



IP
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0617460-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0617460-4

(22) Data do Depósito: 18/10/2006

(43) Data da Publicação do Pedido: 26/04/2007

(51) Classificação Internacional: G01N 33/86

(30) Prioridade Unionista: JP 2005-358448 de 13/12/2005; JP 2006-036148 de 14/02/2006; JP 2005-302557 de 18/10/2005; JP 2005-334594 de 18/11/2005; JP 2005-308065 de 24/10/2005; JP 2006-234270 de 30/08/2006

(54) Título: APARELHO QUE MONITORA A FORMAÇÃO DE TROMBO PELO ESCOAMENTO DE SANGUE ANTICOAGULADO ATRAVÉS DE UM CANAL QUE SIMULA UM VASO SANGUÍNEO ENQUANTO LIBERA UM TRATAMENTO DE ANTICOAGULAÇÃO OU QUE PROMOVE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA, E, MÉTODO IN VITRO PARA MONITORAR A FORMAÇÃO DE TROMBO.

(73) Titular: FUJIMORI KOGYO CO., LTD., Companhia Japonesa. Endereço: 1-23-7, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, JAPÃO(JP)

(72) Inventor: KAZUYA HOSOKAWA

Código de Controle: 25FC7BB95029B63A 1B8D68AA002E4059

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 02/10/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“APARELHO QUE MONITORA A FORMAÇÃO DE TROMBO PELO ESCOAMENTO DE SANGUE ANTICOAGULADO ATRAVÉS DE UM CANAL QUE SIMULA UM VASO SANGUÍNEO ENQUANTO LIBERA UM TRATAMENTO DE ANTICOAGULAÇÃO OU QUE PROMOVE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA, E, MÉTODO *IN VITRO* PARA MONITORAR A FORMAÇÃO DE TROMBO”

CAMPO TÉCNICO

[0001] A presente invenção diz respeito a um método para monitorar a eficácia de uma droga antitrombótica administrada a um paciente ou semelhante, e especificamente, a um aparelho para, e um método de avaliar de modo abrangente a coagulação sanguínea e formação de trombo de plaqueta sob um ambiente equivalente à corrente sanguínea com um sangue integral ou plaquetas contendo plasma.

FUNDAMENTO DA TÉCNICA

[0002] Por exemplo, a aterotrombose, tal como, o infarto do miocárdio causa séria formação de trombo tal que uma placa ateromatosa é quebrada em um local de arteriosclerose, as plaquetas são aderidas no colágeno que incluem fatores teciduais expostos à corrente sanguínea. Além disso, a agregação de plaqueta, a ativação de um sistema de coagulação sanguínea, e outros que ocorrem de modo complexo resultam em trombos obstrutivos sérios. A cardiopatia, tal como, infarto do miocárdio, é uma doença séria e é a segunda que leva à causa das mortes totais no Japão.

[0003] Entretanto, a formação de trombo procede apenas em uma região aterosclerótica no infarto do miocárdio e, uma tendência trombótica no corpo todo não é extremamente procedente. Os exames *in vitro* são inadequados para a avaliação da tendência trombótica em uma tal trombose e o monitoramento do efeito antitrombótico na terapia antitrombótica. Desse modo, é importante tornar inclusivas as avaliações na coagulação e plaquetas (adesão e aglutinação) na presença da corrente sanguínea.

[0004] Antes, a coagulabilidade sanguínea foi avaliada determinando-se o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), o tempo de tromboplastina (PT) usando-se

o plasma. O APTT reflete principalmente a coagulação intrínseca e o PT reflete principalmente a coagulação extrínseca. O exame de plaquetas de sangue é realizado usando-se plasma rico em plaqueta e adicionando-se uma substância de ativação de plaqueta tal como ADP ou colágeno para avaliar, por meio disso, a coagulabilidade de plaquetas a partir de uma alteração na taxa de permeação deste ou coisa semelhante. Além disso, o tempo de coagulação do sangue integral pode ser determinado com o tempo de coagulação do sangue integral, o tempo de coagulação do sangue integral depois da re-adição de cálcio, e outros.

[0005] Além disso, um sistema de exame que usa o sangue integral utiliza tromboelastograma, que monitora a ativação de fatores de coagulação, a aglutinação de plaqueta e outros.

[0006] Entretanto, o trombo cresce no sangue in vivo. Em contraste, o método de exame acima ou semelhante é determinado in vitro isto é, no estado fechado. Desse modo, o estado de crescimento de trombo in vivo não pode ser observado.

[0007] Como proposto para resolver os problemas acima, o Documento de Patente 1 e os Documentos não de Patentes 2 e 3 divulgam o método que inclui levar o sangue fornecido com uma droga antitrombótica a ser avaliada para passar em uma célula de colágeno e monitorar a adesão ou a aglutinação das plaquetas por rotulação de modo fluorescente das plaquetas com um microscópio confocal.

[0008] Entretanto, na invenção descrita no documento, a observação é realizada na presença de uma droga de anticoagulação. Desse modo, o fato que um trombo que é causado pela adesão ou aglutinação de plaquetas ocorrido no sistema de coagulação sanguínea não é formado ou a geração de capacidade de trombo é diminuída, é avaliada pelo monitoramento de uma mudança morfológica na plaqueta. Desse modo, a avaliação não reflete a ativação de plaqueta de interligação com o sistema de coagulação. Portanto, uma tal invenção é favorável para a avaliação da eficácia de uma droga antiplaqueta mas é incapaz de monitorar um trombo próprio e o processo todo de formação de trombo. Além disso, um microscópio de fluorescência é caro, desse modo, dificilmente será usado para exame geral.

[0009] Além disso, no Documento de Patente 2, a fluidez do sangue anticoagulado é determinada pela passagem do sangue através de uma célula de silício semelhante a pente fino. Do mesmo modo, o processo do Documento de Patente 2 também usa o sangue anticoagulado, assim, a influência de um sistema de coagulação não pode ser determinado. Além disso, a viscosidade de sangue no processo tem grande variação individual e na variação diurna, assim, é difícil refletir terapia de droga na viscosidade do sangue.

[0010] A plaqueta é ativada pelo sistema de coagulação, enquanto o sistema de coagulação é promovido pelas plaquetas ativadas. Em outras palavras, o sangue anticoagulado também inibe a ativação de plaquetas, assim, a eficácia de uma droga antitrombótica não pode ser observada. Além disso, o sangue coagula prontamente a menos que qualquer tratamento de anticoagulação não seja realizado, assim, não pode ser usada em um exame.

Documento de Patente 1: JP 2004-251630 A

Documento de Patente 2: JP 2006-145345 A

Documento não de Patente 1: Sangue. 1990;75:390-398

Documento não de Patente 2: Sangue. 1999; 1 de Agosto:94(3):968-75

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

[0011] A presente invenção foi feita em consideração das circunstâncias acima e pretende fornecer um aparelho e método de avaliar abrangentemente a coagulação sanguínea e a formação de trombo de plaqueta sob um ambiente equivalente à corrente sanguínea com um sangue integral ou plaquetas contendo plasma (no relatório descritivo da presente invenção, isto pode ser inclusivamente referido como “sangue”) quando se monitora a eficácia de uma droga antitrombótica administrada a um paciente ou semelhante.

MEIOS DE RESOLVER OS PROBLEMAS

[0012] Para resolver os problemas mencionados acima, a presente invenção fornece um aparelho para monitorar a formação de trombo, que monitora a formação de trombo escoando sangue anticoagulado através de um canal que simula um vaso sanguíneo enquanto libera um tratamento de anticoagulação ou que promove uma

coagulação sanguínea, compreendendo: um câmara (do inglês, *chamber*) de formação de trombo em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz formação de trombo é fornecido; um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo e através do qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo; e um tubo de droga que é conectado ao tubo de entrada e através do qual uma droga que promove coagulação sanguínea (a seguir pode ser referido como “promoção de coagulação”) ou uma droga que libera o tratamento de anticoagulação é fornecido. Na presente invenção, o termo “monitorar” significa não apenas avaliação visual da formação de trombo com os olhos, uma imagem, mas também a avaliação do grau de formação de trombo em termos numéricos pela determinação de pressão ou coisa parecida.

[0013] Além disso, a presente invenção fornece um aparelho para monitorar a formação de trombo que compreende um câmara de formação de trombo em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz formação de trombo é fornecido; um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo e através do qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo; e um tubo de entrada de inibidor da formação de trombo que é conectado à câmara de formação de trombo e mistura um inibidor da formação de trombo com o sangue depois de passar através da câmara de formação de trombo.

[0014] Neste caso, o aparelho para monitorar a formação de trombo é preferivelmente formado em um material base.

[0015] O aparelho para monitorar a formação de trombo da presente invenção preferivelmente ainda compreende uma bomba para pressurizar o tubo de entrada e/ou o tubo de droga ou uma bomba para aspirar um tubo de descarga que é conectado à câmara de formação de trombo e fornecido para descarregar o sangue da câmara de formação de trombo.

[0016] O aparelho para monitorar a formação de trombo da presente invenção, preferivelmente, ainda inclui uma camera (do inglês, *camera*) para capturar imagens de um aparelho de medir pressão e uma câmara de formação de trombo.

[0017] Além disso, o material indutor de trombo preferivelmente compreende

colágeno.

[0018] Mais preferivelmente, o material indutor de trombo ainda compreende um fator de tecido (tromboplastina de tecido).

[0019] Além disso, a presente invenção fornece um método para monitorar a formação de trombo, compreendendo: fluxo sanguíneo anticoagulado em uma câmara de formação de trombo, em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz formação de trombo é fornecido, enquanto libera um tratamento de anticoagulação ou que promove uma coagulação sanguínea para monitorar, deste modo, a formação de trombo. Na presente invenção, o termo “escoando o sangue enquanto libera o tratamento de anticoagulação ou, que promove a coagulação sanguínea” pode ser um estado onde uma reação que libera anticoagulação ou uma reação que promove a coagulação no canal está ocorrendo e, inclui um estado onde uma droga que libera um agente que libera anticoagulação, ou um agente que promove anticoagulação é escoado enquanto se mistura com o sangue no canal ou, um estado onde o agente que libera anticoagulação ou o agente que promove coagulação é prontamente escoado depois da mistura com o sangue.

[0020] No método para monitorar a formação de trombo da presente invenção, é preferível que o tratamento de anticoagulação seja um tratamento com um quelante de cálcio, tal como, ácido cítrico e o tratamento de anticoagulação é liberado com um doador de cálcio livre.

[0021] No método para monitorar a formação de trombo da presente invenção, é preferível que o tratamento de anticoagulação é um tratamento com um aptâmero de trombina e o tratamento de anticoagulação é liberado com o DNA anti-sentido do aptâmero de trombina.

[0022] Aqui, no método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção, é preferível monitorar a formação de trombo escoando sangue anticoagulado em uma câmara de formação de trombo, enquanto promove a coagulação sanguínea sem a liberação do tratamento de anticoagulação. Neste caso, um meio para a promoção de coagulação sanguínea é preferivelmente a

adição de tromboplastina de tecido.

[0023] Além disso, no método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção, o sangue que foi anticoagulado com um tipo ou mais tipos de agentes de anticoagulação é preferivelmente a forma liberada do tratamento de anticoagulação com pelo menos um tipo de agente de liberação de tratamento de anticoagulação que corresponde ao agente de tratamento de anticoagulação usado. Aqui, é preferível que os agentes de tratamento de anticoagulação são um inibidor de fator de fase de contato e um quelante de cálcio e o agente de liberação de tratamento de anticoagulação é um doador de cálcio livre. Além disso, também é preferível que os agentes de tratamento de anticoagulação são um inibidor de fator de fase de contato e heparina e o agente de liberação de tratamento de anticoagulação é heparinase. Além disso, também é preferível que os agentes de tratamento de anticoagulação sejam um inibidor para um fator de fase de contato, tal como, um fator XII de coagulação sanguínea, calicreína ou outros e um aptâmero de trombina e, o agente de liberação de tratamento de anticoagulação é o DNA anti-sentido do aptâmero de trombina. O inibidor para o fator XII de coagulação sanguínea é preferivelmente um inibidor da tripsina derivada do milho.

[0024] No método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção, é preferível determinar a pressão no período de fluxo de entrada e/ou fluxo de saída do sangue na câmara de formação de trombo.

[0025] No método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção, o material indutor de trombo preferivelmente compreende colágeno e um fator de tecido.

EFEITOS DA INVENÇÃO

[0026] De acordo com o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da reivindicação 1 da presente invenção, o aparelho compreende: uma câmara de formação de trombo em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz a formação de trombo é fornecido; um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo e através do qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo; e um tubo de droga que é conectado ao tubo de

entrada e através do qual uma droga que libera o tratamento de anticoagulação ou uma droga que promove a coagulação sanguínea é fornecido. Portanto, o sangue anticoagulado, que é tratado de modo que impede o sangue coletado depois da administração da droga antitrombótica a um paciente de coagular no canal, estendendo-se à câmara de formação de trombo, pode ser monitorado pela formação de modo intencional de um trombo em uma câmara de formação de trombo. Desse modo, a eficácia de uma droga antitrombótica pode ser especificamente monitorada no ambiente similar no interior do corpo humano. Além disso, um agente de tratamento de anticoagulação pode ser usado no período de amostragem do sangue. Portanto, há uma vantagem nessas amostras depois que a amostragem de sangue pode ser armazenada por um certo período de tempo e o tempo de exame pode ser aleatoriamente selecionado.

[0027] De acordo com o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da reivindicação 2 da presente invenção, o aparelho compreende: uma câmara de formação de trombo em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz a formação de trombo é fornecido; um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo e através do qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo; e uma entrada para um inibidor da formação de trombo, que é conectada à câmara de formação de trombo e mistura o inibidor da formação de trombo com o sangue depois de passar através da câmara de formação de trombo. Portanto, a observação de trombo pode ser realizada de uma maneira como descrita acima. Além disso, a coagulação sanguínea não procede a jusante na câmara de formação de trombo, portanto, a influência na determinação da pressão pode ser evitada e mudanças de pressão mais delicadas podem ser monitoradas.

[0028] Uma pequena quantidade de sangue pode ser monitorado quando o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção é formado em um material base. Além disso, o aparelho é fornecido com uma bomba para pressurizar o tubo de entrada e/ou o tubo de droga ou uma bomba para aspirar um tubo de descarga que é conectado à câmara de formação de trombo e fornecido

para descarregar o sangue da câmara de formação de trombo. Portanto, o sangue e a droga para a promoção da coagulação sanguínea podem ser estavelmente escoados por um período predeterminado de tempo em pressão predeterminada ou taxa de fluxo predeterminada.

[0029] Se o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção compreende um aparelho de medir pressão, o grau de formação de trombo pode ser convertido em números, assim, uma avaliação quantitativa pode ser realizada.

[0030] O aparelho pode ser facilmente ajustado quando o material indutor de trombo compreende colágeno. A formação de trombo pode ser eficientemente induzida quando o material indutor de trombo ainda compreende um fator de tecido, tal como, tromboplastina de tecido junto com colágeno.

[0031] Além disso, se o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção compreende uma camera para capturar uma imagem da câmara de formação de trombo, a aparência da formação de trombo pode ser observada como uma imagem e a imagem pode ser então armazenada.

[0032] Além disso, de acordo com o método de monitoramento da formação de trombo da reivindicação 9 da presente invenção, o método compreende: monitorar a formação de trombo escoando-se sangue anticoagulado através de uma câmara de formação de trombo em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz a formação de trombo é fornecido, enquanto libera o tratamento de anticoagulação ou promovendo a coagulação sanguínea. Desse modo, a formação de trombo no material indutor de trombo pode ser monitorado escoando-se o sangue anticoagulado, que é obtido pela anticoagulação do sangue coletado depois da administração da droga antitrombótica a um paciente para prevenir a coagulação, enquanto promove a coagulação sanguínea. Portanto, a eficácia de uma droga antitrombótica pode ser especificamente monitorado no ambiente similar no interior do corpo humano. Além disso, um agente de anticoagulação pode ser usado para a amostragem do sangue. Portanto, há uma vantagem nessas amostras depois que a amostragem de sangue pode ser armazenada por um certo período de tempo e o

tempo de exame pode ser aleatoriamente selecionado. Se o tratamento de anticoagulação é um tratamento com um quelante de cálcio, tal como, ácido cítrico e o tratamento de anticoagulação é liberado por um doador de cálcio livre, o reagente pode ser facilmente obtido e, desse modo, é preferível. Se o tratamento de anticoagulação é um tratamento com um aptâmero de trombina e o tratamento de anticoagulação é liberado pelo DNA anti-sentido do aptâmero de trombina, é possível realizar o exame durante a reflexão a concentração de íon de cálcio fisiológico do sangue.

[0033] Além disso, de acordo com o método de monitoramento da formação de trombo da reivindicação 12 da presente invenção, este é capaz de monitorar a formação de trombo escoando-se sangue anticoagulado na câmara de formação de trombo sem realizar a operação de liberação do tratamento de anticoagulação, durante a indução da coagulação sanguínea. Portanto, a formação de trombo pode ser observada com uma pequena quantidade do sangue e o ônus do paciente pode ser reduzido. Neste caso, além disso, o tubo de droga não é sempre requerido, assim, o aparelho para o monitoramento da formação de trombo pode ser simplificado. Aqui, se tromboplastina de tecido é usada como um agente que promove coagulação sanguínea, a coagulação sanguínea pode ser promovida pela ativação do sistema de coagulação em um caminho alternativo que evita a ativação do fator XII e a ativação de calicreína para monitorar, deste modo, a formação de trombo na câmara de formação de trombo.

