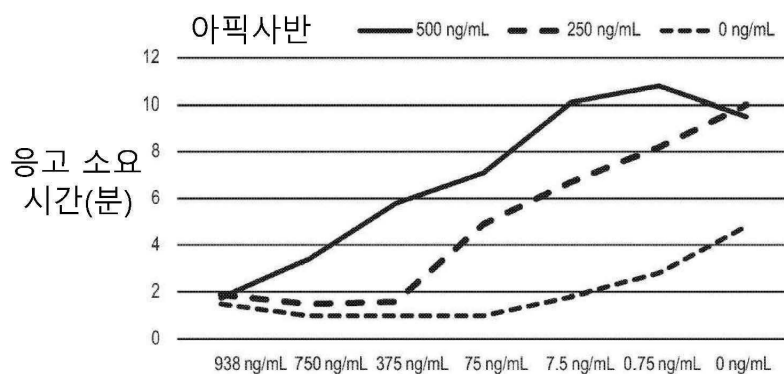
도면6



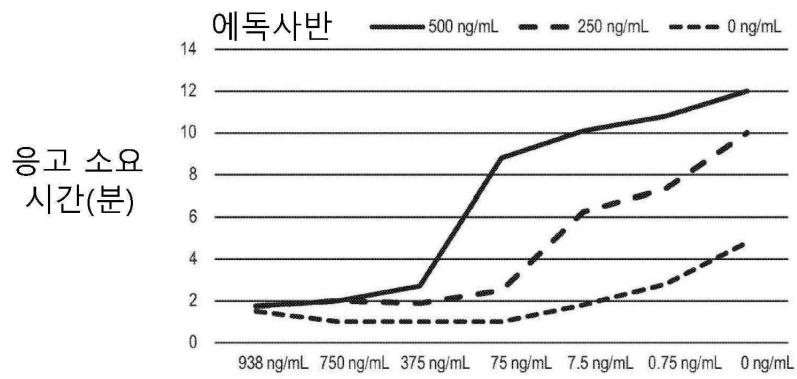
도면7a



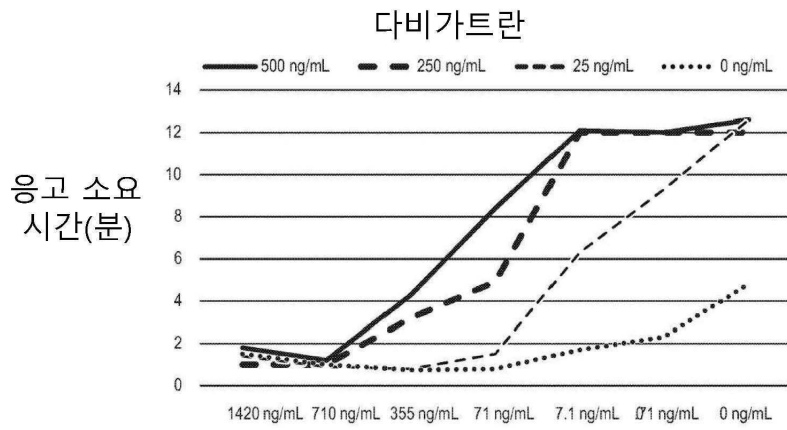
도면7b



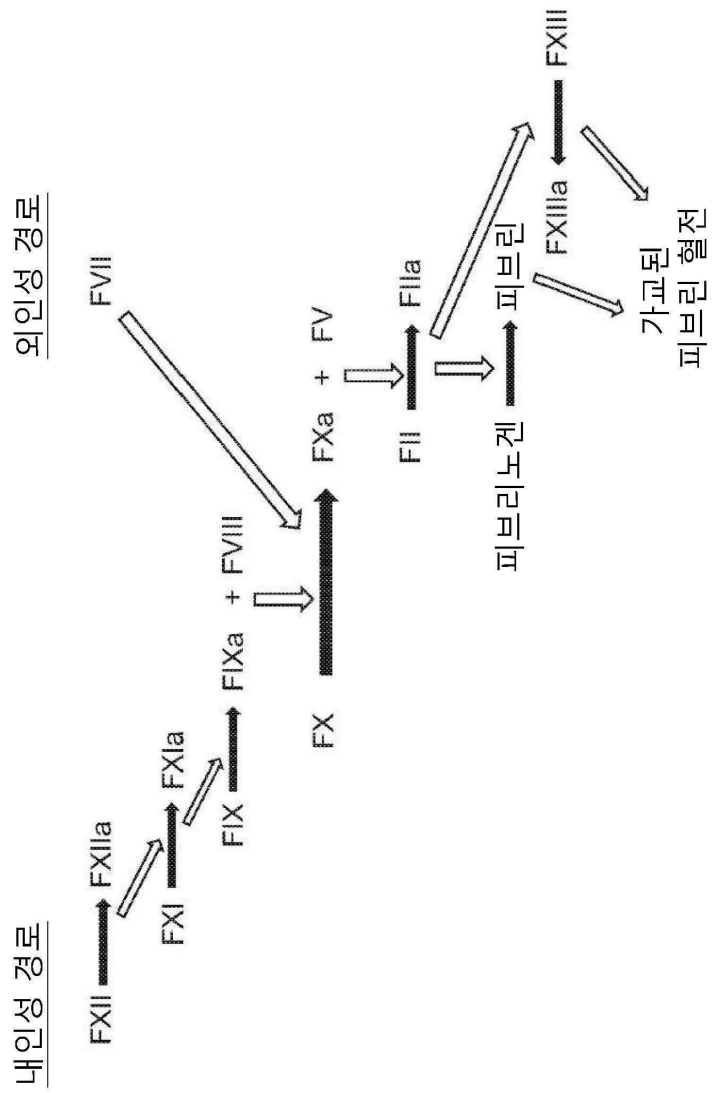
도면7c



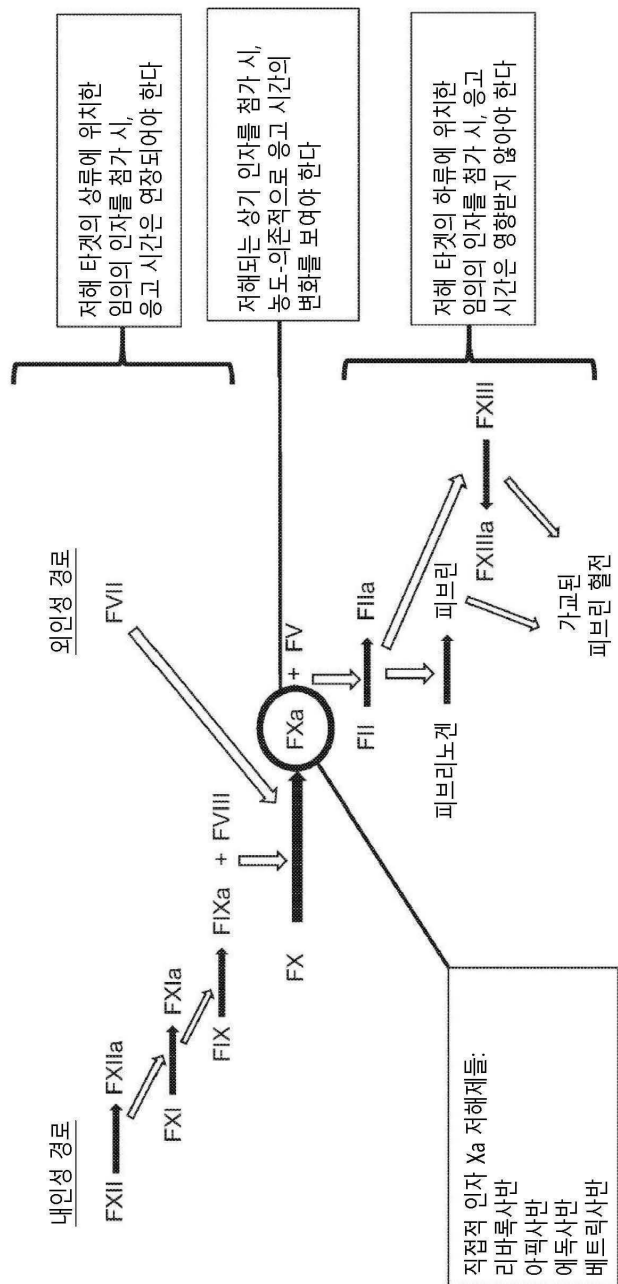
도면7d



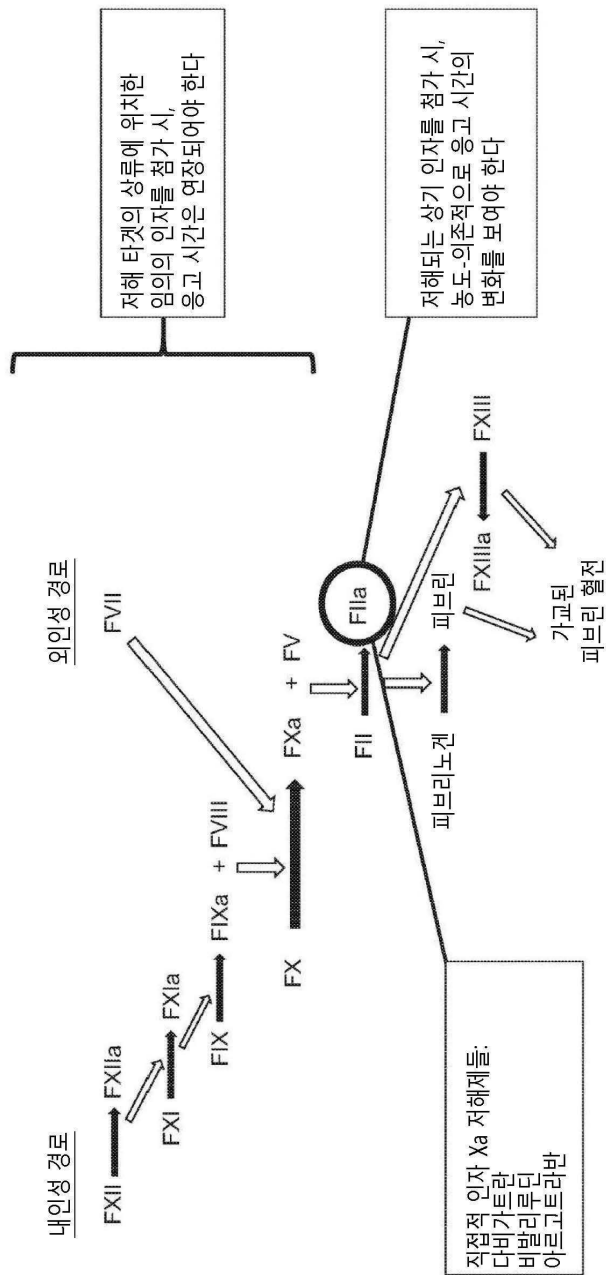
도면8



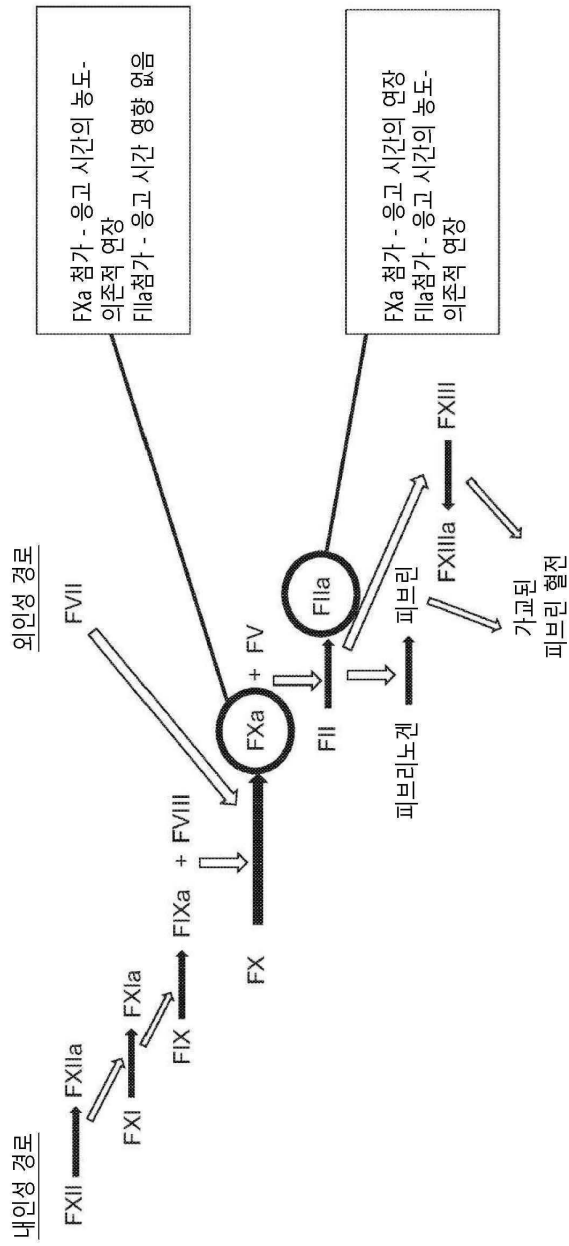
