

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 503**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2009 PCT/JP2009/064202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10018833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2009 E 09806724 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2352025**

54 Título: **Procedimiento de prueba de plaquetas en sangre**

30 Prioridad:

11.08.2008 JP 2008207389

25.12.2008 JP 2008330222

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2021

73 Titular/es:

FUJIMORI KOGYO CO., LTD. (100.0%)
1-23-7, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku
Tokyo 160-0023, JP

72 Inventor/es:

HOSOKAWA, KAZUYA;
FUKASAWA, MASASHI y
GONDA, MAKI

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 808 503 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de prueba de plaquetas en sangre

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la función plaquetaria de la sangre utilizando una pequeña cantidad de sangre, más en particular, a un procedimiento que utiliza un microchip para someter a prueba la función plaquetaria de la sangre.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

(Problemas en la técnica anterior de la prueba de agregación plaquetaria)

15 La activación y la agregación de plaquetas desempeñan un papel central en la formación de trombos (trombo blanco) en las arterias y la hemostasia primaria.

Las plaquetas se unen directa e indirectamente al colágeno existente bajo las células endoteliales vasculares cuando se daña un vaso sanguíneo. En un entorno con un torrente sanguíneo lento (bajo una tensión de cizallamiento baja), su unión es principalmente unión directa mediante receptores de colágeno, tales como GPVI, mientras que en un entorno con un torrente sanguíneo rápido (bajo una tensión de cizallamiento alta), el FvW se une al colágeno y el receptor GPIIb α de plaquetas se une a FvW, provocando la unión indirecta de las plaquetas al colágeno. Las interacciones directas e indirectas con colágeno activan las plaquetas, y mediante dicha estimulación, se liberan diversas sustancias de activación plaquetaria, tales como ADP y serotonina, a partir de gránulos densos y gránulos α .

25

Esos factores de activación plaquetaria liberados activan sus propias plaquetas y las plaquetas cercanas. En las plaquetas activadas, los receptores de fibrinógeno GPIIb y IIIa se alteran estructuralmente a las formas activadas, cambiando las plaquetas a la forma de alta afinidad contra el fibrinógeno. A través del fibrinógeno, que es dimérico, las plaquetas activadas se reticularan secuencialmente entre sí, dando lugar a agregación plaquetaria.

30

Sin embargo, la mayoría de los agregómetros convencionales emplean un procedimiento para medir la activación y el proceso de agregación de plaquetas provocado por la estimulación con una gran cantidad de un reactivo de activación plaquetaria (documento no de Patente 1).

35

Por lo tanto, la reacción de activación plaquetaria se induce en un entorno que es muy diferente de la condición fisiológica de la activación plaquetaria y, aunque ha sido posible medir una diferencia evidente en la función, tal como disfunción congénita de cada receptor, ha sido difícil medir funciones plaquetarias más fisiológicas.

40 El PFA-100 (analizador de la función plaquetaria: documento no de Patente 2) es un sistema para medir la obstrucción de orificios mediante la activación general de plaquetas debida al contacto con colágeno inmovilizado, la tensión de cizallamiento y el contacto con una sustancia de inducción plaquetaria. En comparación con la agregación plaquetaria convencional mediante la estimulación con una sola sustancia de inducción de la activación plaquetaria, este es un sistema de medición que emplea un entorno más similar al entorno fisiológico. Sin embargo, ha sido imposible controlar la variación de los datos y las concentraciones de sustancias de inducción contenidas en la sangre que pasan a través de los orificios. Por lo tanto, la agregación plaquetaria inducida bajo una afección en la que las sustancias de inducción de la activación plaquetaria están en concentraciones muy bajas o ausentes, que se observa en pacientes en los que las plaquetas ya están activadas por el desarrollo de trombosis; y la capacidad de agregación plaquetaria provocada por la estimulación con una concentración muy alta de una sustancia de inducción plaquetaria en el caso de una medición de la función plaquetaria en pacientes que padecen disfunción plaquetaria; no podía medirse de manera apropiada.

50

Además, el documento de Patente 1 da a conocer un procedimiento para medir la función plaquetaria, en el que la sangre se hace pasar a través del interior de un capilar y, a continuación, a través de la abertura de un elemento de división, y se mide el periodo de tiempo necesario para la obstrucción de la abertura del elemento de división por la formación de trombos. Sin embargo, dado que, en este procedimiento, se añade una gran cantidad de un reactivo de activación plaquetaria, ha sido difícil medir la función plaquetaria en detalle reflejando condiciones *in vivo* en los casos, por ejemplo, en los que se activan las plaquetas pero se reduce el número de plaquetas y en los que el número de plaquetas es normal pero la función plaquetaria es débil.

60

El documento de Patente 2 describe un procedimiento para medir la función plaquetaria, que utiliza ácido araquidónico a una concentración suficiente para activar al máximo las plaquetas. Al igual que con el documento de Patente 1, es difícil medir la función plaquetaria con suficiente precisión para reflejar condiciones *in vivo*, en particular en pacientes en los que se activan las plaquetas pero se reduce el número de plaquetas o en los que el número de plaquetas es normal pero la función plaquetaria es débil. El documento de Patente 3 describe un aparato y un procedimiento para monitorizar la formación de trombos, en los que la sangre anticoagulada se hace fluir a

65

través de un canal que simula un vaso sanguíneo mientras se libera un tratamiento anticoagulante o se fomenta la coagulación de la sangre con el fin de monitorizar la formación de trombos. Sin embargo, el documento de Patente 2 no muestra un procedimiento para monitorizar la agregación plaquetaria sola.

5 DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Patente JP 2007-298511 A/Patente US 2007/0254325

10 Documento de Patente 2: Patente WO 2006/115844

Documento de Patente 3: Patente EP 1950567

Documentos no de patente

15 Documento no de patente 1: "Platelet Aggregability Test", Thrombosis and Circulation, vol. 12, n.º 4, págs. 17-20, 2004

Documento no de patente 2: "Measurement of Platelet Aggregability with PFA-100" Thrombosis and Circulation, vol. 13, n.º 3, págs. 90-94, 2005

20 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

25 En enfermedades, tales como la septicemia y el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID), las plaquetas están en un estado activado debido al trastorno endotelial vascular y la formación de trombos, y también se forman complejos entre plaquetas y leucocitos, y similares. Además, dado que se consumen muchísimas plaquetas por la continua formación de trombos, se puede producir un episodio hemorrágico a pesar de la formación de trombos *in vivo*.

30 En las pruebas convencionales de la función plaquetaria, ha sido difícil llevar a cabo un ensayo que refleje de manera estricta dichos síntomas.

35 Por ejemplo, en el procedimiento turbidimétrico, cuando se fomenta la reactividad frente a una sustancia de inducción plaquetaria, se considera que la función plaquetaria se fomenta (fuerte) incluso en los casos en los que se reducen las plaquetas. Además, dado que los complejos entre plaquetas y leucocitos, que se forman por la respuesta inflamatoria, o similar, *in vivo* y afectan en gran medida a la formación de trombos, precipitan junto con eritrocitos durante la centrifugación para la preparación de plasma rico en plaquetas, estos no están incluidos en el plasma rico en plaquetas.

40 Además, cuando se utiliza el PFA-100, se emplea la misma concentración de una sustancia de inducción para la medición tanto en pacientes que tienen una función plaquetaria fuerte como en pacientes que tienen una función plaquetaria débil, de modo que es imposible llevar a cabo de manera apropiada una prueba para confirmar la inducción natural de la agregación en una afección en la que la sustancia de inducción está ausente o en una concentración muy baja, o para confirmar, en un paciente al que se le administró un antiagregante plaquetario, el efecto farmacológico del antiagregante en una afección en la que la concentración de la sustancia de inducción es muy alta. Además, incluso en los casos en los que se retrasó el tiempo de obstrucción en la medición con PFA-100, ha sido difícil llevar a cabo una comparación entre los casos en los que la función plaquetaria es débil y en los que el número de plaquetas es pequeño pero se fomenta la función plaquetaria (activada en el organismo vivo).

50 La presente invención se realizó en vista de las circunstancias descritas anteriormente y tiene como objetivo dar a conocer un procedimiento que permita la evaluación eficiente y precisa de la función plaquetaria en un entorno equivalente al torrente sanguíneo, utilizando una cantidad pequeña de sangre.

55 Para resolver los problemas, la presente invención da a conocer un procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, en el que la agregación plaquetaria se somete a prueba sometiendo sangre anticoagulada a un tratamiento débil de activación plaquetaria con un reactivo de activación plaquetaria, haciendo pasar la sangre anticoagulada tratada a través de un capilar que tiene una superficie adhesiva para plaquetas en, como mínimo, una parte de su superficie interna, y observando o midiendo el comportamiento de la sangre en el capilar para medir la agregación plaquetaria, en el que, como mínimo, una parte del interior de dicho capilar tiene una sección que comprende paredes que se extienden a lo largo de la dirección del torrente sanguíneo en el capilar y divide la anchura del capilar en no menos de 5 canales, en el que la anchura de cada canal en dicha sección es de 10 a 200 μm ,
60 en el que dicha superficie adhesiva para plaquetas se dispone en dicha sección del capilar, y en el que dicho tratamiento débil de activación plaquetaria se lleva a cabo mezclando la sangre anticoagulada con un reactivo de activación plaquetaria en una cantidad con la que no se produce una agregación plaquetaria irreversible.

65 En este caso, la sangre anticoagulada es, preferentemente, sangre entera tratada con un anticoagulante

seleccionado entre ácido cítrico, heparina o hirudina.

Además, la superficie adhesiva para plaquetas está hecha, preferentemente, de revestimiento de colágeno o vidrio.

5 En este caso, el tratamiento de activación plaquetaria se lleva a cabo, preferentemente, con un reactivo de activación plaquetaria, y el reactivo de activación plaquetaria es, preferentemente, adenosina difosfato, que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 5 μ M, o el reactivo de activación plaquetaria es, preferentemente, ácido araquidónico, que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 1 mM.

10 El capilar se forma, preferentemente, en un microchip.

15 En el procedimiento de la presente invención para someter a prueba la agregación plaquetaria, la agregación plaquetaria se somete a prueba, preferentemente, mediante un proceso en el que la sangre anticoagulada, sometida a tratamiento débil de activación plaquetaria, se introduce en el capilar mediante una bomba, y la presión ejercida sobre la bomba por el flujo de entrada de la sangre en el capilar se mide con un sensor de presión. En este caso, la sangre anticoagulada se almacena, preferentemente, en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre que se introduce en el capilar mediante la introducción de un líquido que tiene una densidad relativa menor que la sangre en la sección de almacenamiento de sangre mediante la bomba, y se mide la presión de entrada del líquido, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar.

20 Además, la sangre anticoagulada se almacena, preferentemente, en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre anticoagulada que se mezcla con el reactivo de activación plaquetaria en la sección de almacenamiento de sangre mediante la introducción del reactivo de activación plaquetaria mediante la bomba en la sección de almacenamiento de sangre, y la sangre mezclada con el reactivo de activación plaquetaria se introduce en el capilar, mientras se mide la presión de entrada del reactivo de activación plaquetaria, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por la entrada de la sangre en el capilar.

25 Además, preferentemente, en el procedimiento de la presente invención para someter a prueba la agregación plaquetaria, el capilar se conecta a la sección de almacenamiento de sangre, y la sangre anticoagulada mezclada con el reactivo de activación plaquetaria en la sección de almacenamiento de sangre se deja pasar a través del capilar. En este caso, el reactivo de activación plaquetaria se mezcla, preferentemente, con la sangre anticoagulada inmediatamente antes de la medición. Alternativamente, el reactivo de activación plaquetaria se mezcla con la sangre anticoagulada, de manera que la concentración del reactivo de activación plaquetaria en la mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria aumenta a lo largo de un gradiente de concentración lineal o un gradiente de concentración gradual. La mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria se agita, preferentemente.

40 RESULTADOS DE LA INVENCION

45 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, la agregación plaquetaria se puede someter a prueba dejando pasar sangre anticoagulada a través de un capilar que tiene una superficie adhesiva para plaquetas en, como mínimo, una parte de su superficie interna, y observando o midiendo el comportamiento de la sangre en el capilar, utilizando como un índice la activación de plaquetas mediante la tensión de cizallamiento provocada cuando la sangre pasa a través de la superficie adhesiva para plaquetas.

50 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 2 de la presente invención, el tratamiento de anticoagulación se puede llevar a cabo de manera económica, dado que se utiliza ácido cítrico, heparina o hirudina para el tratamiento de anticoagulación.

55 En los casos en los que se utiliza revestimiento de colágeno como la superficie adhesiva para plaquetas y el anticoagulante que se va a utilizar es un quelante de calcio, tal como ácido cítrico, la medición de la función plaquetaria se lleva a cabo de manera más adecuada mezclando sangre con un reactivo de activación plaquetaria y dejando pasar la mezcla a través del revestimiento de colágeno. Por otro lado, en los casos en los que se utiliza un anticoagulante distinto de un quelante de calcio, especialmente hirudina, la agregación plaquetaria se produce de manera más rápida y fuerte en el colágeno que en los casos en los que el tratamiento de anticoagulación se lleva a cabo con ácido cítrico, lo que provoca la obstrucción del capilar, de modo que es posible una prueba de la función plaquetaria estable incluso sin utilizar un reactivo de activación plaquetaria. Cuando la agregación plaquetaria no se produce debido a una disfunción plaquetaria, a la utilización de un antiagregante plaquetario, o similar, el grado de disminución en la función plaquetaria o el efecto del antiagregante plaquetario se puede medir mezclando un reactivo de activación plaquetaria antes de la medición. Al disponer canales con diferentes anchuras de canal en un solo chip y utilizar sangres anticoaguladas con hirudina y ácido cítrico, la fuerza de la capacidad de agregación plaquetaria, la sensibilidad a una sustancia de inducción plaquetaria, el efecto de un antiagregante plaquetario, y similares, se pueden medir exhaustivamente.