[0034] Além disso, a formação de trombo pode ser monitorada com um operação simples pela liberação do sangue anticoagulado obtido usando-se um tipo ou mais tipos de agentes de tratamento de anticoagulação com pelo menos um tipo de agente de liberação de tratamento de anticoagulação que corresponde ao agente de tratamento de anticoagulação usado. Neste caso, quando um tratamento de anticoagulação é realizado com um inibidor de fator de fase de contato e um quelante de cálcio, e o tratamento de anticoagulação é liberado com um doador de cálcio livre, ou quando um tratamento de anticoagulação é realizado com um inibidor de fator de fase de contato e, heparina e o tratamento de anticoagulação é liberado

com heparinase, o tratamento de anticoagulação que exerce um efeito no período de monitoramento da formação de trombo é um tratamento de anticoagulação com o inibidor de fator de fase de contato, portanto, o monitoramento de formação de trombo pode ser realizado sob condições mais fisiológicas, particularmente, durante a reflexão de um íon de metal bivalente associado com trombose, tal como, cálcio ou magnésio. Neste caso, quando o tratamento de anticoagulação é realizado com um inibidor de uma fase de contato, tal como, um fator XII de coagulação sanguínea ou calicreína e um aptâmero de trombina e, depois o tratamento de anticoagulação é liberado pelo DNA anti-sentido do aptâmero de inibição de trombina, o sangue pode ser armazenado durante um período prolongado. Além disso, o tratamento de anticoagulação pode ser eficientemente realizado quando um inibidor da tripsina derivado do milho é usado como o inibidor do fator XII de coagulação sanguínea.

[0035] Se o método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção realiza a medição de pressão no período de fluxo de entrada e/ou fluxo de saída do sangue na câmara de formação de trombo, o grau de formação de trombo pode ser convertido em números, assim, uma avaliação quantitativa pode ser facilmente realizada por um aparelho extremamente simples.

[0036] Além disso, se o material indutor de trombo compreende colágeno e o fator de tecido, o aparelho pode ser facilmente ajustado e a formação de trombo pode ser eficazmente induzida.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0037] A FIG. 1 é um diagrama esquemático que ilustra um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com uma primeira forma de realização da presente invenção.

[0038] A FIG. 2 (a) é um diagrama esquemático que ilustra as condições de instalação de um material indutor de trombo 15 dos Exemplos 3, 5, e 6 de acordo com a primeira forma de realização da presente invenção e, FIG. 2 (b) é um diagrama esquemático que ilustra os resultados de formação de trombo dos Exemplos 3, 5, e 6 de acordo com a primeira forma de realização da presente invenção.

[0039] A FIG. 3 (a) é um diagrama esquemático que ilustra as condições de instalação do material indutor de trombo 15 do Exemplo 4 da primeira forma de realização da presente invenção, e a FIG. 3 (b) é um diagrama esquemático que ilustra os resultados da formação de trombo do Exemplo 4 de acordo com a primeira forma de realização da presente invenção.

[0040] A FIG. 4 é um diagrama esquemático que ilustra uma parte principal de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo (corpo principal de um microchip) de acordo com uma segunda forma de realização da presente invenção.

[0041] A FIG. 5 é um diagrama esquemático que ilustra uma parte principal do aparelho para o monitoramento da formação de trombo (cobertura de um microchip) de acordo com a segunda forma de realização da presente invenção.

[0042] A FIG. 6 é um diagrama esquemático que ilustra a posição de formação de trombo do Exemplo 7 de acordo com a segunda forma de realização da presente invenção.

[0043] A FIG. 7 é um diagrama esquemático que ilustra uma parte principal de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de um outro exemplo (corpo principal de um microchip) de acordo com a segunda forma de realização da presente invenção.

[0044] A FIG. 8 é um diagrama esquemático que ilustra uma parte principal do aparelho para o monitoramento da formação de trombo (cobertura de um microchip) de um outro exemplo de acordo com a segunda forma de realização da presente invenção.

[0045] As FIGS. 9 são diagramas esquemáticos que ilustram partes principais de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de um outro exemplo de acordo com uma terceira forma de realização da presente invenção, onde a FIG. 9 (A) ilustra um desenho de conclusão, a FIG. 9 (B) ilustra um corpo principal de um microchip e, (C) ilustra uma cobertura do microchip.

[0046] A FIG. 10 é um diagrama esquemático que ilustra um sistema de monitoramento de trombo sistematizado usando o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção.

[0047] A FIG. 11(A) é um resultado obtido pela análise de um tromboelastograma, na forma de onda, de coagulação pela adição de 10 μM de cada um dos aptâmeros para exocyt I e exocyt II ao sangue e, depois do armazenamento do sangue em temperatura ambiente por 15 minutos, adicionando-se 40 μM de cada um dos DNAs anti-sentido de ambos os aptâmeros. A FIG. 11(B) ilustra o tromboelastograma na forma de onda do sangue somente depois da amostragem do sangue.

[0048] As FIGS. 12 são diagramas esquemáticos que ilustram partes principais de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com uma quarta forma de realização da presente invenção, onde a FIG. 12 (A) ilustra um desenho de conclusão, a FIG. 12 (B) ilustra uma cobertura de um microchip, e a FIG. 12 (C) ilustra um material base do microchip.

[0049] A FIG. 13 é um gráfico que mostra resultados de medições de pressão do Exemplo 17 (controle), Exemplo 18 (heparina) e, Exemplo 19 (Reopro).

[0050] A FIG. 14 é um gráfico que mostra os resultados de medições de pressão com adição de 0 (controle), 0,2, 0,5 e, 1 unidade/ml de heparina.

[0051] A FIG. 15 é um gráfico que mostra resultados de medições de pressão com adição de 0 (controle), 2, 5, e 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina.

DESCRIÇÃO DE NUMERAIS DE REFERÊNCIA

1 ...aparelho para o monitoramento da formação de trombo,

10, 110, 311, 411...câmara de formação de trombo,

11, 111...tubo de entrada,

12, 112, 312...tubo de droga,

13, 313, 413...tubo de descarga,

14, 114...porção de constrição,

15, 115, 315...material indutor de trombo,

16...trombo gerado,

20, 21, 320, 420...seringa,

30, 31, 330, 331, 414, 423...bomba,

40, 41, 340...sensor de pressão,

100...material base (corpo principal de microchip),
200...material base (cobertura de microchip),
100A, 100B, 100C...parte da conexão,
100D...circuito a ser medido a pressão,
100E...válvula de regulagem,
300, 400...microchip (aparelho para o monitoramento da formação de trombo),
306...unidade de controle de bomba,
307...computador,
308 ...microscópio estereoscópico fluorescente com camera CCD,
317...tubo de entrada de pressão,
322, 422...entrada de inibidor de coagulação de sangue,
412...tubo de conexão,
430...camera CCD,
431...lente,
432...fonte ótica de iluminação,
433...trilho para mover a camera,
A, B...sistema de monitoramento de trombo

MELHOR MODO PARA REALIZAR A INVENÇÃO

[0052] A seguir, a presente invenção será descrita com referência aos desenhos anexos de acordo com o melhor modo.

[0053] A FIG. 1 é um diagrama esquemático que ilustra uma primeira forma de realização do aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção.

[0054] Como mostrado na FIG. 1, o aparelho 1 para o monitoramento da formação de trombo desta forma de realização compreende uma câmara de formação de trombo 10; um tubo de entrada 11 que é conectado à câmara de formação de trombo e através da qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo; e um tubo de droga 12 que é conectado ao tubo de entrada e através do qual uma droga que libera o tratamento de anticoagulação ou uma droga que promove coagulação sanguínea é fornecido.

[0055] A câmara de formação de trombo 10 está na forma de uma configuração substancialmente cilíndrica fornecida com um material indutor de trombo que induz a formação de trombo em uma parte do interior deste e pode ser produzida a partir de um vidro transparente, uma resina termoplástica, ou semelhante. Os exemplos do material indutor de trombo incluem colágeno, vWF (fator de von Willebrand), trombo previamente preparado e materiais bases fibrosos de seda, algodão, ou semelhante. Estes materiais podem ser usados sozinhos ou em combinação de dois ou mais destes. Entre estes, colágeno é particularmente preferível porque pode ser facilmente obtido, facilmente manipulado e, fornecido como um modelo similar ao vaso sanguíneo real. O colágeno pode compreender um fator de tecido. O material indutor de trombo de colágeno ou vWF está preferivelmente em um estado de ser revestido dentro da câmara de formação de trombo 10 para impedir o material indutor de trombo de escoar com o fluxo de sangue. O revestimento pode ser facilmente realizado, por exemplo, como descrito na JP 05-260950 A ou Blood. 1 de abril de 1995; 85(7): 1826-35, pela dissolução de colágeno em uma solução ácida e mergulhando-o em um material base que tem hidrofiliçidade, tal como, vidro ou poliestireno, seguido por lavagem e secagem para revestir a superfície do material.

[0056] Além disso, é preferível que o material indutor de trombo de um material fibroso ou um trombo previamente preparado possa estar em um estado a ser fixo no interior da câmara de formação de trombo 10. Além disso, pela impregnação de um material fibroso fino higroscópico, tal como algodão, tecido não tecido ou, tecido de pano com colágeno e, a secagem destes, um material indutor de trombo com uma capacidade indutora de trombo superior podem ser obtidos. Além disso, o material base pode ser mergulhado em uma solução de colágeno contendo tromboplastina de tecido e depois secada para intensificar adicionalmente a capacidade indutora de trombo deste.

[0057] O material indutor de trombo pode ser selecionado dependendo do diâmetro interno da câmara de formação de trombo 10 e do monitoramento do objeto. Quando a aterotrombose, tal como, infarto do miocárdio é fornecido para um modelo, é preferível conter colágeno sozinho ou conter tanto colágeno quanto

tromboplastina de tecido. Além disso, é mais preferível que uma porção de constrição possa ser formada no canal da câmara de formação de trombo para fornecer a câmara de formação de trombo com uma tensão de cisalhamento. Além disso, no caso de um exame de trombo de infarto cardíaco cerebral ou semelhante, em que um trombo pode ser transferido de uma outra porção com fluxo sanguíneo e aderido para ocluir o vaso sanguíneo de uma outra porção, é preferível que uma pequena quantidade de trombo seja previamente aderida à câmara de formação de trombo 10 e fornecida como um material indutor de trombo, seguido pelo monitoramento do crescimento de trombo formado neste. No caso de um exame de trombose do capilar sanguíneo, o interior do canal na câmara de formação de trombo pode ser dividido em uma pluralidade de canais cada um tendo uma largura ou espessura limitada de 10 a 30 μm . Se a câmara de formação de trombo 10 tem uma porção de constrição com 100 μm ou menos de largura ou espessura, o canal pode ser ocluído com uma pequena quantidade de trombo formado em uma tal porção de constrição. Portanto, portanto não há necessidade de usar um material indutor de trombo adicional, assim, a formação de trombo pode ser monitorada por um agente que promove a coagulação sanguínea ou um agente que libera anticoagulação. Portanto, a presente invenção inclui essa porção de constrição como um material indutor de trombo.

[0058] O material indutor de trombo pode ser apenas o revestimento com colágeno ou vWF. A câmara de formação de trombo 10 na porção de revestimento pode ser preferivelmente constringida e fornecida para uma porção de constrição 14, assim, a agregação de plaqueta induzida por tensão de cisalhamento alta pode ser monitorada. No caso do revestimento com colágeno como um material indutor de trombo, é preferível que pelo menos o material base em uma porção a ser fornecida para uma base é feita de vidro ou plástico plano para obter excelente adesividade. Além disso, uma porção em que a câmara de formação de trombo 10 ou uma porção onde o material indutor de trombo da câmara de formação de trombo 10 a ser formado pode ser construído como um cassete destacável. Este caso é preferível porque o trombo resultante pode ser facilmente lavado ou observado ou o material

indutor de trombo pode ser facilmente trocado por um novo. Neste caso, o cassete pode formar uma conexão impermeável a líquido com um anel O de borracha de silicone ou semelhante. Preferivelmente, a extremidade do cassete oposto à extremidade deste que se conecta ao tubo de entrada 11 da câmara de formação de trombo 10 pode ser conectada a um tubo de descarga 13 que permite a descarga do sangue. Preferivelmente, o tubo de descarga 13 pode ser dividido com um garrote e a ponta deste pode ser então fornecida com um calibre de pressão 41 tal como um do tipo diafragma. Por outro lado, a ponta do tubo de descarga 13 é preferivelmente conectada a um recipiente de armazenamento (não mostrado).

[0059] O tubo de entrada 11 conectado à câmara de formação de trombo 10 pode ser fabricado usando um vidro transparente, uma resina termoplástica, ou semelhante. A extremidade do tubo de entrada 11, que é oposta à outra extremidade deste conectando-se à câmara de formação de trombo 10, é conectada a um seringa 20 que fornece sangue. A seringa 20 é conectada a uma bomba 30 e uma pressão (não mostrada) significa, então que o pistão da seringa 20 é prensada em pressão predeterminada. A bomba pode ser uma bomba geral comercialmente disponível. Alternativamente, a bomba pode ser uma bomba de seringa construída pela extrusão da seringa com ar em uma pressão constante ou, invertendo a seringa de modo que o pistão fique no topo e, colocando-se um peso no pistão.

[0060] O tubo de entrada 11 pode ser preferivelmente dividido por um garrote e a extremidade deste é preferivelmente provida com um calibre de pressão 40 tal como um do tipo diafragma em uma parte do tubo de entrada 11 perto da câmara de formação de trombo 10.

[0061] O sangue na seringa 20 é submetido a um tratamento de anticoagulação. Os exemplos do agente de tratamento de anticoagulação usado no tratamento de anticoagulação incluem citrato de sódio ou citrato de potássio, oxalato de sódio ou oxalato de potássio, Citrato Dextrose Ácido (ACD) e, a etilenodiaminotetraacetato (EDTA). Um tal agente de tratamento de anticoagulação pode ser usado na forma de pó, um produto liofilizado ou, uma solução, tal como, uma solução aquosa. Entre esses agentes de anticoagulação, o citrato de sódio a 3,2 % geral é preferível

porque é facilmente obténível. Neste caso, um volume do agente de tratamento de anticoagulação é preferivelmente misturado com 9 volumes de sangue.

[0062] No geral, o sangue integral ou plasma sem um agente de tratamento de anticoagulação é coagulado em alguns minutos. A coagulação pode ser reduzida ou eliminada pela adição de um quelante de cálcio, tal como, citrato. Em particular, foi relatado que o citrato pode inibir a aglutinação e funções de protrombinase e tenase exógena e intrínseca.

[0063] O sangue tratado com citrato pode ser armazenado na forma líquida por um período predeterminado de tempo (por exemplo, de algumas horas a alguns dias) e processado nas preparações de sangue, tal como, um produto de citafereze, plasma rico em plaqueta e, plasma pobre em plaqueta. O plasma que contém pode ser armazenado em cerca de -70°C ou menos por um período prolongado (de alguns meses a alguns anos). Na presente invenção, o sangue integral e o plasma também podem ser usados e, neste caso, o cálcio ou semelhante podem ser preferivelmente adicionados novamente.

[0064] Entretanto, no geral, o sangue integral ou plasma novamente adicionados com cálcio são espontaneamente coagulados devido à ativação de contato em qualquer um da maioria dos recipientes de armazenamento. Neste caso, a ativação de contato pode ocorrer dentro de cerca de 2 a 4 minutos. Por esta razão, na presente invenção, o sangue recentemente preparado por um tratamento de citrato depois da amostragem do sangue, o sangue preparado por um tratamento de citrato depois de ser congelado para armazenamento e depois descongelado ou, o plasma contendo plaqueta podem ser adicionados com um agente que libera anticoagulação, tal como, cálcio, somente depois do monitoramento de trombo.

[0065] Outros agentes de anticoagulação podem incluir heparina, hirudina, hirulog (peptídeo de região de terminal C de hirudina), aprotinina, anticorpo de antitrombina, aptâmero de trombina, inibidor da tripsina derivada do milho (1977, J. Biol. Chem 252, 8105). Estes materiais inibem a coagulação sanguínea pela inibição de uma coagulação em cascata como um resultado da inibição de um fator de coagulação sanguínea, desse modo, serão algumas vezes referidos como

“inibidores do fator de coagulação” no relatório descritivo da presente invenção.

[0066] O sangue para o monitoramento pode ser testado por qualquer método, tal como, um método em que o inibidor do fator de coagulação é previamente colocado em uma seringa ou um recipiente que coleta sangue a vácuo e o sangue é então coletado ou, um método em que um inibidor do fator de coagulação é rapidamente adicionado ao sangue somente depois da amostragem do sangue, para obter, desse modo, sangue anticoagulado.

[0067] Além disso, o sangue é coletado em um recipiente que coleta sangue a vácuo contendo um inibidor do fator de coagulação, tal como, heparina e, depois heparinase e um agente de tratamento de anticoagulação adequado para o monitoramento do objeto são adicionados para decompor heparina de modo que a heparina seja substituída por um agente de tratamento de anticoagulação adequado para o monitoramento do objeto. Além disso, o sangue é coletado em um recipiente que coleta sangue a vácuo contendo ácido cítrico e depois adicionado com um inibidor do fator de coagulação adequado para o monitoramento do objeto, tal como, cloreto de cálcio, um inibidor da tripsina derivada do milho, ou um aptâmero de trombina. Portanto, o sangue anticoagulado pode ser coletado dependendo do monitoramento do objeto.

