(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 637 317**

(51) Int. CI.:

G01N 27/447 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015 E 15180931 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2990787**

(54) Título: **Procedimiento para medir la función trombocítica**

(30) Prioridad:

27.08.2014 DE 102014112270

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2017

(73) Titular/es:

Leibniz - Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. (100.0%)
Bunsen-Kirchhoff-Strasse 11
44139 Dortmund, DE

(72) Inventor/es:

WEST, JONATHAN;
JANASEK, DR., DIRK y
SICKMANN, PROF. DR., ALBERT

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 para medir la función trombocítica

La invención se refiere a un procedimiento para medir la función trombocítica.

Existe una necesidad de pruebas de la función trombocítica en el sector de la medicina humana y veterinaria, que puedan diagnosticar trastornos de los trombocitos (plaquetas sanguíneas) y de la hemostasia, y monitorizar terapias anticoagulantes, que sean para ello más fiables en términos de predicción y más rentables, y que puedan utilizarse fuera de laboratorios clínicos. Las pruebas de la función trombocítica disponibles en la actualidad miden la respuesta de reacción de una población de trombocitos (varios millones de trombocitos) a agonistas en condiciones estáticas. Estas condiciones no reflejan condiciones *in vivo,* en las que se dan señales paracrinas finamente distribuidas, y tampoco se tienen en cuenta las diferencias inherentes en la capacidad funcional (por ejemplo, la sensibilidad) entre distintos trombocitos, particularmente con respecto a trombocitos hipersensibles.

A la agregometría de transmisión luminosa se le considera el "patrón oro" de las pruebas de la función trombocítica pero, sin embargo, la agregometría de impedancia no se utiliza ampliamente debido a diversos factores que influyen en su precisión. En la actualidad, todas las pruebas para trombocitos analizan las respuestas de una población de trombocitos a agonistas (estimulantes), pero no proporcionan información alguna al nivel de los trombocitos individuales.

A partir del documento WO 2007/008064 A2 se conoce un sistema de electroforesis de flujo libre con una cámara microfluídica que, como es suficientemente sabido en sistemas de electroforesis de flujo libre, sirve para separar entre sí partículas y analizarlas, basándose en sus cargas eléctricas, e influir adicionalmente en las partículas que han sido separadas de esta manera, eventualmente en una unidad de detección conectada detrás.

A partir del documento WO 2013/013228 A1 se conoce un procedimiento que sirve principalmente para estudiar muestras de sangre de pacientes a quienes se ha administrado previamente un medicamento, con el fin de comprobar la eficacia del medicamento. Como alternativa, también se puede prever añadir directamente a la muestra de sangre dicho medicamento o una sustancia correspondiente, sin administrarlo previamente a los pacientes, y realizar después las pruebas correspondientes. A continuación, es decir, después de la acción del medicamento o de una sustancia correspondiente sobre la muestra de sangre, se introduce la muestra en un campo eléctrico y se realiza una distinción entre trombocitos activados y no activados basándose en la distinta desviación en el campo eléctrico.

A partir del documento US 7 138 269 B2 se conocen sistemas microfluídicos para caracterizar partículas y células sanguíneas, en los cuales se puede utilizar un campo eléctrico para distinguir partículas diversamente cargadas, gracias a su distinto movimiento en el sistema microfluídico, con lo que se pueden examinar individualmente las partículas individuales. En este caso, se puede añadir un reactivo a la disolución a examinar, que contiene las partículas, antes del examen.

Ward *et al.* (Journal of Immunological Methods 1974, vol. 6, n.º 1-2, 121-128) describe un procedimiento para medir la función trombocítica en el cual se conduce una disolución líquida de trombocitos a una cámara de electroforesis, a la que se aplica un campo eléctrico orientado en la dirección de entrada de la disolución de trombocitos, y se la pone en contacto con un estímulo (suero equino) inmediatamente antes de la acción del campo eléctrico y se observa y se evalúa la velocidad de cada trombocito individual en el campo eléctrico. Una menor movilidad sugiere un efecto más intenso del suero equino sobre los trombocitos.