- 5 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 3 de la presente invención, se puede medir una función plaquetaria más fisiológica, dado que la superficie adhesiva para plaquetas está fabricada de revestimiento de colágeno.
- 10 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 3 de la presente invención, se puede medir la función plaquetaria con una sustancia que es menos costosa, dado que la superficie adhesiva para plaquetas está fabricada de vidrio.
- 15 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, se puede medir la función plaquetaria en una condición más fisiológica y se pueden obtener resultados de prueba que reflejan diversas enfermedades, dado que la sangre anticoagulada se somete a tratamiento débil de activación plaquetaria.
- 20 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, el tratamiento débil de activación plaquetaria se puede llevar a cabo de manera sencilla, dado que el tratamiento débil de activación plaquetaria se lleva a cabo mezclando la sangre anticoagulada con un reactivo de activación plaquetaria en una cantidad con la que no se produce agregación plaquetaria irreversible, y una combinación de activación plaquetaria por un reactivo de activación plaquetaria y activación plaquetaria por tensión de cizallamiento sobre la superficie adhesiva para plaquetas permite la observación de una activación plaquetaria más fisiológica.
- 25 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 4 de la presente invención, la función plaquetaria se puede someter a prueba en condiciones más fisiológicas y se pueden obtener resultados que reflejan diversas enfermedades, dado que el reactivo de activación plaquetaria es adenosina difosfato que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 5 μ M.
- 30 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 4 de la presente invención, la función plaquetaria se puede someter a prueba en condiciones más fisiológicas y se pueden obtener resultados que reflejan diversas enfermedades, dado que el reactivo de activación plaquetaria es ácido araquidónico que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 1 mM.
- 35 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, se produce fácilmente la activación plaquetaria por tensión de cizallamiento, dado que, como mínimo, una parte del interior del capilar tiene una sección que comprende paredes que se extienden a lo largo de la dirección del torrente sanguíneo en el capilar y divide la anchura del capilar en no menos de 5 canales.
- 40 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, los pequeños agregados plaquetarios, cuando se forman, pueden aumentar la presión interna sin ser arrastrados por el torrente sanguíneo incluso con un torrente sanguíneo rápido y bajo una tensión de cizallamiento alta, dado que la anchura de cada canal en la sección es de 10 a 200 μ m, lo que permite al canal proporcionar un andamiaje.
- 45 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 1 de la presente invención, los agregados plaquetarios se retienen fácilmente en la sección, dado que la superficie adhesiva para plaquetas se disponen la sección del capilar.
- 50 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 5 de la presente invención, una prueba se puede llevar a cabo con una pequeña cantidad de sangre, dado que el capilar se forma en un microchip.
- 55 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 6 de la presente invención, la función plaquetaria se puede medir cuantitativamente, dado que la sangre anticoagulada se introduce en el capilar mediante una bomba, y la presión ejercida sobre la bomba por el flujo de entrada de la sangre en el capilar se mide con un sensor de presión, sometiendo a prueba de ese modo la función plaquetaria.
- 60 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 7 de la presente invención, la bomba no se contamina con sangre, dado que la sangre anticoagulada se almacena en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre que se introduce en el capilar mediante la introducción de un líquido que tiene una densidad relativa menor que la sangre en la sección de almacenamiento de sangre mediante la bomba, y se mide la presión de entrada del líquido, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar.
- 65 Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 8 de la presente invención, una prueba se puede llevar a cabo rápidamente, dado que la sangre anticoagulada se almacena en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre anticoagulada que se mezcla con un

reactivo de activación plaquetaria en la sección de almacenamiento de sangre mediante la introducción del reactivo de activación plaquetaria mediante la bomba en la sección de almacenamiento de sangre, y la sangre mezclada con el reactivo de activación plaquetaria se introduce en el capilar, mientras se mide la presión de entrada del reactivo de activación plaquetaria, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar.

Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 9 de la presente invención, se puede medir en un solo experimento la activación plaquetaria por el reactivo de activación plaquetaria en un amplio intervalo de concentración y la hiperactividad y la hipoactividad de plaquetas, lo que es deseable, dado que el reactivo de activación plaquetaria se mezcla con la sangre anticoagulada de manera que la concentración del reactivo de activación plaquetaria en la mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria aumenta a lo largo de un gradiente de concentración lineal o un gradiente de concentración gradual.

Con el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, según la reivindicación 10 de la presente invención, se pueden obtener resultados de prueba más precisos, dado que se agita la mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama que muestra un primer microchip que constituye un dispositivo de monitorización de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria.

La figura 2 es un diagrama que muestra un primer dispositivo de monitorización de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria.

La figura 3 es un diagrama que muestra un segundo microchip que constituye un dispositivo de monitorización de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria.

La figura 4 es un diagrama que muestra un segundo dispositivo de monitorización de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria.

La figura 5 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 1.

La figura 6 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 2.

La figura 7 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 3.

La figura 8 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 4.

La figura 9 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 5.

La figura 10 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 109 en el ejemplo 6.

La figura 11 es un diagrama (fotografías) que muestra el estado de activación plaquetaria en el ejemplo 7. A: sin ADP; B: ADP 0,025 μ M; C: ADP 0,05 μ M; D: ADP 0,1 μ M.

La figura 12 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 209 en los ejemplos 8 a 10.

La figura 13 es un diagrama que muestra un tercer dispositivo de monitorización de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria.

La figura 14 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 209 en los ejemplos 11 a 13.

La figura 15 es un diagrama que muestra cambios en la presión en la bomba 209 en los ejemplos 14 y 15.

La figura 16 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido ácido araquidónico. A muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16a a la que se había añadido ácido araquidónico. B muestra el aumento de presión en un experimento similar a 16a, en el que el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina.

La figura 17 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 10 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido ácido araquidónico. C muestra los resultados sobre el aumento de presión a 10 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16b a la que se había añadido ácido araquidónico. D muestra el aumento de presión en un experimento similar a 16b, en el que el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina.

La figura 18 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 5 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido ácido araquidónico. E muestra los resultados sobre el aumento de presión a 5 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16C a la que se había añadido ácido araquidónico. F muestra el aumento de presión en un experimento similar a 16c, en el que el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina.

La figura 19 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido colágeno. A muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 μ l/min., resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16d a la que se añadieron 6 μ l de colágeno. B, C y D muestran el aumento de presión en experimentos similares al ejemplo 16d, donde se utilizó la sangre a la que se añadieron 18 μ l de colágeno en el ejemplo 18; donde se utilizó la sangre a la que se añadieron 12 μ l de colágeno en el ejemplo 18; y donde el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina; respectivamente.

La figura 20 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 10 μ l/min., resultados que se

obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido colágeno. E muestra los resultados sobre el aumento de presión a 10 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16e a la que se había añadido colágeno. F muestra el aumento de presión en un experimento similar a 16e, en el que el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina.

5 La figura 21 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 5 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando sangre a la que se había añadido colágeno. F muestra los resultados sobre el aumento de presión a 5 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre del sujeto G en el ejemplo 16f a la que se había añadido colágeno. G muestra el aumento de presión en un experimento similar a 16f, en el que el sujeto G había tomado preliminarmente 100 mg de aspirina.

10 La figura 22 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre tratada con 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ReoPro en el ejemplo 21. El "control" indica los resultados sobre el aumento de presión a 20 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre en el ejemplo 19 (sin tratamiento con ReoPro).

15 La figura 23 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 7 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre tratada con 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ReoPro en el ejemplo 21. El "control" indica los resultados sobre el aumento de presión a 7 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre en el ejemplo 20 (sin tratamiento con ReoPro).

20 La figura 24 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 20 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre tratada con 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OS-1 en el ejemplo 22. El "control" indica los resultados sobre el aumento de presión a 20 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando sangre sin tratamiento con OS-1.

25 La figura 25 es un diagrama que muestra los resultados sobre el aumento de presión a 7 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando la sangre tratada con 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OS-1 en el ejemplo 22. El "control" muestra los resultados sobre el aumento de presión a 7 $\mu\text{l}/\text{min.}$, resultados que se obtuvieron utilizando sangre sin tratamiento con OS-1.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

30 Se describe un dispositivo de prueba de plaquetas que se puede utilizar en el procedimiento haciendo referencia a las figuras. En la presente invención, "sangre" incluye sangre entera y plasma rico en plaquetas.

35 La figura 1 es un diagrama conceptual que muestra el primer microchip que constituye el dispositivo de prueba de plaquetas, no según la invención, que se puede utilizar en el procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria. A continuación se realizará una explicación basándose en la figura 1.

40 La figura 1(A) es una vista en planta que muestra el primer sustrato 100, en el que una ranura correspondiente al capilar 101 del microchip 1 está grabada sobre la superficie. La forma en sección transversal de esta ranura es arbitraria y puede ser rectangular, en forma de U, en forma de V, o similar. Dado que los agregados plaquetarios son frágiles, la profundidad de la ranura es, preferentemente, no mayor de 10 a 200 μm para medir el aumento de presión. La anchura de la ranura es, preferentemente, de 10 a 100 μm .

45 En una parte entre el primer extremo (el extremo en el lado de entrada) y el segundo extremo (el extremo en el lado de salida) de la ranura correspondiente al capilar 101, se disponen una serie de paredes de división en canales 103 que se extienden a lo largo de la dirección del torrente sanguíneo para formar la sección de división en canales 102 que divide la anchura del capilar en una serie de canales.

50 Además, los intervalos entre las paredes de división en canales 103 son, preferentemente, no mayores de 200 μm . Con una anchura no mayor de 200 μm , cuando se ha formado un agregado plaquetario, el agregado plaquetario puede aumentar la presión interna sin ser arrastrado por el torrente sanguíneo incluso con un torrente sanguíneo rápido y bajo una tensión de cizallamiento alta. Además, en la sección de división en canales 102, la anchura del capilar 101 está dividida, preferentemente, en no menos de 5 canales mediante las paredes de división en canales 103. Es decir, en el caso en el que la anchura del canal está dividida en no menos de 5 canales, se promedia la obstrucción de los respectivos canales divididos y, por lo tanto, se pueden obtener fácilmente datos con menos variación.

55 La forma de las paredes de división en canales 103 no está limitada, siempre que puedan dividir la anchura del capilar 101 en una serie de canales.

60 La figura 1(B) es una vista en planta que muestra el segundo sustrato 110 sobre el que se graban orificios penetrantes correspondientes a la entrada 104 y la salida 105 del microchip 1. Las posiciones de los orificios penetrantes correspondientes a la entrada 104 y la salida 105 son las posiciones correspondientes, tras la laminación con el primer sustrato 100, al primer extremo del capilar 101 y el segundo extremo del capilar 101, respectivamente, sobre el primer sustrato 100. Además, al revestir, con colágeno, o similar, el lado posterior del segundo sustrato 110 que cubre la sección de división en canales 102 en el primer sustrato 100, se forma una superficie adhesiva para plaquetas 106. Más en particular, tal como se muestra en la figura 1(C), el colágeno, o

65

similar, se aplica ampliamente sobre el área que se va a utilizar como la superficie adhesiva para plaquetas 106 teniendo en cuenta el margen de seguridad.

5 La superficie adhesiva para plaquetas también se puede extender sobre toda la longitud del capilar, tal como se muestra en la figura 3 (segundo microchip). En el segundo microchip, el material del segundo sustrato 210 es vidrio, y toda la longitud del lado del segundo sustrato en el capilar 201 en el microchip 2 funciona como la superficie adhesiva para plaquetas 206.

10 Alternativamente, en lugar de proporcionar un orificio penetrante en la posición correspondiente al segundo extremo del capilar en el segundo sustrato y, de ese modo, proporcionar una salida, tal como se muestra en las figuras 1 y 3, una sección de reserva de líquido residual 307 para almacenar residuo sanguíneo que ha pasado a través de la superficie adhesiva para plaquetas 306 se puede proporcionar al disponer una ranura, de manera que esta rodea la posición correspondiente al segundo extremo del capilar 301 en el segundo sustrato 310 y cubre la ranura con el primer sustrato 300, tal como se muestra en la figura 13. Al establecer la capacidad de la sección de reserva de líquido residual 307 mayor que la cantidad de sangre que se va a someter a prueba, se puede eliminar la operación de aspiración de residuo sanguíneo de la salida con una bomba, o similar, y descargarlo, tal como en los microchips primero y segundo, de modo que la prueba se puede llevar a cabo más fácilmente. Se puede proporcionar un orificio penetrante en la sección de reserva de líquido residual 307 para proporcionar un orificio de ventilación 305. Al colocar un material absorbente de sangre 308 en la posición correspondiente al orificio penetrante 305 sobre la superficie del microchip 3, se puede evitar la dispersión de residuo sanguíneo a la salida del microchip incluso en los casos en los que la cantidad de la muestra de sangre es grande. Los ejemplos del material absorbente de sangre que se va a unir incluyen esponjas y telas.

