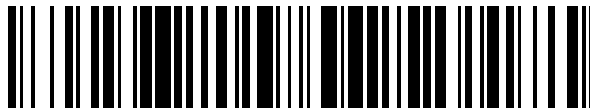


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 934**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13716505 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2847587**

54 Título: **Dispositivos microfluídicos para medir la coagulación plaquetaria, y sistemas y métodos asociados**

30 Prioridad:

10.05.2012 US 201261645191 P
04.10.2012 US 201261709809 P
29.10.2012 US 201213663339
05.02.2013 US 201361760849 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS
CENTER FOR COMMERCIALIZATION (100.0%)
4311-11th Avenue NE, Suite 500
Seattle, WA 98105-4608, US**

72 Inventor/es:

SNIADOCKI, NATHAN, J.;
TING, LUCAS, H.;
FEGHFI, SHIRIN;
BIELAWSKI, KEVIN, S. y
WHITE, NATHAN, J.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 586 934 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

Dispositivos microfluídicos para medir la coagulación plaquetaria, y sistemas y métodos asociados

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de las siguientes solicitudes pendientes:
- 1.Solicitud de Patente Provisional USA N° 61/645 191, presentada el 10 de mayo 2012;
 - 2.Solicitud de Patente Provisional USA N° 61/709 809, presentada el 4 de octubre 2012;
 - 3.Solicitud de Patente USA N° 13/663,339, presentada el 29 de octubre 2012; and
 - 4.Solicitud de Patente Provisional USA N° 61/760 849, presentada el 5 de febrero 2013.
- 10 Declaración relativa a la investigación con patrocinio federal
- Esta invención se ha realizado con ayuda gubernamental según N66001-11-1-4129 concedida por SPA WAR - Space and Naval Warfare Systems Center (SSC). El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

Campo técnico

- 15 La presente tecnología se refiere en general a dispositivos microfluídicos para medir la coagulación plaquetaria, y sistemas y métodos asociados.

Antecedentes

- 20 Las plaquetas son esenciales para detener la pérdida de sangre para que se cure el tejido. En una herida, las plaquetas experimentan un proceso de coagulación de activación, cambio de forma, secreción y agregación que en último término conduce a un coágulo hemostático que contiene filamentos de fibrina y plaquetas. Las plaquetas desempeñan una función biomecánica singular en la hemostasis: sus fuerzas actina-miosina potencian las adhesiones de integrina y evitan la fibrinólisis, aproximando entre sí los filamentos de fibrina y las plaquetas.

- 25 La hemodinámica tiene un importante papel en la actividad de las plaquetas. Se pueden dar elevados gradientes de velocidad de cizallamiento en puntos en los que los vasos sanguíneos se curvan, ramifican o estrechan, y pueden surgir en un stent vascular o una válvula artificial. Se ha observado que esos gradientes de cizallamiento hacen que las plaquetas se adhieran a la pared vascular, lo que conduce a su activación y agregación. Elevados gradientes de cizallamiento pueden provocar un proceso autónomo en el que la agregación plaquetaria aumenta el gradiente de cizallamiento local, lo que a su vez hace que las plaquetas se adhieran y agreguen.

- 30 El método primario con el que el cuerpo responde a una lesión es la formación de coágulos para detener la hemorragia. La fuerza de un coágulo depende en gran medida de la capacidad de las células plaquetarias atrapadas en su interior para contraerse con fuerza, lo que endurece la malla de fibrina que rodea a las plaquetas y fija el coágulo a la herida para evitar la ruptura. La adecuada formación de coágulos es crítica en pacientes con traumatismos, ya que una formación de coágulos deficiente va asociada a un incremento significativo de la mortalidad. Por ejemplo, los pacientes traumatológicos con disfunción plaquetaria pueden presentar lesiones más graves y empeoramiento del shock. Pueden requerir más transfusiones de sangre y presentar mayores índices de mortalidad. Los pacientes en tales situaciones necesitan ser transportados más rápidamente desde el escenario de la lesión y pueden ser objeto de intervenciones de triaje de "control de daños", como una estrategia de reanimación hipotensiva. A su llegada al hospital, a esos pacientes se les pueden aplicar tratamientos más tempranos y agresivos, incluyendo transfusiones de productos sanguíneos a medida, y pueden ser derivados más rápidamente a cirugía urgente.

- 45 Los tests diagnósticos tradicionales que determinan si las plaquetas se coagulan adecuadamente son técnicamente complejos, y requieren una importante cantidad de sangre para su realización. Además, esos tests pueden requerir una cantidad de tiempo importante para una lectura completa. Este tiempo de procesado puede retrasar la aplicación de potenciales técnicas de tratamiento en los pacientes traumatológicos, incrementando así la posibilidad de un resultado negativo.

- 50 Shiring Fegghi et al: "Mechanobiology of Platelets: Techniques to Study the Role of Fluid Flow and Platelet Retraction Forces at the Micro- and Nano-Scale" (Mecanobiología de las Plaquetas: Técnicas para Estudiar la Función del Flujo de Fluidos y las Fuerzas de Retracción Plaquetaria a Micro y Nanoescala), International Journal of Molecular Sciences vol. 12, N°. 12, 7 de diciembre 2011, páginas 9009-9030 presenta un sensor de fuerza microescala para medir las fuerzas de tracción celular. Este sensor es un sistema de postes verticales, de tamaño micro y flexibles, que se curvan de forma proporcional a las fuerzas que aplican las células a los extremos de los postes. Los postes están hechos de PDMS utilizando litografía blanda, similar a la fabricación de dispositivos microfluídicos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una ilustración parcialmente esquemática de una cámara de flujo microfluidica configurada según las diferentes realizaciones de la tecnología.

5 La Figura 1B es una ilustración parcialmente esquemática de un sistema de micropostes sometidos a flujo de fluidos en la cámara de la Figura 1A según las diferentes realizaciones de la tecnología.

La Figura 2 es una vista superior de un sistema de micropostes configurado según las diferentes realizaciones de la tecnología.

La Figura 3 es una vista isométrica lateral de un dispositivo de análisis de plaquetas para la medición de las fuerzas de las plaquetas, y configurado según las diferentes realizaciones de la tecnología.

10 La Figura 4 es un diagrama de bloques que ilustra un método para medir la coagulación plaquetaria en una muestra biológica, según las diferentes realizaciones de la tecnología.

Las Figuras 5A-5C son gráficos que ilustran la activación del cizallamiento requerida para iniciar la desviación de los micropostes en tres pacientes representativos, según las diferentes realizaciones de la tecnología.

15 La Figura 6 es un diagrama de bloques que ilustra un método para seleccionar el tratamiento de un paciente, en respuesta al umbral* de activación de cizallamiento del paciente, según las diferentes realizaciones de la tecnología.