Es misión de la invención poner a disposición una disolución por medio de la cual se pueda medir la sensibilidad de trombocitos individuales con alto rendimiento y el menor gasto posible en aparatos.

Esta misión se resuelve según la invención, en un procedimiento del tipo indicado al principio, conduciendo una disolución líquida de trombocitos, en la que los trombocitos se encuentran en forma individual, a una cámara microfluídica, a la que se aplica un campo eléctrico orientado transversalmente a la dirección de entrada, e inmediatamente antes o bien durante la acción del campo eléctrico, poniéndola en contacto con al menos un estimulante y observando y evaluando la trayectoria de movimiento de los trombocitos en el campo eléctrico, de manera que los trombocitos con una trayectoria de movimiento dirigida hacia el polo negativo del campo eléctrico se clasifican como trombocitos activados, y los trombocitos con una trayectoria de movimiento dirigida hacia el polo positivo del campo eléctrico se clasifican como trombocitos no activados.

Con la invención, se pone a disposición un procedimiento con el que es posible, con escaso gasto en aparatos y alto rendimiento, medir la sensibilidad de trombocitos individuales. Para ello, se combina una disolución de trombocitos, en la que los trombocitos están presentes de manera individual, es decir, por ejemplo, una disolución de trombocitos muy diluida, inmediatamente antes o durante la acción de un campo eléctrico, con un estimulante que actúa sobre los trombocitos. Dependiendo del efecto del estimulante (el agonista), la superficie de los trombocitos individuales cambia de manera conocida, y con ello su estado de carga eléctrica. Se sabe que la carga superficial de un trombocito no activado es negativa y la de un trombocito activado está entre menos negativa y positiva. Dependiendo de si ha tenido lugar o no la activación del trombocito respectivo por el estimulante (cuando se utiliza

un activador como estimulante), la trayectoria de movimiento del trombocito individual en el campo eléctrico cambia, lo que se puede observar fácilmente al microscopio. Igualmente, cuando se usa un inhibidor como estimulante, se puede comprobar el efecto del inhibidor sobre el trombocito respectivo mediante la observación de la trayectoria de movimiento del trombocito. Dependiendo del curso de la trayectoria de movimiento, es posible de forma sencilla la clasificación del trombocito. Por lo tanto, el campo eléctrico en la cámara microfluídica no se utiliza para la separación (de partículas), sino que se evalúa el cambio en las trayectorias de movimiento, y se realiza una mezcla de las partículas (trombocitos) con un estimulante, inmediatamente antes o durante la acción del campo eléctrico.

En una modalidad particularmente preferida, se prevé poner primeramente en contacto la disolución de trombocitos con un primer estimulante y a continuación, aguas abajo en la cámara, se pone en contacto con un segundo estimulante. El primer estimulante es entonces, preferiblemente, un activador, y el segundo es un inhibidor.

En otra modalidad preferida se prevé conducir la disolución líquida de trombocitos a una cámara microfluídica para electroforesis de flujo libre.

La combinación o mezcladura de la disolución de trombocitos con el estimulante puede tener lugar de diversas maneras.

Según una primera modalidad, se prevé combinar primeramente la disolución líquida de trombocitos con una disolución de estimulante y, a continuación, conducir la disolución mezclada de trombocitos y estimulante a la cámara microfluídica. Por lo tanto, en esta modalidad la mezcladura se lleva a cabo inmediatamente antes de la introducción en la cámara microfluídica.

Según una segunda modalidad, se prevé conducir en paralelo la disolución líquida de trombocitos y una disolución de estimulante a la cámara microfluídica. La mezcladura se produce entonces solo en la zona de acción del campo eléctrico.

Finalmente, se prevé como alternativa que, antes de introducir la disolución de trombocitos en la cámara microfluídica, se inmovilicen partículas de estimulante en el fondo de la cámara. La disolución de trombocitos, y por lo tanto los trombocitos, entran entonces en contacto con las partículas de estimulante dispuestas de manera estacionaria en la cámara. La inmovilización en el fondo de la cámara también es particularmente adecuada para poner en contacto los trombocitos con un segundo estimulante.

En el sentido de la invención, debe entenderse por una disolución de estimulante no solo disoluciones como tales, sino también suspensiones en las que estén presentes partículas de estimulante no disueltas.