20 La figura 1(C) es una vista en planta que muestra el microchip 1, en el que el primer sustrato 100 y el segundo sustrato 110 están laminados entre sí, de manera que la ranura en el primer sustrato 100 y la superficie adhesiva para plaquetas del segundo sustrato 110 están orientadas hacia dentro. La línea ondulada indica que el capilar 103 existe en el microchip 1.

30 Los ejemplos de la superficie adhesiva para plaquetas incluyen revestimiento de colágeno y vidrio. Entre estos, el colágeno es especialmente preferente, dado que se puede obtener y manipular fácilmente, y puede proporcionar un modelo similar a un vaso sanguíneo real. La superficie adhesiva para plaquetas también puede ser una que contenga colágeno y tromboplastina tisular. La sustancia, tal como colágeno, reviste la superficie adhesiva para plaquetas 106 con una alta resistencia adhesiva para evitar que el torrente sanguíneo la elimine por lavado.

35 El revestimiento de colágeno se puede aplicar de manera sencilla con una alta resistencia adhesiva, por ejemplo, disolviendo colágeno en una solución ácida y aplicando la solución resultante a una posición predeterminada sobre un sustrato, tal como vidrio o poliestireno, al que se le confirió hidrofiliidad, seguido por el lavado y secado del sustrato, tal como se describe en la Patente JP 05-260950 A y en Blood. 1 de abril de 1995;85(7):1826-35.

40 En los casos en los que se va a revestir una resina hidrófoba, o similar, el revestimiento se puede lograr hidrofiliando la superficie de la resina mediante tratamiento con plasma, o similar, y, a continuación, aplicando una solución de colágeno al área deseada, seguido por secado al aire o secado a presión reducida.

45 En los casos en los que se utiliza un plástico como el material de base, este se puede revestir fácilmente con colágeno o colágeno que contiene tromboplastina tisular hidrofiliando su superficie mediante tratamiento con plasma, o similar, y, a continuación, aplicando una solución de colágeno al área deseada utilizando un dispensador, tal como una pipeta o una jeringa.

50 En los casos en los que se utiliza vidrio como la superficie adhesiva para plaquetas, se puede utilizar un segundo sustrato 110, en el que sólo la posición correspondiente a la superficie adhesiva para plaquetas 106 está fabricada con vidrio y el otro área está fabricada con un plástico, silicona, o similares, o, tal como se muestra en la figura 3, la superficie adhesiva para plaquetas 206 se puede extender a lo largo de toda la longitud del capilar 201 en los casos en los que se utiliza un sustrato de vidrio como el segundo sustrato 210 y el segundo sustrato está laminado con un primer sustrato 200 formado con un plástico, silicona, o similares.

55 El material del microchip 1 es, preferentemente, un metal, vidrio, plástico, silicona, o similares. En vista de la utilización en la monitorización de sangre (análisis de imágenes, especialmente), es preferente un material transparente. Además, en vista de la formación de un circuito, es preferente un plástico, y es especialmente preferente un plástico transparente. En los casos en los que el material es una silicona, tal como PDMS (polidimetilsiloxano), se logra una excelente adhesión entre los sustratos, de modo que el primer sustrato 100 se puede laminar con el segundo sustrato 110 incluso presionando sin utilizar un adhesivo, o similar, para la adhesión, pero en los casos en los que se aplica una alta presión al interior del microchip 1, se utiliza, preferentemente, un adhesivo. También es posible suprimir de manera fácil y efectiva la coagulación sanguínea en sitios inesperados utilizando poli(acrilato de 2-metoxietilo) (PMEA). La ranura y el orificio proporcionados en el sustrato del microchip 1 se pueden grabar con un cortador o un haz láser, y en los casos en los que el material del microchip 1 es un plástico, también se pueden formar mediante moldeo por inyección. La formación mediante moldeo por inyección es

preferente, dado que se pueden preparar de manera eficiente microchips 1 que tienen una calidad constante.

A continuación se describirá un ejemplo de prueba de la función plaquetaria que utiliza el microchip 1, basándose en la figura 1(C). A una primera entrada 104, está conectado un tubo, que no se muestra, y, a través del tubo, están conectados un depósito de sangre (sección de almacenamiento de sangre) 107 y una bomba 109 de envío de líquido, que no se muestran. Al inyectar el líquido en la bomba 109 conectada en el depósito 107, se inyecta la sangre en el depósito al microchip 1. Si el líquido en la bomba es un reactivo de activación plaquetaria, se activan las plaquetas de la sangre anticoagulada en el depósito y, además, se activan debido a la tensión de cizallamiento cuando pasan a través de la superficie adhesiva para plaquetas. Además, la concentración del reactivo de activación plaquetaria en el depósito se puede aumentar continuamente. Al colocar una barra de agitación en el depósito de sangre y agitar la sangre en el mismo, el reactivo de activación plaquetaria se mezcla constantemente con la sangre, lo que es preferente.

El líquido en la bomba de envío de líquido puede ser un líquido que tenga una densidad relativa menor que la sangre, tal como aceite mineral o solución salina fisiológica, y el líquido se puede introducir en el depósito llenado preliminarmente con sangre anticoagulada, permitiendo de ese modo que la sangre se introduzca en el capilar. Al medir la presión de entrada del líquido, la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar se puede medir indirectamente. La sangre anticoagulada con la que se llena preliminarmente el depósito es, preferentemente, una mezcla con un reactivo de activación plaquetaria. También es posible colocar previamente un reactivo de activación plaquetaria en el depósito en estado seco o líquido, seguido por el mezclado con la sangre. Además, al aumentar el caudal de la bomba de envío de líquido de manera gradual, también es posible aumentar la tensión de cizallamiento de manera gradual.

Los ejemplos del anticoagulante utilizado para el tratamiento de anticoagulación para suprimir la coagulación sanguínea incluyen citrato de sodio o potasio; oxalato de sodio o potasio; ACD (Ácido-Citrato-Dextrosa); y sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dicho anticoagulante se puede utilizar como un polvo, un producto liofilizado o una solución, tal como una solución acuosa. Entre estos anticoagulantes, es preferente citrato de sodio al 3,2 %, que se utiliza comúnmente, dado que está disponible fácilmente. En este caso, es preferente utilizar 1 volumen de este anticoagulante por cada 9 volúmenes de sangre.

Los ejemplos de los otros anticoagulantes que se pueden utilizar incluyen heparina, hirudina, aptómeros de trombina e inhibidor de tripsina derivada de maíz (1977. J. Biol. Chem 252. 8105). Se puede utilizar más de un anticoagulante. En los casos en los que el anticoagulante empleado es hirudina, se produce una agregación plaquetaria más fuerte, en comparación con el caso de tratamiento de anticoagulación con ácido cítrico, incluso sin el tratamiento con un reactivo de activación plaquetaria, de modo que la hirudina es adecuada para la medición de la función plaquetaria dependiente de la tensión de cizallamiento. En el caso de sangre anticoagulada con ácido cítrico, la medición de la función plaquetaria dependiente de la estimulación por un reactivo de activación plaquetaria se puede llevar a cabo con precisión, de modo que el ácido cítrico es más adecuado para la evaluación de un antiagregante plaquetario, y similares.

Los ejemplos del procedimiento para obtener la sangre anticoagulada incluyen un procedimiento en el que el anticoagulante descrito anteriormente se coloca preliminarmente en una jeringa o un tubo de extracción de sangre a vacío, seguido por la recogida de la sangre con el mismo, y un procedimiento en el que el anticoagulante se añade rápidamente a la sangre inmediatamente después de la extracción de la sangre.

También es posible extraer la sangre con un tubo de extracción de sangre a vacío, o similar, que contiene heparina, seguido por la adición de heparinasa y un anticoagulante adecuado para monitorizar, degradando de ese modo la heparina con la heparinasa, para lograr el reemplazo de la heparina con el anticoagulante adecuado para la medición.

Los ejemplos del reactivo de activación plaquetaria que se va a mezclar con la sangre anticoagulada incluyen ADP, colágeno, trombina, ácido araquidónico y ristocetina. El reactivo de activación plaquetaria se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración a la que se produce una activación plaquetaria débil. La concentración a la que se produce una activación plaquetaria débil es una concentración a la que no se produce agregación plaquetaria irreversible (agregación secundaria de plaquetas) en un estado estático. Por ejemplo, en el caso de ADP, es de 0,001 a 5 μM , y en el caso de ácido araquidónico, es de 0,001 a 1 mM. Sin embargo, en los casos en los que las reactividades con estos reactivos de activación plaquetaria disminuyen claramente debido a una anomalía de la función plaquetaria o a la administración de un antiagregante plaquetario, la medición del grado de disminución se lleva a cabo, preferentemente, con la adición de un reactivo de activación plaquetaria a una concentración mayor que estas concentraciones. En particular, en los casos en los que se mide la magnitud del efecto de clopidogrel o aspirina, es preferente llevar a cabo la medición con una concentración aumentada de ADP o ácido araquidónico, respectivamente.

La mezcla del reactivo de activación plaquetaria débil y la sangre anticoagulada, que se ha introducido desde la entrada 104 y se deja pasar a través del capilar 101, pasa a través de la sección de división en canales 102 mientras provoca tensión de cizallamiento y, de ese modo, potencia la activación de plaquetas, lo que conduce a la adhesión

5 y acumulación de las plaquetas en la superficie adhesiva para plaquetas. Al ajustar el caudal y el microchip y llevar a cabo experimentos comparativos bajo tensión de cizallamiento alta y tensión de cizallamiento baja, son posibles una evaluación más detallada de la función plaquetaria, una evaluación del efecto farmacológico de un antiagregante plaquetario, y similares. Al observar el caudal y la propiedad de la mezcla que pasa a través de la sección de división en canales 102, se puede monitorizar la función plaquetaria. La sangre sometida a monitorización se descarga desde la salida 105 proporcionada en el extremo del capilar 101.

A continuación se describirá un dispositivo de prueba de plaquetas que utiliza el microchip 1.

10 La figura 2 es un diagrama conceptual de un dispositivo de prueba de plaquetas A, en el que el microchip 1 está construido con sustratos transparentes e incorporada al dispositivo. A continuación se describirá el primer dispositivo basándose en la figura 2.

15 A una entrada 104 del microchip 1, un depósito 107 (sección de almacenamiento de sangre), en el que está ubicada la sangre anticoagulada y está contenida una barra de agitación 108, está conectado en una posición invertida, y al depósito 107, está conectada una bomba 109 de envío de líquido para suministrar un reactivo de activación plaquetaria mediante un tubo. A la bomba 109 de envío de líquido, está conectado un sensor de presión, que no se muestra.

20 Desde la bomba 109 de envío de líquido, el reactivo de activación plaquetaria se inyecta en el depósito 107, y el reactivo de activación plaquetaria y la sangre anticoagulada se mezclan mediante la barra de agitación 108, que es impulsada por un agitador magnético 113.

25 Al ajustar el caudal de la bomba cuando se introduce el reactivo de activación plaquetaria desde la bomba 109 de envío de líquido en el depósito 107 y, de ese modo, hacer que la concentración del reactivo de activación plaquetaria en la mezcla con sangre aumente de manera automática desde 0 hasta una concentración a la que se pueden inducir suficientemente las plaquetas, se puede medir en un solo experimento el fomento de la función de plaquetas y la disminución en la función de plaquetas, lo que es preferente. Por ejemplo, la concentración de ADP se puede aumentar a lo largo de un gradiente de concentración desde 0 hasta 0,1 μM , o la concentración de la sustancia de inducción se puede aumentar desde 0 hasta 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 y 0,1 μM de manera gradual.

30 La sangre anticoagulada mezclada con el reactivo de activación plaquetaria se inyecta en el capilar 101 del microchip 1. La mezcla pasa a través del capilar 101 y alcanza la sección de división en canales 102 que tiene una superficie adhesiva para plaquetas, tal como colágeno o vidrio.

35 Al observar la activación de plaquetas (adhesión, agregación, y similares) en la sección de división en canales 102 y la obstrucción del capilar provocada por la utilización de una cámara 111, se puede someter a prueba la función plaquetaria. Alternativamente, es posible una prueba de la función plaquetaria más cuantitativa al medir la presión en el canal con el sensor de presión conectado a la bomba 109 de envío de líquido. Además, al medir el periodo de tiempo necesario para que la mezcla de la sangre y el reactivo de activación plaquetaria pase a través del capilar 101 o la cantidad de la mezcla que ha pasado a través del capilar 101, también se puede llevar a cabo una prueba de la función plaquetaria.

45 La cámara 111 se conecta a un analizador de imágenes 114, y esto permite obtener imágenes, y similares, del estado de activación plaquetaria. La combinación de la evaluación visual tomando imágenes de la activación plaquetaria dentro del capilar y una prueba cuantitativa para la activación plaquetaria basada en el aumento de presión es muy importante en vista de la evaluación general del estado de la sangre de un paciente. Por ejemplo, en casos en que las plaquetas ya están activadas *in vivo* pero se consumen y reducen de manera notable en una afección patológica, tal como DIC, se retrasan el aumento de presión y la obstrucción. Incluso en dichos casos, tomar imágenes del interior con la cámara permite la confirmación de unas mayores adhesión y agregación, y similares, de plaquetas en la superficie adhesiva para plaquetas desde inmediatamente después del comienzo de la prueba, de modo que es posible la evaluación general del estado de la sangre de un paciente.

50 La cámara 111 puede ser móvil a lo largo de la dirección del torrente sanguíneo en el capilar 101.

55 Las plaquetas también se pueden analizar mediante el marcaje fluorescente de las plaquetas con quinacrina, o similar. En dicho caso, los resultados de la monitorización se pueden digitalizar monitorizando la luminancia por unidad de área debido a la fluorescencia mediante el análisis de imágenes, obteniendo de ese modo los resultados de la monitorización como datos.