[0068] O tubo de droga 12 conectado à câmara de formação de trombo 10 pode ser fabricado usando-se um vidro transparente, uma resina termoplástica, ou semelhante. A extremidade do tubo de droga 12, que é oposto ao outro lado deste, conectando-se à câmara de formação de trombo 10, é conectado a uma seringa 21 para o fornecimento de uma droga que libera o tratamento de anticoagulação ou uma droga que promove a coagulação sanguínea. A seringa 21 pode ser conectada a uma bomba 31 e uma pressão (não mostrada) significa que o pistão da seringa 21 pode ser prensado em pressão predeterminada. A bomba pode ser uma bomba geral comercialmente disponível. Alternativamente, a bomba pode ser uma bomba de seringa construída pela extrusão da seringa com ar em uma pressão predeterminada ou, invertendo a seringa de modo que o pistão fique no topo e, colocando-se um peso em um pistão. O tubo de droga 12 é enchido com um agente

que libera anticoagulação ou um agente que promove coagulação, como descrito posteriormente.

[0069] Para realizar o monitoramento do trombo com o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção, por exemplo, a seringa 20 é enchida com o sangue integral e plasma de plaqueta submetido a um tratamento de anticoagulação com um tratamento de citrato de sódio (solução A). A seringa 21 é enchida com uma droga que libera o tratamento de anticoagulação, tal como, uma solução de cloreto de cálcio (solução B). A solução A e a solução B são fornecidas no tubo de entrada 11 pelas bombas 30 e 31, respectivamente, assim, a solução B pode ser atingida a uma concentração de 5 a 20 mmol em que a coagulação em cascata da solução A pode ser iniciada. Subseqüentemente, a solução A e a solução B são misturadas no tubo de entrada 11, de modo que a mistura seja escoada na câmara de formação de trombo 10. Além disso, por exemplo, colágeno ou semelhante, capaz de induzir a formação de trombo são previamente aplicados em uma parte do interior da câmara de formação de trombo 10 para formar um material indutor de trombo. A câmara de formação de trombo pode ser fabricada usando-se, por exemplo, um tubo plástico transparente. A formação de trombo pode ser facilmente monitorada por um aparelho para monitorar a passagem de sangue através de uma tal câmara de formação de trombo transparentemente visível 10.

[0070] O monitoramento da formação de trombo pode ser avaliado com observação visual escoando-se o sangue por um período predeterminado de tempo através de um célula (câmara de formação de trombo 10) tratada com colágeno e depois removendo-se o sangue desta. Quando a bomba para a alimentação da solução A e da solução B é acionada por ar, a solução A e a solução B podem ser alimentada em pressão constante. Portanto, a formação de trombo no colágeno pode ser monitorada por uma diminuição na taxa de fluxo do sangue descarregado do tubo de descarga 13. Alternativamente, quando um calibre de pressão é montado nas partes perto da câmara de formação de trombo 10 do tubo de entrada 11 e do tubo de descarga 13, a formação de trombo no colágeno pode ser monitorada pela

observação de uma mudança na pressão interna da câmara de formação de trombo 10. Alternativamente, pode ser observado sob microscópio provendo-se a câmara de formação de trombo 10 com uma espessura de 500 μm ou menos. Em particular, trombo com plasma rico em plaqueta pode ser facilmente observado porque é altamente visível e a formação de trombo deste, também pode ser observado a olho nu. Além disso, também é possível rotular fluorescentemente as plaquetas de sangue e monitorar a fluorescência deste com um microscópio de fluorescência pelo método descrito no Documento de Patente 1.

[0071] Os exemplos da droga para a liberação do tratamento de anticoagulação por um agente quelante, tal como, ácido cítrico incluem: haletos de cálcio, tais como, cloreto de cálcio, brometo de cálcio, e iodeto de cálcio; sais de cálcio inorgânico, tais como, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, nitrato de cálcio e, bicarbonato de cálcio; e sais de cálcio de ácidos orgânicos, tais como, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido algínico, ácido láctico, ácido glucônico, ácido glicérico e, ácido glicerofosfórico, que são compostos de cálcio fornecidos como doadores de cálcio livres.

[0072] O agente que libera anticoagulação pode ser selecionado e usado dependendo do inibidor do fator de coagulação quando um tratamento de anticoagulação é realizado com um inibidor do fator de coagulação (agente de tratamento de anticoagulação). Por exemplo, como um agente que libera anticoagulação quando o tratamento de anticoagulação com heparina é realizado, a protamina, heparinase ou anticorpo anti-heparina podem ser usados. Como um agente que libera anticoagulação, quando os tratamentos de anticoagulação são realizados com hirudina, hirulog e, aprotinina, o agente que libera anticoagulação, tal como, anticorpo anti-hirudina, anticorpo anti-hirulog e, anticorpo antiaprotinina, respectivamente, pode ser usado.

[0073] Os exemplos do agente que libera anticoagulação quando um tratamento de anticoagulação é realizado usando-se anticorpo de antitrombina como um inibidor do fator de coagulação incluem: uma trombina completamente inativada, tal como, uma trombina de PPACK; o fragmento de degradação de trombina e, um

polipeptídeo sintético contendo um epítipo de reconhecimento de anticorpo de trombina.

[0074] Os anticorpos usados no tratamento de anticoagulação ou a liberação de anticoagulação, preferivelmente, incluem anticorpos dos quais os domínios Fc são removidos por papainase ou semelhante, para minimizar os efeitos destes no sistema de complemento ou anticorpos, tais como, anticorpos de ovo de galinha sem a capacidade de ativar o sistema de complemento humano.

[0075] Quando um aptâmero de trombina (Blood. 1993 Jun 15; 81(12): 3271-6 ou J Mol Biol. 1997 Oct 10; 272(5): 688-98.), que é um oligo DNA de filamento simples, é usado como um agente de tratamento de anticoagulação, uma substância que liga-se ao aptâmero de trombina e inibe as funções deste, tal como DNA anti-sentido ou RNA de anti-sentido, pode ser usado como um agente que libera anticoagulação. Quando dois tipos de aptâmero de trombinas, um reconhecendo exocyt I e o outro reconhecendo exocyt II, são usados na combinação, um efeito extremamente superior do tratamento de anticoagulação pode ser obtido em comparação com o caso em que cada um deles é usado sozinho. O DNA anti-sentido usado neste caso pode ser um contra parte do aptâmero de trombina contanto que este inative substancialmente a função de antitrombina do aptâmero de trombina.

[0076] Além disso, um fato que o aptâmero de trombina e o DNA anti-sentido deste são eficazes como um agente de tratamento de anticoagulação e um agente que libera anticoagulação, respectivamente, serão descritos com referência aos exemplos de referência como descrito abaixo.

[0077] O sistema de coagulação não pode ser ativado dentro de algumas horas quando um tratamento de anticoagulação é realizado com heparina. Desse modo, o sangue pode ser armazenado por um longo período de tempo no monitoramento de uma formação de trombo. Entretanto, por exemplo, há um caso onde o tratamento de anticoagulação não é adequado para o exame do sangue coletado de um paciente submetido a administração de heparina.

[0078] Por outro lado, hirudina, hirulog e, anticorpo de antitrombina são

inibidores para a inibição da conversão de fibrinogênio em fibrina pela inibição de trombina que age no estágio final do sistema de coagulação. Entretanto, um fator de fase de contato (tal como, pré-caliceína ou fator XII) da coagulação em cascata é gradualmente ativado mesmo no caso de inibir completamente a trombina, assim, a ativação a montante da coagulação em cascata pode ocorrer. Portanto, há um caso que não é adequado para um armazenamento prolongado do sangue.

[0079] Também, aprotinina inibe a atividade de caliceína na fase de contato para atrasar a coagulação intrínseca sanguínea em cascata. Entretanto, a coagulação em cascata é gradualmente ativada mesmo sob a inibição de atividade de caliceína, assim, o sangue é coagulado depois de algumas horas mesmo na presença de aprotinina.

[0080] Portanto, no monitoramento da formação de trombo do sangue depois de cerca de algumas dezenas de minutos, é possível monitorar a formação de trombo pelo tratamento de anticoagulação com o inibidor de trombina e/ou aprotinina. Entretanto, pode não ser preferível no caso de requerer um longo tempo para começar o monitoramento do, ou requerer um longo tempo para o monitoramento.

[0081] Quando a formação de trombo é monitorada depois de uma hora ou mais da amostragem do sangue, um tratamento de anticoagulação pode ser realizado usando um aptâmero de trombina em combinação com um inibidor da tripsina derivada do milho, hirudina e, aprotinina. Alternativamente, uma pequena quantidade de heparina, por exemplo, menos do que 1 unidade/ml, que é um nível que não tem uma grande influência no tempo de coagulação, pode ser usado em combinação com um inibidor de fator de fase de contato ou um inibidor de trombina.

[0082] Um efeito extremamente superior do tratamento de anticoagulação pode ser obtido quando um aptâmero de trombina é usado em combinação com dois tipos de aptâmeros para exocyt I e exocyt II. Além disso, o DNA anti-sentido dos aptâmeros respectivos pode liberar o tratamento de anticoagulação, imediatamente.

[0083] Também, um inibidor de fator de fase de contato, tal como um inibidor da tripsina derivada do milho (inibidor do fator XII) ou aprotinina (inibidor de caliceína) e, um inibidor de trombina, tal como, um aptâmero de trombina, são adicionados a

uma amostra (sangue) antecipadamente e depois adicionados com o DNA anti-sentido do aptâmero de trombina (inibidor de aptâmero de trombina) ou semelhante. Desse modo, a função do inibidor de trombina sozinho é inibida para liberar a inibição funcional de trombina, seguida por escoar rapidamente a amostra na câmara de formação de trombo. Como um resultado, por exemplo, uma coagulação extrínseca em cascata pode ser ativada por um fator de tecido (tromboplastina de tecido) ou semelhante, assim, a coagulação sanguínea é promovida e a formação fisiológica de trombo pode ser monitorado.

[0084] Alternativamente, os tratamentos de anticoagulação podem ser realizados tanto com o agente de tratamento de anticoagulação quanto com o inibidor da tripsina derivada do milho que são capazes de liberar um tratamento de anticoagulação, tal como um quelante (ácido cítrico), heparina ou, semelhante; e um doador de cálcio livre, tal como, cloreto de cálcio ou, heparinase pode ser então deixada para liberar os tratamentos de anticoagulação correspondentes, seguido por permitir que o sangue seja escoado em uma câmara que forma trombo para promover a coagulação sanguínea pela ativação da coagulação extrínseca em cascata.

[0085] Neste caso, um material indutor de trombo pode conter, preferivelmente, uma quantidade apropriada de um fator de tecido (tromboplastina de tecido). Particular e preferivelmente, o material indutor de trombo pode ser revestido com uma mistura preparada pela mistura de colágeno com tromboplastina de tecido e depois secagem, porque a formação de trombo é promovida apenas na câmara de formação de trombo. Quando um material indutor de trombo revestido com uma solução de colágeno que contém um fator de tecido (tromboplastina de tecido) como um modelo de trombo ateromatoso é usado, o monitoramento que reflete um mecanismo patológico pode ser realizado.

[0086] Além disso, a formação de trombo pode ser monitorada adicionando-se o doador de cálcio livre e o inibidor de tripsina ao sangue submetido ao tratamento de anticoagulação com o quelante de cálcio, tal como, ácido cítrico, e escoando rapidamente o sangue na câmara de formação de trombo ou, adicionando-se

heparinase e inibidor de tripsina ao sangue submetido ao tratamento de anticoagulação com heparina, e depois, escoando rapidamente o sangue na câmara de formação de trombo. O método como descrito acima, em que o trombo é monitorado pela mistura do sangue anticoagulado obtido usando-se um tipo ou mais tipos de agente de tratamentos de anticoagulação com pelo menos um agente de liberação de tratamento de anticoagulação que corresponde ao agente de anticoagulação usado e depois escoando rapidamente o sangue na câmara de formação de trombo, pode utilizar um aparelho para o monitoramento da formação de trombo como ilustrado na FIG. 9 como descrito abaixo.

[0087] Os inibidores de trombina mencionados acima, tais como, hirudina e aptâmero de trombinas, inibidores moleculares inferiores sintetizados de fator de fase de contato, e agentes de tratamento de anticoagulação de proteína são caros comparados com qualquer um dos agentes de tratamento de anticoagulação, tais como, ácido cítrico e EDTA, que formam quelatos com cálcio e outros. Entretanto, estes não alteram as concentrações de íons de metal bivalente, tais como, cálcio, magnésio e, zinco, assim, a formação de trombo com as concentrações originais destes íons no sangue do paciente pode ser refletido para o monitoramento. Portanto, o monitoramento que mais reflete a condição clínica do paciente torna-se possível.

[0088] A coagulação sanguínea pode ser eliminada pela inibição de um fator de fase de contato, tal como, fator XII ativado ou calicreína. Entretanto, foi relatado que a ativação de XIIa e calicreína não contribui muito para o trombo ou hemostase fisiológica real. De fato, não há nenhuma descoberta de hemorragia ou coisa parecida mesmo em um paciente com deficiência congênita de fator XII, pré-calicreína ou, semelhante de modo algum. Particularmente, na aterotrombose, tal como, infarto do miocárdio, é vastamente conhecido que o sistema de coagulação é ativado por um fator de tecido devido à placa causada pela aterosclerose. O fator XII pode ser principalmente ativado por trombina na plaqueta ativada. Portanto, na realização de um tratamento de anticoagulação, quando um inibidor para a inibição da ativação do fator XII ou pré-calicreína ou um inibidor para a inibição do fator XII

ativado ou calicreína é usado como um agente anticoagulação, não há necessidade de adicionar o agente que libera anticoagulação. Adicionando-se qualquer substância que ativa coagulação extrínseca, tal como, um fator de tecido (por exemplo, tromboplastina de tecido) ou, um material indutor de trombo ao sangue em vez do agente de tratamento de anticoagulação ou pela adição da substância ao material indutor de trombo, o sistema de coagulação é ativado em um caminho alternativo que evita a ativação do fator XII e a ativação de calicreína para promover coagulação sanguínea, assim, o trombo pode ser monitorado na câmara de formação de trombo.

[0089] Assim como os agentes de tratamento de anticoagulação, que podem ser usados no monitoramento de uma formação de trombo depois de promover a coagulação sanguínea pela adição de uma substância que ativa a coagulação extrínseca, tal como, um fator de tecido sem a adição do agente que libera anticoagulação, os inibidores moleculares inferiores sintetizados, tais como, o inibidor de Calicreína PKSI-527 (Thromb Res 57: 889, 1990) e D-Phe-Arg-CK que é o inibidor do fator XII ativado (Cal Biochem, Co., Ltd.) são exemplificados. Além disso, os inibidores de proteína incluem anticorpos contra protease de fase de contato na coagulação em cascata, tal como anticorpo anti-calicreína, anticorpo anti-pré-calicreína, anticorpo do fator XII anti-coagulação, anticorpo do fator XII de coagulação anti-ativada e, inibidor da tripsina derivada do milho.

[0090] Para monitorar a formação de trombo depois de promover a coagulação sanguínea pela adição de uma substância que ativa a coagulação extrínseca sem a adição do agente que libera anticoagulação, particularmente, dos pontos de vista de disponibilidade e capacidade de anticoagulação, é preferível que o sangue seja uma vez submetido a um tratamento de anticoagulação com uma combinação de ácido cítrico e inibidor da tripsina derivada do milho ou uma combinação de aptâmero de trombina e inibidor da tripsina derivada do milho e, o sangue é armazenado depois disso, porque o grau de liberdade da operação de monitoramento pode ser elevado. Além disso, somente antes do monitoramento de trombo, um tratamento de anticoagulação com um inibidor da tripsina derivada do milho é mantida enquanto

um outro tratamento de anticoagulação é parcialmente liberado por um doador de cálcio livre ou pelo DNA anti-sentido de um aptâmero de trombina. Neste caso, como um modelo de trombo ateromatoso, é preferível ativar a coagulação extrínseca usando-se um material indutor de trombo revestido com colágeno ou colágeno contendo tromboplastina de tecido para promover a coagulação sanguínea.

[0091] Os recipientes usados no monitoramento de trombo, tais como, uma seringa para o fornecimento do sangue e um recipiente que coleta sangue à vácuo, são preferivelmente revestidos com heparina ou com um material que tem capacidade anti-trombo e compatibilidade sanguínea, tal como, lactoamida de polivinila (PVLA) ou acrilato de poli-2-metoxietila (PMEA).

[0092] Em um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com uma outra forma de realização da presente invenção, um tubo e uma câmara de formação de trombo podem ser integrados um com o outro em um material base por um canal fino, tal como, um microchip.

[0093] A FIG. 4 é uma vista plana de uma parte principal de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com um segundo aspecto da presente invenção. Na FIG. 4, um material base 100 é provido de ranhuras e um circuito é formado neste. Esta forma de realização é configurada como segue. Em um material base pequeno, uma câmara de formação de trombo como uma parte principal do aparelho para o monitoramento da formação de trombo, um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo e através do qual o sangue é escoado na câmara de formação de trombo e, um tubo de droga que é conectado ao tubo de entrada e através do qual um agente que libera anticoagulação ou uma droga que promove coagulação sanguínea é introduzido na câmara de formação de trombo são integrados uns com os outros e fornecidos como um circuito de microchip. Nesta forma de realização, as partes, outras que não a parte principal, que são integradas no material base são as mesmas daquelas da primeira forma de realização.

[0094] Na FIG. 4, um material base 100 é um corpo principal de um microchip e os materiais deste pode ser qualquer um entre metal, vidro, plástico, silicón e

outros. À luz da observação, um trombo ou semelhante, um material transparente é preferível. À luz da formação de um circuito, um material plástico é preferível. Portanto, um material plástico transparente é particularmente preferível. Quando este é feito de resina de silicone, tal como, polidimetila siloxano (PDMS), a adesividade deste é excelente. Desse modo, o circuito pode ser formado pela ligação de contato com uma cobertura sem adesivo ou semelhante. Quando um material base feito de poliestireno é usado, o canal pode ser facilmente revestido com PVLA e submetido a um tratamento anti-trombo. Além disso, PMEA também pode permitir um tratamento anti-trombo simples, eficaz (ver Exemplo de referência 4).