Descripción detallada

20 La presente tecnología se refiere en general a dispositivos microfluídicos para la medición de la coagulación plaquetaria, y sistemas y métodos relacionados. En algunas realizaciones, un dispositivo fluídico incluye un sistema de microestructuras incluyendo pares de bloques en general rígidos, y postes generalmente flexibles. El dispositivo fluídico comprende además por lo menos un canal de fluido configurado para aceptar el sistema. El canal de fluido está configurado para inducir el flujo del fluido de una muestra biológica, como sangre entera, a través del sistema. El dispositivo fluídico puede incluir además un componente de detección, configurado para medir el grado de desviación de uno o más de los postes flexibles en el sistema. En algunas realizaciones, el dispositivo fluídico comprende un dispositivo manual, utilizable para los tests de fuerzas de las plaquetas y coagulación en el punto de atención sanitaria.

30 Más abajo se describen detalles específicos de varias realizaciones de la tecnología, con referencia a las Figuras 1A-6. No se dan en la siguiente presentación otros datos describiendo estructuras y detalles bien conocidos, asociados frecuentemente a herramientas de investigación celular, o dispositivos fluídicos de punto de atención, para evitar complicar innecesariamente la descripción de las diversas realizaciones de la tecnología. Muchos de los detalles, dimensiones, ángulos y otras características mostradas en las figuras son simplemente ilustrativos de realizaciones específicas de la tecnología. En consecuencia, otras realizaciones pueden tener otros detalles, dimensiones, ángulos y características sin apartarse del espíritu o ámbito de la presente tecnología. Por consiguiente, una persona con conocimientos ordinarios en la materia comprenderá que la tecnología puede tener otras realizaciones con elementos adicionales, o la tecnología puede tener otras realizaciones sin algunas de las características que se muestran y describen más abajo con referencia a las Figuras 1A-6.

40 La Figura 1A es una ilustración parcialmente esquemática de una cámara de flujo de fluidos 100 configurada según las diferentes realizaciones de la tecnología. La cámara 100 puede incluir un canal principal 102 a través del cual fluye el fluido desde una entrada 122 a una salida 124. En algunas realizaciones, el fluido puede comprender sangre entera o plaquetas, u otros fragmentos de sangre entera, incluyendo plasma y proteínas plasmáticas. En otras realizaciones, el fluido puede comprender por lo menos uno de lo siguiente: células endoteliales, células tumorales circulantes, células cancerosas, fibroblastos, células de músculo liso, cardiomiocitos, hematíes, leucocitos, bacterias, megacariocitos, enzimas, minerales, biominerales, o fragmentos de lo que antecede. Si bien la Figura 1A ilustra un único canal principal 102, en otras realizaciones la cámara 100 puede incluir varios canales de fluidos. En realizaciones con múltiples canales de fluidos, el usuario puede introducir distintos fluidos, muestras biológicas y/o reactivos en los distintos canales. O como se describirá en más detalle a continuación, la cámara 100 puede incluir múltiples canales de fluidos capaces de funcionar en paralelo, y estudiar distintas características de una muestra de fluido. Por ejemplo, la cámara 100 puede estudiar una muestra de control frente a una muestra modificada, o puede introducir una muestra en múltiples canales de fluidos con distintas químicas de superficie.

55 El canal principal 102 está configurado para aceptar uno o más sistemas 114 de microestructuras, tales como micropostes. En varias realizaciones, el sistema 114 está posicionado en o cerca de una base o fondo 118 del canal principal 102, de forma que el flujo puede fluir esencialmente sobre y a través del sistema 114. Como se describirá con más detalle más adelante, en algunas realizaciones, el sistema 114 comprende uno o más pares de microestructuras. En algunos casos, cada par de microestructuras incluye un bloque generalmente rígido 108 próximo a un poste 110 generalmente flexible. Como se comentará en

60

más detalle más abajo, en algunas de las realizaciones la parte superior del poste 110 comprende una punta magnética 116. La punta magnética 116 del extremo superior del poste 110 puede ser de cobalto, níquel, samario y otros metales de tierras raras obtenidos por deposición electroquímica en los poros de una plantilla. En otras realizaciones, la punta magnética 116 comprende otros materiales, o está formada o depositada por otros métodos.

En diversas formaciones, el bloque 108 está aguas arriba del poste aguas abajo 110. En algunas realizaciones, el bloque 108 y el poste 110 están separados por 5-15 μm , y en una realización concreta están separados por 9 μm . En varias realizaciones, el sistema 114 puede incluir otras combinaciones de bloques 108 y postes 110. Por ejemplo, la relación de bloques 108 a postes 110 puede no ser de 1:1, sino que puede haber múltiples postes 110 próximos a un único bloque 108. En otras realizaciones, esta proporción se invierte. Aún en otras realizaciones, el poste 110 está aguas arriba del bloque 108. El poste 110 puede actuar como una viga elástica en voladizo, que se desvía proporcionalmente a la fuerza aplicada a su punta superior. Por ejemplo, la desviación puede ser un continuo desde la base a la punta del poste 110. En varias realizaciones, el poste 110 se desvía significativamente más que el bloque 108. En algunos casos, la desviación del bloque 108 es insignificante o inexistente.

El sistema 114 puede incluir también una o más válvulas de spin 126 debajo o junto a uno o más postes 110 o bloques 108. Por ejemplo, puede haber una válvula de spin 126 por cada par de microestructuras bloque-y-poste, y la válvula de spin 126 puede estar posicionada entre el bloque 108 y el poste 110. Como se describirá en más detalle más abajo, la válvula de spin 126 puede utilizarse para medir los cambios en el campo magnético provocados por la punta magnética 116 del poste 110 desviándose hacia el bloque 108. La válvula de spin 126 puede utilizar el efecto magnetorestrictivo (GMR) gigante en películas finas. La válvula de spin 126 puede incluir una tira de metales de película delgada con pulverización catódica en pilas alternadas de capas magnéticas y no magnéticas. Debido a las interacciones de los espines de los electrones en las distintas capas, la resistencia de la tira es sensible a los cambios en el campo magnético en el plano. La válvula de spin 126 puede tener sensibilidad magnética del orden de 1 nT, que puede alcanzar una relación señal-ruido de 20:1. En algunas realizaciones, el cambio de resistencia de la válvula de spin 126 puede ser medido estableciendo una configuración de puente Wheatstone.

En varias realizaciones, la cámara de flujo 100 está dimensionada para su uso en el punto de asistencia. Por ejemplo, la cámara de flujo 100 puede estar dimensionada para acoger una muestra relativamente pequeña (ej., menos de 3 μl) de un fluido como puede ser sangre. En algunas realizaciones, una gota de sangre es suficiente para que funcione el dispositivo. En una realización, el canal principal 102 tiene una longitud de 2 cm, una anchura de 4 mm, y una profundidad de 0,5 mm. El canal principal 102 puede tener otras dimensiones en distintas realizaciones. En varias realizaciones, la cámara de flujo 100 está sellada herméticamente. Como se describirá más abajo con referencia a la Figura 3, en algunas realizaciones, toda o una porción de la cámara 100 o el sistema 114 comprende una tarjeta configurada para ser colocada en un dispositivo manual que activa un test de fluido o lee los resultados del test (ej., la magnitud de las fuerzas de las plaquetas).