60 El microchip 1 se coloca en un calentador 115 con forma de platina, y al calentar el microchip de 1 a 37 $^{\circ}\text{C}$ con el calentador 115, se puede llevar a cabo la monitorización en una condición similar al interior del organismo.

65 La mezcla que contiene sangre que ha pasado a través de la sección de división en canales 102 se descarga suavemente desde la salida 105 al conducto 112 de salida.

La barra de agitación se somete, preferentemente, a tratamiento de anticoagulación. El tratamiento de anticoagulación puede ser el revestimiento de la superficie de un material magnético con heparina, poli(vinil-lactonamida) (PVLVA), poli(acrilato de 2-metoxietilo) (PMEA), o similares, sumergiendo el material magnético en una resina fundida, o la formación de la superficie de una barra de agitación con la misma mediante el acabado de la resina, tal como moldeo por inyección en molde.

Aunque el dispositivo, en el que se mezclan un reactivo de activación plaquetaria y sangre anticoagulada en un depósito fuera del microchip, seguido por su introducción en el capilar en el microchip, se explicó anteriormente basándose en un ejemplo, el dispositivo de prueba de la función plaquetaria no está limitado al ejemplo descrito anteriormente.

Por ejemplo, también es posible construir un dispositivo en el que una sección de mezcla para mezclar sangre anticoagulada y un reactivo de activación plaquetaria se disponen en un microchip, y la sangre y el reactivo de activación plaquetaria se mezclan en el microchip, después de lo cual la mezcla se deja fluir al capilar desde la sección de mezcla.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación en más detalle a modo de ejemplos específicos, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

[Preparación de microchip y dispositivo de prueba de la función plaquetaria]

Se prepararon dos sustratos transparentes, es decir, un primer sustrato 100 mostrado en la figura 1(A) y un segundo sustrato 110 mostrado en la figura 1(B) (productos moldeados por inyección fabricados por Richell Corporation). El lado del primer sustrato 100 en el que la ranura correspondiente a un capilar 101 se abre y el lado del segundo sustrato 110 que tiene una superficie adhesiva para plaquetas 106 se unieron, de manera que éstos se enfrentan entre sí utilizando un agente de acoplamiento de silano y unión por compresión térmica a 60 °C durante 16 horas, para proporcionar el microchip 1 mostrado en la figura 1(C). En el primer sustrato 100, la longitud, la profundidad y la anchura del canal (capilar) 101 fueron 20 mm, 50 µm y 2 mm, respectivamente. En cuanto a la sección de división en canales 102, las paredes de división 103 que tienen, cada una, una longitud de 2 mm, una anchura de 25 µm y una altura de 50 µm, se colocaron a intervalos iguales de 25 µm, y esta parte se utilizó como una sección de división en canales 102. En el segundo sustrato 100, cada uno de los orificios correspondientes a una entrada 104 y una salida 105 era un orificio penetrante que tiene una sección transversal circular y un diámetro interno de 2 mm y una profundidad de 2 mm. En la posición en el segundo sustrato 110, que se superpone con la sección de división en canales 102 del primer sustrato 100, se aplicaron 3 mg/ml de colágeno tipo I (fabricado por Nitta Gelatin Inc.) y se secaron a vacío para proporcionar la superficie adhesiva para plaquetas 106.

Tal como se muestra en la figura 2, el microchip 1 preparado se colocó en un calentador 115 con forma de platina, y se conectó un depósito 107 a la entrada 104 del microchip 1. Una bomba 109 se conectó al depósito 107 mediante un tubo, y la presión ejercida sobre la bomba se midió con un sensor de presión, que no se muestra. En el depósito 107, estaba contenida una barra cilíndrica de agitación 108 con un diámetro de 2 mm y una longitud de 5 mm, que se preparó revistiendo un cilindro de hierro con PMEVA. La barra de agitación 108 se ajustó de manera que se puede rotar de 60 a 180 rpm mediante la fuerza magnética de un agitador 113 colocado bajo el calentador 115, que se calentó hasta 37 °C. Un conducto 112 de salida se conectó a la salida, de manera que se puede descargar la sangre después del análisis. Una cámara 111, a la que se conectó un analizador de imágenes 114, se colocó sobre la sección de división en canales 102 del microchip 1, permitiendo de ese modo la observación del estado de la activación plaquetaria en la sección de división en canales 102.

Ejemplo 1)

Utilizando el microchip 1 y el sistema de prueba de plaquetas A mostrado en la figura 2, se llevó a cabo la medición. Se recogió del sujeto A sangre sometida a tratamiento de anticoagulación con ácido cítrico.

La sangre entera sometida a tratamiento de anticoagulación con ácido cítrico se introdujo en el depósito 107, y se inyectó solución salina fisiológica desde la entrada en el depósito 107 mediante la bomba 109 conectada, extruyendo de ese modo la sangre desde el depósito 107 y permitiendo que la sangre fluyera en el microchip 1. En el depósito 107, está contenida la barra de agitación 108, y la sangre se agita mediante la barra de agitación 108.

El caudal de la bomba 109 fue de 100 µl/min. durante los primeros 10 segundos, y 3 µl/min. a continuación.

Los cambios en la presión en la bomba 109 se muestran en la figura 5.

Ejemplo 2)

El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que el caudal fue de 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. en lugar de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$.

5 (Se utilizó una muestra de sangre A del mismo sujeto que en el ejemplo 1.) Los cambios en la presión en la bomba 109 se muestran en la figura 6.

(Comentarios) Al aumentar el caudal desde 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. hasta 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. utilizando la misma muestra, la tensión de cizallamiento aumentó, y se confirmó el aumento de presión.

10 Ejemplo 3)

El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 2, excepto que se llenó una solución de ADP 0,5 μM en la bomba 109 en lugar de solución salina fisiológica. (Se utilizó una muestra de sangre del mismo sujeto A que en el ejemplo.) Los cambios en la presión en la bomba 109 se muestran en la figura 7.

15 Ejemplos 4 a 6)

Los experimentos en los ejemplos 1 a 3 se llevaron a cabo mediante la medición utilizando muestras de otro sujeto (sujeto B). Los cambios en la presión en la bomba 109 se muestran en las figuras 8, 9 y 10, respectivamente.

20 Experimento comparativo)

Se centrifugó sangre de los sujetos A y B a 800 rpm para obtener plasma rico en plaquetas, y la capacidad de agregación plaquetaria inducida por ADP se midió utilizando un agregómetro (PA-20, Kowa Company, Ltd.). Los agregados grandes inducidos por ADP 1 μM en la sangre del sujeto A fueron aproximadamente la mitad de los de la sangre del sujeto B.

25

Comentarios)

30 Basándose en los resultados en los sujetos A y B, se confirmó que el aumento de presión debido a la adhesión y agregación al colágeno bajo tensión de cizallamiento era más débil en el sujeto A que en el sujeto B. Sin embargo, en el sujeto A, la capacidad de agregación debido a ADP era más fuerte, y se confirmó que el aumento de presión debido a la adhesión y agregación al colágeno tras la adición de ADP era equivalente al del sujeto B.

35 Ejemplo 7)

Se llevó a cabo un experimento utilizando el microchip 1 y el sistema A en el ejemplo 1 para el diagnóstico por imágenes. La bomba 109 se llenó con aceite mineral, y el depósito 107 se llenó con sangre anticoagulada con ácido cítrico. El aceite mineral se suministró al depósito 107 utilizando la bomba 109 a un caudal de 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. para permitir que la sangre fluyera al microchip 1. Se llevaron a cabo exactamente los mismos experimentos utilizando sangre preparada mediante la adición de ADP a sangre tratada con ácido cítrico hasta concentraciones finales de 0,025 μM , 0,05 μM y 0,1 μM , respectivamente. Cada panel en la figura 11 muestra una imagen del estado en el interior del microchip 1 después de 1 minuto del experimento, que se tomó mediante la cámara 111.

40

45 Comentarios)

Cuando se añadió ADP, se observó un aumento en la cantidad de plaquetas adheridas a la parte de la cresta, que se produjo de una manera dependiente de la concentración de ADP, y fue posible confirmar visualmente la adherencia de plaquetas incluso a niveles en los que no se produjo un aumento de presión.

50 [Preparación de microchip y dispositivo de prueba de la función plaquetaria]

El primer sustrato 200 mostrado en la figura 3A y el segundo sustrato 210 mostrado en la figura 3B se laminaron entre sí y se unieron, para proporcionar el microchip 2 mostrado en la figura 3C. En cuanto al sustrato 200, se utilizó un sustrato fabricado de PDMS (Fluidware), y la profundidad de todos los canales era de 120 μm ; la anchura del canal era de 1 mm; la longitud de la cresta era de 1 mm; la anchura de la cresta era de 50 μm ; y la anchura de la ranura era de 50 μm . En cuanto al sustrato 210, se utilizó un portaobjetos, y se dispusieron orificios penetrantes correspondientes a la entrada y la salida, tal como en el sustrato 110, pero, a diferencia del sustrato 110, no se aplicó colágeno, dado que el vidrio desempeña una función como superficie adhesiva para plaquetas. Es decir, la longitud total del lado del segundo sustrato en el capilar 201 funciona como una superficie adhesiva para plaquetas 206.

55

El dispositivo de prueba de la función plaquetaria B mostrado en la figura 4 es el mismo que el dispositivo de prueba de la función plaquetaria A en la figura 2, excepto que se utilizó el microchip 2 en lugar del microchip 1, y que este no tiene barra de agitación ni agitador. Dado que, en los ejemplos siguientes, se colocó en el depósito sangre

65

anticoagulada mezclada preliminarmente con ADP, no era necesaria una barra de agitación ni un agitador.

Ejemplo 8)

5 Se utilizaron el microchip 2 mostrado en la figura 3 y el dispositivo de prueba de la función plaquetaria B mostrado en la figura 4. Aproximadamente 600 μ l de sangre anticoagulada con ácido cítrico se introdujeron en un depósito de sangre 207. Una bomba 209 se llenó con aceite mineral, y la bomba 209 se conectó al depósito 207, cuyo extremo estaba conectado, además, a una entrada 204 en el microchip 2. El aceite mineral se inyectó desde la bomba 209 en el microchip 2 a un caudal de 20 μ l/min., y se midió la presión de entrada del aceite mineral mediante un sensor de presión, que no se muestra.

Ejemplo 9)

15 Se midieron los cambios de presión llevando a cabo un experimento que fue el mismo que el del ejemplo 8, excepto que se añadió, además, ADP (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a la sangre anticoagulada con ácido cítrico en el depósito 207 hasta una concentración final de 2 nM.

Ejemplo 10)

20 Se midieron los cambios de presión llevando a cabo un experimento que fue el mismo que el del ejemplo 9, excepto que se utilizó sangre extraída 3 horas después de la dosificación con 75 mg de clopidogrel (Sanofi-aventis).

25 Los cambios en la presión en la bomba 209 en los ejemplos 8 a 10 se muestran en la figura 12. La adición de una cantidad muy pequeña de ADP provocó un aumento de presión, y el aumento se suprimió mediante la administración de clopidogrel.

[Preparación de microchip y dispositivo de prueba de la función plaquetaria]

30 Se prepararon dos sustratos transparentes, es decir, el primer sustrato 100 mostrado en la figura 1(A) y el segundo sustrato 110 mostrado en la figura 1(B) (productos moldeados por inyección fabricados por Richell Corporation). El lado del primer sustrato 100 en el que una ranura correspondiente a un capilar 101 se abre y el lado del segundo sustrato 110 que tiene una superficie adhesiva para plaquetas 106 se unieron, de manera que estos se enfrentan entre sí utilizando un agente de acoplamiento de silano y unión por compresión térmica, para proporcionar el microchip 1 mostrado en la figura 1(C). En el primer sustrato 100, la longitud, la profundidad y la anchura del canal (capilar) 101 fueron 20 mm, 50 μ m y 2 mm, respectivamente. En cuanto a la sección de división en canales 102, las paredes de división 103 que tienen, cada una, una longitud de 1,5 mm, una anchura de 50 μ m y una altura de 50 μ m, se colocaron a intervalos iguales de 50 μ m, y esta parte se utilizó como la sección de división en canales. En el segundo sustrato, cada uno de los orificios correspondientes a la entrada y la salida era un orificio penetrante que tenía una sección transversal circular y un diámetro interno de 2 mm y una profundidad de 2 mm. En la posición en el segundo sustrato 110, que se superpone con la sección de división en canales 102 del primer sustrato 100, se aplicaron aproximadamente 10 μ l de colágeno tipo I 3 mg/ml (fabricado por Nitta Gelatin Inc.) y se secaron a vacío para proporcionar una superficie adhesiva para plaquetas 106. El área en la que se aplicó el colágeno estaba desde 4 mm aguas arriba de la cresta hasta 2 mm aguas abajo de las crestas, incluyendo la cresta.

45 Tal como se muestra en la figura 4, el microchip 1 preparado se colocó en un calentador 215, y una bomba 209 y un depósito 207 se conectaron al microchip 1, tal como en el ejemplo 8.