[0095] A FIG. 5 é uma vista plana de um material base a ser fornecido como uma cobertura do microchip que é sobreposta e ligada ao material base 100 da FIG. 4. Um material base 200 da FIG. 5 é um pedaço transparente de vidro ou uma placa ou uma lâmina que são formados de plástico ou semelhante. Um material base 200 é fornecido como uma cobertura, e é sobreposta e ligada ao material base 100, assim, o circuito do material base pode ser formado de uma câmara de formação de trombo 110, um tubo de entrada 111 e, um tubo de droga 112.

[0096] Para prover a superfície interna da câmara de formação de trombo 110 com um material indutor de trombo 115, por exemplo, colágeno ou semelhante podem ser aplicados na posição de ajuste predeterminada do material base 200. Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo que tem uma câmara de formação de trombo pode ser obtida quando o material base 100 e o material base 200 são ligados um ao outro pela junção ou ajuste enquanto se direciona a superfície aplicada colágeno do material base 200 interno. Pela razão de aplicação simples, colágeno pode ser preferivelmente aplicado ao material base plano 200 não tendo nenhuma ranhura. Além disso, a tromboplastina de tecido é preferivelmente aplicada depois da mistura com colágeno, porque um material indutor de trombo que tem uma capacidade indutora de trombo superior pode ser obtido. Além disso, para a formação de trombo de modo fácil com colágeno aplicado, o vidro que tem a porção aplicada de colágeno pode ser submetida ao tratamento adicional, tal como,

substituindo o vidro por um vidro fosco ou semelhante de modo que a área da superfície possa ser aumentada.

[0097] A parte da conexão 100A, a parte da conexão 100B e a parte da conexão 100C do material base 100 são conectados aos tubos (não mostrado) que formam partes do tubo de entrada, o tubo de droga, e o tubo de descarga, respectivamente. Desse modo, a parte da conexão 100A e a parte da conexão 100B são, cada uma, conectadas às bombas (não mostradas) através dos tubos. O sangue anticoagulado é injetado da parte da conexão 100A e, o agente que libera anticoagulação que corresponde ao agente de tratamento de anticoagulação é injetado da parte da conexão 100B.

[0098] De acordo com esta forma de realização, a formação de trombo pode ser monitorada com uma quantidade extremamente pequena de sangue, desse modo, a carga do paciente pode se tornar menor. Além disso, as plaquetas ligadas no material base 200 a partir do material base 200 lateral, podem ser monitoradas pela rotulação das plaquetas com um reagente fluorescente, tal como mepacrina.

[0099] Além disso, o circuito 100D tem uma extremidade selável na qual o ar é bloqueado. Desse modo, o circuito 100D é fornecido como um calibre de pressão. A extremidade do circuito 100D pode ser preferivelmente fornecida com um válvula de regulação 100E para aliviar a pressão ou aumentar a sensibilidade quando o circuito 100D é fornecido como um calibre de pressão. A válvula de regulação 100E pode ser fechada por uma tampa ou uma fita de adesão e o volume deste pode ser alterado com a embalagem, tal como, resina dependendo da sensibilidade requerida. O circuito 100D é formado de modo estreito para impedir o sangue de se misturar com ar e impedir o ar de escapar. A espessura do circuito 100D depende do material do material base 100, mas é de cerca de 0,1 mm a 0,5 mm. Se a impressão interna do tubo de entrada 111 do aparelho para o monitoramento da formação de trombo é aumentada pela formação de trombo, o ar no circuito 100D é comprimido pelo sangue, assim, o sangue anticoagulado pode ser introduzido no circuito 100D na medida exata. A impressão interna pode ser monitorada pelo movimento do sangue no circuito 100D em qualquer tempo.

[00100] A adesão de plaquetas ao colágeno, a ativação do sistema de coagulação nas plaquetas ativadas e, o acúmulo de plaquetas ativadas pela aglutinação de plaqueta pode ser monitorado pelo aparelho para o monitoramento da formação de trombo e/ou o método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção, respectivamente.

[00101] Além disso, para a reprodução da formação de trombo de aterotrombose, as porções de constrição 14 e 114 são formadas na câmara de formação de trombos 10 e 110, respectivamente. Portanto, o monitoramento, que também reflete uma aglutinação de plaqueta que cria tensão de cisalhamento, pode ser monitorado.

[00102] As FIGS. 9 são diagramas esquemáticos que representam a parte principal de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com uma terceira forma de realização da presente invenção. As FIGS. 9 descrevem um tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 322 e um tubo de entrada de pressão 317, que mistura a coagulação sanguínea inibidor com o sangue localizado a jusante da câmara de formação de trombo. Nesta forma de realização, o tubo de droga não é fornecido a montante da câmara de formação de trombo.

[00103] De acordo com a terceira forma de realização, o sangue coletado depois da adição de agentes de tratamento de anticoagulação (por exemplo, ácido cítrico e inibidor da tripsina derivada do milho) é ainda adicionado com um agente que libera anticoagulação (por exemplo, doador de cálcio livre) somente antes da medição e depois introduzido em uma seringa 320. Subseqüentemente, um líquido por enchimento por pressão do sangue, tal como, óleo mineral, é comprimido na seringa a partir de um tubo de entrada de pressão 317 conectado à seringa 320, extrusando-se, por meio disso, o sangue a um microchip 300.

[00104] Um aumento na pressão exercida na seringa de amostra 320 mostra um estado ocluído do canal com formação de trombo, assim, o monitoramento da formação de trombo com uma mudança na pressão é particularmente adequado para o monitoramento do um modelo de trombo ateromatoso forte em que um trombo obstrutivo é formado. O material indutor de trombo pode ser, mas não especificamente limitado a, um preparado de colágeno e um fator de tecido. Por

exemplo, um tal material indutor de trombo é eficaz para o monitoramento do trombo quando a coagulação sanguínea é promovida pela ativação da coagulação extrínseca.

[00105] No momento de medição de pressão, para uma medição mais correta de pressão no canal com formação de trombo, como mostrado nas FIGS. 9, um inibidor de coagulação sanguínea é introduzido pelo tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 322 e misturado com o sangue localizado a jusante da câmara de formação de trombo através de um canal formado no microchip 300. Desse modo, o sangue no canal subsequente à câmara de formação de trombo pode ser impedido da formação de trombo. Portanto, uma tal configuração é preferível porque uma mudança na pressão no canal, que é devido à constrição ou fechamento do canal com formação de trombo na câmara de formação de trombo, pode ser específica e exatamente medida.

[00106] Tal um inibidor de coagulação sanguínea pode ser preferivelmente, mas não especificamente limitado ao, agente de tratamento de anticoagulação usado na presente invenção. Em consideração a eficácia de custo e manuseabilidade, é preferível selecionar adequadamente qualquer um desses que impedem a coagulação sanguínea pela deformação albuminoidal, incluindo uma solução alcalina ou ácida, álcool, uréia, e SDSs.

[00107] Aqui, na forma de realização ilustrada nas FIGS. 9, o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção compreende uma bomba de sucção fornecida em um tubo de descarga 313 em vez de um tubo de entrada de pressão 317, assim, o aparelho pode determinar o grau de formação de trombo na base de uma mudança na pressão de sucção (pressão negativa). Uma tal configuração pode levar a uma medição mais eficiente enquanto se impede a ocorrência de uma situação que um líquido para a alimentação por pressão de óleo mineral ou semelhante seja misturado com o sangue em uma região de contato e a mistura é alimentada, quando a quantidade do sangue é pequena no caso de usar uma bomba que expulsa indiretamente o sangue por intermédio de um líquido separado em uma camada como descrito mais tarde.

[00108] Além disso, portanto, não há necessidade de usar um recipiente fechado tal como uma seringa como um recipiente (tanque de amostra) para o fornecimento do sangue no aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção. Desse modo, o recipiente pode não ter nenhuma cobertura e pode ser aberto ao ar. Como um resultado, o aparelho para o monitoramento da formação de trombo pode ser simplificado. Além disso, no aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção, a pressão interna do canal é negativa. Desse modo, quando o aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção é preparado a partir de um microchip, por exemplo, mesmo no caso de uma adesão incompleta entre o corpo principal do microchip e a cobertura do microchip, não há, de modo algum, nenhum vazamento do sangue. Em alguns casos, pode ser diretamente usado como um aparelho para o monitoramento da formação de trombo apenas pelo ajuste do corpo principal do microchip e a cobertura do microchip junto, com tanto que o ajuste seja exato.

[00109] A FIG. 10 ilustra um sistema de monitoramento de trombo sistematizado adicional A.

[00110] O sistema de monitoramento de trombo A da FIG. 10 enche uma bomba de micro-alimentação 330 com um líquido que tem uma densidade menor do que a do sangue. Depois, o líquido é comprimido em uma seringa de amostra 320 em que o sangue é colocado em um tubo de entrada de pressão 317 e depois disposto em camada no sangue, extrusando, desse modo, o sangue em um microchip 300. O sangue extrusado é misturado com o agente que libera anticoagulação injetado a partir de um tubo de droga 312, seguido pelo alcance a uma câmara de formação de trombo 311. Um líquido para o bombeamento do sangue em uma bomba de micro-alimentação 330 pode ser qualquer um de óleos e gorduras, tais como, parafina líquida, óleo mineral e, óleo de silicona, e uma solução salina normal. Deste modo, torna-se possível impedir tanto a bomba de micro-alimentação 330 quanto um sensor de pressão 340 de serem poluídos com o sangue pela extrusão do sangue de modo indireto.

[00111] Além disso, uma tal bomba para a extrusão do sangue de modo indireto

pelo líquido a ser separado em uma camada em relação ao sangue pode ser utilizada no aparelho para o monitoramento da formação de trombo de acordo com qualquer uma das formas de realização da presente invenção.

[00112] Além disso, o sensor de pressão 340 pode determinar a pressão aplicada na seringa de amostra 320 pela bomba de micro-alimentação 330.

[00113] Além disso, nesse sistema de monitoramento de trombo A, o estado de formação de trombo pode ser reconhecido em mais detalhes por uma análise de imagem. Em particular, no caso de rotulação de plaquetas e glóbulos brancos com quinacrina e depois monitoramento da adesão e a aglutinação deste à colágeno, a luminância por área de unidade devido ao desenvolvimento de cor de fluorescência é monitorado por uma análise de imagem. Desse modo, os resultados do monitoramento do podem ser avaliados e armazenados como dados. A análise da imagem pode ser realizada pelo processamento de uma imagem capturada por um microscópio estereoscópico fluorescente 308 com uma câmara CCD por um computador 307 e que representa a imagem em um mostrador.

[00114] Portanto, no sistema de monitoramento de trombo A, é possível para determinar um estado abrangente da formação de trombo a partir dos resultados da análise da imagem e uma mudança na pressão aplicada na seringa de amostra 320.

[00115] Além disso, um tal sistema de monitoramento de trombo pode ser sistematizado usando-se o aparelho para o monitoramento da formação de trombo de qualquer uma das formas de realização da presente invenção.

[00116] As FIGS. 12 são diagramas esquemáticos que ilustram um aparelho para o monitoramento da formação de trombo de uma quarta forma de realização da presente invenção. O aparelho para o monitoramento da formação de trombo é fornecido com uma camera para a observação da formação de trombo.

[00117] No aparelho para o monitoramento da formação de trombo, por exemplo, o sangue que é anticoagulado com ácido cítrico e um inibidor da tripsina derivada do milho é adicionado com um agente de liberação de tratamento de anticoagulação (por exemplo, doador de cálcio livre) e rapidamente enchido em uma seringa 420. A seringa 420 é aspirada por uma bomba 414 conectada a um tubo de descarga 413

para permitir que o sangue passe através de uma câmara de formação de trombo 411, formando, desse modo, um trombo. O grau de formação de trombo pode ser determinado pela alteração na pressão de sucção (pressão negativa).

[00118] Também, para impedir que o sangue, depois de passar através da câmara de formação de trombo se coagule, obstruindo, desse modo, um tubo de descarga 413 ou, de afetar em uma medição de pressão, um tubo de entrada de inibidor da formação de trombo 422 mistura um inibidor da formação de trombo com o sangue depois de passar através da câmara de formação de trombo.

[00119] Além disso, uma camera 430 (por exemplo, camera CCD) é disposta sob o microchip 400 para retirar uma imagem da câmara de formação de trombo, assim, o espaço acima do microchip pode ser eficazmente usado. Um trilho 433 é capaz de mover a camera 430 para frente e para trás e em volta da câmara de formação de trombo. Usando-se a camera 430 que tem uma função de armazenar sua posição quantificada como o eixo X e o eixo Y, pode capturar imagens enquanto se move regularmente em volta de uma pluralidade de pontos específicos. Como configurado acima, é possível monitorar o processo de formação de trombo com tempo sobre uma área ampla da câmara de formação de trombo 411 até a ampliação da camera 430 ser ajustada a um nível alto. Além disso, uma fonte ótica 432 (por exemplo, LED) é preferivelmente localizada em torno da camera 430, como a fonte ótica 432 pode ser simultaneamente movida enquanto mantém sua relação posicional com a camera 430. É preferível que a fonte ótica 432 seja capaz de irradiar a luz em um comprimento de onda que pode excitar uma substância fluorescente específica junto com luz branca dependendo de um material fluorescente que seja fornecido como uma imagem alvo, permitindo, desse modo, a excitação de vários materiais fluorescentes.

EXEMPLOS

[00120] A seguir, a presente invenção será descrita em detalhes com exemplos específicos. Entretanto, a presente invenção não é limitada a estes exemplos.

EXEMPLO 1

[00121] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo ilustrado na

FIG. 1 é usado para encher uma seringa 20 com 50 ml de um sangue tratado com citrato (solução A) em que 9 partes em volume do sangue imediatamente depois da amostra de sangue são misturadas com 1 parte em volume de citrato de sódio a 3,2 % e, para encher uma seringa 21 com 10 ml de CaCl_2 0,2M (solução B). As seringas 20 e 21 são conectadas a tubos de náilon transparentes (tubo de entrada 11 e tubo de droga 12) com um tubo interno de 3 mm. Ambos os tubos são ligados em uma junção na forma de T (garrote) e depois conectados a uma câmara de formação de trombo de policarbonato 10 de 3 mm em um diâmetro interno e 1 cm de comprimento através de um tubo de náilon simples (tubo de entrada 11) de 3 mm em um diâmetro interno e 3 cm de comprimento. A própria câmara de formação de trombo 10 é construída como um cassete removível. A porção de junção entre o cassete e o tubo de náilon (tubo de entrada 11) é fabricada hermética a líquidos por intermédio de um anel O feito de borracha de silicone. Um membro de vidro é fixo no interior do cassete por um adesivo com base em epóxi, formando, desse modo, uma porção de constrição 14. A porção de constrição 14 é designada de modo que o sítio mais estreito da porção de constrição 14 possa ter um diâmetro interno (a abertura máxima entre a porção de constrição 14 e a parede interna) de 1,5 mm. Além disso, a câmara de formação de trombo 10 é conectada hermética a líquidos com um tubo como um tubo de descarga 13 tendo o mesmo diâmetro e formado do mesmo material através de um anel O feito de borracha de silício, e desse modo, um aparelho de monitoramento de trombo 1 como ilustrado na FIG. 1 é fabricado. Observar que os calibres de pressão do tipo flange 40 e 41 são montados em partes do tubo de entrada 11 e o tubo de descarga 13 perto da câmara de formação de trombo 10 por intermédio de junções (garrotes), respectivamente. Além disso, o material de vidro da porção de constrição da superfície interna da câmara de formação de trombo 10 é preparada tal que o colágeno é revestido como um material indutor de trombo 15 na porção de constrição de vidro no interior pela imersão em uma solução de ácido acético 0,1 N contendo 1 % de colágeno insolúvel tipo I (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e depois secagem. As seringas 20 e 21 são invertidas de modo que o pistão esteja no topo e os pesos

sejam então colocados nos pistões para permitir que a solução A e a solução B sejam escoadas em 5 ml/min e a 0,5 ml/min, respectivamente, para serem bombeadas na seringa.

[00122] Quando a solução A e a solução B são escoadas por 10 minutos, uma diferença entre os calibres de pressão 40 e 41 do tubo de entrada 11 e o tubo de descarga 13 é imerso depois de alguns minutos e uma tal diferença é depois aumentada com o tempo. Simultaneamente, é confirmado que o sangue descarregado do tubo de descarga 13 também é gradualmente diminuído. Quando o fluxo de todas as soluções é completado, uma solução salina fisiológica é escoada no aparelho para o monitoramento da formação de trombo 1 para lavar a câmara de formação de trombo 10. Desse modo, a formação de trombo pode ser encontrada na câmara de formação de trombo 10 pela observação visual.

EXEMPLO 2

[00123] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo 1 é preparado e a formação de trombo é então monitorado de uma maneira similar ao Exemplo 1, exceto que a solução A do Exemplo 1 é ainda adicionada com uma heparina não fracionada (preparada a partir de mucosa de porco) em uma concentração de 1 mg/ml.

[00124] Neste caso, não há nenhuma diferença de pressão e nenhuma diminuição no fluxo sanguíneo ocorreu, e trombo não pode ser encontrado na câmara de formação de trombo 10 por observação visual depois da lavagem com uma solução salina fisiológica.

EXEMPLO 3

[00125] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo 1 foi preparado de uma maneira similar ao Exemplo 1 com as exceções que: um tubo de vidro de 3 mm de diâmetro e 5 cm de comprimento foi fornecido como uma câmara de formação de trombo tipo cassete 10; as seringas 20 e 21 foram, cada uma, conectadas às bombas de seringa conduzidas por motores elétricos; e, em vez da porção de constrição 14 e do colágeno revestido como um material indutor de trombo 15 na porção de constrição 14, como mostrado na FIG. 2(a), seda de 1,5 cm

de comprimento imersa em colágeno do Exemplo 1 e ar seco a 4° C foram ligados por um adesivo como um material indutor de trombo 15 na superfície interna da câmara de formação de trombo 10 que é de 5 mm dentro da parte da conexão do tubo de vidro e o tubo de entrada 11.