La Figura 1B es una vista parcialmente esquemática del sistema de microestructuras 114 de la Figura 1A sometido al flujo del fluido y configurado según las diferentes realizaciones de la tecnología. Con referencia a las Figuras 1A y 1B juntas, en funcionamiento, el sistema 114 está situado en el canal principal 102 y expuesto a condiciones de flujo de fluidos (ej., condiciones de flujo laminar para crear gradiente de cizallamiento en el sistema 114) por un periodo de tiempo determinado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema 114 puede ser situado dentro del canal 102 y se puede aplicar continuamente flujo de sangre entera durante menos de un minuto. En otras realizaciones, el flujo se puede aplicar intermitentemente, o durante más o menos de un minuto. Por ejemplo, se puede suministrar el flujo durante un minuto o menos, cinco minutos o menos o quince minutos o menos. En algunas realizaciones, el flujo puede ser suministrado sin que se requiera ninguna acción del usuario u otra intervención.

En varias realizaciones, el término "flujo de fluido" puede referirse a un fluido bombeado o movido mecánicamente de otro modo, un fluido a presión (ej., introducido con una jeringa), o puede referirse a inmersión (sin bombeo). Mientras una unidad de flujo (ej., una bomba) 104 se muestra conectada a la cámara de flujo 100 y configurada para recircular el medio a través de la cámara 100 y proporcionar flujo estático, laminar y/o alterado en la dirección de las flechas de flujo, en otras realizaciones la unidad de flujo 104 está ausente, y la muestra de fluido es introducida en el canal principal 102 por la entrada 122. Por ejemplo, la muestra de fluido puede ser recogida (ej., en tubos de heparina u otros anticoagulantes), cargada en una jeringa y bombeada por el canal principal 102 a velocidades de cizallamiento de pared de fisiológicamente normales (2000 s^{-1}) a patológicamente elevadas (12000 s^{-1}). En algunas realizaciones, la muestra de fluido puede ser retirada del canal principal 102 por la salida 124, mientras en otras realizaciones la muestra de fluido permanece en el canal principal 102 tras el test para facilidad de eliminación. En realizaciones con una unidad de flujo 104, la unidad de flujo 104 puede comprender una bomba de desplazamiento positivo, una bomba piezoeléctrica, un vacío parcial, una bomba de diafragma, una bomba peristáltica, una bomba hidrostática u otro dispositivo.

Cuando la muestra de fluido (ej., sangre entera) es introducida en el canal principal 102, las plaquetas que fluyen se adhieren rápidamente a las microestructuras (ej., encima y entre el bloque 108 y el poste 110)

- para formar un coágulo en microescala 120. Más específicamente, las plaquetas se agregan en el coágulo 120, que forma un puente mecánico entre las estructuras del bloque 108 y el poste 110 en el sistema 114. Las plaquetas se contraen bajo las fuerzas de cizallamiento, haciendo que el poste 110 se desvíe hacia el extremo. El grado de desviación del poste 110 puede utilizarse para cuantificar cuánta fuerza están produciendo las plaquetas en la sangre, con lo que consecuentemente se puede identificar cualquier deficiencia en la coagulación. En varias realizaciones, el bloque 108 y el poste 110 están lo suficientemente juntos como para disuadir a los eritrocitos y los blancos de aposentarse en el espacio de coágulo entre el bloque 108 y el poste 110.
- 10 Para medir la desviación de un poste 110, la diferencia entre la posición de su extremo y la base puede ser analizada por las imágenes de microscopía de contraste de fase y de fluorescencia, tomadas en la parte superior y la base del sistema 114. La magnitud y dirección de cada fuerza de tracción (F) pueden ser calculadas a partir de la desviación (δ) mediante la relación:

$$F = \frac{3\pi ED^4}{64L^3} \delta$$

- 15 La longitud L y el diámetro D de las microestructuras del sistema pueden ser medidas utilizando un microscopio electrónico de barrido. En algunas realizaciones, el diámetro del poste 110 es 2,2 μm y la longitud es 7 μm. El módulo de Young del material del poste (ej., polidimetil siloxano (PDMS), E = 2,5 MPa) puede ser determinado por ensayo de tracción.

- 20 La punta magnética 116 del poste 110 puede ser utilizada para medir las fuerzas en las plaquetas con un componente de detección magnética. Por ejemplo, la punta magnética 116 puede tener un momento dipolar no orientado paralelo a la válvula de spin 126. En el caso de una punta magnética de níquel 116, el momento dipolar inicial será 4,8 pAm². Suponiendo que la punta magnética 116 está aproximadamente a 60 μm del sensor, su momento dipolar producirá un campo magnético en el plano de = 4,4 μT. Esta medición será la lectura basal para un poste no desviado 110.

- 25 Cuando las fuerzas de las plaquetas desvían el poste 110 hacia el bloque 108, la punta magnética 116 gira con un ángulo θ. Debido a la reorientación del momento dipolar μ' de la punta magnética 116, hay un descenso en el campo magnético en el plano medido en la válvula de spin 126. En una realización concreta, una fuerza de 40 nN es producida por el coágulo 120. Así, en base a una constante de resorte de 221 nN/μm para un poste 110 hecho de SU-8, habrá una rotación de aproximadamente 0,3° en la punta magnética 116 del poste 110. Esta rotación hará que el momento dipolar μ' de la punta magnética 116 cambie su orientación también en 0,3°, lo que provocará una caída de μ₀-μ' = 20 nT en el campo magnético en el plano medido por la válvula de spin 126. Aunque una caída de 20 nT puede ser demasiado pequeña para la mayoría de los magnetómetros comerciales de bajo coste (ej., un sensor de efecto Hall o magnetómetro de saturación), la válvula de spin 126 puede ser lo bastante sensible como para detectar tal cambio en el campo magnético. Como se comentará más adelante con referencia a la Figura 2, el sistema 114 puede incluir también almohadillas de contacto que permiten la conexión entre la válvula de spin 126 y el equipo electrónico para detectar las fuerzas de las plaquetas.

- 40 En otras realizaciones, otros componentes magnéticos, como nanocables magnéticos, pueden ser integrados o colocados dentro o junto a otras secciones del poste 110. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un nanocable es integrado en aproximadamente por lo menos los 2/3 superiores del poste 110 y es usado para la detección magnética. La desviación del poste utilizando nanocables puede ser detectada mediante un magnetómetro, ej. una válvula de spin o un sensor GMR colocado junto (ej., debajo) al sistema magnetizado 114. En otras realizaciones, los imanes se omiten desde el poste 110 y las mediciones de las fuerzas de las plaquetas en los postes 110 pueden realizarse utilizando microscopio óptico y procesamiento de imágenes. Determinados componentes de detección óptica para detectar fuerzas en los postes 110 pueden incluir un microscopio de contraste de fase, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal o un fotodiodo. En otras realizaciones se pueden utilizar otros componentes de detección óptica.