도면9



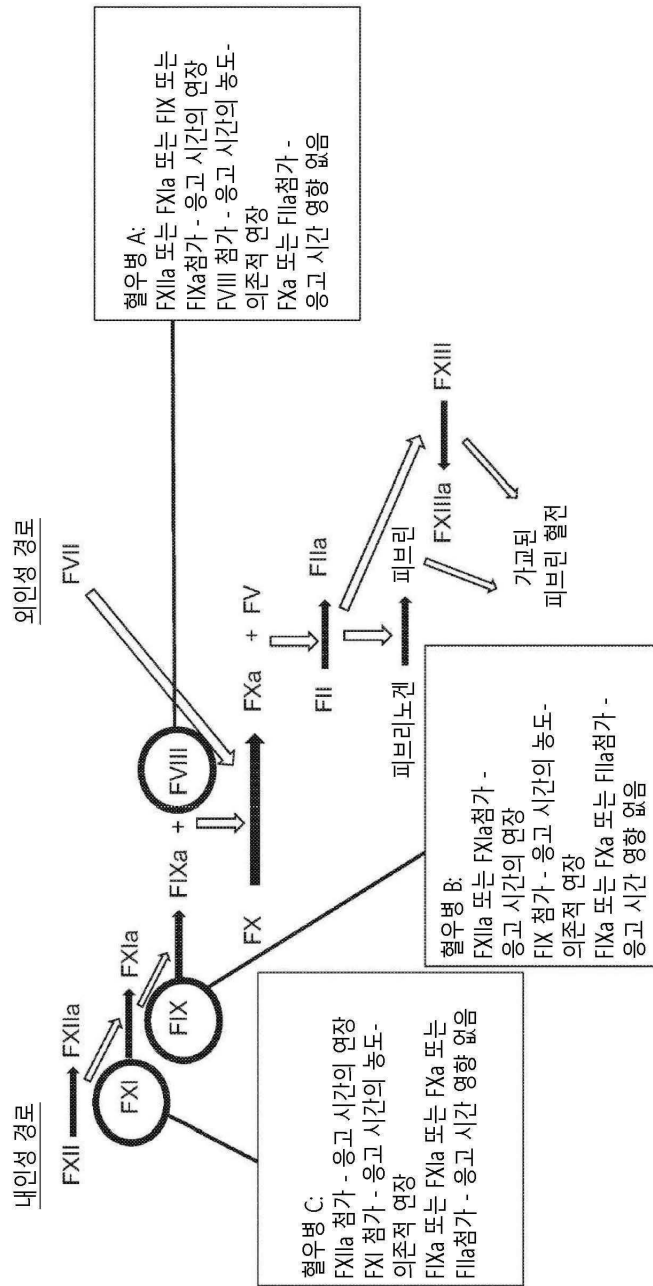
도면10



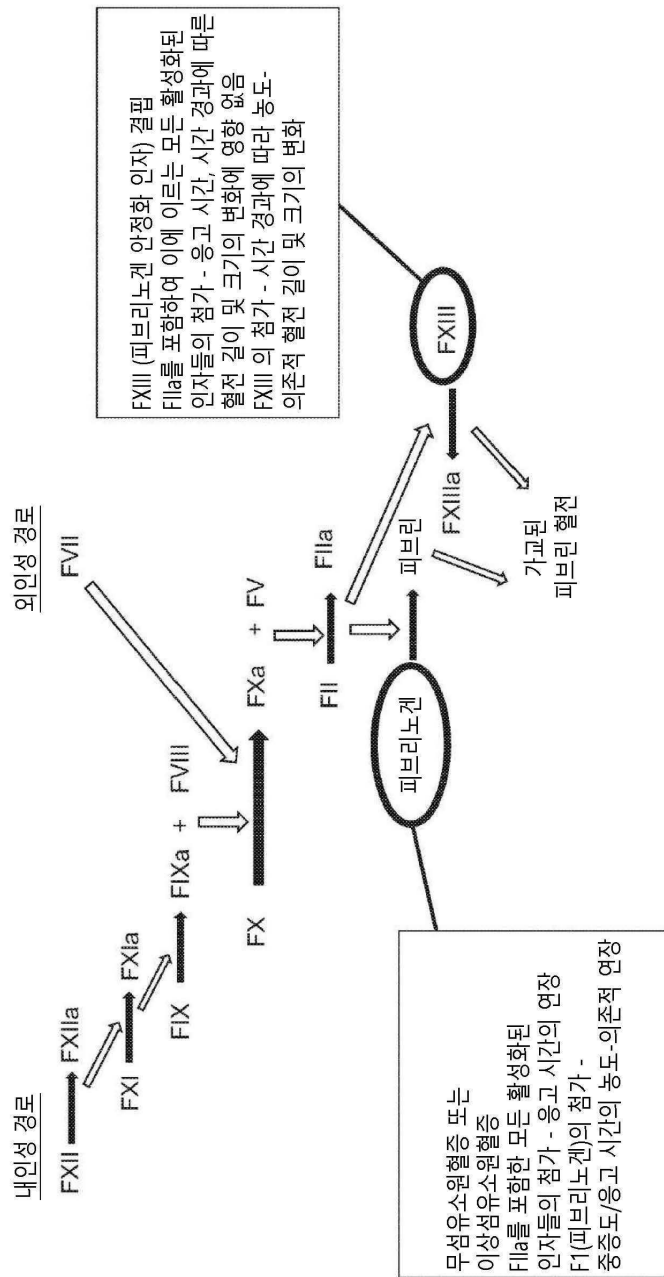
도면11



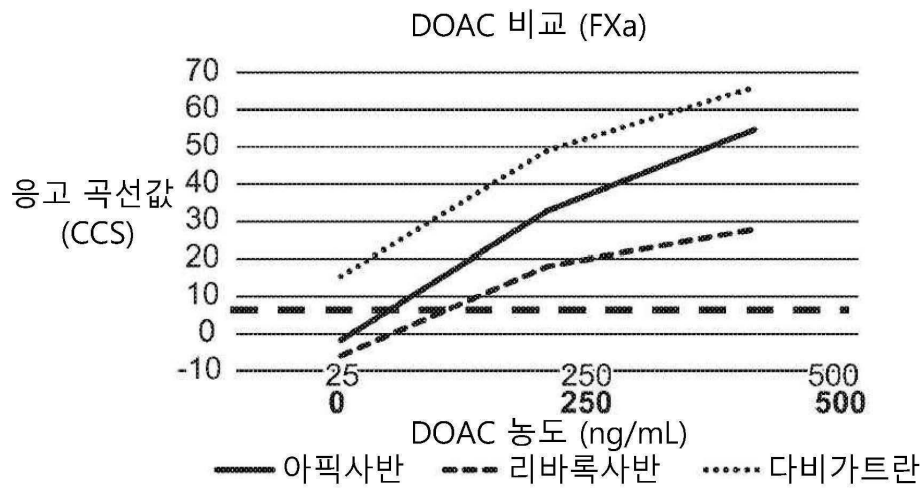
도면14



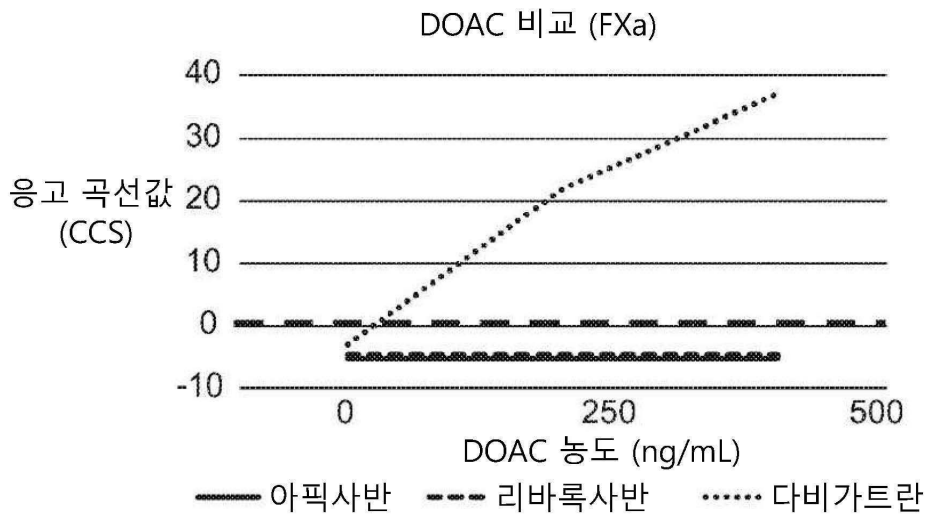
도면15



도면16a



도면16b



도면16c

	FXa CCS	FIIa CCS	결과
음성 대조군	-4.7	-4.7	음성
아픽사반(250 ng/mL)	32.8	-4.7	Fxa-I 양성