Ejemplo 11)

50 (a) Se recogió sangre del sujeto D utilizando un tubo de recogida de sangre con hirudina (Multiplate Services GmbH), y aproximadamente 600 μ l de la sangre anticoagulada con hirudina se introdujeron en el depósito 207. La bomba 209 se llenó con aceite mineral y se conectó al depósito 207, cuyo extremo estaba conectado, además, a la entrada 104 en el microchip 1. El aceite mineral se inyectó desde la bomba 209 en el depósito a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y 20 μ l/min. a continuación, inyectando de ese modo la sangre en el depósito en el microchip 1 a los mismos caudales, midiéndose al mismo tiempo la presión de entrada del aceite mineral con un sensor de presión, que no se muestra.

55 (b) Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en (a), excepto que se inyectó aceite mineral al depósito a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y 10 μ l/min. a continuación, inyectándose de ese modo la sangre en el depósito al microchip 1 a los mismos caudales, midiéndose al mismo tiempo la presión de entrada del aceite mineral.

60 (c) Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en (a), excepto que se inyectó aceite mineral al depósito a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y 5 μ l/min. a continuación, inyectándose de ese modo la sangre en el depósito al microchip 1 a los mismos caudales, midiéndose al mismo tiempo la presión de entrada del aceite mineral.

65

Los resultados del ejemplo 11 (a), (b) y (c) se muestran en la figura 14(A). La abscisa indica el tiempo, y la ordenada indica el aumento de presión debido a la obstrucción en el chip. El aumento de presión se produjo en el sujeto D en el orden de los ejemplos (a), (b) y (c), es decir, en orden descendiente de tensión de cizallamiento.

5 Ejemplo 12)

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el ejemplo 11 también con el sujeto E. Los resultados se muestran en la figura 14(B).

10 Ejemplo 13)

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el ejemplo 11 también con el sujeto F. Los resultados se muestran en la figura 14(C).

15 Ejemplo de referencia)

Se midió la capacidad de agregación plaquetaria para los sujetos D, E y F utilizando un agregómetro de sangre entera Multiplate (Dynabyte). Se recogió sangre utilizando un tubo de recogida de sangre con hirudina, y se midió la capacidad de agregación inducida por ADP 6 μ M. Los resultados fueron los siguientes: D, 691 UA/min.; E, 525 UA/min.; y F, 652 UA/min. La capacidad de agregación inducida por ADP fue más fuerte en el sujeto D, seguido por el sujeto F y el sujeto E, en ese orden.

Comentarios

25 En cualquiera de D, E y F, el aumento de presión se produjo, en primer lugar, bajo una tensión de cizallamiento alta, seguido por una tensión de cizallamiento media y baja, en ese orden. Además, el aumento de presión se produjo, en primer lugar, en el sujeto D, seguido por F y E, en ese orden, y este resultado se correlacionó con el resultado de la prueba de capacidad de agregación inducida por ADP llevada a cabo con Multiplate.

30 Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en el ejemplo 11a, excepto que se recogió sangre con un tubo de recogida de sangre con ácido cítrico y se anticoaguló con citrato de sodio. En este caso, no se observó aumento de presión incluso 10 minutos después.

35 Ejemplo 14)

Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto E anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de reactivo de ADP 100 μ M (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, se llenó el depósito con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 20 μ l/min. a continuación.

Ejemplo 15)

45 a) Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en el ejemplo 14, excepto que se utilizó sangre del sujeto D.

b) Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en el ejemplo 14, excepto que se utilizó sangre del sujeto D extraída 6 horas después de la administración oral de 100 mg de clopidogrel.

50 Los resultados de los ejemplos 15 y 14 se muestran en la figura 15. En la figura 5, A indica los resultados del ejemplo 15a); B indica los resultados del ejemplo 15b); y C indica los resultados del ejemplo 14. Se puede observar que, en el sujeto D, el aumento de presión se retrasó debido a la administración de clopidogrel, y que el aumento de presión después de la administración de clopidogrel fue incluso más lento que el de la sangre del sujeto E.

55 Ejemplo 16)

a) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de ácido araquidónico 50 mM (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 20 μ l/min. a continuación.

60 b) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de ácido araquidónico 50 mM (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 10 μ l/min. a continuación.

65

c) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de ácido araquidónico 50 mM (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y 5 μ l/min. a continuación.

d) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de colágeno 100 μ g/ml (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 20 μ l/min. a continuación.

e) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de colágeno 100 μ g/ml (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 10 μ l/min. a continuación.

f) Aproximadamente 600 μ l de sangre del sujeto G anticoagulada con ácido cítrico se mezclaron con 6 μ l de colágeno 100 μ g/ml (Chrono-log Corporation), e inmediatamente a continuación, el depósito se llenó con la sangre. Una bomba llenada con aceite mineral se conectó al depósito, que estaba conectado, además, al microchip, tal como en el ejemplo 11a. El microchip 1 se colocó en un calentador, y se dejó que la sangre fluyera a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y de 5 μ l/min. a continuación.

Ejemplo 17)

Se llevaron a cabo los experimentos a a f en el ejemplo 16 para el sujeto G 6 horas después de la dosificación con 100 mg de aspirina.

Ejemplo 18)

Utilizando sangre del sujeto G extraída 6 horas después de la dosificación con 100 mg de aspirina, se llevaron a cabo experimentos de la misma manera que en los ejemplos 16d a f, excepto que el colágeno que se va a añadir se aumentó hasta 12 μ l o 18 μ l.

Los resultados del ejemplo 16 a 18 se muestran en las figuras 16 a 21.

A partir de estos resultados, se demostró que el efecto antiplaquetario de la aspirina se puede analizar añadiendo ácido araquidónico o colágeno a sangre tratada con ácido cítrico y dejando que la mezcla resultante fluya en el microchip, mientras se mide el aumento de presión. Además, tal como se muestra en la figura 19, se reveló que la sangre extraída después de la dosificación con aspirina también puede provocar un aumento de presión aumentando el colágeno que se va a añadir. Por lo tanto, se reveló que el procedimiento de la presente invención permite la evaluación de no solo la presencia/ausencia del efecto de la aspirina, sino también el grado de supresión de la función plaquetaria.

Por lo tanto, mediante el diagnóstico combinacional basado en la confirmación visual de agregados plaquetarios activados por la capacidad de formación de imágenes y el aumento de presión, es posible captar el estado de las plaquetas del paciente con más detalle.

Ejemplo 19)

Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en el ejemplo 11(a), excepto que se utilizó sangre del sujeto H.

Ejemplo 20)

Se llevó a cabo un experimento de la misma manera que en el ejemplo 19, excepto que se inyectó aceite mineral desde la bomba 209 en el depósito a un caudal de 200 μ l/min. durante los primeros 5 segundos, y 7 μ l/min. a continuación, inyectando de ese modo la sangre en el depósito en el microchip 1 a los mismos caudales, midiéndose al mismo tiempo la presión de entrada del aceite mineral.

Ejemplo 21)

Se llevó a cabo la medición de la misma manera que en el ejemplo 19 y el ejemplo 20, excepto que se añadió ReoPro (Eli Lilly) 0,4 μ g/ml y 0,8 μ g/ml, respectivamente, que es un anticuerpo contra el receptor GPIIb/IIIa en la membrana plaquetaria, a sangre anticoagulada con hirudina.

Ejemplo 22)

5 Se llevó a cabo la medición de la misma manera que en el ejemplo 19 y el ejemplo 20, excepto que se añadieron 0,01 µg/ml y 0,1 µg/ml de OS-1 (Biochemistry. 22 de abril de 2008;47(16):4674-82), respectivamente, que es un inhibidor del receptor GPIb en la membrana plaquetaria, a sangre anticoagulada con hirudina.

Los resultados de los ejemplos 19, 20 y 21 se muestran en la figura 22 y la figura 23.

10 La figura 22 muestra el efecto inhibitor de ReoPro a un caudal de 20 µl/min., y la figura 23 muestra el efecto inhibitor de ReoPro a un caudal de 7 µl/min.

Los resultados del ejemplo 22 se muestran en la figura 24 y la figura 25.

15 La figura 24 muestra el efecto inhibitor de OS-1 a un caudal de 20 µl/min., y la figura 25 muestra el efecto inhibitor de OS-1 a un caudal de 7 µl/min.

Comentarios)

20 GPIIb/IIIa se une principalmente al fibrinógeno y está implicado en la agregación plaquetaria, y GPIb es un receptor que se une a FvW y está implicado en la reacción de adhesión plaquetaria bajo una tensión de cizallamiento alta.

OS-1, que suprime la reacción de adhesión plaquetaria, mostró una acción antiplaquetaria fuerte bajo una tensión de cizallamiento alta, mientras que ReoPro mostró un efecto antiplaquetario bastante fuerte bajo una tensión de cizallamiento baja.

25

DESCRIPCIÓN DE SÍMBOLOS

30 A, B: dispositivo de monitorización de plaquetas; 1, 2, 3: microchip; 100, 200, 300: primer sustrato; 101, 201, 301: capilar; 102, 202, 302: sección de división en canales; 103, 203, 303: paredes de división en canales; 104, 204, 304: entrada; 105, 205: salida; 106, 206, 306: superficie adhesiva para plaquetas; 107, 207: depósito; 108: barra de agitación; 109, 209: bomba; 110, 210: segundo sustrato; 111, 211: cámara; 112, 212: conducto de salida; 113: agitador; 114, 214: analizador de imágenes; 115, 215: calentador; 305: orificio de ventilación; 307: sección de reserva de líquido residual; 308: material absorbente de la sangre

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para someter a prueba la agregación plaquetaria, que comprende someter sangre anticoagulada a un tratamiento débil de activación plaquetaria con un reactivo de activación plaquetaria, hacer pasar la sangre anticoagulada tratada a través de un capilar que tiene una superficie adhesiva para plaquetas en, como mínimo, una parte de su superficie interna, y observar o medir el comportamiento de la sangre en el capilar para someter a prueba la agregación plaquetaria,

10 en el que, como mínimo, una parte del interior de dicho capilar tiene una sección que comprende paredes que se extienden a lo largo de la dirección del torrente sanguíneo en el capilar y divide la anchura del capilar en no menos de 5 canales, donde la anchura de cada canal en dicha sección es de 10 a 200 μm ,

15 en el que dicha superficie adhesiva para plaquetas se dispone en dicha sección del capilar, y en el que dicho tratamiento débil de activación plaquetaria se lleva a cabo mezclando la sangre anticoagulada con un reactivo de activación plaquetaria en una cantidad con la que no se produce la agregación plaquetaria irreversible.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicha sangre anticoagulada es sangre entera tratada con un anticoagulante seleccionado entre ácido cítrico, heparina o hirudina.
- 20 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha superficie adhesiva para plaquetas está fabricada de revestimiento de colágeno o fabricada de vidrio.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho reactivo de activación plaquetaria es adenosina difosfato, que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 5 μM , o dicho reactivo de activación plaquetaria es ácido araquidónico, que se mezcla con la sangre anticoagulada a una concentración de 0,001 a 1 mM.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho capilar se forma en un microchip.
- 30 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha sangre anticoagulada se introduce en el capilar mediante una bomba, y la presión ejercida sobre la bomba por el flujo de entrada de la sangre en el capilar se mide con un sensor de presión, sometiendo a prueba de ese modo la agregación plaquetaria.
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que dicha sangre anticoagulada se almacena en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre que se introduce en el capilar mediante la introducción de un líquido que tiene una densidad relativa menor que la sangre en la sección de almacenamiento de sangre mediante la bomba, y se mide la presión de entrada del líquido, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar.
- 40 8. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que dicha sangre anticoagulada se almacena en una sección de almacenamiento de sangre conectada al capilar y la bomba, sangre anticoagulada que se mezcla con el reactivo de activación plaquetaria en la sección de almacenamiento de sangre mediante la introducción del reactivo de activación plaquetaria mediante dicha bomba en la sección de almacenamiento de sangre, y la sangre mezclada con el reactivo de activación plaquetaria se introduce en el capilar, midiéndose al mismo tiempo la presión de entrada del reactivo de activación plaquetaria, midiéndose indirectamente de ese modo la presión ejercida por el flujo de entrada de la sangre en el capilar.

45
- 50 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicho reactivo de activación plaquetaria se mezcla con la sangre anticoagulada, de manera que la concentración del reactivo de activación plaquetaria en la mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria aumenta a lo largo de un gradiente de concentración lineal o un gradiente de concentración gradual.
- 55 10. Procedimiento, según la reivindicación 8 o 9, en el que la mezcla de la sangre anticoagulada y el reactivo de activación plaquetaria se agita.

