

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 926**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 33/49</b>	(2006.01)
<b>G01N 35/08</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/15</b>	(2006.01)
<b>B01L 3/00</b>	(2006.01)
<b>B01F 13/00</b>	(2006.01)
<b>B01F 13/08</b>	(2006.01)
<b>B01F 15/02</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>G01N 35/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/KR2013/012289**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104807**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13868176 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2940470**

54 Título: **Aparato de prueba de agregación plaquetaria en respuesta a un fármaco**

30 Prioridad:

**31.12.2012 KR 20120158117**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.11.2020**

73 Titular/es:

**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS  
FOUNDATION (100.0%)  
145 Anam-ro, Seongbuk-gu  
Seoul 136-701, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, SE HYUN;  
LIM, CHAE SEUNG;  
NAM, JEONG HOON y  
LIM, HYUN JUNG**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 792 926 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

Aparato de prueba de agregación plaquetaria en respuesta a un fármaco

**Campo técnico**

- 5 La invención se refiere a un aparato y procedimiento de prueba de la respuesta farmacológica de una plaqueta y en particular a un aparato y procedimiento de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de manera tal que pueden ser realizadas diversas pruebas automáticamente con una pequeña cantidad de sangre usando microfluidos en un disco giratorio desechable para el diagnóstico temprano de la isquemia trombótica y enfermedades hemorrágicas.

**Técnica anterior**

- 10 La trombosis es la formación de una hemostasis o un coágulo de sangre dentro de un vaso sanguíneo. La trombosis en la arteria coronaria del corazón o en la parte cerebrovascular causa un ataque al corazón o un infarto cerebral. Actualmente, la trombosis, conocida como el asesino silencioso, se está convirtiendo en la principal causa de muerte. El problema es que la trombosis o la enfermedad hemorrágica no es causada solamente por un defecto genético y su causa no ha sido descubierta claramente.
- 15 Lo más grave es que la tasa de prevalencia de la trombosis está aumentando rápidamente debido a defectos genéticos y factores adquiridos. Por lo tanto, han sido requeridos un aparato y un procedimiento para hacer una prueba cuantitativa para trombosis o enfermedad hemorrágica y para llevar a cabo un diagnóstico temprano y una decisión de pronóstico.
- 20 Hay muchos factores que juegan un papel en la hemostasia en los sitios de lesión vascular. Todos los mecanismos bioquímicos y biológicos de cada factor juegan un papel crítico y la hemostasia de una plaqueta juega el papel más crucial. Una plaqueta no está adherida a las paredes arteriales en ningún sitio de lesión, pero el mecanismo bioquímico y biológico está activado en los sitios de lesión vascular, por lo que la hemostasia es lograda independientemente de las condiciones de flujo.
- 25 Han sido desarrollados numerosos procedimientos y dispositivos para subdividir y probar la función plaquetaria. Una prueba de función plaquetaria es una prueba importante para discernir los trastornos hemorrágicos causados por un trastorno congénito o adquirido de la función plaquetaria en caso de que los trastornos hemorrágicos no tengan un trastorno plaquetario numérico. Además, esta prueba de la función plaquetaria es usada para examinar un aumento de la tendencia a la hemorragia o la tolerancia a fármacos causada por el agente antiplaquetario usado para el tratamiento o prevención de los trastornos cardiovasculares.
- 30 Si hay una lesión en las células endotelioideas del vaso sanguíneo, un material interno del endotelioide tal como colágeno es expuesto a la sangre y una plaqueta es adherida al material y es activada. El mecanismo de adhesión de plaquetas tiene diferentes características dependiendo de las condiciones del flujo sanguíneo.
- 35 En particular, si el caudal sanguíneo es alto en la arteria y la tensión de cizallamiento aplicada a la pared del vaso sanguíneo es alta, la plaqueta no es adherida fácilmente a la membrana interna del vaso sanguíneo. En esta condición, el factor von Willebrand (FvW) es activado y adherido fácilmente a la pared del vaso sanguíneo y una plaqueta es adherida a la pared del vaso sanguíneo por el FvW. Por supuesto, es sabido que un complejo de receptores glicoprotéicos tal como GPIb-IX-V que está contenido en la membrana de las células plaquetarias induce la reacción con el FvW, lo que conduce a la adhesión.
- 40 Como tal, una plaqueta adherida induce una agregación al atraer el mismo tipo de plaqueta y lleva a la hemostasia. Entonces, la hemostasia es reforzada por la fibrina.
- 45 Sin embargo, la función plaquetaria no siempre es favorable, pero puede producir un efecto adverso en una determinada condición o situación de flujo. Por ejemplo, cuando la pared del vaso sanguíneo es estrechada localmente por el endurecimiento de la arteria, una plaqueta que pasa a través de esta parte estrecha resulta expuesta a una alta relación de cizallamiento y es activada, y entonces se producen la adhesión y agregación en la parte posterior de la parte estrecha y conduce a la trombosis que bloquea el vaso sanguíneo.
- Como ha sido explicado con anterioridad, una plaqueta y un FvW son activados por el tamaño de un flujo sanguíneo, es decir, una cizalla tensiona el flujo, lo que lleva al aumento de una propiedad adhesiva y a la generación de hemostasia. Es sabido que la tensión de cizallamiento requerida para la activación de una plaqueta o un FvW es de al menos 8 Pa y la velocidad de cizallamiento es de al menos 5.000 1/s.
- 50 Por lo tanto, diversos dispositivos son sugeridos y desarrollados para un diagnóstico temprano y una prueba de pronóstico de la hemostasia o enfermedad hemorrágica y pueden ser divididos en un procedimiento eléctrico, un procedimiento óptico, un procedimiento de medición del tiempo para detener la hemorragia, etc., en base al sensor de medición.