- 50 Los sistemas 114 comentados más arriba pueden ser fabricados utilizando diversas técnicas de plantillas o mediante conformado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema 114 puede ser creado por fundición de una película de PDMS o un material similar con un grosor de 0,25 mm sobre un cubreobjetos de vidrio del Nº 2. En otras realizaciones, se pueden utilizar otros materiales y/o grosores de materiales. En algunas realizaciones, las microestructuras individuales comprenden, silicona, polímeros, metal o cerámica. En una realización concreta, los postes individuales 110 se hacen utilizando SU-8 fotoresistente, con una constante de resorte de aproximadamente 221 nN/μm. En algunas realizaciones, las microestructuras u otra porción de la cámara 100 pueden estar sustancialmente recubiertas con una capa antifouling.

El sistema 114 de microestructuras puede ser micromoldeado con las formas, disposiciones o patrones deseados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los bloques individuales 108 son generalmente de

- forma rectangular, con ángulos agudos configurados para generar elevadas fuerzas de cizallamiento. En otras realizaciones, los bloques 108 tienen otras formas, como cuñas, triángulos, columnas, esferas, estrellas, etc. En una realización concreta, el bloque 108 tiene una altura de aproximadamente 10- 60 μm , una anchura de 10-30 μm , y una profundidad de 5-20 μm . En algunas realizaciones, los postes individuales 110 tienen en general forma de columnas, pero pueden tener otras formas en otras realizaciones. En una realización concreta, los postes 110 tienen una altura de aproximadamente 10-60 μm , y un diámetro de aproximadamente 2-6 μm . En algunas realizaciones, la punta magnética 116 comprende una capa de níquel de un grosor aproximado de 1 μm , y un diámetro aproximado de 3 μm . En otras realizaciones, los postes 110 pueden tener otras dimensiones.
- 5 Puede ser conveniente tratar o recubrir las microestructuras u otra parte del dispositivo 100 con una química de superficie o agente de unión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un elemento de unión (ej., fibronectina) puede ser absorbido en la superficie de un sello de PDMS. Los sellos pueden no seguir ningún patrón ("sello plano") o un conjunto de patrones de relieve positivo, en forma de una rejilla de cuadrados ("sellos cuadrados"). Cuando el elemento de unión es absorbido, el sello puede ser colocado en contacto conformal con el sustrato, para transferir la fibronectina a las regiones de contacto. Después cada sustrato puede ser tratado con 0,2% Pluronic F127 u otro material adecuado para asegurar las células se adhieren a zonas en las que se imprimió la fibronectina y prevenir la absorción de proteínas y la adhesión de las plaquetas al bloque en el canal principal 102. Esto puede ayudar a separar las plaquetas de los otros constituyentes de la sangre del test. En algunas realizaciones, las paredes del canal principal 102 están recubiertas con una tinción fluorescente y luego colágeno tipo I y Factor von Willebrand.
- 10 En algunas realizaciones, las microestructuras individuales (o puntas de las microestructuras) están sustancialmente recubiertas con por lo menos una química de superficie o elemento de unión, como pueden ser proteínas, glucanos, poliglucanos, glucoproteínas, colágeno, vitronectina, laminina, anticuerpos monoclonales, plasmina, agonistas (ej., trombina o calcio), proteínas de matriz (ej., fibrinógeno, fibronectina, Factor von Willebrand), enzimas, minerales, biominales, inhibidores de la actividad de la actina-miosina (ej., Y-27632, ML-7, o blebistatina), y/o fragmentos de lo anterior. En algunas realizaciones, las microestructuras están recubiertas con proteínas de matriz extracelular que permiten a las plaquetas fijarse a ellas, como lo harían a la pared de un vaso dañado. En algunas realizaciones, microestructuras de cada microcanal pueden ser selladas con Factor von Willebrand a concentraciones del orden de 10-50 $\mu\text{g/ml}$.
- 15 Como se ha comentado antes, en algunas realizaciones el dispositivo 100 incluye múltiples canales, capaces de funcionar en paralelo para estudiar distintas características de la muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el dispositivo 100 puede incluir múltiples canales, cada uno de ellos con una química de superficie de distinta microestructura. En una realización concreta, un primer microcanal funciona como un canal de control, un segundo canal incluye una química de superficie de una microestructura que fomenta la coagulación, y un tercer canal incluye una química de superficie de microestructura que inhibe la coagulación plaquetaria. Múltiples canales pueden combinarse para realizar simultáneamente pruebas con una gama de componentes de la formación de coágulos.
- 20 La Figura 2 es una vista superior de un sistema 214 de microestructuras para su uso en la cámara de flujo de fluidos 100 de la Figura 1. El sistema 214 es albergado en un microcanal 202 que incluye una entrada de fluidos 222 y una salida de fluidos 224. El sistema 214 comprende un patrón de pares de bloques 208 y los correspondientes postes aguas abajo 210. Mientras la realización ilustrada incluye una rejilla de pares de microestructuras en filas y columnas, en otras realizaciones los pares pueden situarse en disposiciones distintas, o puede haber más o menos hileras y columnas. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede haber 100 bloques 208 y 100 postes 210. Además, los bloques 208 y los postes 210 no tienen que estar por pares, sino que puede haber varios postes 210 por bloque 208 (ej., los postes 210 pueden rodear al bloque 208), o puede haber múltiples bloques 208 por poste 210.
- 25 Una serie de válvulas de spin 226 se posicionan en el sistema 214, cada válvula de spin 226 entre un bloque 208 y un poste 210. Una o más almohadillas de contacto 230 para conectar las válvulas de spin 226 al equipo electrónico están situadas a lo largo del borde del sistema 214. Puede utilizarse un equipo de adquisición de datos y de procesado de señal para determinar la desviación de los postes 210 de la manera descrita más arriba. Un cambio de tensión en las válvulas de spin 226 indica la fuerza que están produciendo las plaquetas en una muestra de sangre. Si las plaquetas de una muestra se dañan, se produce un cambio menor en la tensión medida.
- 30 La Figura 3 es una vista isométrica lateral de un dispositivo de ensayo de plaquetas 350 para medir las fuerzas de las plaquetas, y configurado según las diferentes realizaciones de la tecnología. En algunas realizaciones, el dispositivo 350 puede comprender un sistema de ensayo de punto de asistencia fácilmente transportable, de tamaño manual (ej., con dimensiones inferiores o iguales a 10 cm x 8 cm x 5 cm). El dispositivo 350 puede incluir una parte receptora 354 capaz de contener una tarjeta de muestra 300. La tarjeta de muestra 300 puede comprender una cámara de flujo o un sistema como la cámara de flujo 100, o el sistema 114 comentados más arriba con referencia a la Figura 1, o partes de ellos. En varias realizaciones, la tarjeta 300 puede incluir un canal de fluido o múltiples canales con distintas condiciones de ensayo (ej., distintas químicas de superficie de microestructura) capaces de funcionar en

paralelo. En otras realizaciones, distintas tarjetas 300 pueden ser utilizadas para distintas condiciones de ensayo. En algunas realizaciones, el dispositivo 350 puede ser reutilizable, con nuevas muestras de fluido colocadas en tarjetas 300 nuevas o esterilizadas. En otras realizaciones, el dispositivo de ensayo 350 es desechable y diseñado para un solo uso.