Fig. 1

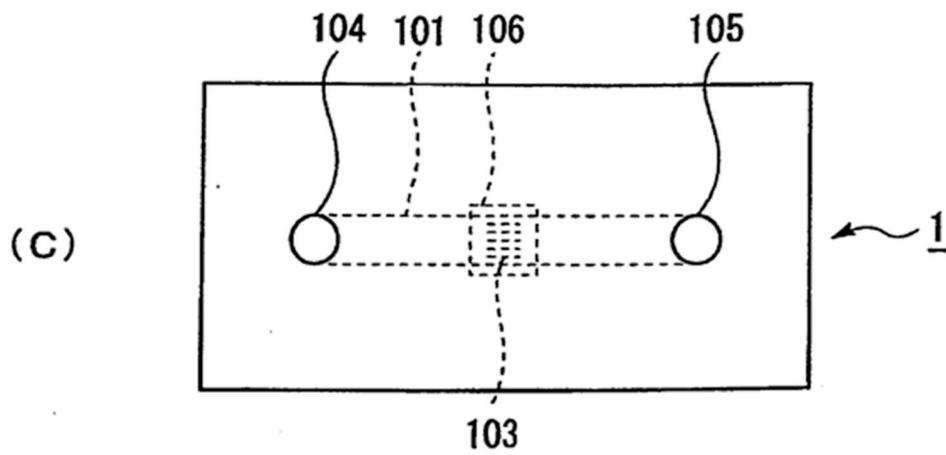
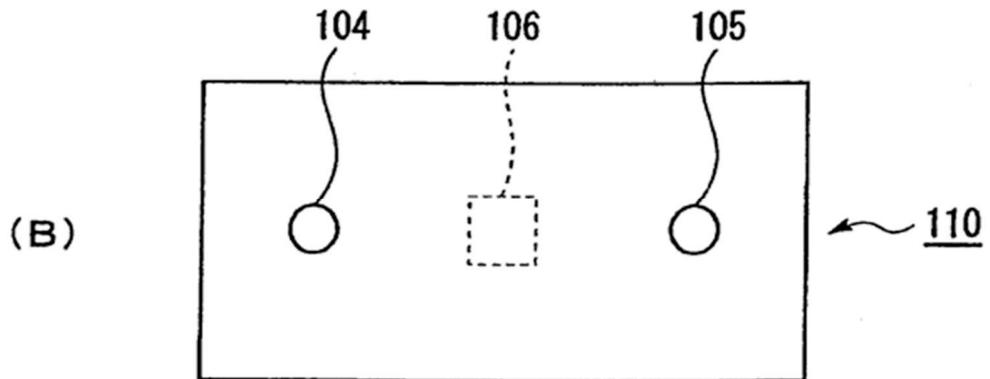
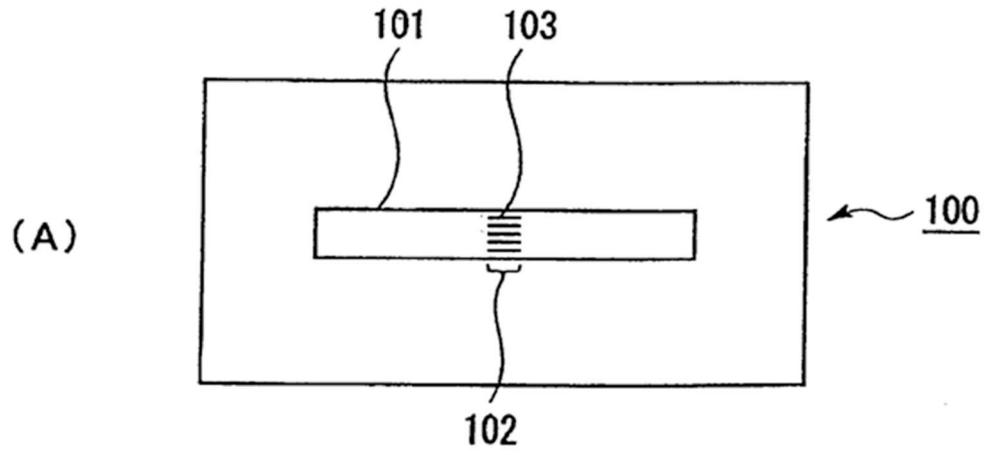


Fig. 3

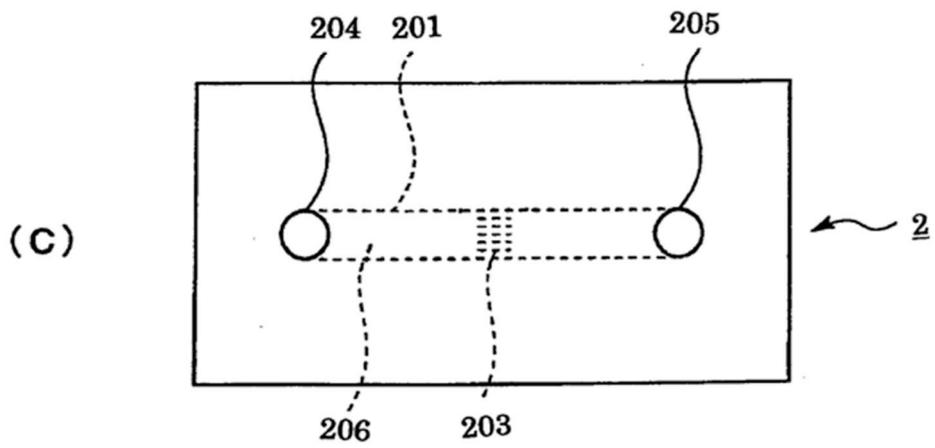
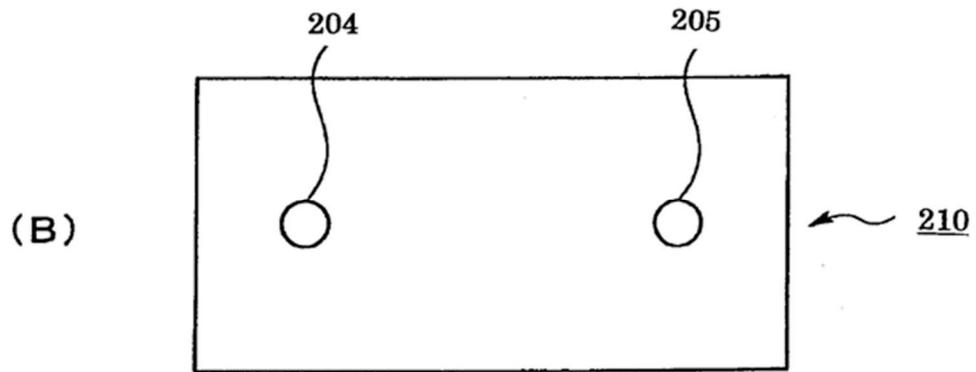
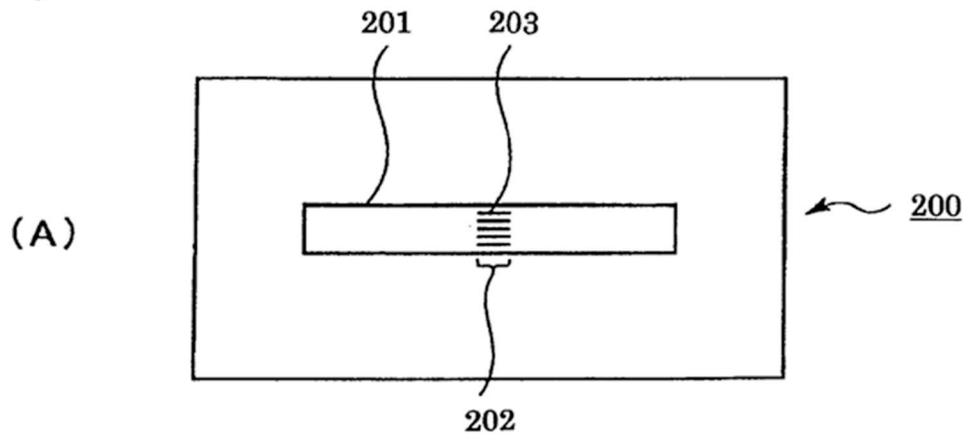


Fig. 4

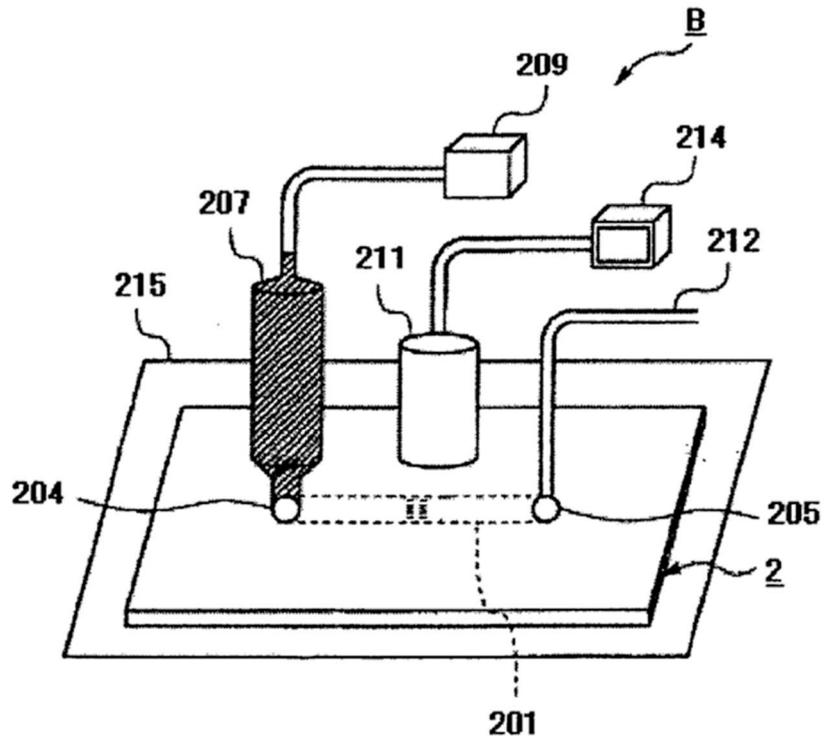


Fig. 5

Caudal A de 3 μ l/min de solución salina fisiológica

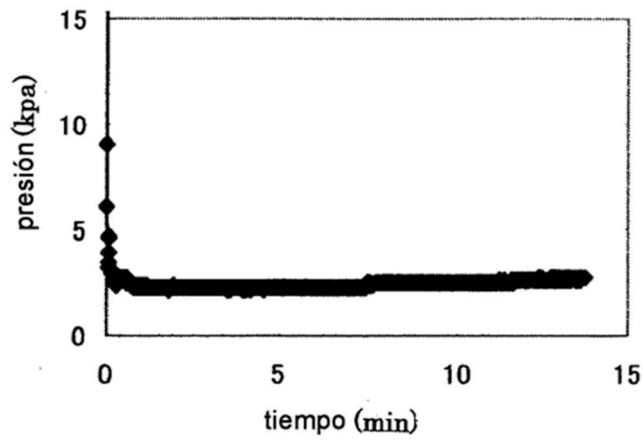


Fig. 6

Caudal A de 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ de solución salina fisiológica

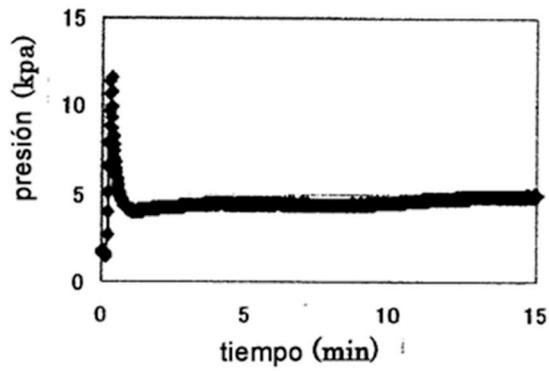


Fig. 7

Caudal A de 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ de ADP

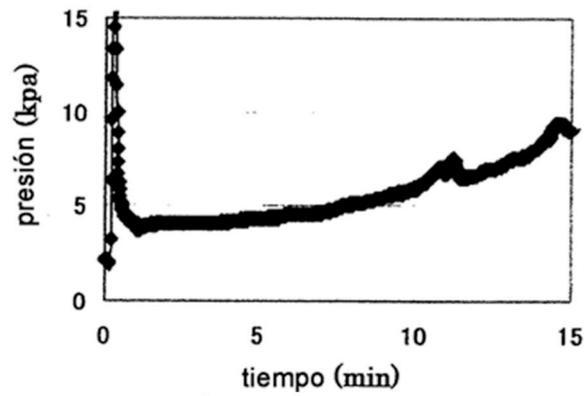


Fig. 8

Caudal B de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ de solución salina fisiológica

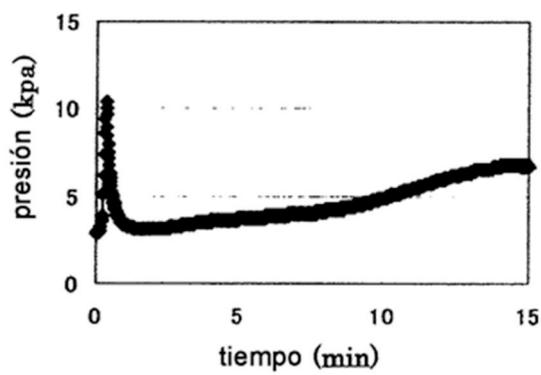


Fig. 9

Caudal B de 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ de solución salina fisiológica