En principio, se pueden utilizar todos los estimulantes conocidos y adecuados para el tratamiento de trombocitos; y preferiblemente se utilizan difosfato de adenosina, colágeno, trombina o prostaglandina como activadores, y ácido acetilsalicílico, convulxina, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor o prostaciclina como inhibidores.

Como medio portador fluido para los trombocitos en la disolución de trombocitos se puede utilizar, por ejemplo, un tampón de HEPES.

Según una primera modalidad, para evaluar la trayectoria de movimiento de los trombocitos se puede prever, preferiblemente, que la trayectoria de movimiento de los trombocitos en la cámara se capte mediante procedimientos de formación de imágenes o procedimientos ópticos de detección.

El campo eléctrico en la cámara microfluídica se puede generar mediante tensión de corriente continua o mediante tensión de corriente continua pulsada. Los electrodos para generar el campo eléctrico se pueden disponer en la cámara microfluídica. Pueden ser electrodos microfabricados o bien electrodos de alambre. Los electrodos están hechos, por ejemplo, de oro, platino, grafito u otro material conductor que pueda imprimirse sobre un sustrato transparente, tal como vidrio o poli(metacrilato de metilo), o bien se fabrican, en forma de alambre, a partir de estos materiales.

Dentro de la cámara microfluídica, los electrodos están separados del canal de flujo propiamente dicho por una zona límite (por ejemplo, puentes de electrólito), que puede estar formada por una matriz polimérica tal como un hidrogel o un material similar, o que puede estar integrada por una serie de microcanales.

A continuación se explica con mayor detalle la invención por medio de los dibujos. Estos muestran,

en la Figura 1, una representación esquemática de la estructura superficial fundamental de trombocitos no activados y activados,

en la Figura 2, una vista desde arriba de una cámara de electroforesis de flujo libre con una primera modalidad de la aportación de trombocitos,

en la Figura 3, una cámara de electroforesis de flujo libre en una vista desde arriba, con una segunda modalidad de la aportación a la disolución, y

en la Figura 4, una cámara de electroforesis de flujo libre en vista lateral, con una tercera modalidad de la aportación de trombocitos.

En la Figura 1 se indican con T_{NA} los trombocitos no activados, con forma redonda y a una escala muy ampliada. Estos trombocitos no activados T_{NA} presentan una carga superficial negativa en su superficie O1.

Cuando estos trombocitos no activados T_{NA} son activados por un estimulante o un agonista, lo que se indica simbólicamente por la flecha Pf, los trombocitos activados T_A adoptan otra estructura superficial, en concreto una superficie irregular, y los componentes de membrana se organizan de manera diferente en la membrana de los trombocitos, de forma que la carga eléctrica en la superficie O2 de los trombocitos activados T_A está entre menos negativa y positiva. El procedimiento según la invención aprovecha esta distinta distribución de carga superficial de trombocitos no activados T_{NA} y trombocitos activados T_A.

En la Figura 2 se representa una cámara microfluídica en forma de una cámara 1 de electroforesis de flujo libre, a la que se aplica un campo eléctrico transversalmente a la dirección de flujo principal, que se extiende en la dirección longitudinal de la cámara 1, lo que se indica con un polo positivo P y un polo negativo M. En las zonas de borde a ambos lados de la cámara 1 están dispuestos electrodos adecuados correspondientes, o bien están integrados en la cámara 1, cuando los electrodos son electrodos impresos.

La cámara 1 de electroforesis de flujo libre presenta una pluralidad de canales 2 de entrada y canales 2a de salida paralelos. En el ejemplo de realización según la Figura 2, un conducto 3 de aportación, en forma de Y, está conectado a un canal central de entrada, aportándose a través de uno de sus afluentes 4 una disolución 8 de trombocitos con trombocitos no activados T_{NA} individuales y aportándose a través de su otro afluente 5 una disolución 9 de estimulante, que se mezclan en una zona 6 de mezcladura del conducto 3 de aportación y llegan mezcladas a la cámara 1. Paralelamente a ello, se lleva a la cámara 1, a través de los otros canales 2, un tampón 7 de elución, de forma que el flujo recorre la cámara 1 en toda su anchura y longitud.