다비가트란(250 ng/mL)	49	22	FIIa-I 양성

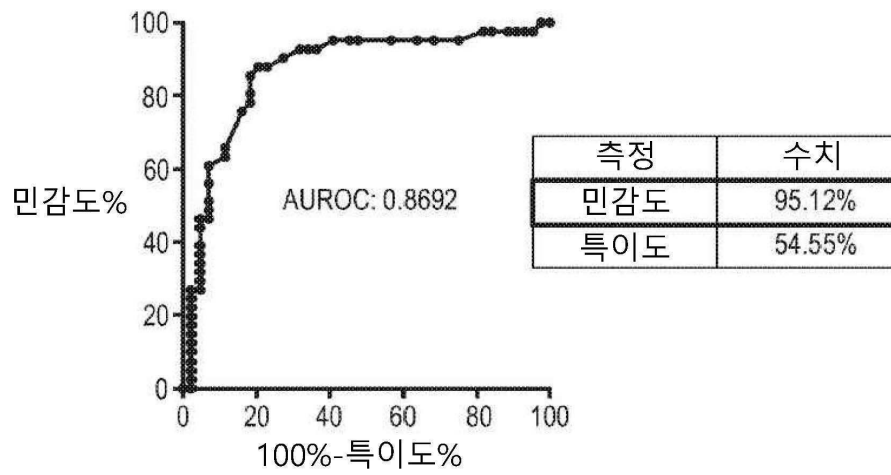
도면17

표 1: 환자 기술 통계

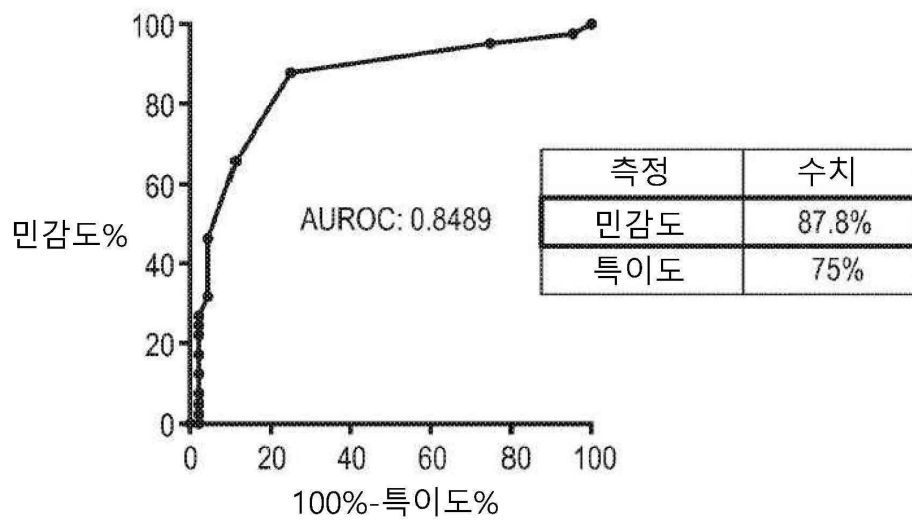
특성	대조군			FXa 저해제		
	합계 (N=48)	정상 ¹ (N=28)	비정상 ² (N=20)	합계 (N=44)	리비록사반 (N=23)	아픽사반 (N=21)
남성(성별) - 수(%)	18 (37.5)	11 (39.3)	7 (35.0)	26 (60)	14 (67)	12 (55)
나이 - 연도 (평균 ± 표준편차)	71 ± 15	72 ± 12	68 ± 17	69 ± 18	69 ± 19	70 ± 17
혈소판 저해제 - 수(%)	22 (45.8)	15 (53.6)	6 (30.0)	18 (41)	6 (26)	12 (57)
출혈(Bleed) - 수(%)	1 (2.1)	0 (0)	1 (5.0)	1 (2.3)	1 (4.3) ⁷	0 (0)
혈전 - 수(%)	2 (4.2)	2 (7.1) ⁵	0 (0) ⁶	1 (2.3)	1 (4.3) ⁸	0 (0)
심장질환 ³ - 수(%)				36 (82)	17 (73)	19 (90)
기타 ⁴ - 수(%)					PE/DVT, 암(폐), COPD 병력	PE/DVT, 암(폐), COPD 병력