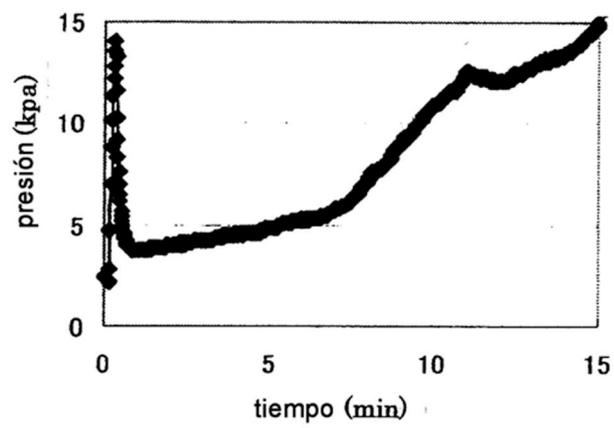


Fig. 10

Caudal B de 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ de ADP

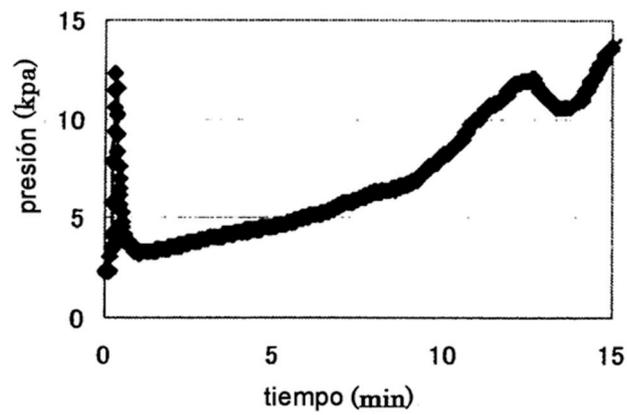
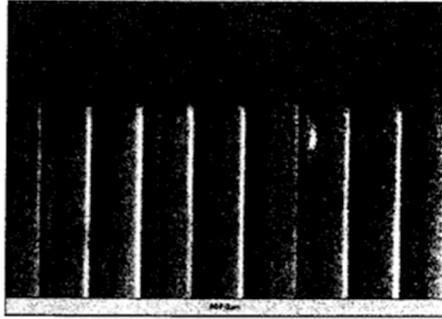
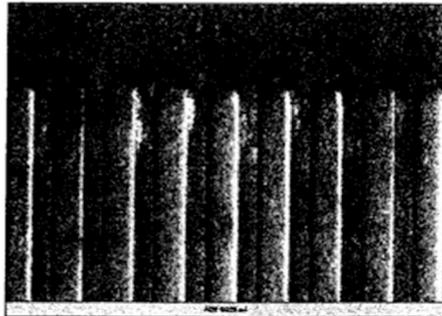


Fig. 11

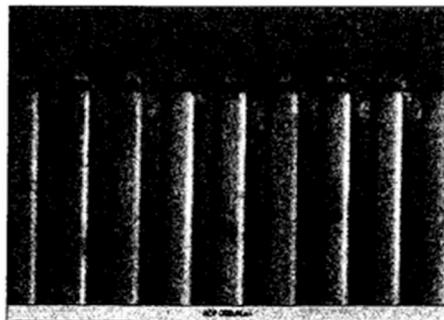
(A)



(B)



(C)



(D)

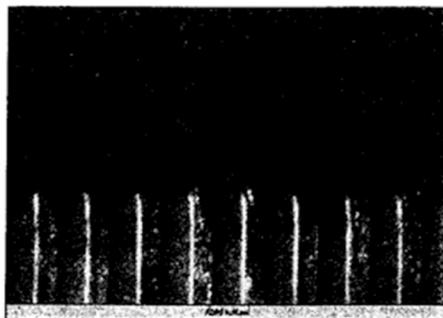


Fig. 12

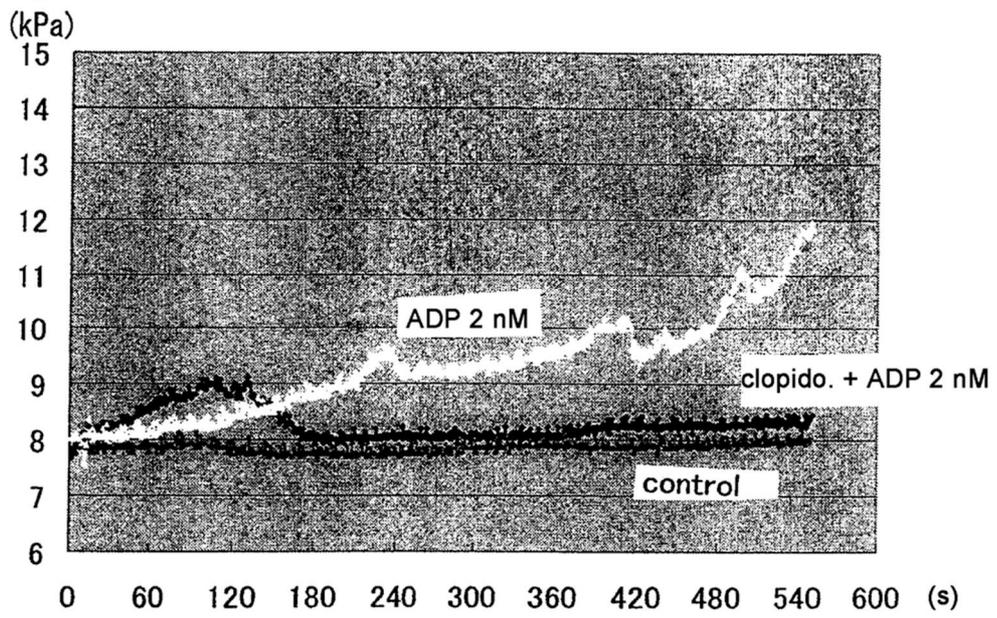


Fig. 13

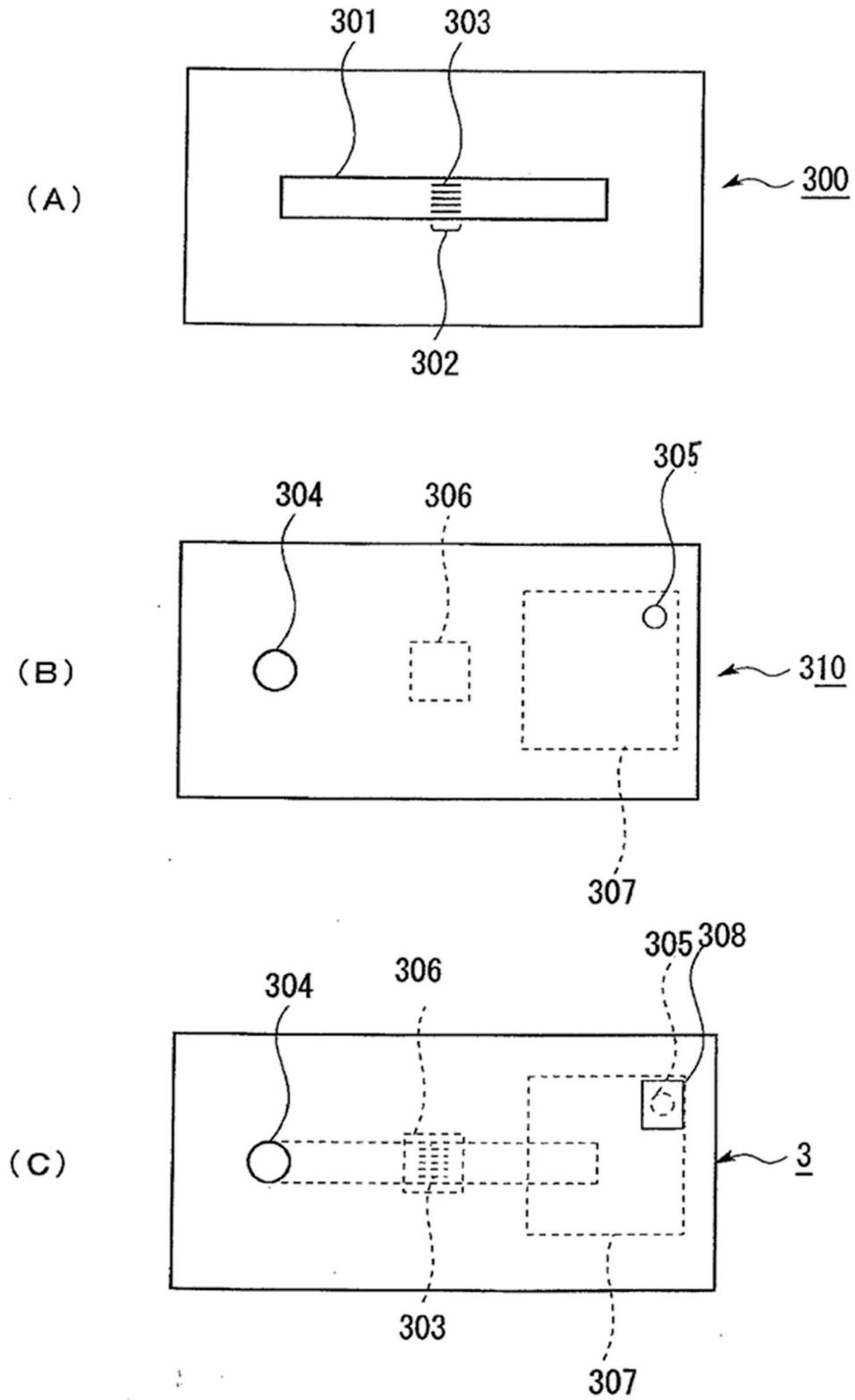
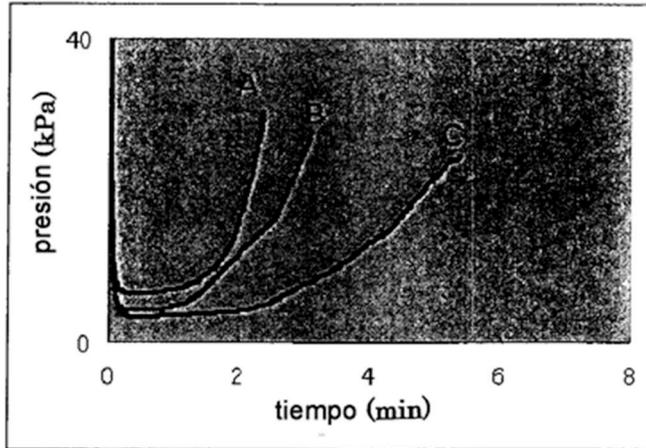
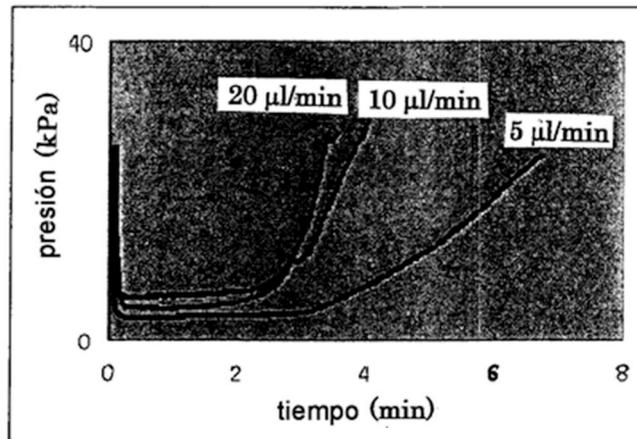


Fig. 14

(A)



(B)



(C)