5 El dispositivo de ensayo 350 puede incluir varios componentes electrónicos, tales como equipo de adquisición de datos y/o de procesamiento de señal que puede acoplarse a las almohadillas de contacto 230 descritas más arriba con referencia a la Figura 2. Tales componentes electrónicos pueden recibir y/o procesar los datos de desviación de microestructuras. En algunas realizaciones, los datos de desviación se procesan dentro del dispositivo 350, y se genera un valor de salida de función plaquetaria. Tales datos de salida pueden ser transmitidos a un usuario vía una pantalla 352 en el dispositivo 350 o una pantalla remota.

10 La Figura 4 es un diagrama de bloques que ilustra un método 400 de medición de la coagulación plaquetaria en una muestra biológica, según realizaciones de la tecnología. En el bloque 410, el método 400 incluye la colocación de un sistema de bloque-y-poste de microestructuras en un dispositivo de flujo de fluidos. Como se ha comentado más arriba, en varias realizaciones el bloque comprende una estructura, generalmente rígida, cercana a un poste en general flexible. En algunas realizaciones, el poste puede incluir una punta magnética.

15 En el bloque 420, el método 400 incluye además hacer circular fluido sobre las microestructuras. En varias realizaciones, el fluido comprende una muestra de sangre, y en algunas realizaciones es una muestra de sangre entera de aproximadamente 3 μ l. El método de circulación de fluido puede realizarse en una cámara de flujo de fluidos, como la cámara descrita más arriba con referencia de la Figura 1A. En varias realizaciones, el fluido puede ser introducido sin ningún paso de lavado o aclarado. En el bloque 430, el método 400 incluye inducir la formación de coágulo sobre las microestructuras, en un espacio situado encima y entre el bloque y el poste. Este paso puede incluir causar la desviación de por lo menos una de las microestructuras, como puede ser la desviación del poste hacia el bloque. El método 400 puede incluir además la medición de la desviación de las microestructuras 440. En varias realizaciones, la desviación se mide mediante un montaje de detección magnética, como es mediante el uso de válvulas de spin, para medir los cambios en el campo magnético.

20 Las Figuras 5A-5C son gráficos que ilustran la activación del cizallamiento requerida para iniciar la desviación de los micropostes en tres pacientes representativos (donantes de plaquetas) y según las diferentes realizaciones de la tecnología. El nivel umbral de activación del cizallamiento puede determinarse observando el gradiente de cizallamiento necesario para causar la desviación de un microposte en un sistema de micropostes en una cámara de flujo de fluidos, como la cámara de flujo de fluidos descrita más arriba con referencia a la Figura 1A. Como se muestra, los pacientes presentan distintos niveles de activación de cizallamiento necesarios para la contracción de las plaquetas y la correspondiente formación de coágulos. Algunos pacientes tienen niveles umbrales de cizallamiento bajos para la activación, mientras que otros presentan umbrales de cizallamiento más altos. Por ejemplo, las plaquetas del paciente de la Figura 5A están inactivas a 2.000 1/s, pero comienzan a generar fuerza a 5.000 1/s. En la Figura 5B, las plaquetas del paciente requirieron 8.000 1/s para activarse, mientras que las plaquetas del paciente de la Figura 5C requirieron 12.000 1/s para activarse. Esto puede significar que parte de la población tiene mayor tendencia a la activación de cizallamiento *in-vivo*. Como se comentará más abajo con referencia a la Figura 6, esta característica puede tenerse en cuenta al adaptar la terapia o el tratamiento. Esto puede proporcionar información a los médicos sobre la actividad plaquetaria de un paciente para el tratamiento antiplaquetario, o en casos tales como la recuperación postquirúrgica.

30 La Figura 6 es un diagrama de bloques que ilustra un método 600 de selección del tratamiento de un paciente en respuesta al umbral de activación del cizallamiento del paciente, según realizaciones de la tecnología. En el bloque 610, el método incluye inducir un gradiente de cizallamiento en una muestra de fluido, como puede ser una muestra de sangre. El gradiente de cizallamiento puede ser inducido en una cámara de flujo de fluidos, como la cámara descrita más arriba con referencia a la Figura 1A. En el bloque 620, el método 600 incluye además la determinación del nivel umbral de activación de cizallamiento requerido para la formación de coágulo. El nivel umbral puede determinarse observando el gradiente de cizallamiento necesario para causar la desviación de un microposte en un sistema de micropostes en la cámara de flujo de fluidos. En el bloque 630, el método 600 incluye seleccionar un tratamiento para el paciente, en base al nivel umbral de activación de cizallamiento. Por ejemplo, un paciente con un bajo umbral de cizallamiento al que se haya practicado un stent arterial puede necesitar chequeos más frecuentes de reoclusión, ya que sus plaquetas pueden unirse fácilmente. En un ejemplo inverso, una persona con un umbral de cizallamiento superior puede no necesitar una dosis alta de fármacos anticoagulantes, debido a una resistencia innata a la activación del cizallamiento. El método 600 puede proporcionar así un tratamiento adaptado a la situación particular del paciente.

35 40 45 50 55 60 La tecnología presentada aquí ofrece varias ventajas sobre los sistemas existentes. Por ejemplo, los dispositivos presentados aquí pueden detectar de forma rápida y precisa la función plaquetaria en los entornos de asistencia de emergencia. Los dispositivos pueden ser portátiles, funcionando con pilas, y requerir poco o ningún tiempo de calentamiento. La muestra puede ser solamente de unos pocos microlitros y la prueba se realiza en menos de cinco minutos. Además, el dispositivo puede ser

ES 2 586 934 T3

relativamente sencillo, sin piezas móviles que puedan tener un fallo mecánico, y sin requerir vibración o centrifugación. Además un dispositivo tan sencillo se puede fabricar de forma relativamente económica.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo fluídico que comprende:

5 un sistema (114, 214) de microestructuras, que consta generalmente de bloques rígidos (108, 208) y estructuras generalmente flexibles (110, 210); por lo menos un canal de fluido (102, 202) de tamaño suficiente para albergar el conjunto (114, 214), donde el canal de fluidos (102, 202) está configurado para inducir el flujo del fluido de una muestra biológica a través del sistema (114, 214); y medios para detectar el grado de desviación de una o más de las estructuras flexibles (110, 210) del sistema (114, 214) hacia un bloque (108,208).

10 2. El dispositivo de la reivindicación 1, donde el sistema (114, 214) comprende pares de los bloques generalmente rígidos (108, 208) y estructuras en general flexibles (110, 210), o donde las microestructuras están hechas de por lo menos uno de los materiales siguientes: silicona, polímeros, metal o cerámica.

15 3. El dispositivo de la reivindicación 1, donde los medios de detección comprenden por lo menos uno de los siguientes: un componente de detección óptico o un componente de detección magnética.

4. El dispositivo de la reivindicación 3, donde el componente de detección magnético es una válvula de spin (126, 226), una sonda Hall, o un magnetómetro de saturación.