1. 정상적인 PT, INR, aPTT 또는 DDimer를 가진 항응고제를 복용하지 않은 환자들
2. PT, INR, aPTT 또는 DDimer 이상증을 가진 항응고제를 복용하지 않은 환자들
3. A Fib, SSS, CHF를 포함하는 심장 질환으로 인해 FXa 치료를 개시
4. 심각하지 않은(non-primary) 심장 질환으로 인해 FXa 치료를 개시
5. 체혈 중 입원 사유는 출혈 사건 때문임. 환자는 직장 출혈이 제시됨
6. 체혈 중 입원 사유는 출혈 사건 때문임. 환자는 PE 진단을 받았고 다른 환자 한 명은 DVT 진단을 받았다
7. 체혈 중 입원 사유는 출혈 사건 때문임. 환자는 자궁 출혈이 제시됨 (자궁암 병력)
8. 체혈 중 입원 사유는 응고 사건 때문임. 환자는 PE 진단을 받음 (PE 및 DVT 병력)

도면18a



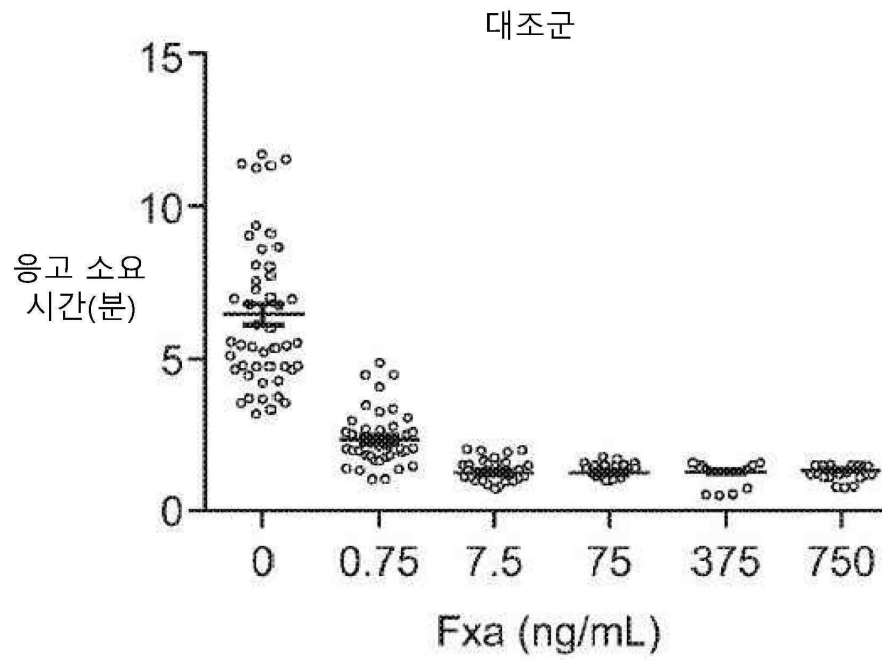
도면18b



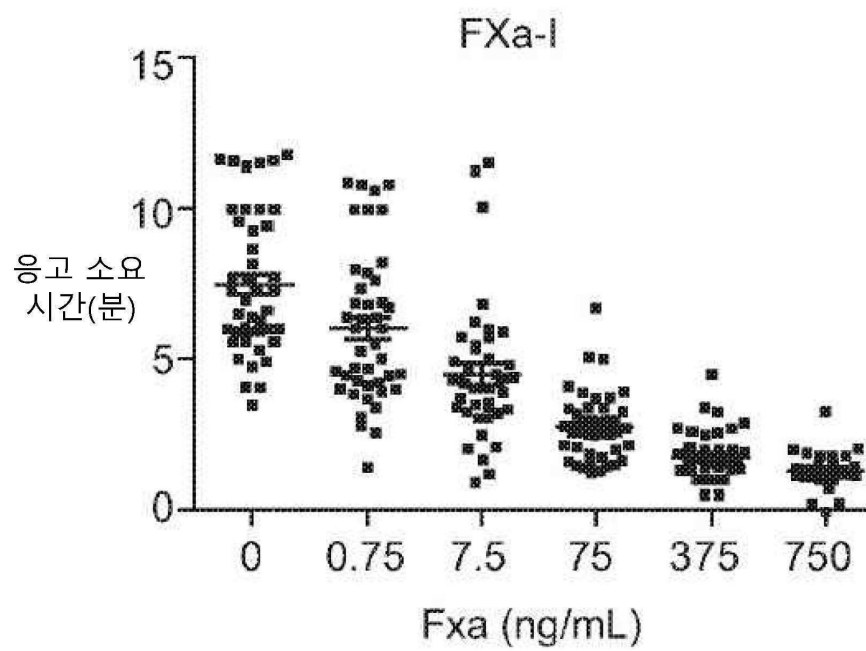
도면18c

특성	대조군			FXa 저해제		
	합계	정상	비정상	합계	리바록사반	아픽사반
PT - 평균 ± 표준편차 (n)	14.4 ± 2.9 (44)	13.3 ± 0.4 (24)	15.9 ± 3.9 (20)	17.7 ± 3.5 (41)	18.4 ± 4.1 (22)	16.9 ± 2.5 (19)
INR - 평균 ± 표준편차 (n)	1.1 ± 0.3 (44)	1.1 ± 0.1 (39)	1.8 ± 0.8 (5)	1.4 ± 0.3 (41)	1.5 ± 0.4 (22)	1.4 ± 0.2 (19)
P-값 (PT) - 정상 대조군, 비정상 대조군					<0.001, 0.05	0.001, 0.74
P-값 (INR) - 정상 대조군, 비정상 대조군					<0.001, 0.76	0.006, 0.17