La disolución 8 de trombocitos consiste preferiblemente, aparte de los trombocitos no activados T_{NA} contenidos de manera individual en la disolución; en un tampón de HEPES, y el tampón 7 de elución también puede ser un tampón de HEPES, pero eventualmente también puede ser una disolución de estimulante.

En la zona 6 de mezcladura del conducto 3 de aportación en forma de Y, la disolución 9 de estimulante actúa sobre los trombocitos, provocando así que algunos trombocitos se activen y su carga superficial cambie de negativa a entre menos negativa y positiva.

Esto lleva a que, en la zona de influencia del campo eléctrico dentro de la cámara 1, la trayectoria de movimiento B_{NA} de los trombocitos no activados T_{NA} se extienda en dirección al polo positivo P, mientras que la trayectoria de movimiento B_A de los trombocitos activados T_A se extiende en dirección al polo negativo M.

Según la invención, se detecta la trayectoria de movimiento respectiva de cada trombocito individual, por ejemplo por medio de un microscopio; y se clasifican y se evalúan (es decir, se califican) como trombocitos no activados T_{NA} los trombocitos con una trayectoria de movimiento dirigida hacia el polo positivo, y como trombocitos activados T_A los trombocitos con una trayectoria de movimiento B_A dirigida hacia el polo negativo.

En el ejemplo de realización según la Figura 3, el conducto de aportación de la disolución 8 de trombocitos y de la disolución 9 de estimulante en la cámara 1 es diferente, comparado con el ejemplo de realización según la Figura 2, pero por lo demás el ejemplo de realización no difiere del ejemplo de realización según la Figura 2. En el ejemplo de realización según la Figura 3, la disolución 9 de estimulante se introduce centralmente en los canales 2 de entrada, y fluye a través de la cámara 1 esencialmente a lo largo de la zona rayada. La disolución 8 de trombocitos se introduce a través de un canal 2' de entrada dispuesto adyacente a ello. Por acción del campo eléctrico en la cámara 1, los trombocitos T_{NA} inicialmente no activados se desvían en dirección al polo positivo y, por tanto, entran en contacto con la disolución 9 de estimulante. Aquellos trombocitos que permanecen no activados, es decir los trombocitos T_{NA}, se mueven a lo largo de una trayectoria de movimiento representada como B_{NA}, en dirección al polo positivo P. En contraste, los trombocitos T_A que se han activado al entrar en contacto con la disolución de estimulante cambian su trayectoria de movimiento, y finalmente su trayectoria de movimiento B_A está orientada en dirección al polo negativo M. Por lo tanto, observando la trayectoria de movimiento B_{NA}, B_A de los trombocitos individuales, en este ejemplo de realización también se les puede clasificar, los trombocitos con una trayectoria de movimiento B_{NA} finalmente dirigida hacia el polo positivo P son trombocitos no activados T_{NA}, y los trombocitos con una trayectoria de movimiento B_A finalmente dirigida hacia el polo negativo son trombocitos activados T_A.

En Figura 4 se representa una modalidad adicional, la cámara 1 de electroforesis de flujo libre está girada 90º con respecto a la representación según las Figuras 2 y 3, y se muestra desde un lado. En esta realización no se introduce en la cámara ninguna disolución estimulante, sino que las partículas de estimulante están inmovilizadas en la superficie del fondo de la cámara 1.

La disolución 8 de trombocitos se aporta a través de los canales 2 de entrada, al igual que un tampón de separación, que no está representado en la Figura 4. Además, a través de una entrada 10 en el lado superior se introduce en la cámara 1 un tampón adicional para el enfoque dinámico.

Los trombocitos que se han activado se indican una vez más con T_A; su trayectoria de movimiento se desvía entonces transversalmente al plano del dibujo de la Figura 4 en dirección al polo negativo. La evaluación de las trayectorias de movimiento de los trombocitos individuales en la cámara 1 tiene lugar como se ha descrito más arriba.