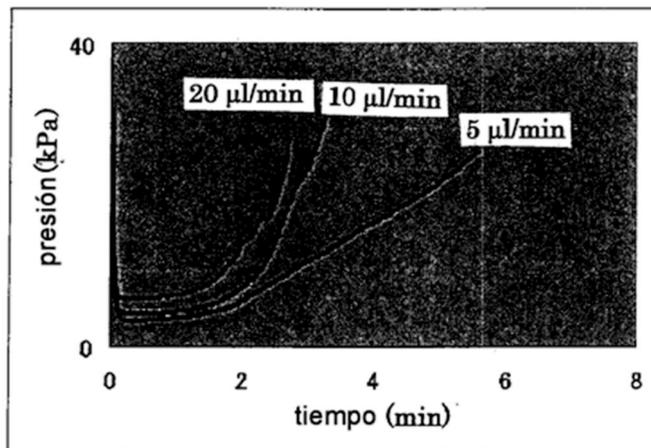


Fig. 15

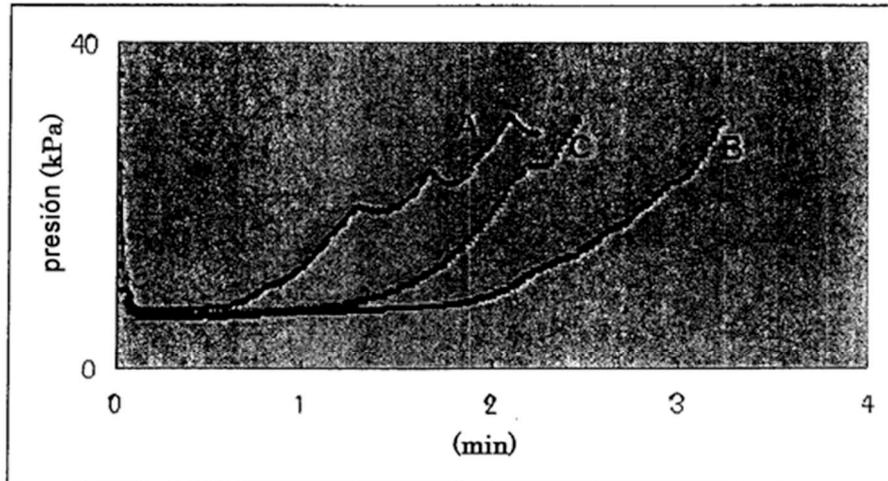


Fig. 16

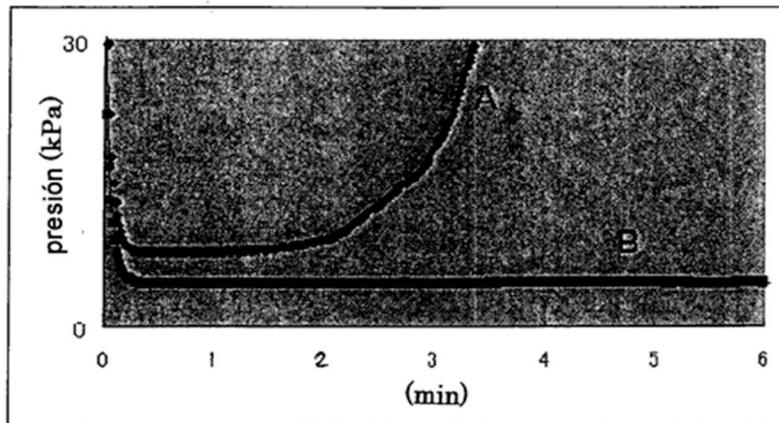


Fig. 17

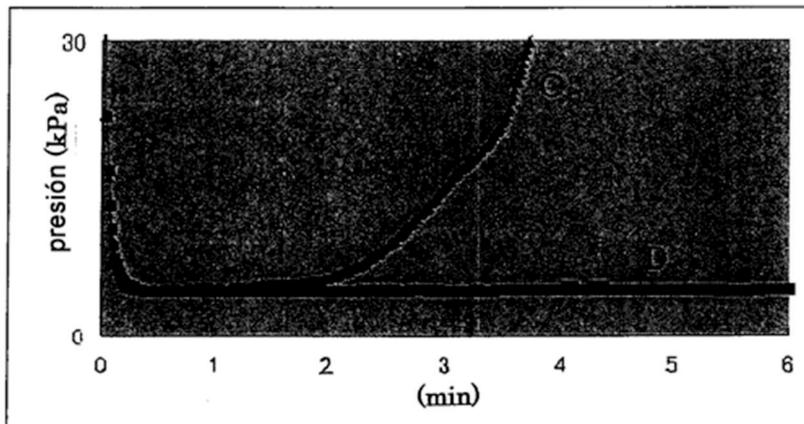


Fig. 18

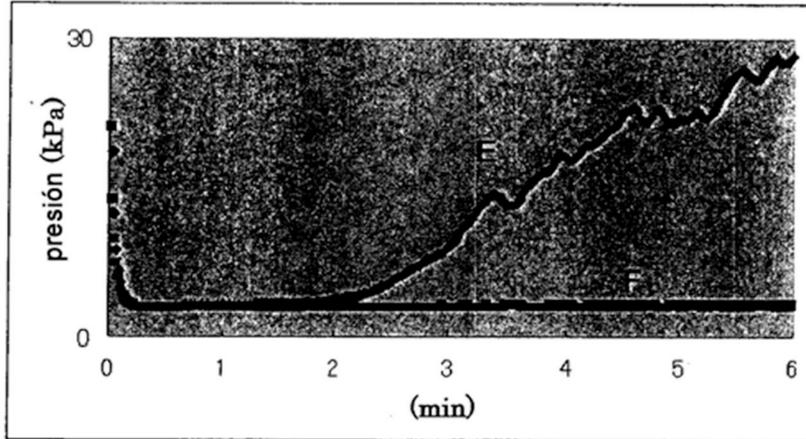


Fig. 19

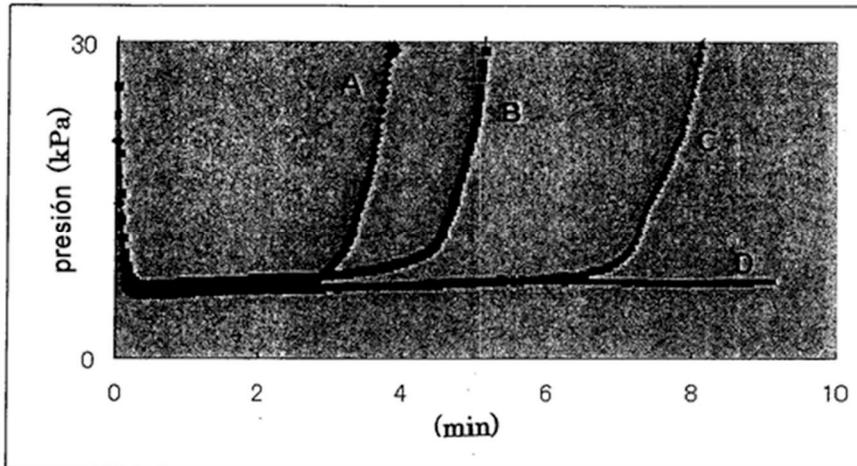


Fig. 20

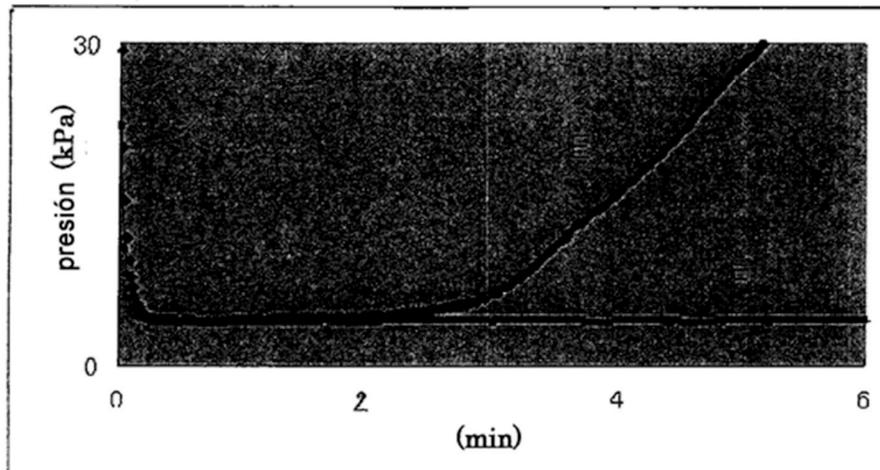


Fig. 21

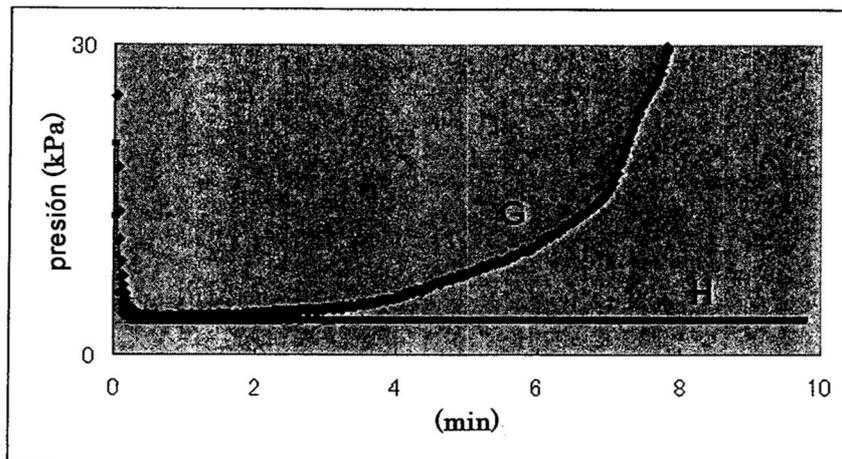


Fig. 22

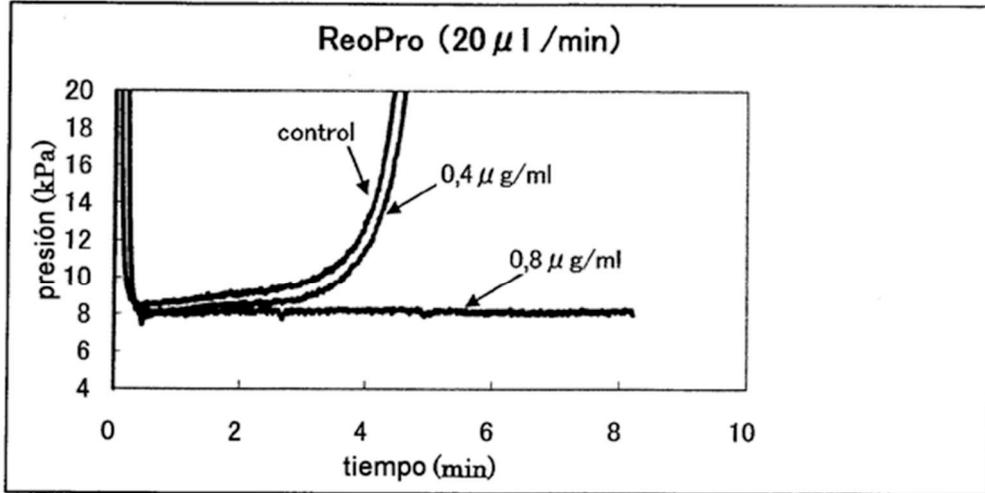


Fig. 23

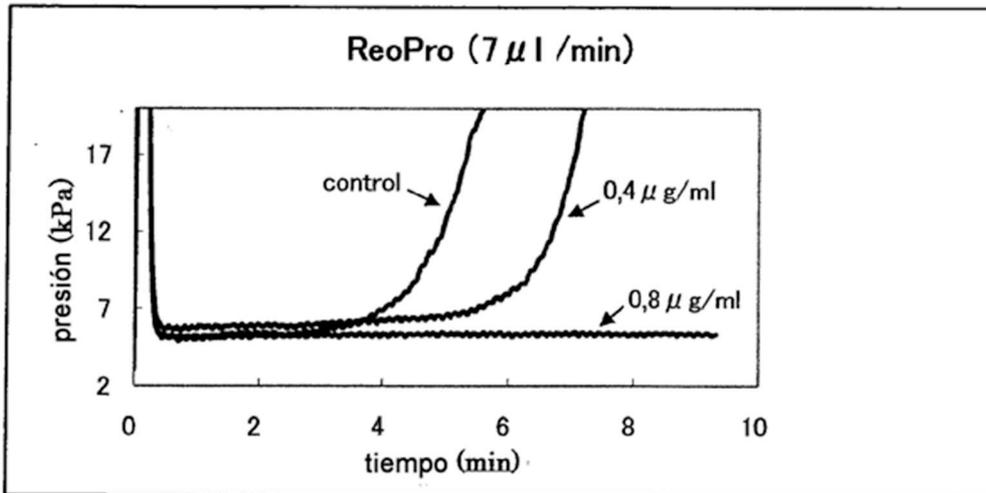


Fig. 24

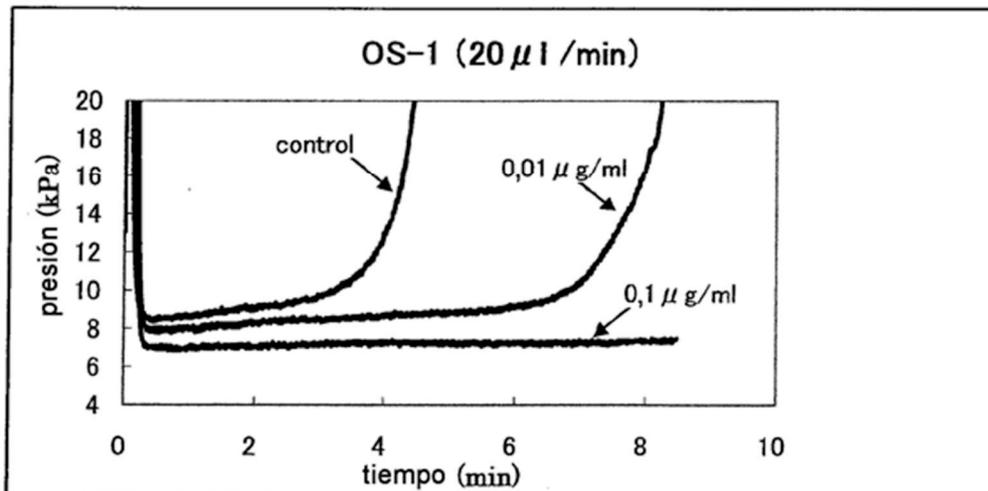
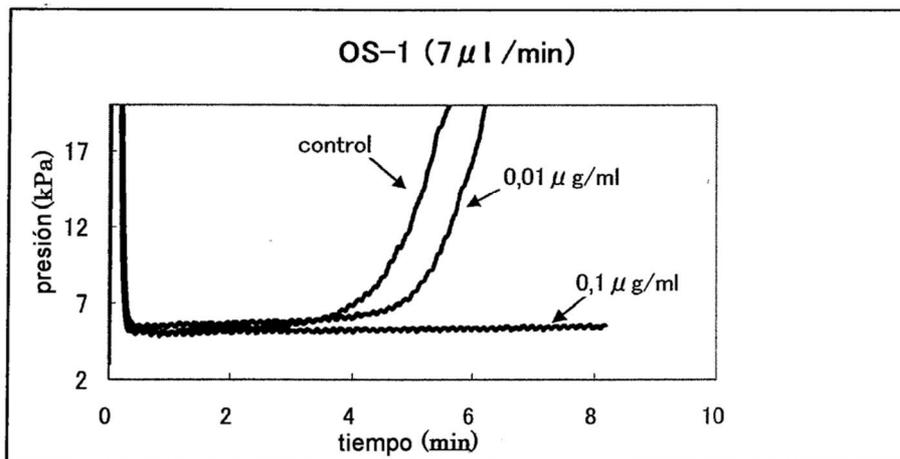


Fig. 25



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- JP 2007298511 A
- US 20070254325 A
- WO 2006115844 A
- EP 1950567 A
- JP 5260950 A [

10

Literatura no patente citada en la descripción

- Platelet Aggregability Test. *Thrombosis and Circulation*, 2004, vol. 12 (4), 17-20
- Measurement of Platelet Aggregability with PFA-100. *Thrombosis and Circulation*, 2005, vol. 13 (3), 90-94
- *Blood*, 01 April 1995, vol. 85 (7), 1826-35
- *J. Biol. Chem*, 1977, vol. 252, 8105
- *Biochemistry*, 22 April 2008, vol. 47 (16), 4674-82