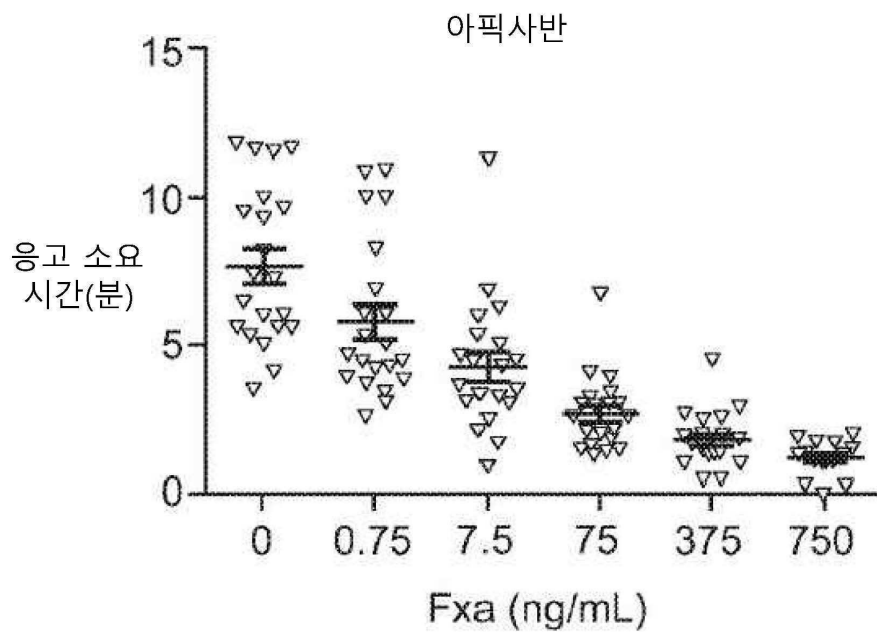
도면19a



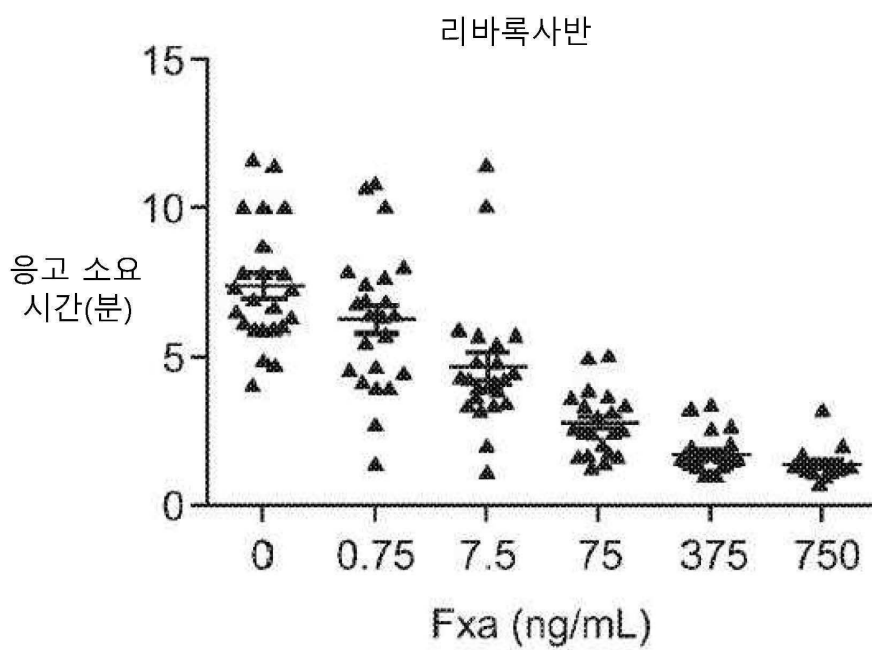
도면19b



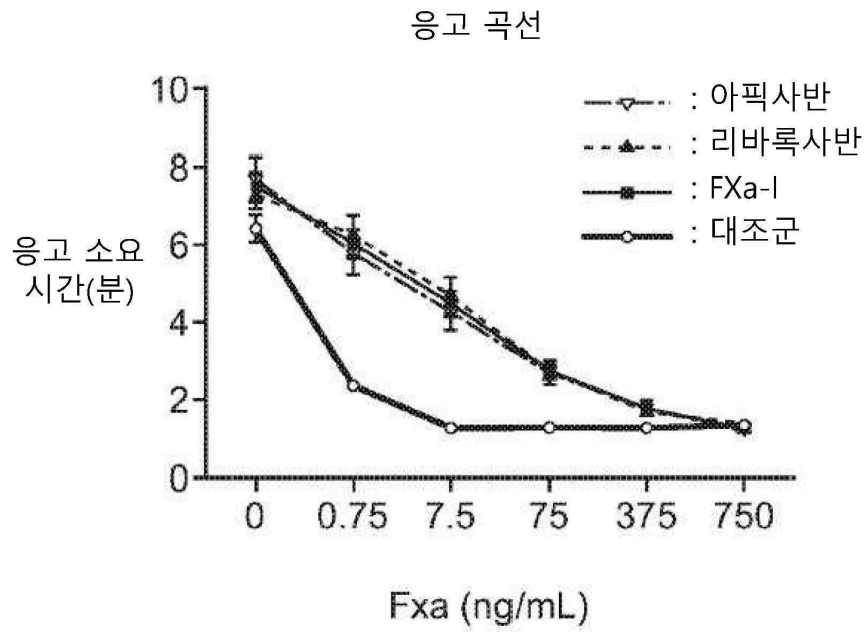
도면19c



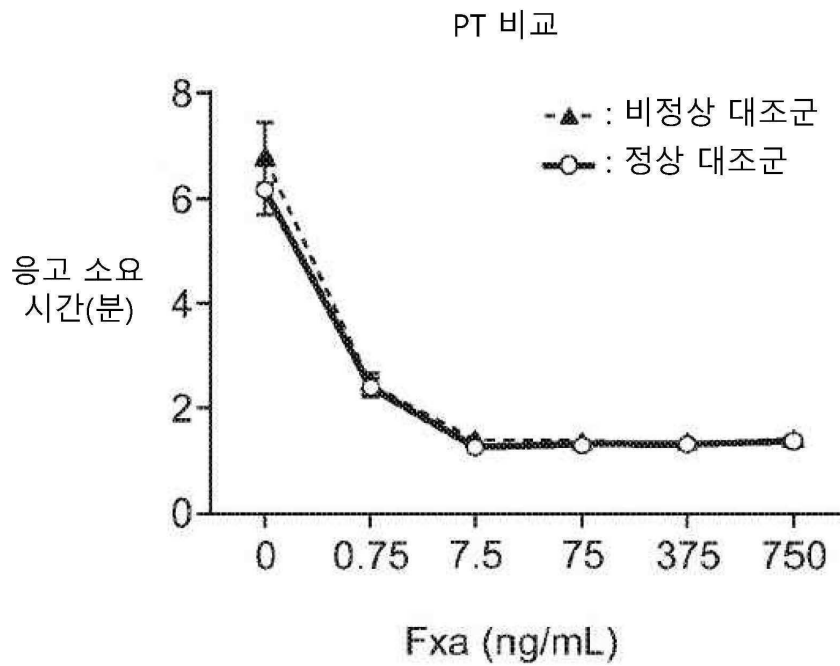
도면19d



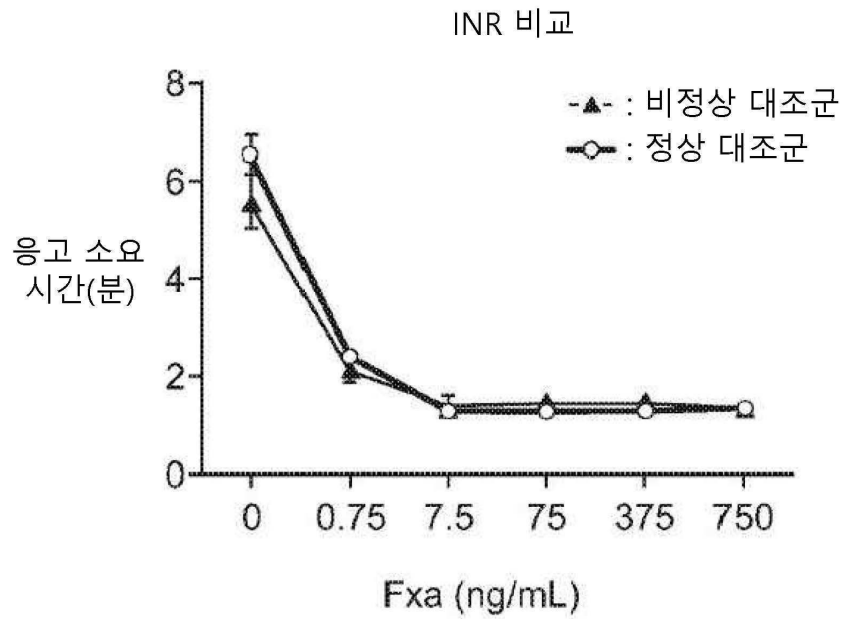
도면19e



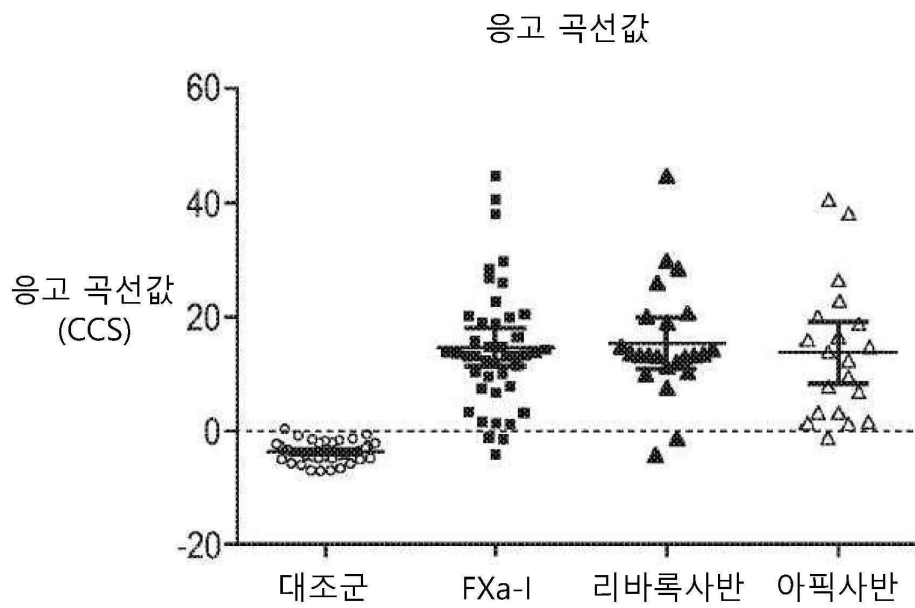