20 5. El dispositivo de la reivindicación 3, donde las estructuras en general flexibles individuales (110, 210) incluyen un material magnético (116), y de preferencia donde el componente de detección magnético comprende válvulas de spin (126, 226) colocadas entre bloques individuales (108, 208), y estructuras en general flexibles (110, 210), y configurado para detectar los cambios en un campo magnético en el sistema (114, 214) causados por la desviación de las estructuras en general flexibles (110, 210) incluyendo el material magnético.

25 6. El dispositivo de la reivindicación 3, donde el componente de detección óptico es un microscopio de contraste de fase, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal o un fotodiodo.

30 7. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la muestra biológica comprende por lo menos uno de lo siguiente: sangre entera, plasma, proteínas plasmáticas, proteínas que se encuentran en sangre u otros fluidos biológicos, plaquetas, células endoteliales, células tumorales circulantes, células cancerosas, fibroblastos, células de músculo liso, cardiomiocitos, eritrocitos, leucocitos, bacterias, megacariocitos o fragmentos de ellos.

35 8. El dispositivo de la reivindicación 1, donde como mínimo algunas de las microestructuras están por lo menos parcialmente recubiertas con por lo menos un elemento de unión seleccionado de un grupo compuesto por proteínas, enzimas, minerales bioactivos, glucanos, poliglucanos, glucoproteínas, colágeno, factor von Willebrand, vitronectina, laminina, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, plasmina, agonistas, proteínas de la matriz, inhibidores de la actividad actina-miosina, y fragmentos de ellos.

40 9. El dispositivo de la reivindicación 1, donde el dispositivo fluídico comprende un dispositivo de tamaño manual (350), o donde el dispositivo comprende además una pantalla (352) configurada para mostrar una característica de la muestra biológica, basada en el grado de desviación de una o más de las estructuras generalmente flexibles (110, 210).

10. Un método analítico que comprende:

Colocar un par de microestructuras en una cámara de flujo de fluidos (100), incluyendo ese par un bloque en general rígido (108, 208) cercano a una estructura en general flexible (110, 210); el fluido circulante sobre las microestructuras; y medir la desviación de la estructura en general flexible (110, 210).

45 11. El método de la reivindicación 10, donde colocar el par de microestructuras en la cámara de flujo de fluidos (100) comprende colocar una microestructura como mínimo parcialmente recubierta de por lo menos uno de los siguientes: enzimas, minerales, factor von Willebrand, una proteína, glucano, poliglucano, glucoproteína, colágeno, vitronectina, laminina, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, plasmina, agonista, proteína de la matriz, un inhibidor de la actividad actina-miosina o fragmentos de ellos.

50 12. El método de la reivindicación 10, donde el fluido circulante sobre las microestructuras comprende hacer circular un fluido biológico sobre las microestructuras, y de preferencia hacer circular el fluido biológico sobre las microestructuras comprende hacer circular un fluido biológico que contenga por lo menos uno de los siguientes: proteínas plasmáticas, minerales, factor von Willebrand, una proteína, glucano, poliglucano, glucoproteína, colágeno, vitronectina, laminina, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, plasmina, agonista, proteína de la matriz, un inhibidor de la actividad actina-miosina, o fragmentos de ellos.

55 13. El método de la reivindicación 10, donde la medición de la desviación de la estructura generalmente flexible (110, 210) comprende utilizar un componente de detección óptico para medir la desviación de la

estructura en general flexible (110, 210).

5 14. El método de la reivindicación 10, donde la medición de la desviación de la estructura generalmente flexible (110, 210) comprende la utilización de un componente de detección magnético para medir la desviación de la estructura generalmente flexible (110, 210), y de preferencia utilizar el componente de detección magnético comprende utilizar uno o más de los siguientes: una válvula de spin (126, 226), una sonda Hall, o un magnetómetro de saturación para medir el cambio en un campo magnético causado por la desviación de la estructura generalmente flexible (110,210).

10 15. El método de la reivindicación 10, donde colocar el par de microestructuras en la cámara de flujo de fluidos (100) comprende colocar el bloque generalmente rígido (108, 208) en una posición aguas arriba en relación con la estructura en general flexible (110, 210), o donde el método comprende además inducir la formación de coágulos.

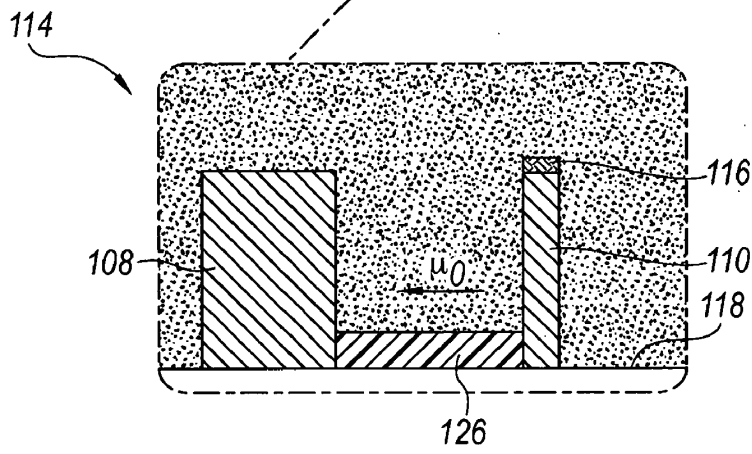
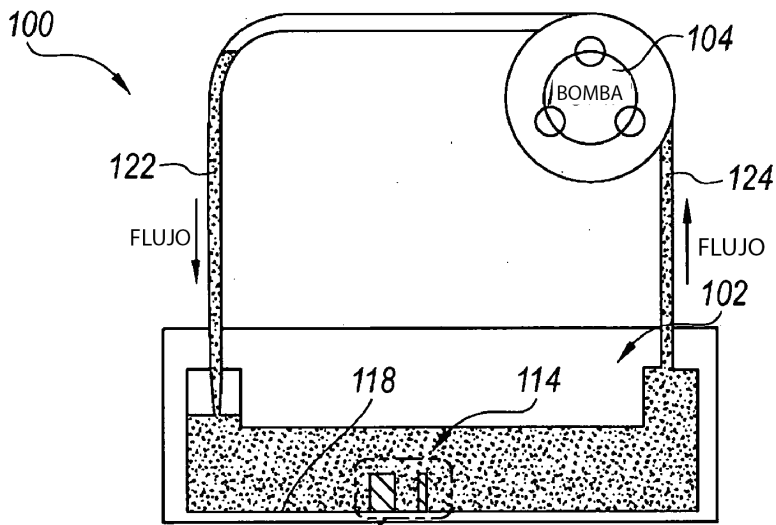