[00126] Depois de escoar a solução A na seringa 20 a 3 ml/min e a solução B na seringa 21 a 0,3 ml/min por 15 minutos, a câmara de formação de trombo 10 foi separada e o interior desta foi então lavado com uma solução salina fisiológica. Como um resultado, a observação visual confirmou que o trombo 16 com um comprimento de cerca de 1 cm e uma espessura de cerca de 1 mm na forma de um cometa como mostrado na FIG. 2(b), que parece ser formado a partir de um lado a jusante da seda como um ponto de partida e estende-se à jusante, foi ligada na superfície interna do tubo de vidro. Aqui, é considerado que a influência do fluxo sanguíneo pode causar o trombo em uma forma de cometa.

[00127] A parte mais vasta do trombo teve uma largura de cerca de 3 mm.

EXEMPLO 4

[00128] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo 1 foi preparado de uma maneira similar ao Exemplo 3 com a exceção que, em vez de seda, como mostrado na FIG. 3(a), 50 µl do sangue sem um tratamento de anticoagulação foi gotejado na superfície interna de um tubo de vidro por uma pipeta de Pasteur e depois deixada em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos, obtendo-se, desse modo, um trombo na forma de disco com um diâmetro de cerca de 2 mm como um material indutor de trombo 15.

[00129] De uma maneira similar ao Exemplo 3, depois de escoar a solução A e a solução B, a câmara de formação de trombo 10 foi removida e depois o interior deste foi lavado com uma solução salina fisiológica. Como um resultado, a observação visual confirmou que o trombo 16 com um comprimento de cerca de 1 cm e uma espessura de cerca de 1 mm na forma de um cometa como mostrado na FIG. 3(b) estende-se em direção a jusante enquanto se enrola em volta do trombo visto que um material indutor de trombo 15 foi ligado na superfície interna do tubo de vidro. Aqui, é considerado que a influência do fluxo sanguíneo pode causar o trombo

gerado em uma forma de cometa.

[00130] A parte mais vasta do trombo teve uma largura de cerca de 3 mm.

EXEMPLO 5

[00131] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo 1 foi preparada e a formação de trombo foi então monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 3 com a exceção que a solução A foi ainda adicionada com Argatoroban (marca registrada, fabricado por Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.) como um agente de tratamento de anticoagulação em uma concentração de 0,1 mg/ml em relação à solução A do Exemplo 3.

[00132] Como um resultado, a observação visual não confirma a presença de trombo em um tubo de vidro depois da lavagem com a solução salina fisiológica.

EXEMPLO 6

[00133] Um aparelho 1 para o monitoramento da formação de trombo é preparada e a formação de trombo é então monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 3 com as exceções que o sangue anticoagulado preparado pela adição de hirudina em uma concentração de 1 µg/ml em relação ao sangue integral é usado como a solução A e anticorpo policlonal anti-hirudina (fabricado por COSMO BIO CO., LTD.) dissolvido em uma concentração de 1 mg/ml em uma solução salina fisiológica em relação ao sangue integral é usado como a solução B.

[00134] Neste caso, quase a mesma formação de trombo é confirmada como aquela do Exemplo 3.

EXEMPLO 7

[00135] São preparados 10 ml do sangue integral (solução A) que foi submetido a um tratamento de anticoagulação adicionando-se ao sangue imediatamente depois da amostragem do sangue 10 µg de aprotinina e 1 µg/ml de hirudina recombinante (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.); e 1 ml de uma solução (solução B) que foi preparada pela adição de um anticorpo policlonal anti-hirudina (fabricado por COSMO BIO CO., LTD.) do qual um domínio Fc foi removido por uma resina imobilizada de papaína a 1000 vezes solução s salina fisiológica diluída de 1 frasco/ml de reagente de tromboplastina (fabricado por Sysmex Corporation) como

uma droga para a promoção de coagulação sanguínea.

[00136] Para a fabricação de um aparelho para o monitoramento da formação de trombo, um material base 100 mostrado na FIG. 4, que é feito de polidimetila siloxano com uma largura de 40 mm, um comprimento de 70 mm, e uma espessura de 1,5 mm, e um material base 200 mostrado na FIG. 5, que tem uma espessura de 1 mm e é feito de vidro com as mesmas dimensões, são usados.

[00137] Um circuito que contém uma câmara de formação de trombo 110 é formado pelo corte de uma ranhura com uma profundidade de 0,5 mm em uma superfície de um material base 100 com um padrão mostrado na FIG. 4. A profundidade da parte da ranhura a ser fornecida como um tubo de entrada 111 é de 1 mm. O comprimento do circuito 100 é 30 mm. Um orifício passante de 1 mm de diâmetro é formado na extremidade da ranhura e fornecido como um valor de regulagem 100 E que é fechado por uma tampa operável e fechável. A câmara de formação de trombo 110 tem um comprimento de 30 mm e uma largura de 2,5 mm uma porção mais ampla e uma porção de constrição 114 que tem uma largura de 0,5 mm. Depois, um orifício passante com um diâmetro de 1 mm é fornecido como cada uma das partes da conexão 100A e 100B. Além disso, um orifício passante com um diâmetro de 2,5 mm é fornecido como um parte da conexão 100C.

[00138] Colágeno na forma de uma fita com uma largura de 10 mm é aplicado como um material indutor de trombo 115 ao material base 200 em uma posição que cobre a porção de constrição 114 do material base 100 como mostrado na FIG. 5. A aplicação de colágeno é realizada tal que a tira adesiva retangular que corresponde à porção de constrição 114 do material base 200 é ligada e um agente de extração com base em silicona SRX-211 (Dow Corning Toray Co., Ltd.) é então revestido neste. Subseqüentemente, a tira adesiva é retirada. Depois, uma solução de colágeno tipo 1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) dissolvida em ácido acético 0,1N é gotejada de modo que seja 1 % deste na região do vidro livre do agente de extração e depois deixada em repouso por 1 hora a 25° C. Depois que o colágeno na camada do agente de extração é lavado com água purificada e, colágeno é apenas aplicado a uma região de vidro retangular que corresponde à porção de

construção 114, onde o agente de extração não é aplicado.

[00139] Subseqüentemente, a superfície aplicada ao colágeno do material base 200 e a superfície formada por circuito do material base 100 são ligadas juntas face-a-face.

[00140] As partes de conexão 100A e 100B são conectadas a tubos de silicone que tem um tubo interno de 1 mm da superfície traseira (lado livre de circuito) do material base 100 e depois conectadas a uma seringa de 10 ml enchida com a solução A e uma seringa de 1 ml enchida com a solução B, respectivamente. Estas seringas são, cada uma, ligadas às bombas de seringa, respectivamente. Observar que uma outra parte da conexão 100C é conectada a um tubo de silício que tem um tubo interno de 2,5 mm, que é fornecido como um tubo de descarga.

[00141] A solução A é injetada a partir da parte da conexão 100A em uma taxa de fluxo de 0,3 ml/min. A solução B é injetada a partir da parte da conexão 100B em uma taxa de fluxo de 0,03 ml/min.

[00142] A solução A e a solução B são deixadas desenvolverem-se a partir parte de conexão 100A e da parte de conexão 100B por 5 minutos, respectivamente. Uma solução salina fisiológica é injetada da parte de conexão 100A para lavar o sangue. Como um resultado, a formação de trombo é principalmente confirmada na região a e na região b da FIG. 6 na superfície tratada com colágeno do material base 200.

EXEMPLO 8

[00143] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo é preparado e a formação de trombo é monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 7 com as seguintes exceções: a solução A é preparada tal que o sangue imediatamente depois da amostragem do sangue é adicionado com anticorpo policlonal anti-fator XII (fabricado por COSMO BIO CO., LTD.), do qual um domínio Fc é cortado por papaína, em uma concentração de 0,3 mg/ml e heparina não fracionada (origem suína, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) em uma unidade de 0,3; a solução B é preparada pela diluição de um reagente de tromboplastina (fabricado por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) 50 vezes; a aplicação de colágeno é realizada pelo pré-tratamento da região aplicada colágeno de um material base de poliestireno

transparente 200 (1 mm de espessura) mostrado na FIG. 8 com o gotejamento de uma solução preparada pela dissolução de permanganato de potássio em ácido sulfúrico concentrado em uma concentração de 2g/l, submetendo a reação a 25° C por 10 minutos seguido por lavagem rápida com água purificada, o colágeno é aplicado pelo gotejamento de uma solução em que o colágeno tipo 1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) dissolvido em ácido acético 0,1N é dissolvido em uma concentração de 1% na região pré-tratada e, deixando em repouso a 25° C por 1 hora seguido por lavagem com água purificada; e um material base 100 sem uma porção de constricção é usado para a câmara de formação de trombo 110 mostrada na FIG. 7. Observar que a parte de conexão 100C do material base 100 é fornecida por um orifício passante de 1 mm de diâmetro e conectado a um tubo de silicone de 1 mm em um diâmetro interno como um tubo de descarga.

[00144] Depois de escoar a solução A e a solução B por 10 minutos, uma solução salina fisiológica é injetada da parte de conexão 100A para lavar o sangue, confirmando, desse modo, a ligação de trombo vermelho na parte do canal da região aplicada colágeno do material base 200.

EXEMPLO 9

[00145] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparado e formação de trombo foi monitorado de uma maneira similar ao Exemplo 7 com as exceções que:

[00146] uma solução A foi preparada tal que o sangue imediatamente depois da amostragem do sangue foi submetido a um tratamento de anticoagulação pela adição de aprotinina em uma concentração de 0,05 mg/ml e hirudina recombinante (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) em uma concentração de 1 µg/ml e depois adicionados com quinacrina (Sigma Co., Ltd.); e

[00147] a parte de conexão 100B é fechada por uma tampa e apenas a solução A é então injetada pela parte de conexão 100A em uma taxa de fluxo de 1 ml/min.

[00148] Quando observado com um microscópio estereoscópico de fluorescência focalizado na superfície aplicada ao colágeno da lateral do material base 200, um desenvolvimento de cor de fluorescência de quinacrina verde foi confirmado na

porção da superfície aplicada ao colágeno e uma tal região espalha-se como região macular com o tempo. Depois de 10 minutos, o desenvolvimento de cor de fluorescência verde que pode ser devido à adesão trombocítica foi confirmado com a maior parte da superfície aplicada ao colágeno.

EXEMPLO 10

[00149] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparado e a formação de trombo foi monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 9, exceto que solução A foi preparada sem a adição de quinalina.

[00150] O sangue foi injetado pela parte de conexão 100A em uma taxa de fluxo de 1 ml/min. Quando o tubo da parte de conexão 100C foi comprimido para fechar o tubo por 2 segundos durante a injeção, o sangue foi movido instantaneamente a 20 mm a partir do ponto de ramificação no circuito 100D acompanhado por um aumento na pressão interna. Mesmo depois da abertura da parte de conexão 100C, o sangue não se moveu do ponto 20 mm, assim, a evidência de um aumento na pressão pode ser confirmado.

EXEMPLO 11

[00151] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo é preparado e a formação de trombo é monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 8 com as exceções que: o anticorpo policlonal anti-trombina (COSMO BIO CO., LTD.) do qual um domínio Fc é removido por uma papaína é adicionado de modo que esteja em uma concentração de 30 µg/ml em vez de heparina da solução A do Exemplo 8; e a solução B do Exemplo 8 é ainda adicionada com trombina PPACK em uma concentração de 5 mg/ml.

[00152] Depois de escoar a solução A e a solução B por 15 minutos, uma solução salina fisiológica é injetada pela parte de conexão 100A para lavar o sangue. Como um resultado, é confirmado que trombo vermelho é ligado em uma porção do canal da região tratada com colágeno do material base 200.

EXEMPLO 12

[00153] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparado e a formação de trombo foi monitorado de uma maneira similar ao Exemplo 7 com a

exceção que:

[00154] A solução A foi preparada tal que 50 ml do sangue imediatamente depois da amostragem do sangue, que foi adicionado com 0,5 unidades/ml de heparina e 10 µg/ml de aprotinina, foi centrifugado a 800 rpm e plasma rico em plaqueta (PRP) foi preparado a partir do sobrenadante, obtendo-se, desse modo, a solução A; e

[00155] uma solução em que 1 frasco/ml de um reagente de tromboplastina (Sysmex Corporação) foi diluído 30 vezes com uma solução salina fisiológica foi usada como solução B.

[00156] A formação de trombo da porção de constrição 114 foi monitorada por 15 minutos usando um microscópio estereoscópico. Uma pluralidade de coágulos de plaqueta ligados em torno da porção de constrição 114 foi confirmada. Também foi monitorado que o número dos coágulos aumentou enquanto os tamanhos destes também aumentaram, com a ligação repetida dos coágulos de plaqueta e separando-se.

EXEMPLO 13

[00157] A formação de trombo foi monitorada pelo desenvolvimento da solução A e solução B de uma maneira similar ao Exemplo 7 com as seguintes exceções:

[00158] solução A foi preparada pela adição de 500 µg de eritrócito coletado do sedimento centrifugado a 20 ml de PRP da solução A do Exemplo 12;

[00159] uma solução em que 1 frasco/ml de um reagente de tromboplastina (Sysmex Corporação) diluído 30 vezes com uma solução salina fisiológica foi usada como solução B;

[00160] uma lâmina de vidro foi preparada pelo revestimento da superfície total do material base 200 com um agente de extração com base em silicóna SRX-211 (Dow Corning Toray Co., Ltd.); e

[00161] aproximadamente 1 µl do sangue integral foi ligado próximo ao ponto final do alargamento de uma porção de ampliação que estende-se sucessivamente a 2,5 mm de largura, que é adjacente a montante de uma porção de constrição 114 da câmara de formação de trombo 110 no material base 100, depois o sangue integral foi deixado em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos para causar a

coagulação deste, e um trombo preliminar foi formado para ser usado como um material indutor de trombo.

[00162] A região ligada ao trombo foi monitorada por um microscópio estereoscópico por 15 minutos. A formação de um novo trombo vermelho, que foi localizado a jusante do trombo preliminar como uma origem, foi confirmada depois de cerca de 5 minutos, gradualmente estendida a jusante até 15 minutos e, a largura deste estendida a 2,5 mm. Foi confirmado que o sangue flui junto do trombo formado ou flui através das aberturas entre o trombo formado.

EXEMPLO 14

[00163] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparado e a formação de trombo foi monitorada de uma maneira similar a Exemplo 7 com as seguintes exceções:

[00164] 50 ml de sangue imediatamente depois da amostragem do sangue adicionado com um aptâmero de trombina de exocyt I (GGTTGGTGTGGTTGG: SEQ ID NO. 1) e uma concentração final de 5 μM e um inibidor da tripsina derivada do milho (COSMO BIO CO., LTD.) e uma concentração final de 30 $\mu\text{g/ml}$ foi centrifugada a 800 rpm por 10 minutos e, plasma rico em plaqueta (PRP) foi formado a partir do sobrenadante e fornecido como a solução A;

[00165] o DNA anti-sentido (CCAACCACACCAACC: SEQ ID NO. 2) foi dissolvido em uma solução salina fisiológica de modo que estejam 150 μM em concentração e fornecido como a solução B; e

[00166] no momento da montagem de um inibidor de trombo 115, uma solução, que foi preparada pela mistura da solução de colágeno do Exemplo 7 com uma solução preparada pela dissolução de 1 frasco de reagente de tromboplastina (Sysmex Corporação) em 1 ml de água purificada e depois submetida a diálise em uma taxa de 5: 1, foi gotejada em uma região não aplicada silicona e secada com ar a 4°C.

[00167] A formação de trombo da porção de constrição 114 foi monitorada por 5 minutos usando-se um microscópio estereoscópico. Uma pluralidade de coágulos de plaqueta ligados em torno da porção de constrição 114 foi confirmada. Também foi

monitorado que o número de coágulos aumentou enquanto os tamanhos deste também aumentaram, com os coágulos de plaqueta anexando-se repetidamente e separando-se .

EXEMPLO 15

[00168] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparado e a formação de trombo foi monitorada de uma maneira similar ao Exemplo 14 com as seguintes exceções:

[00169] depois de preparar PRP pelo mesmo procedimento como aquele do Exemplo 14, DNA anti-sentido (CCAACCACACCAACC: SEQ ID NO. 2) foi adicionado de modo que estejam 15 μ M em concentração, imediatamente antes da medição, liberando, desse modo, o tratamento anti-trombina e fornecido como a solução A;

[00170] a abertura da injeção da parte de conexão 100B é fechada de uma maneira similar ao Exemplo 9;

[00171] o colágeno tipo I (reagente de colágeno para o revestimento de uma placa de cultura celular com colágeno, solução de estoque Tipo A-1, Cellmatrix Co., Ltd.) foi usado em vez da solução de colágeno do Exemplo 14; e

[00172] apenas a solução A foi escoada em uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min. por 5 minutos.

[00173] A formação de trombo da porção de constrição 114 foi monitorada usando-se um microscópio estereoscópico. Uma pluralidade de coágulos de plaqueta ligados em torno da porção de constrição 114 foi confirmada. Também foi monitorado que o número do coágulos aumentou enquanto os tamanhos destes aumentaram, com os coágulos de plaqueta anexando-se repetidamente e separando-se .