도면19f



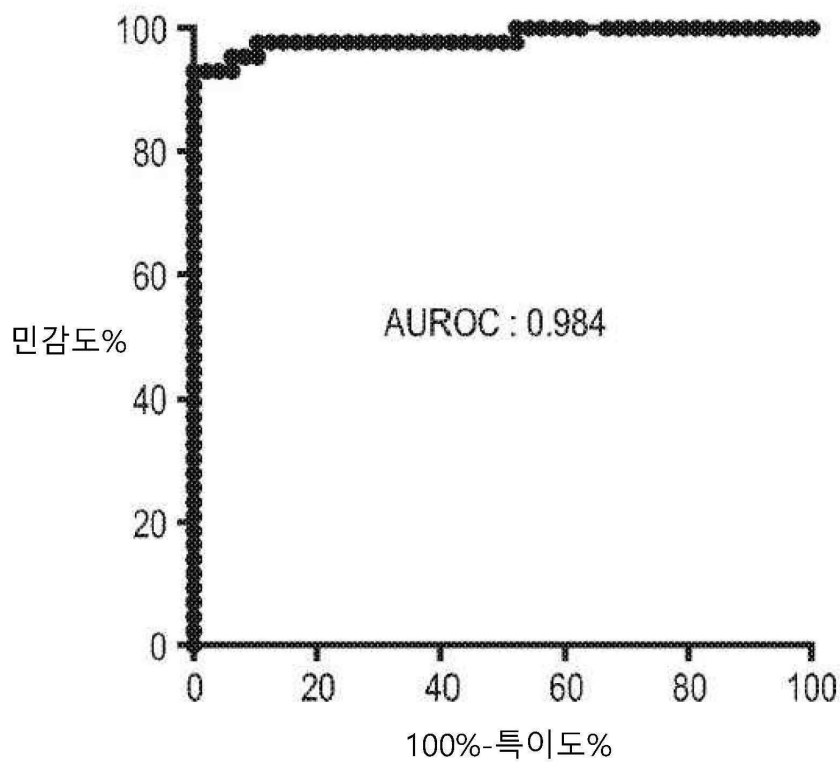
도면19g



도면20a



도면20b



도면20c

	대조군	FXa-I	리바록사반	아픽사반
95% CI	-3.2 – -4.2	11.5 – 18.1	10.7 – 20.4	8.3 – 19.3

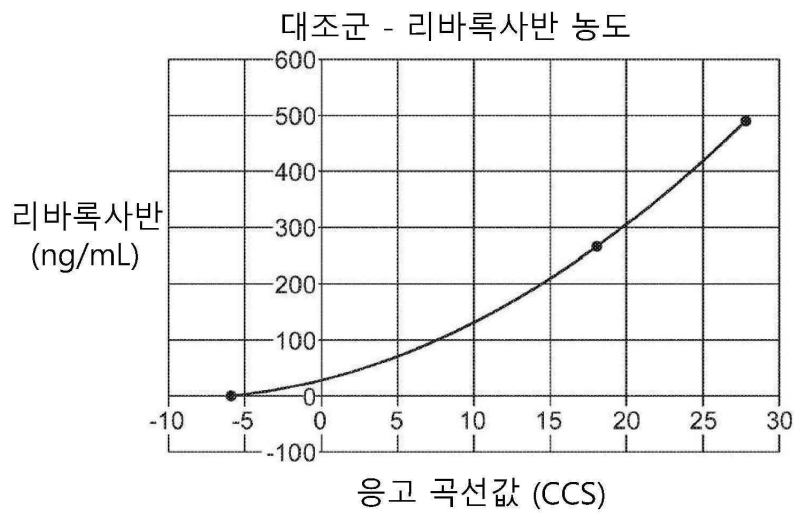
도면20d

	양성	음성	합계
FXa-I	40 ¹	3	43
대조군	1	47	48