Por supuesto, la invención no está restringida a los ejemplos de realización mostrados. Son posibles otras modalidades sin apartarse de la idea fundamental. Por ejemplo, se puede poner primeramente en contacto la disolución de trombocitos con un primer estimulante y, a continuación, en la dirección de avance del flujo en la cámara, en contacto con un segundo estimulante. El primer estimulante es entonces un activador, por ejemplo, y se puede poner en contacto con los trombocitos individuales de la manera descrita en las Figuras 2 a 4. El segundo estimulante es entonces un inhibidor, por ejemplo, que está inmovilizado en el fondo de la cámara 1, preferiblemente aguas abajo de la entrada en la cámara 1, o se introduce en la cámara 1 aguas abajo de la cámara 1. La trayectoria de movimiento de los trombocitos en la zona de entrada a la cámara 1 refleja entonces el efecto del activador sobre los trombocitos y la trayectoria de movimiento de los trombocitos aguas abajo refleja el efecto del inhibidor sobre los trombocitos.

Listado de referencias numéricas:

1	cámara
2, 2'	canales de entrada
2a	canales de salida
3	conducto de aportación en forma de Y
4	afluente
5	afluente
6	zona de mezcladura
7	tampón de elución
8	disolución de trombocitos
9	disolución de estimulante
10	entrada
T_{NA}	trombocitos no activados
T_A	trombocitos activados
Pf	flecha
M	polo negativo
P	polo positivo
B_{NA}	trayectoria de movimiento de trombocitos no activados
B_A	trayectoria de movimiento de trombocitos activados
O1	superficie de un trombocito no activado
O2	superficie de un trombocito activado

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para medir la función trombocítica, caracterizado por que se conduce una disolución líquida de trombocitos, en la que los trombocitos se encuentran en forma individual, a una cámara microfluídica, a la que se aplica un campo eléctrico orientado transversalmente a la dirección de entrada de la disolución de trombocitos, e inmediatamente antes o bien durante la acción del campo eléctrico, se la pone en contacto con al menos un estimulante y se observa y se evalúa la trayectoria de movimiento de cada trombocito individual en el campo eléctrico, de manera que un trombocito con una trayectoria de movimiento dirigida hacia el polo negativo del campo eléctrico se clasifica como trombocito activado, y un trombocito con una trayectoria de movimiento dirigida hacia el polo positivo del campo eléctrico se clasifica como trombocito no activado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que primeramente se pone en contacto la disolución de trombocitos con un primer estimulante y a continuación, aguas abajo en la cámara, se pone en contacto con un segundo estimulante.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se conduce la disolución líquida de trombocitos a una cámara microfluídica de electroforesis de flujo libre.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado por que primeramente se combina la disolución líquida de trombocitos con una disolución de estimulante y a continuación se conduce la disolución mezclada de trombocitos y estimulante a la cámara microfluídica.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado por que se conducen en paralelo la disolución líquida de trombocitos y una disolución de estimulante a la cámara microfluídica.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que, antes de la introducción de la disolución de trombocitos en la cámara microfluídica, se inmovilizan partículas de estimulante en el fondo de la cámara.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que se utilizan como estimulantes difosfato de adenosina, colágeno, trombina o prostaglandina.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que se utilizan como estimulantes ácido acetilsalicílico, convulxina, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, prostaciclina.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que se pone primeramente en contacto la disolución de trombocitos con un primer estimulante y a continuación, aguas abajo en la cámara, se pone en contacto con un segundo estimulante, en donde como primer estimulante se utiliza un activador según la reivindicación 7 y como segundo estimulante un inhibidor según la reivindicación 8.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la trayectoria de movimiento de los trombocitos en la cámara se capta mediante procedimientos de formación de imágenes o procedimientos ópticos de detección.