EXEMPLO 16

[00174] Um aparelho para o monitoramento da formação de trombo foi preparada de uma maneira similar ao Exemplo 7 com as seguintes exceções:

[00175] uma ranhura de 0,1 mm de profundidade foi formada na superfície do material base por corte em um padrão mostrado na FIG. 7, enquanto deixando

paredes de partição, tal que, linhas convexas, cada uma, tendo um comprimento de 1 mm e uma largura de 40 μm opuseram-se na superfície toda da porção de fundo em torno do centro da câmara de formação de trombo 110 com intervalos de 40 μm entre elas;

[00176] a abertura da injeção da parte de conexão 100B foi fechada de uma maneira similar ao Exemplo 9; e

[00177] o material base 200 foi uma lâmina de vidro simples sem um tratamento de superfície. A abertura (canal) entre a divisão das paredes simula um capilar sanguíneo.

[00178] O sangue integral, imediatamente depois da amostragem do sangue, foi submetido a um tratamento de anticoagulação pela adição de um inibidor da tripsina derivada do milho com uma concentração final de 30 $\mu\text{g/ml}$ e um aptâmero de trombina de exocyt I com uma concentração final de 10 μM . Imediatamente antes do monitoramento, o DNA anti-sentido de aptâmero de trombina de exocyt I foi adicionado de modo que estejam 30 μM em concentração, seguido por injeção de 100A em uma taxa de fluxo de 0,05 ml/min por 5 minutos.

[00179] A formação de trombo na abertura entre a divisão das células foi monitorada usando-se um microscópio estereoscópico. Como um resultado, os canais foram fechados na seqüência durante o monitoramento do por 5 minutos. Foi monitorado que cerca de metade dos canais foram fechados pela formação de trombo.

EXEMPLO 17

[00180] Um sistema de alimentação de solução tipo seringa mostrado nas FIGS. 9 foi usado. Um microchip 300, onde o material base e a cobertura do microchip mostrados na FIG. 9(B) e FIG. 9(C), respectivamente, feitos dos mesmos materiais daqueles do Exemplo 7 foram ligados por pressão, foi usado. O microchip 300 compreende um tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 322 e um tubo de descarga 313 que foram conectados ao material base 100 como no caso com o tubo de descarga do Exemplo 7. Entretanto, as ranhuras do microchip 300 da FIG. 9 são todas formadas de 200 μm de profundidade. Também, um canal foi

formado, tal que, o sangue possa ser introduzido no canal da seringa de amostra 320, enquanto o canal teve uma largura de 1 mm e um comprimento de 40 mm e foi conectado a uma câmara de formação de trombo 311 composto de canal estreito que tem uma largura de 200 µm e um comprimento de 10 mm e o tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 322. A solução foi preparada tal que 1 frasco do reagente Sysmex Corporação PT (tromboplastina de tecido) foi dissolvido em 1 ml de água purificada e depois submetida a diálise em água purificada, o produto submetido a diálise em água purificada foi misturado com colágeno tipo I (fabricado por Nitta Gelatin Inc.) em uma taxa de 1: 1. A solução foi aplicada à posição do material indutor de trombo 315 como mostrado na FIG. 9. Depois que a porção aplicada foi secada a 4° C ao ar e a câmara de formação de trombo 311 foi coberta, foi usada como um material indutor de trombo 315. O sangue foi coletado depois da adição de um agente de tratamento de anticoagulação, tal que, as concentrações finais dos componentes respectivos na seringa foram 25 µg/ml para o inibidor da tripsina derivada do milho, 10 µM para aptâmero de trombina de exocyt I, 10 µM para aptâmero de trombina de exocyt II (5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGG TGACTION-3': SEQ ID NO. 3). Imediatamente antes do monitoramento, o sangue coletado, desse modo, foi adicionado com DNAs anti-sentido em relação ao aptâmero de trombinas de exocyt I e exocyt II de modo que cada um deles atingiria uma concentração de 40 µM. Depois, uma seringa (seringa de 1 ml, fabricada por Terumo Corporation) foi enchida com o sangue e fornecida como a seringa de amostra 320 mostrada na FIG. 9. O My Flow (fabricado por Arbiotec Co., Ltd), que é uma bomba de micro-alimentação capaz de monitorar a impressão interna de uma bomba que alimenta líquido, foi conectada a um tubo de entrada de pressão 317 mostrado na FIG. 9. Óleo mineral foi comprimido no microchip 300 a partir do topo da seringa 320 e o sangue foi expulso no microchip 300 em uma taxa de fluxo de 50 µl/min, enquanto a pressão exercida na seringa de amostra 320 foi monitorado.

[00181] Como um inibidor de coagulação sanguínea, 1 M de Tris-HCl (pH 10) foi escoado do tubo de entrada do inibidor de coagulação sanguínea 322 em uma taxa de fluxo de 50 µl/min. A pressão começou a aumentar 6 minutos depois de começar

a medição de pressão.

[00182] A pressão, repetindo as mudanças destes altos e baixos devido ao movimento de trombo (“controle” mostrado in Fig. 13), aumentou até 80 kPa.

EXEMPLO 18

[00183] A amostragem do sangue foi realizado com a adição de um agente de tratamento de anticoagulação de maneira similar ao Exemplo 17. Subseqüentemente, o mesmo procedimento daquele do Exemplo 17 foi realizado, exceto que a heparina não fracionada foi adicionada em uma concentração de 1 unidade/ml. A medição de pressão foi então realizada. A pressão começou a aumentar 13 minutos depois de começar a medição. A pressão aumentou até cerca de 10 kPa (“Heparina” mostrada na FIG. 13).

EXEMPLO 19

[00184] A amostragem do sangue foi realizada com a adição de um agente de tratamento de anticoagulação de maneira similar ao Exemplo 17. Subseqüentemente, o mesmo procedimento daquele do Exemplo 17 foi realizado, exceto que ReoPro (LILLY Co., Ltd.) foi adicionado em uma concentração de 50 µg/ml. A medição de pressão foi então realizada. Um aumento na pressão pode não ser confirmado na medição por 18 minutos (“ReoPro” mostrado na FIG. 13).

EXEMPLO 20

[00185] A amostragem do sangue foi realizada com a adição de 3,2 % de ácido cítrico de modo que a razão de ácido cítrico e o sangue sejam de 1: 9. Além disso, o sangue foi adicionado com um inibidor da tripsina derivada do milho em uma concentração de 25 µg/ml para realizar uma reação de anticoagulação. Imediatamente depois da adição de cloreto de cálcio ao sangue anticoagulado de modo que deveria atingir 15 mM em relação ao sangue anticoagulado no período de monitoramento da formação de trombo, o sangue foi adicionado a uma seringa (seringa de 1 ml, fabricada por Terumo Corporation), seguido por fluxo de entrada do sangue no mesmo microchip conforme aquele do Exemplo 17 em uma taxa de fluxo de 40 µl/min. Subseqüentemente, uma mudança na pressão foi medida usando-se o mesmo sistema daquele do Exemplo 17. A pressão começou a aumentar 15 minutos

depois de começar a medição de pressão e esta aumentou até cerca de 60 kPa.

EXEMPLO 21

[00186] A amostragem do sangue foi realizada com a adição de um agente de tratamento de anticoagulação de maneira similar ao Exemplo 20. Subseqüentemente, o mesmo procedimento daquele do Exemplo 20 foi realizado, exceto que a heparina foi adicionada em concentrações de 0,2 unidades/ml, 0,5 unidades/ml e, 1 unidade/ml, respectivamente. A medição de pressão foi então realizada. Os resultados são mostrados na FIG. 14.

EXEMPLO 22

[00187] A amostragem do sangue foi realizada com a adição de um agente de tratamento de anticoagulação de maneira similar ao Exemplo 20. Subseqüentemente, o mesmo procedimento daquele do Exemplo 20 foi realizado, exceto que ReoPro (LILLY Co., Ltd.) foi adicionado em uma concentração de 2 µg/ml. A medição de pressão foi então realizada. A pressão começou a aumentar 20 minutos depois de começar a medição de pressão e esta aumentou até cerca de 15 kPa depois de 25 minutos (FIG. 15).

EXEMPLO 23

[00188] Um sistema de alimentação de solução tipo seringa mostrado na FIG. 12 foi usado. Além disso, um microchip 400, onde o material base 200 como uma cobertura do microchip e o material base 100 como um corpo do microchip mostrados na FIG. 12(B) e FIG. 12(C) foram ligados por pressão um ao outro, foi usado. Um tubo de descarga 413 feito de um tubo de Teflon (marca registrada) foi enchido com óleo mineral e uma extremidade deste foi conectada ao microchip 400 através de um tubo de conexão 412 feito de borracha de silício e a outra extremidade deste foi conectada a uma bomba de sucção 414 em que um sensor de pressão foi instalado. Um tubo de entrada que forma um canal do microchip 400 foi conectado a uma seringa 420 através do tubo de conexão 412 feito de borracha de silicone. Uma extremidade do tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 422 feito de Teflon (marca registrada) foi conectada a uma bomba que alimenta líquido 423 e a outra extremidade deste foi conectada à extremidade terminal da

câmara de formação de trombo através do tubo de conexão 412 feito de borracha de silicone. Deste modo, o microchip 400 foi conectado ao tubo de descarga 413, a seringa 420, e o tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 422 e, desse modo, um aparelho B para o monitoramento da formação de trombo foi produzido. A camera CCD 430 fornecida com uma fonte ótica de iluminação 432 (LED) que foi montada em um trilho 433 e móvel, foi ajustada sob a câmara de formação de trombo.

[00189] Todas as ranhuras nos microchips tiveram uma profundidade de 120 μm .

[00190] O canal em que o sangue foi introduzido teve uma largura de 800 μm e um comprimento de 7 mm. O canal estreito teve uma largura de 200 μm e um comprimento de 10 mm.

[00191] A solução foi preparada, tal que, 1 frasco de reagente de PT (tromboplastina de tecido, Sysmex Corporation) foi dissolvido em 1 ml de água purificada e depois submetido a diálise em água purificada, o produto submetido a diálise em água purificada foi misturado com colágeno tipo I (fabricado por Nitta Gelatin Inc.) em uma taxa de 1: 1. A solução foi então aplicada à região do material base 200 do microchip que reveste o canal da porção de constricção na superfície a ser ligado por pressão com o material base 100 do microchip. Depois que a porção aplicada foi secada a vácuo a 4^o C e o material base 100 e o material base 200 foram então ligados por pressão um com o outro, fornecendo, desse modo, um microchip 400 que tem uma câmara de formação de trombo 411.

[00192] A amostragem do sangue foi realizada usando-se um recipiente que coleta sangue a vácuo no qual o citrato de sódio fornecido como um agente de anticoagulação foi incluso. Imediatamente antes da introdução na seringa 420, o sangue foi adicionado com cloreto de cálcio e uma concentração final de 12,5 mM e um inibidor da tripsina derivada do milho e uma concentração final de 25 $\mu\text{g/ml}$.

[00193] O My Flow (fabricado por Arbiotec Co., Ltd), que é uma bomba de micro-alimentação capaz de monitorar a impressão interna de uma bomba que alimenta líquido, foi conectada a um tubo de descarga 413 como uma bomba 414. Desse modo, a sucção foi realizada em uma taxa de 15 $\mu\text{l/min}$ enquanto a impressão

interna do canal foi monitorado.

[00194] Como um inibidor de coagulação sanguínea, 1 M de Tris-HCl (pH 10) foi escoado do tubo de entrada de inibidor de coagulação sanguínea 422 em uma taxa de fluxo de 8 μ l/min. A formação de trombo branco foi principalmente observada depois de 4 minutos a partir do começo da medição de pressão, enquanto uma diminuição na pressão interna foi confirmado. Além disso, foi confirmado que a impressão interna diminuiu 30 kPa depois de 10 minutos a partir do começo.

[00195] Além disso, a formação de trombo foi observada pela tirada de imagens enquanto a camera 430 foi movida em torno da região que forma trombo no canal. A posição onde a formação de trombo foi observada foi memorizada e, a camera 430 captou imagens enquanto se move regularmente em volta de uma pluralidade de pontos específicos. Como um resultado, o crescimento e a destruição de trombo com o tempo foi registrada em relação a uma pluralidade de trombos grandes.

[00196] A seguir, os experimentos de referência serão realizados como descritos abaixo para mostrar a eficácia dos aptâmeros de trombina e os DNAs anti-sentido destes, como agentes de tratamento de anticoagulação e agentes que liberam anticoagulação, respectivamente.

[EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA 1]

[00197] O sangue imediatamente depois da amostragem do sangue, o sangue preparado pela adição de um volume de um décimo de 300 μ g/ml de um inibidor da tripsina derivada do milho ao primeiro sangue e, o sangue preparado pela adição de um aptâmero de trombina que reconhece exocyt I para o segundo sangue de modo que estejam 5 μ M em concentração, foram fornecidos. Depois, para estes três tipos de sangue, o tempo utilizado para coagulação foram medidos em tubos Eppendorf (feitos de polipropileno). A amostra foi virada de cabeça para baixo a cada um minuto e a fluidez desta foi confirmada. O sangue livre de aditivo mostrou um tempo de coagulação de 9 minutos. Em contraste, o sangue adicionado com o inibidor de tripsina mostrou um tempo de coagulação de 22 minutos. Além disso, o sangue adicionado com o aptâmero de trombina mostrou um tempo de coagulação de 62 minutos.

[00198] Além disso, quando 5 μM de um aptâmero de trombina que reconhece exocyt I e 5 μM de um aptâmero de trombina que reconhece exocyt II foram usados em combinação, a coagulação sanguínea não foi confirmado mesmo depois de 3 horas mesmo no caso do sangue livre do inibidor de tripsina. Aptâmero de trombina de reconhecimento de exocyt I: 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' SEQ ID NO. 1, Aptâmero de trombina de reconhecimento de exocyt II:

5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTION-3' SEQ ID NO. 3.

EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA 2]

[00199] A medição de APTT foi realizada em 200 μM de plasma em relação a cada amostra A adicionada com 10 μM de solução salina fisiológica, a amostra B adicionada com 10 μM de 500 μM de aptâmero de trombina que reconhece exocyt I e, amostra C adicionada com 10 μl de uma solução que contém 500 μM de aptâmero de trombina que reconhece exocyt I e 1500 μM de DNA anti-sentido de aptâmero de trombina que reconhece exocyt I. A amostra A foi de 44 segundos, a amostra B foi de 2 minutos ou mais e, a amostra C foi de 45 segundos.

[EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA 3]

[00200] A FIG. 11(A) é uma análise de uma forma de onda de coagulação com tromboelastograma pelo armazenamento do sangue adicionado com 10 μl de aptâmeros para exocyt I e exocyt II em temperatura ambiente por 15 minutos e, depois pela adição de 40 μM de DNAs anti-sentido de ambos os aptâmeros. A FIG. 11(B) é um tromboelastograma na forma de onda de sangue somente depois da amostragem do sangue.

[00201] Como é evidente a partir dos resultados da FIG. 11(A) e FIG. 11(B), é observado que a adição de dois tipos de aptâmero de trombinas permite que o sangue seja armazenado e o DNA anti-sentido possa liberar o tratamento de anticoagulação deste.

[00202] A partir dos resultados dos experimentos de referência 1 a 3, é evidente que a combinação do inibidor da tripsina derivada do milho e do aptâmero de trombina podem inibir eficazmente a coagulação do sangue integral e que o efeito de anticoagulação do aptâmero de trombina pode ser inativado pelo DNA anti-sentido

ao aptâmero de trombina.

[EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA 4]

[00203] A seguir, as eficácias do revestimento de PME A para o armazenamento de sangue e adesão de plaqueta no material base serão descritas.

(1) 1 % de solução de metanol contendo PME A preparado de acordo com JP 04-152952 A foi aplicado a um recipiente de resina de acril de 2,5 ml (dimensões internas: 1 cm × 1 cm × 4,5 cm) e depois secado a 90° C por 10 minutos. Subseqüentemente, 760 µl do sangue submetido a um tratamento de anticoagulação com 2 % de ácido cítrico foi adicionado a cada um dos recipientes não revestidos e um recipiente revestido de PME A, seguido pela aspiração com uma pipeta a cada 5 minutos para confirmar a coagulação sanguínea.

[00204] Conseqüentemente, o recipiente não revestido mostrou um aumento aparente na viscosidade em 30 minutos e coagulação em 60 minutos. Em contraste, o recipiente revestido de PME A mostrou um aumento aparente na viscosidade em 35 minutos, mas a coagulação foi prolongada em 90 minutos.

[00205] (2) O PME A acima foi revestido de modo plano em uma placa de acril transparente. Este foi usado em vez placa revestida de colágeno do Exemplo 9 (FIG. 8) e um experimento de adesão de plaquetas e leucócitos rotulados com quinacrina no sangue foi realizado de uma maneira similar ao Exemplo 9.

[00206] Como um resultado, adesão ou aglutinação aparente de plaquetas e leucócitos foi observada depois de 10 minutos do início do fluxo sanguíneo. Em contraste, a adesão ou a aglutinação de plaquetas e leucócitos na placa de acril revestida de PME A não foi observada mesmo depois de 30 minutos.

[00207] A partir dos resultados acima, no aparelho para o monitoramento da formação de trombo da presente invenção, revestindo-se as seringas de armazenamento de sangue, o tubo, o material base e outros com PME A, a formação de trombo pode ser eliminada em um lugar outro que não a câmara de monitoramento de trombo. Portanto, é sugerido que o monitoramento de trombo específico à câmara de monitoramento de trombo possa ser atingido.