합계	41	50	91

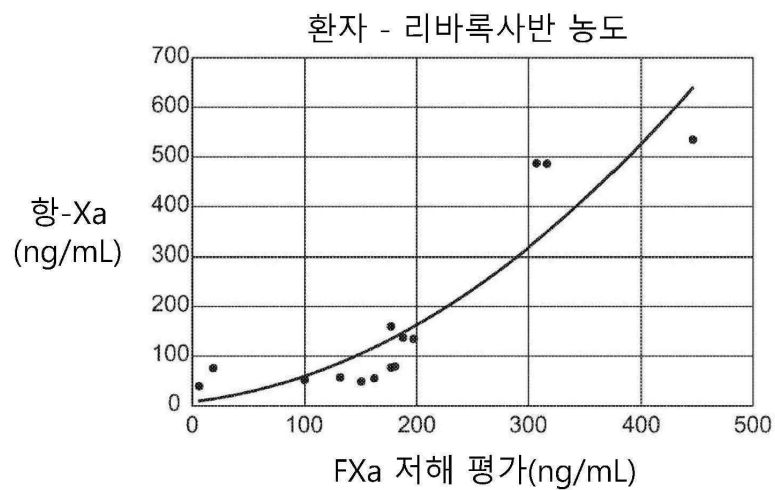
도면20e

측정	수치
민감도	93.02%
특이도	97.92%
유덴 지수	0.91

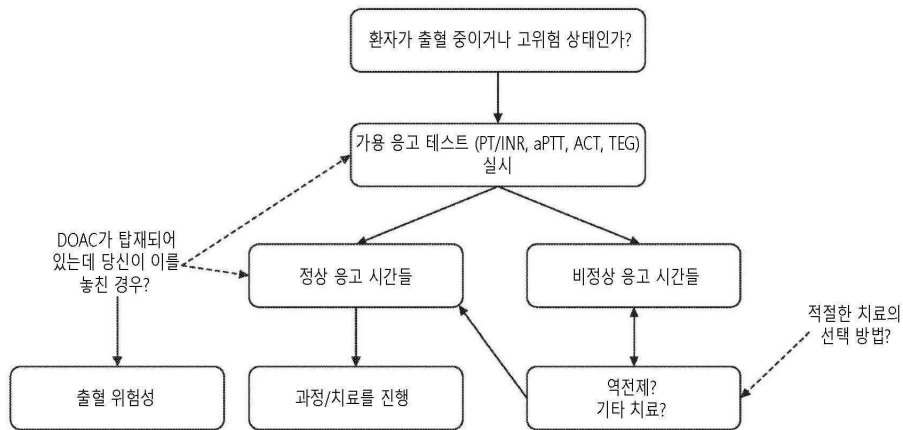
도면21a



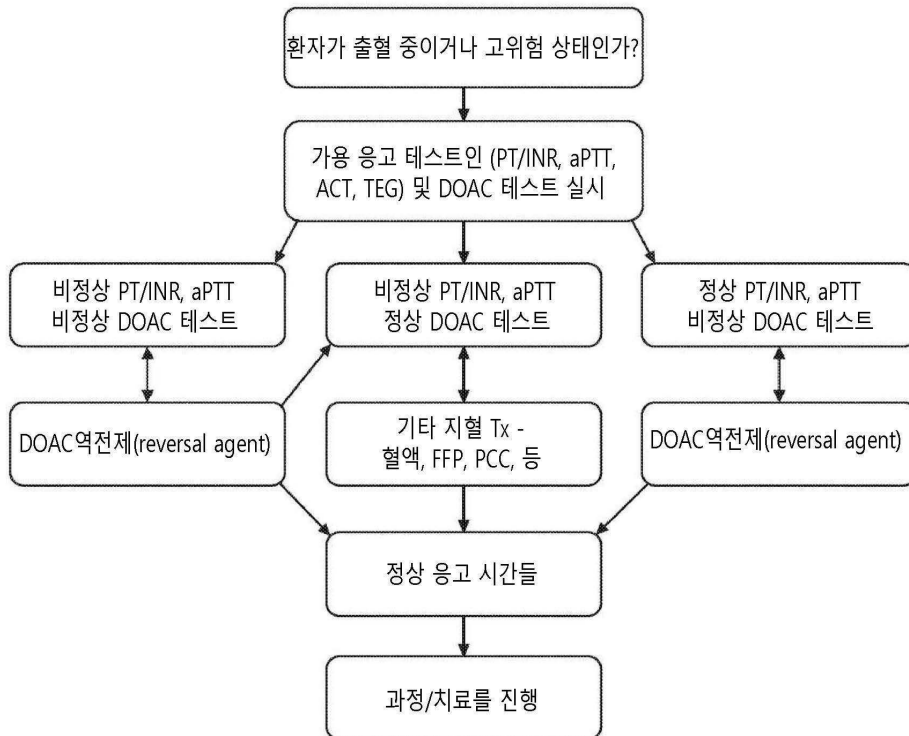
도면21b



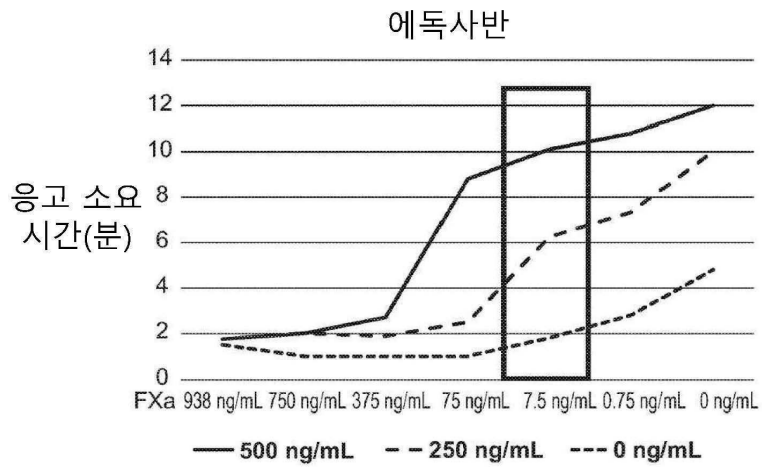
도면22



도면23



도면24a



도면24b