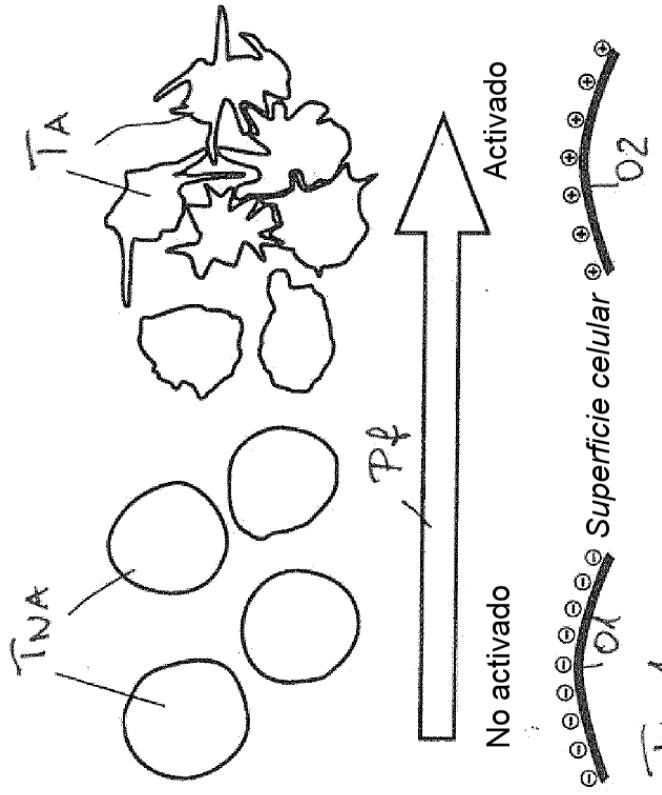
TA
TNA
Pf
No activado
Activado
Superficie celular
O1
O2