[00208] Na descrição acima, a presente invenção foi descrita com referência às

formas de realização preferidas. Entretanto, a presente invenção não é limitada aos exemplos e formas de realização descritas acima e, várias modificações podem ser aplicadas contanto que não divirjam da essência da presente invenção. Por exemplo, a pressão da bomba pode ser ajustada para ser alta e o diâmetro interno do tubo de descarga pode ser ajustado para ser pequeno. Neste caso, contra-pressão pode ser gerada no tubo de entrada e o tubo de descarga, assim, a formação de trombo pode ser monitorada enquanto se controla o volume de fluxo de sangue sob a carga da pressão interna que corresponde à pressão sanguínea. Além disso, a taxa de fluxo de sangue neste momento pode ser livremente controlada por meio de pressão de bomba e o grau de estrangulamento do tubo de descarga.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[00209] O aparelho para o monitoramento da formação de trombo e o método de monitoramento da formação de trombo da presente invenção podem ser favoravelmente usados na avaliação abrangente de coagulação sanguínea e de formação de trombo de plaqueta sob um ambiente equivalente à corrente sanguínea usando o sangue integral ou as plaquetas contendo plasma, para avaliar a eficácia de uma droga antitrombótica aplicado a um paciente ou semelhante.

REIVINDICAÇÕES

1. Aparelho que monitora a formação de trombo pelo escoamento de sangue anticoagulado através de um canal que simula um vaso sanguíneo enquanto libera um tratamento de anticoagulação ou que promove a coagulação sanguínea, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma câmara de formação de trombo (10) em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo (15) que induz a formação de trombo é fornecido;

um tubo de entrada (11) que é conectado à câmara de formação de trombo (10) e através do qual sangue é escoado na câmara de formação de trombo (10);

um tubo de droga (12) que é conectado ao tubo de entrada (11) e através do qual uma droga que libera o tratamento de anticoagulação ou uma droga que promove a coagulação sanguínea é fornecido; e

uma bomba (30,31) para pressurizar o tubo de entrada (11) e/ou o tubo de droga (12) ou uma bomba para aspirar um tubo de descarga (13) que é conectado à câmara de formação de trombo (10) e fornecido para descarregar o sangue da câmara de formação de trombo (10); e

um aparelho de medir pressão (40,41).

2. Aparelho que monitora a formação de trombo pelo escoamento de sangue anticoagulado através de um canal que simula um vaso sanguíneo enquanto libera um tratamento de anticoagulação ou que promove a coagulação sanguínea, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma câmara de formação de trombo (411) em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo que induz a formação de trombo é fornecido;

um tubo de entrada que é conectado à câmara de formação de trombo (411) e através do qual sangue é escoado na câmara de formação de trombo (411);

um tubo de entrada de inibidor da formação de trombo (422) que é conectado à câmara de formação de trombo (411) e mistura um inibidor da formação de trombo com o sangue depois de passar através da câmara de formação de trombo (411); e

uma bomba para pressurizar o tubo de entrada e/ou o tubo de droga ou

uma bomba (414) para aspirar um tubo de descarga (413) que é conectado à câmara de formação de trombo (411) e fornecido para descarregar o sangue da câmara de formação de trombo (411); e

um aparelho de medir pressão.

3. Aparelho, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o(s) dito(s) tubo(s) (413, 422) e a câmara de formação de trombo (411) são integrados uns com os outros em um substrato e providos como um circuito de microchip (400).

4. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o material indutor de trombo (15) compreende colágeno.

5. Aparelho, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o material indutor de trombo (15) compreende ainda um fator de tromboplastina de tecido.

6. Aparelho, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma câmara (430) para tirar uma imagem da câmara de formação de trombo (411).

7. Método *in vitro* para monitorar a formação de trombo, com a utilização de um aparelho, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que compreende:

escoar sangue anticoagulado em uma câmara de formação de trombo (10), em pelo menos uma parte da qual um material indutor de trombo (15) que induz a formação de trombo é fornecido, em pelo menos uma parte do qual um material indutor de trombo que induz a formação de trombo é provido, enquanto libera um tratamento de anticoagulação ou promove a coagulação sanguínea, e

monitorar a formação de trombo determinando a pressão no momento do fluxo de entrada e/ou fluxo de saída de sangue na câmara de formação de trombo (10).

8. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que:

o tratamento de anticoagulação é um tratamento com um quelante de cálcio; e

o tratamento de anticoagulação é liberado por um doador de cálcio livre.

9. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que:

o tratamento de anticoagulação é um tratamento com um aptâmero de trombina; e

o tratamento de anticoagulação é liberado por um DNA anti-sentido do aptâmero de trombina.

10. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a formação de trombo é monitorada escoando-se o sangue anticoagulado na câmara de formação de trombo (10) sem liberar o tratamento de anticoagulação, enquanto promove a coagulação sanguínea.

11. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a coagulação sanguínea é promovida por uma tromboplastina de tecido.

12. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o sangue anticoagulado é obtido usando-se um ou mais tipos de agentes de tratamento de anticoagulação, e o dito tratamento de anticoagulação é liberado por pelo menos um tipo de agente de liberação de tratamento de anticoagulação que corresponde ao agente de tratamento de anticoagulação usado.

13. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que:

o dito agente de tratamento de anticoagulação é um inibidor para o fator de fase de contato e um quelante de cálcio; e

o dito agente de liberação de tratamento de anticoagulação é um doador de cálcio livre.

14. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que:

o dito agente de tratamento de anticoagulação é um inibidor para o fator de fase de contato e heparina; e

o dito agente de liberação de tratamento de anticoagulação é heparinase.

15. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que:

o dito agente de tratamento de anticoagulação é um inibidor para o fator de fase de contato e um aptâmero de trombina; e

o dito agente de liberação de tratamento de anticoagulação é um DNA anti-sentido do aptâmero de trombina.

16. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que o dito fator de fase de contato é o fator XII de coagulação sanguínea ou calicreína.

17. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito fator de fase de contato é o fator XII de coagulação sanguínea, e um inibidor para o fator XII de coagulação sanguínea é um inibidor da tripsina derivada do milho.

18. Método para monitorar a formação de trombo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 17, caracterizado pelo fato de que o dito material indutor de trombo (15) inclui colágeno e uma tromboplastina de tecido.