Fig. 1A

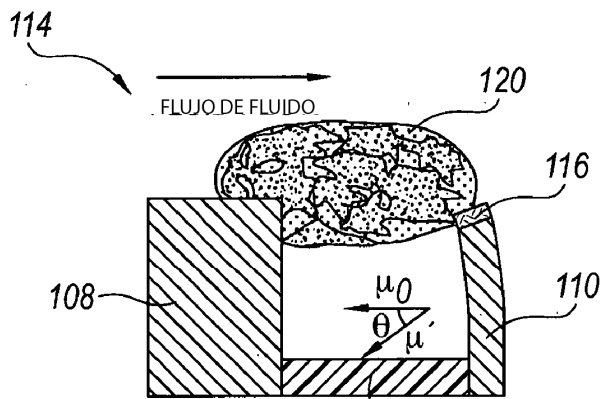


Fig. 1B

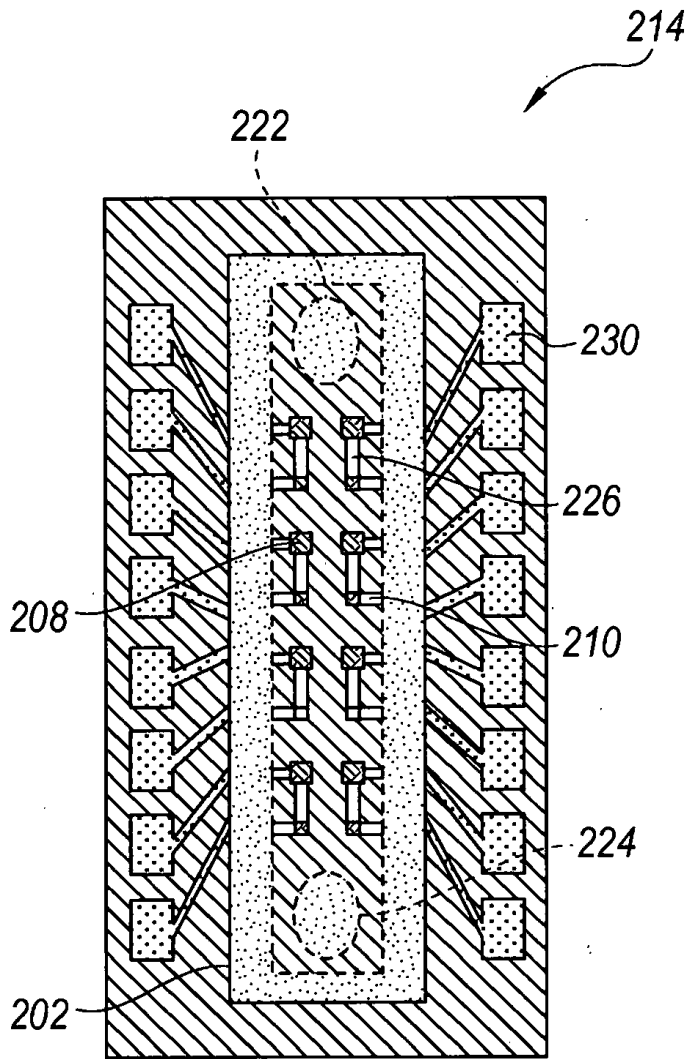


Fig. 2

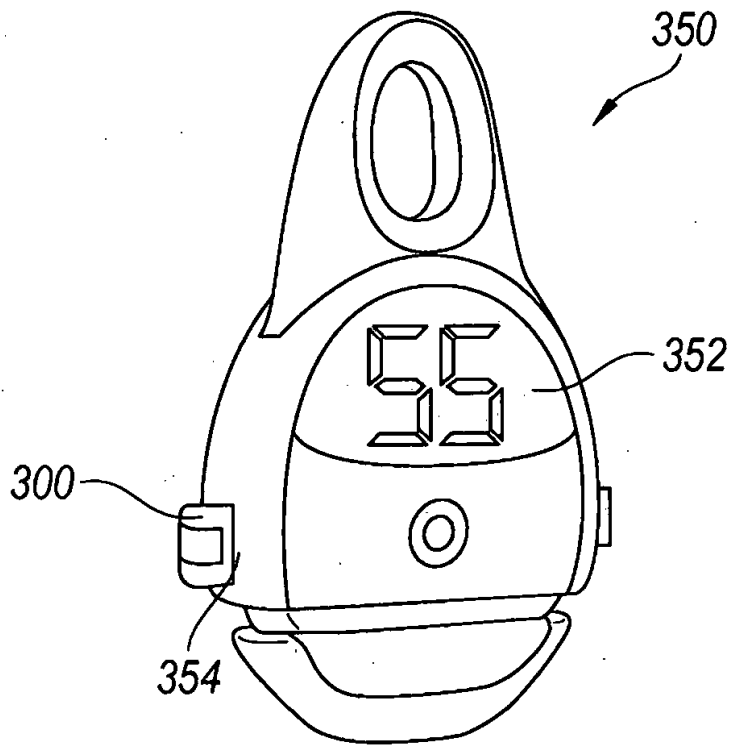


Fig. 3

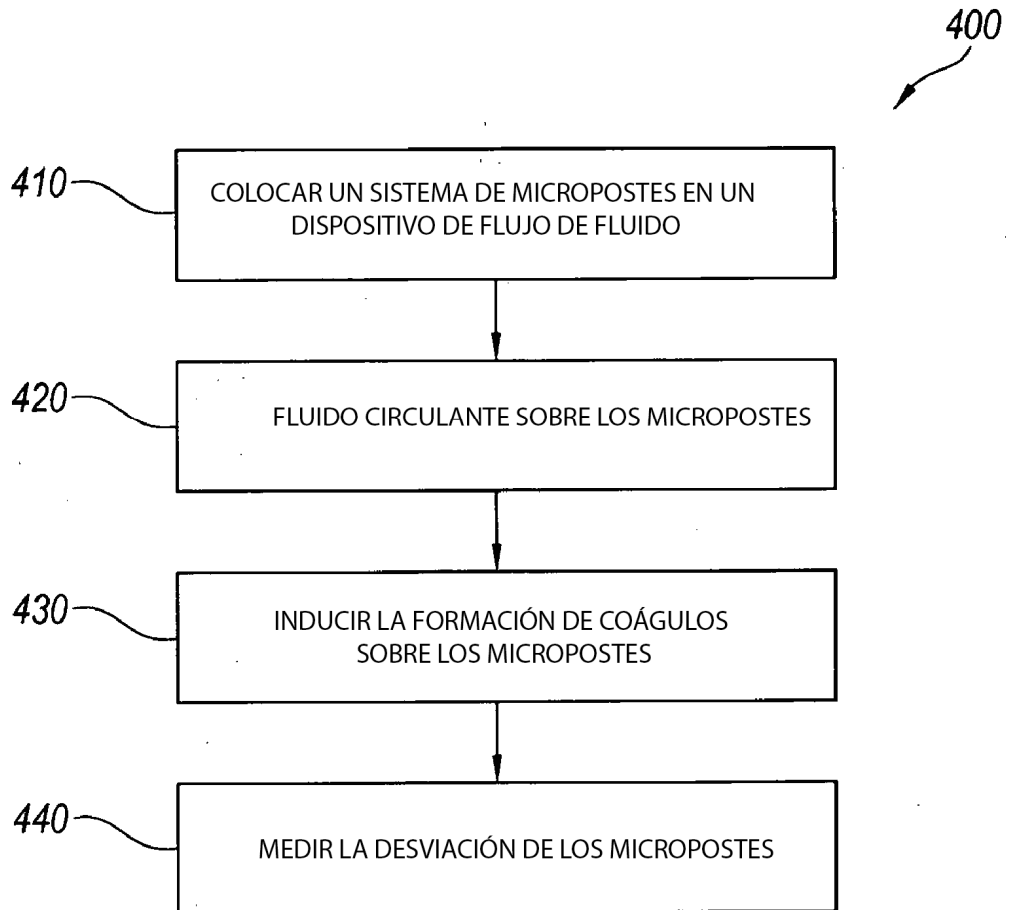