Fig.1

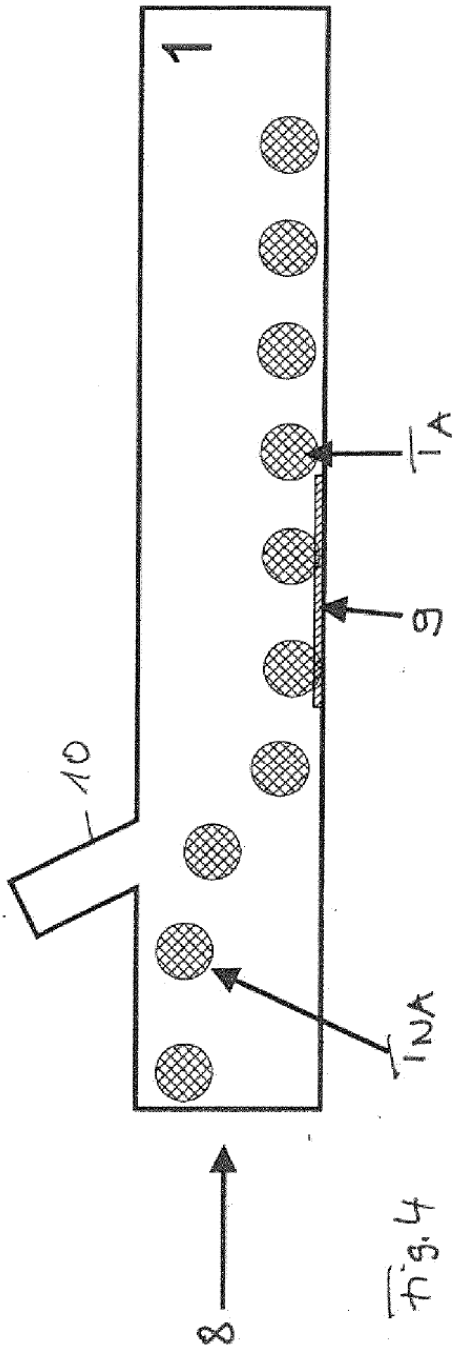
1
10
TA
9
TNA
8

Fig.4

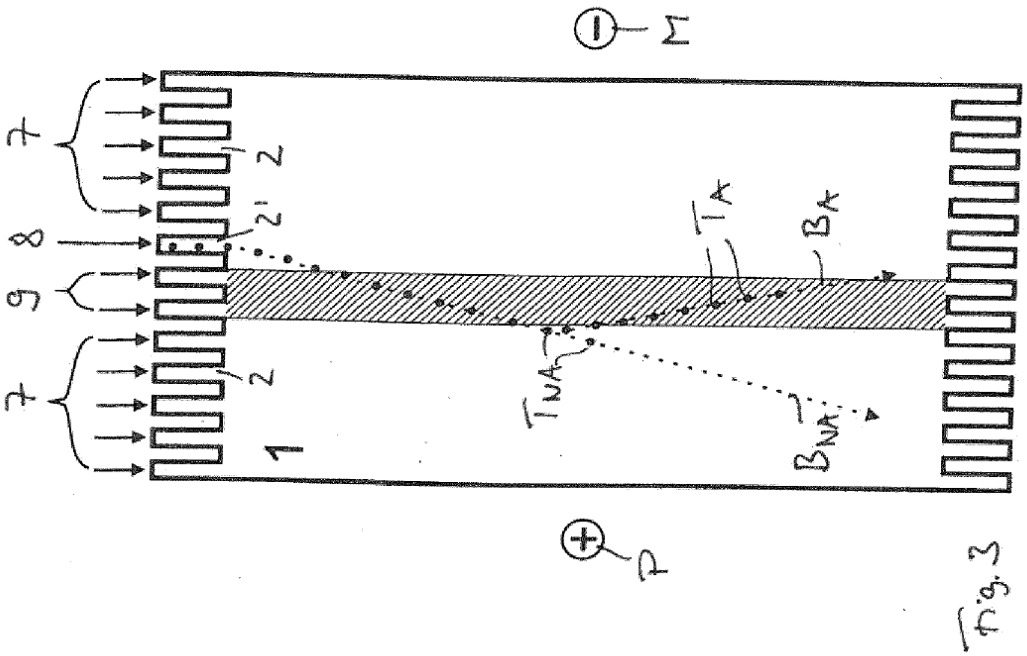

Fig. 3

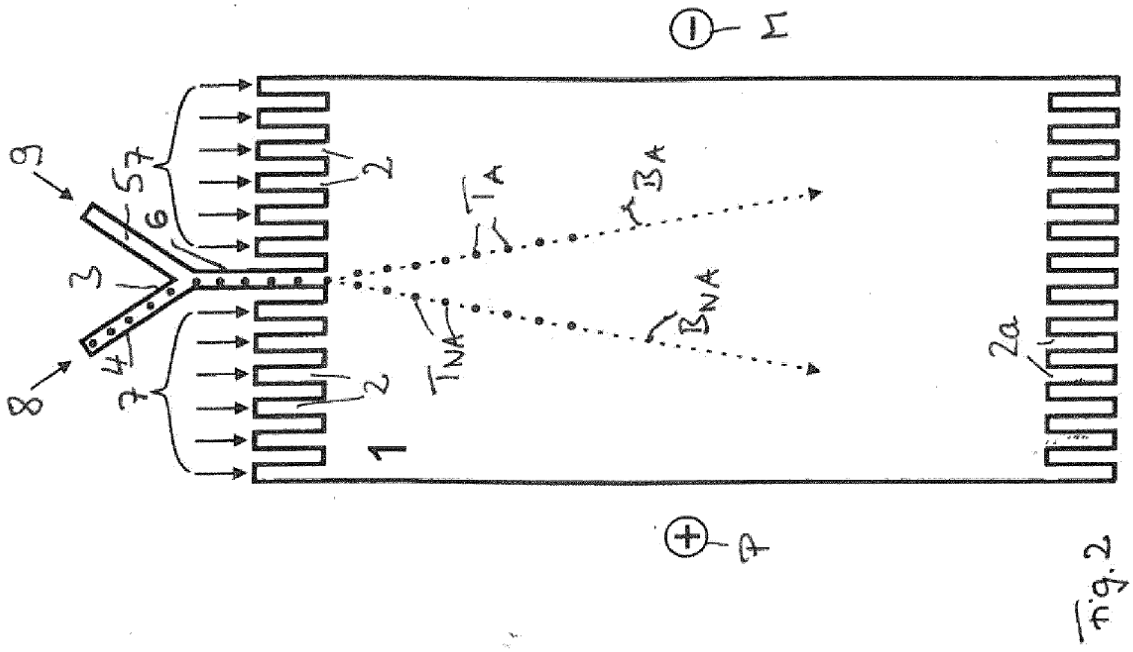

Fig. 2