FIG. 1

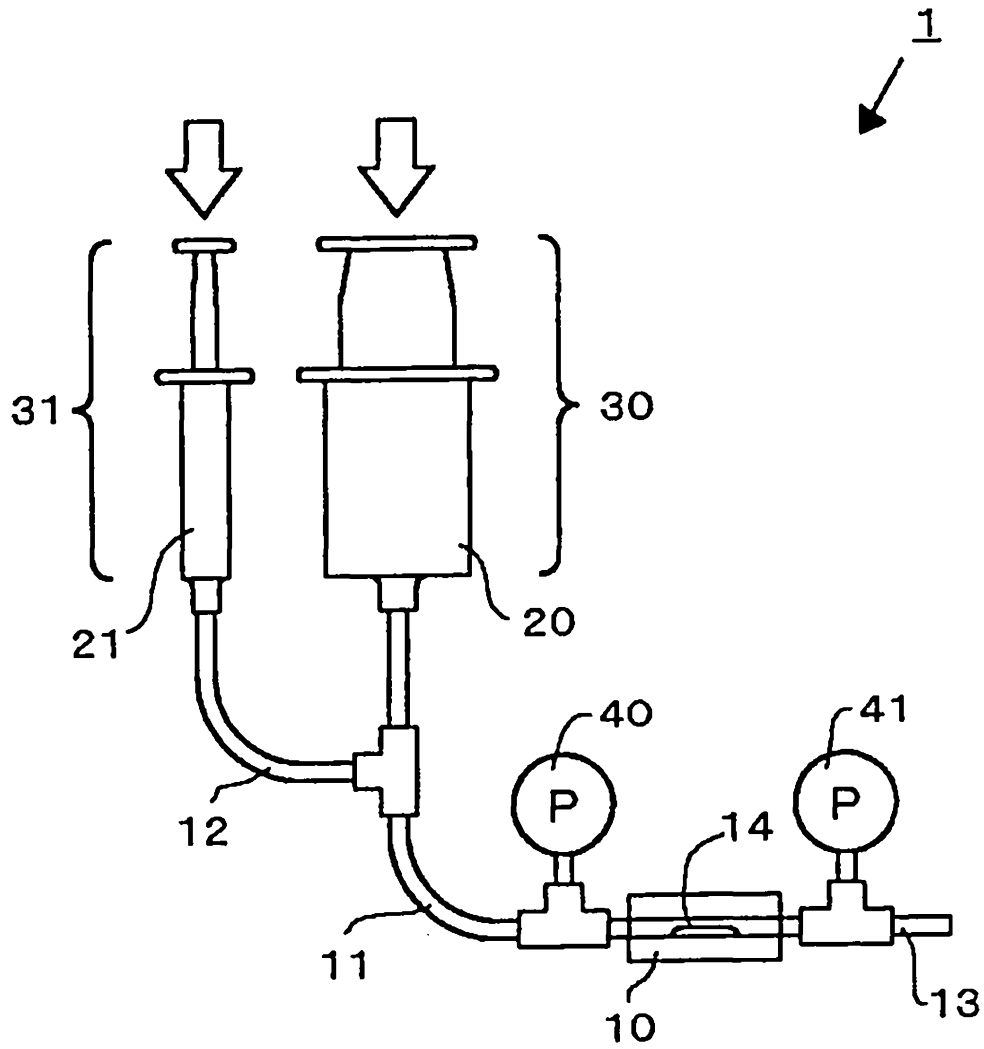


FIG. 2

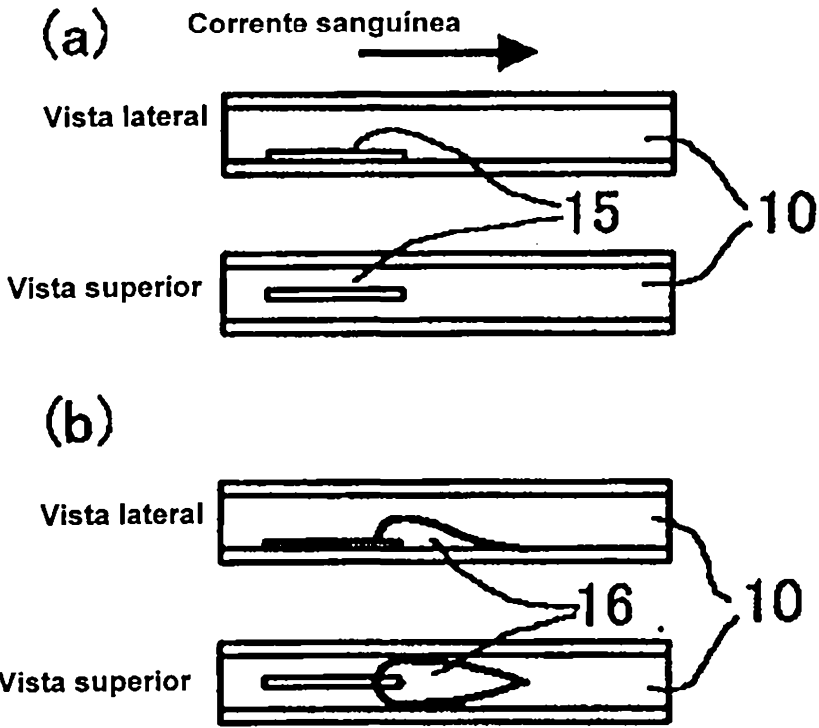


FIG. 3

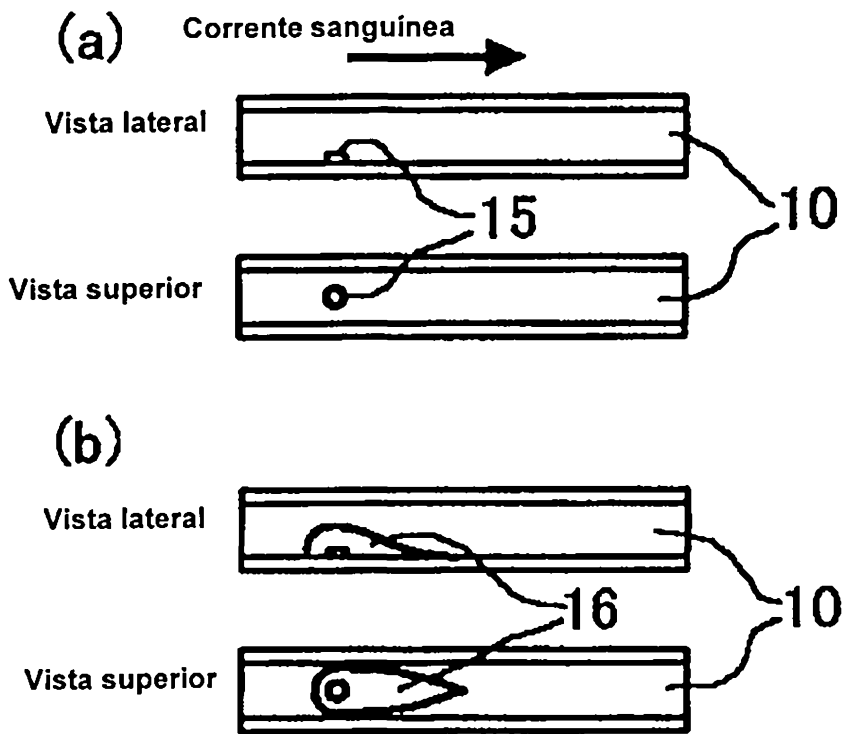


FIG. 4

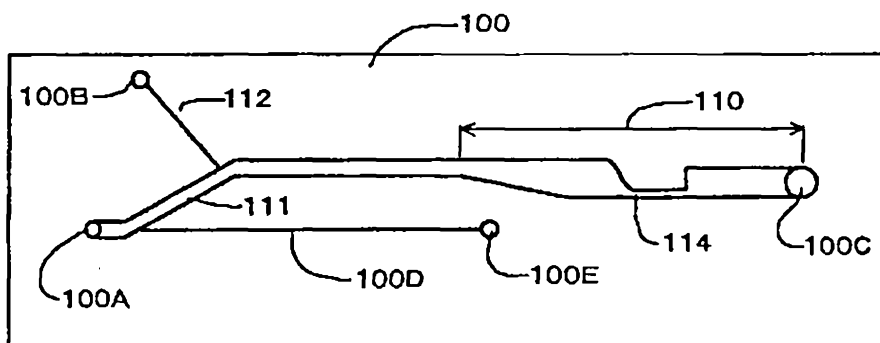


FIG. 5

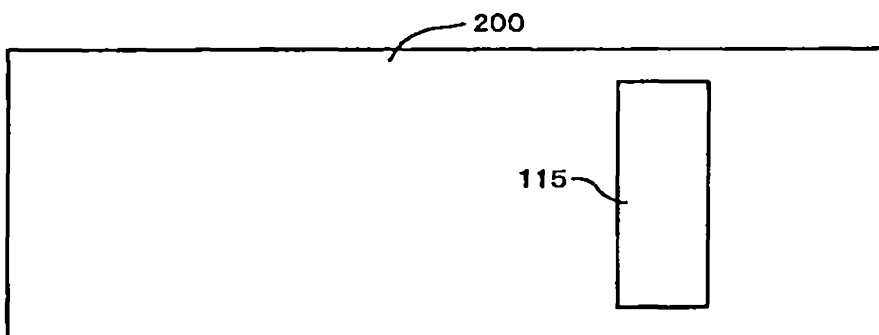


FIG. 6

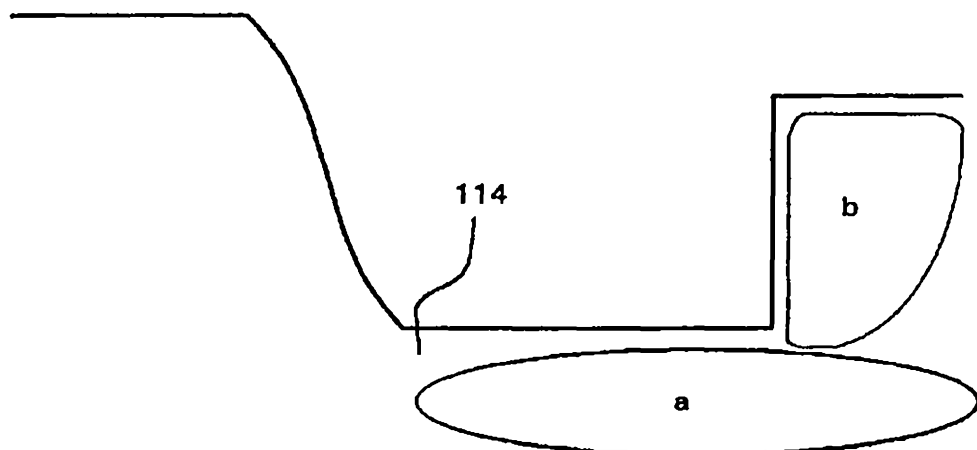


FIG. 7

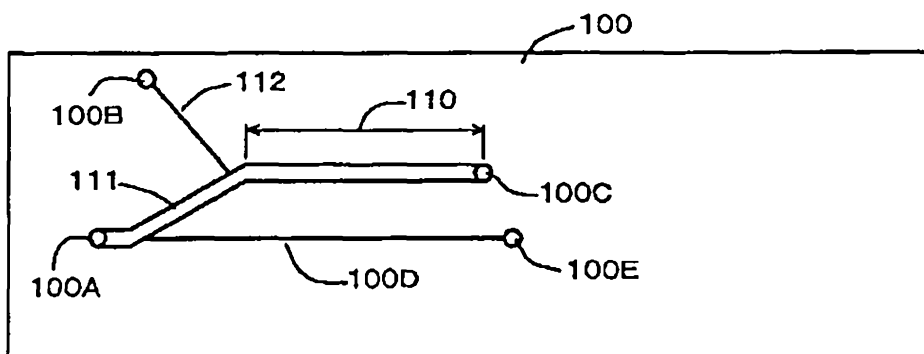


FIG. 8

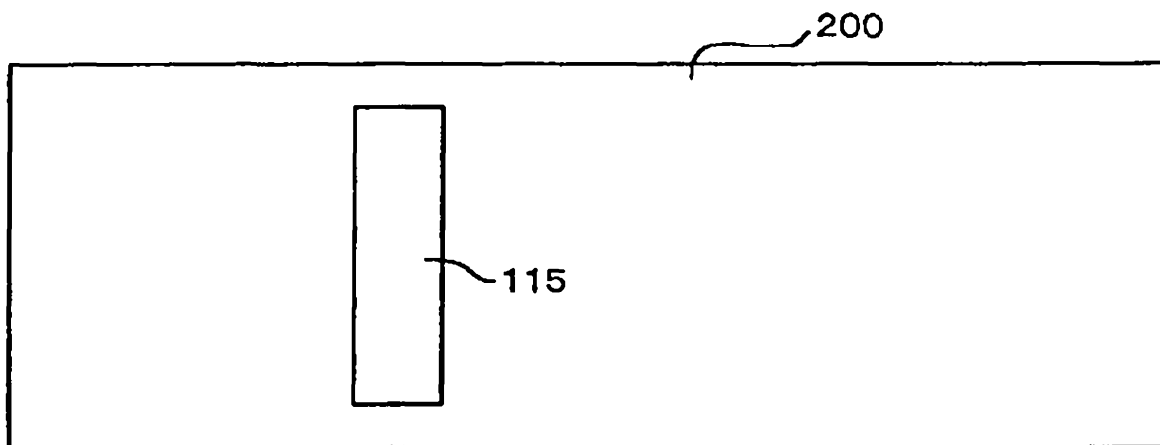
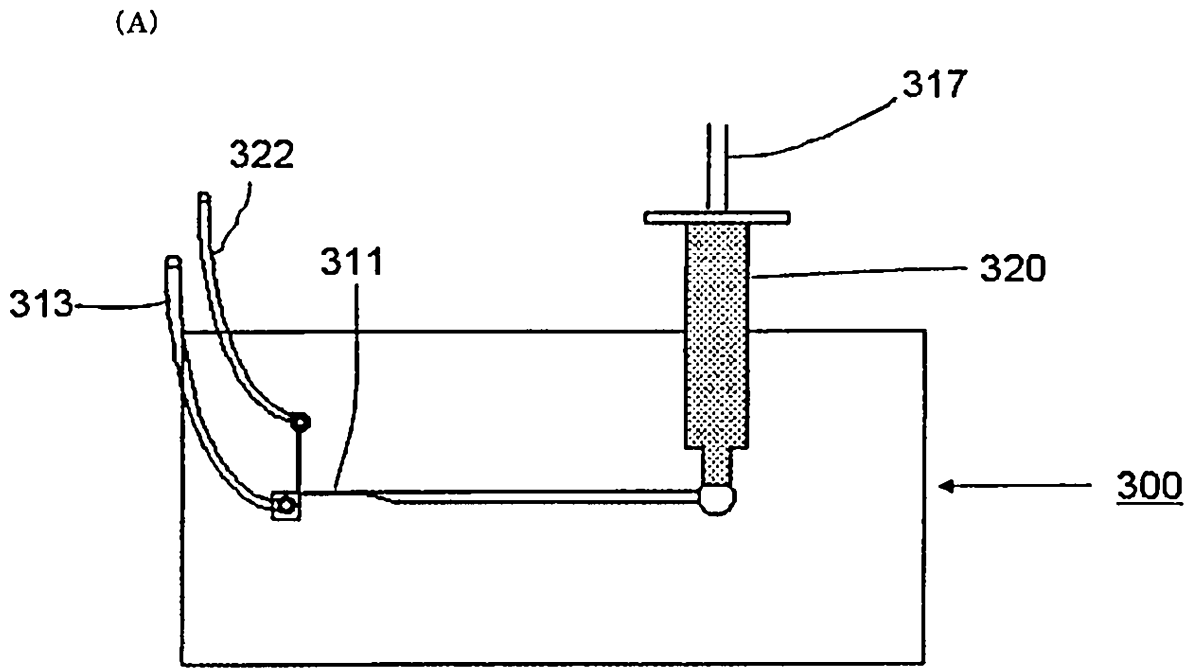
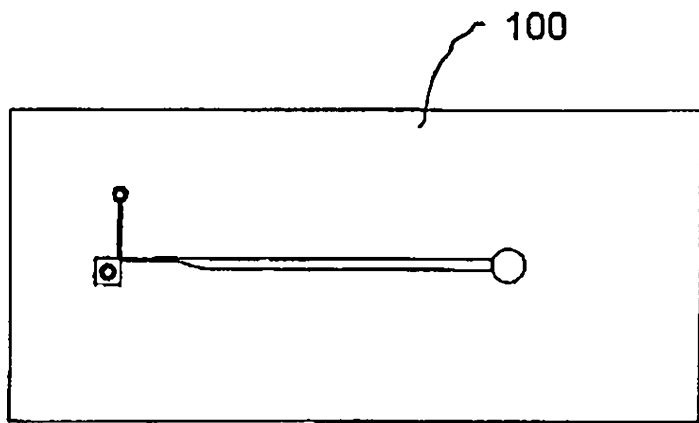


FIG. 9



(B)



(C)

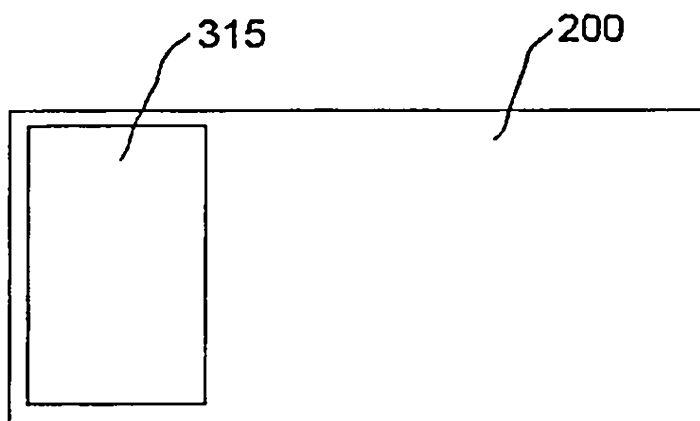


FIG. 10

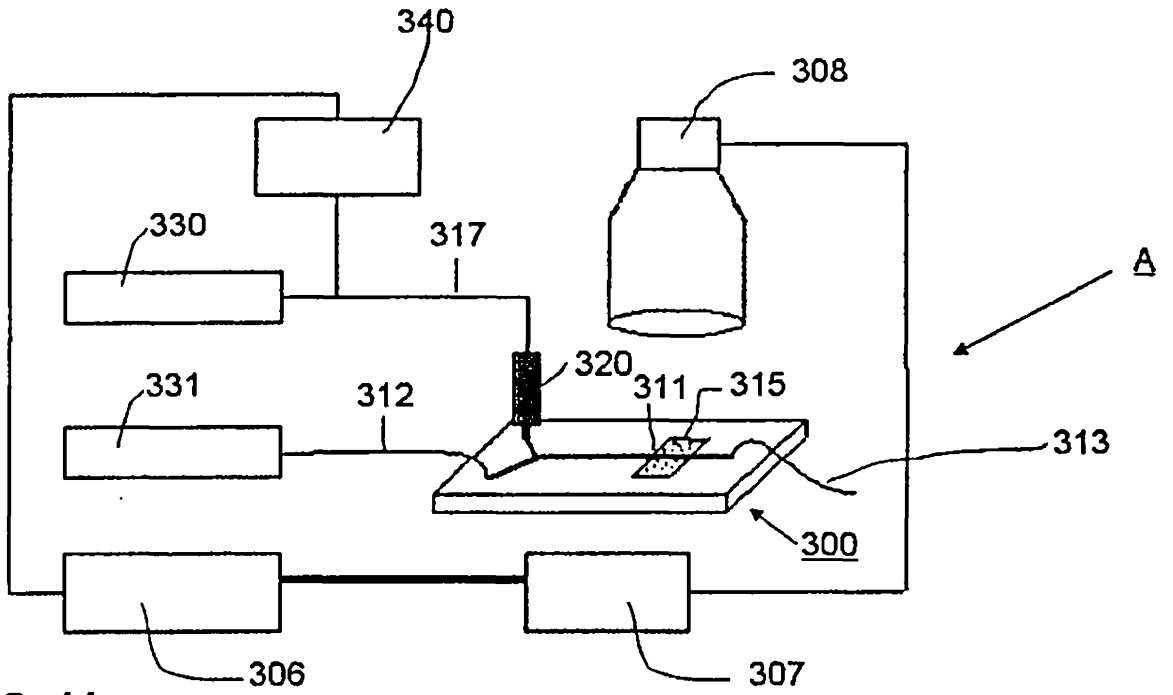


FIG. 11

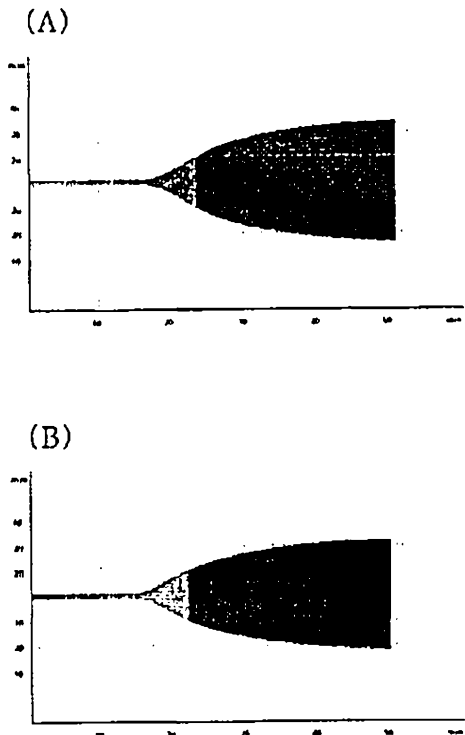
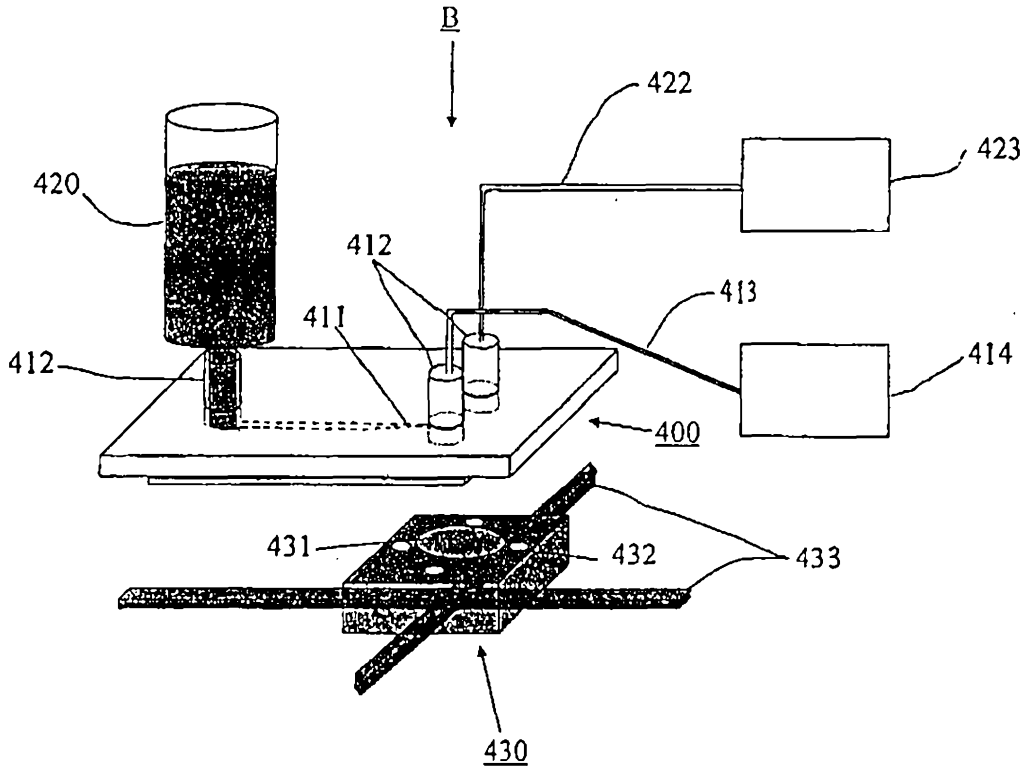
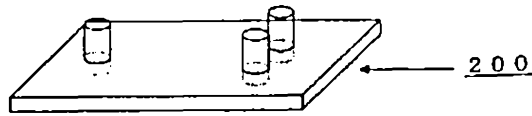


FIG. 12

(A)



(B)



(C)

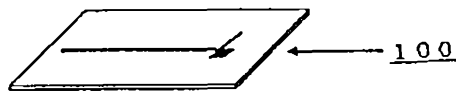


FIG. 13

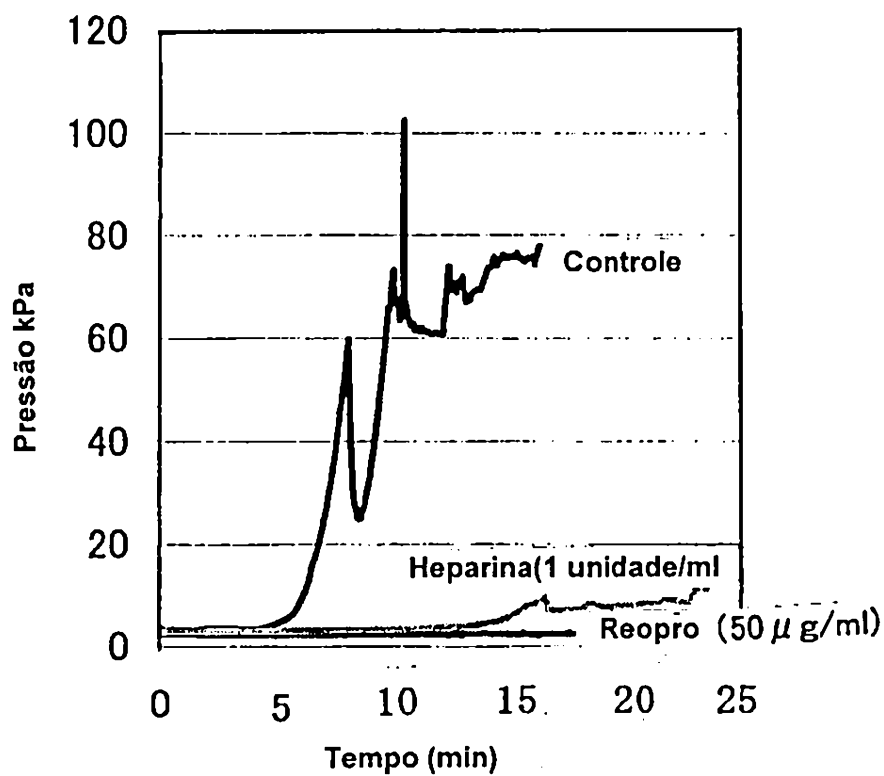


FIG. 14

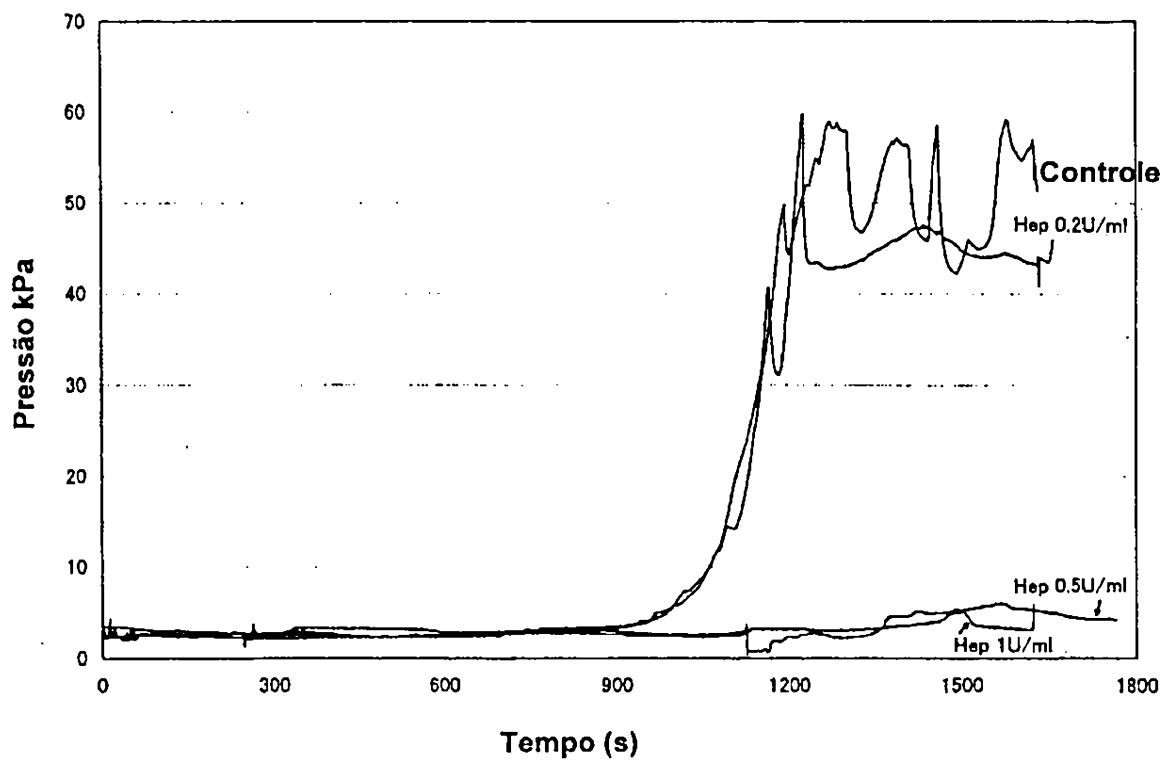


FIG. 15