Fig. 4

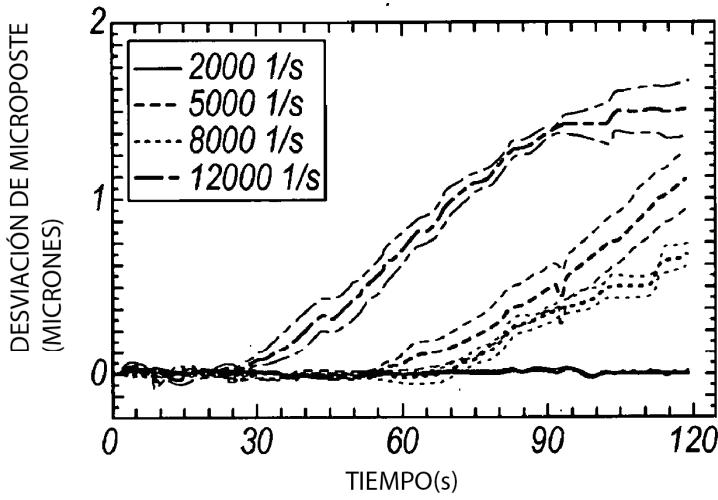


Fig. 5A

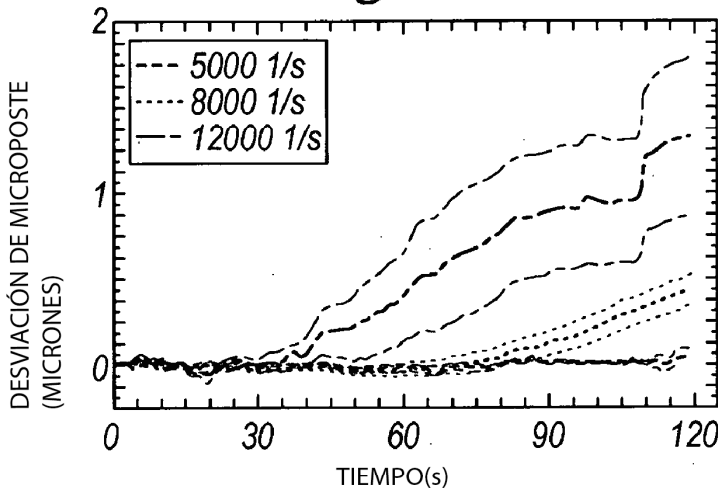


Fig. 5B

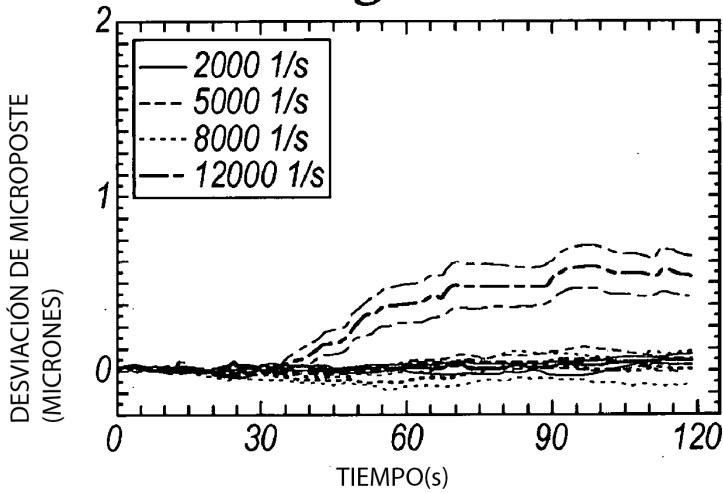


Fig. 5C

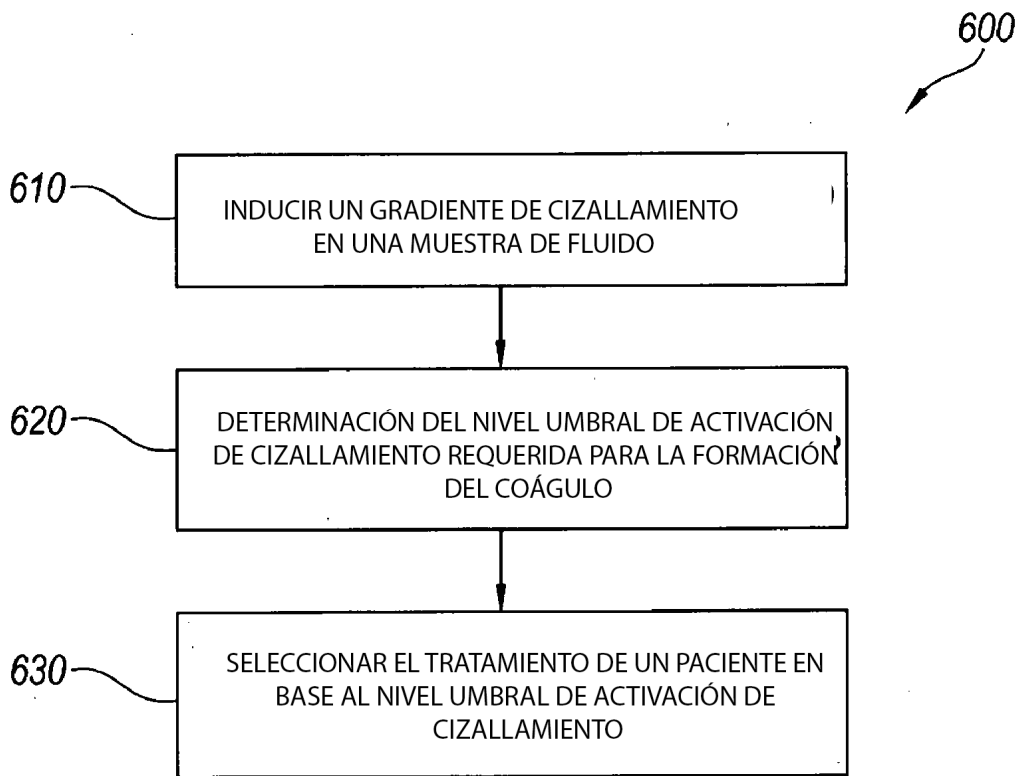


Fig. 6