Aproximadamente hace 100 años ha sido desarrollado un procedimiento de tiempo de sangrado (BT) que mide el tiempo de sangrado, que todavía es usado para una prueba de detección de la función plaquetaria. Sin embargo, una prueba actual de la función plaquetaria tiene problemas tal como una difícil estandarización, una baja validez diagnóstica y un uso de una técnica invasiva, y por tanto ha sido requerido un procedimiento de medición objetivado para medir la función plaquetaria.

Para resolver los problemas, es desarrollado un analizador de la función plaquetaria (por ejemplo: PFA-100) que es usado para medir la función plaquetaria. Este analizador usa la característica de que una plaqueta es agregada por el FvW activado en una alta velocidad de cizallamiento. Para medir esta característica, después de que la sangre entera fluye en un tubo capilar largo, una plaqueta es agregada en un orificio revestido por ADP o epinefrina junto con colágeno y después el tiempo en el que el orificio es bloqueado se mide por la presión, el caudal, etc.

Esta prueba de función plaquetaria depende estrictamente de la función del FvW. Esta prueba tiene la desventaja de que la prueba depende del hematocrito (Hct) y una prueba antiplaquetaria tal como una prueba con aspirina o clopidogrel no es posible. Además, como desventaja, son requeridas pruebas de dos etapas para la prueba de función plaquetaria y el costo de la prueba está en aumento.

En particular, para activar el FvW, una muestra de sangre debe ser expuesta durante un tiempo predeterminado con una alta velocidad de cizallamiento. Para ello, PFA-100 usa un procedimiento para hacer fluir la sangre a alta velocidad en un tubo capilar largo. Sin embargo, como desventaja, este procedimiento requiere una gran cantidad de sangre. También, es una desventaja que el FvW no esté activado en el centro del tubo capilar en el que la velocidad de cizallamiento es mínima mientras que el FvW está activado cerca de la pared del tubo en la que la velocidad de cizallamiento es máxima, por lo que no está garantizada la repetibilidad de los resultados de la prueba.

El documento EP 2 116 305 A1 desvela un procedimiento y dispositivo de control de flujo de fluidos a través de un dispositivo de procesamiento de muestras. El procedimiento comprende proporcionar un dispositivo de procesamiento de muestras que comprende un sustrato que comprende primeros y segundos lados principales y un primer revestimiento adherido al primer lado principal del sustrato, el dispositivo de procesamiento de muestras comprende además una matriz de proceso formada en este, la matriz de proceso comprende una primera cámara que define un volumen de primera cámara, una segunda cámara, un canal que se extiende entre la primera y la segunda cámara, y una punta de válvula que sobresale en el volumen de primera cámara de la primera cámara, en el que el labio de la válvula separa la primera cámara del canal, en el que el labio de la válvula está ubicado entre una porción del volumen de la primera cámara y el primer revestimiento, y en el que la porción del volumen de la primera cámara está ubicado entre la válvula hp y el segundo lado principal del sustrato; formar una abertura en la punta de la válvula, en la que la primera cámara está en comunicación fluida con el canal después de formar la abertura; y girar el dispositivo de procesamiento de muestras sobre un eje de rotación después de formar la abertura para desplazar el material de muestra de la primera cámara al canal a través de la abertura.

El documento KR 101 193 566 B1 desvela un dispositivo de análisis multifuncional de plaquetas que comprende una cámara de almacenamiento de muestras que contiene una muestra de sangre; un agitador montado en el interior de la cámara de almacenamiento de muestras que induce la vibración de la muestra de sangre; un canal paralelo que separa la sangre en una pluralidad de trayectorias; un dispositivo de vacío que está conectado al extremo del canal paralelo; una fuente de luz para irradiación del canal paralelo con la luz; y un sensor de imagen.

El documento EP 2 324 924 A2 desvela un sistema microfluídico que incluye un dispositivo microfluídico que comprende una cámara que contiene una muestra de fluido, un canal que está conectado a la cámara y a través del cual fluye la muestra de fluido, y una válvula que controla el flujo de la muestra de fluido a través del canal; un aparato de irradiación que irradia energía electromagnética; y un difusor que difunde y distribuye la energía electromagnética irradiada por el aparato de irradiación a una región de irradiación del dispositivo microfluídico.

IMPACT de Diamed Co., Ltd. usa un flujo de Couette de tipo de rotación en forma de Cono-Placa. En este procedimiento, es aplicada una tensión de cizallamiento uniforme a la sangre allí contenida y es medido el grado de adhesión de las plaquetas cuando es aplicada una alta tensión de cizallamiento. Al igual que PFA-100, este procedimiento tiene la desventaja de que depende demasiado de la concentración y la función del fibrinógeno y el FvW.

Verify-NOW (Accumetrics) usa un procedimiento para medir un grado de agregación plaquetaria por una turbidez usando un sensor óptico. En este procedimiento, un agonista es mezclado con la sangre y después una microesfera revestida por colágeno se hace reaccionar para que sea agregada una plaqueta en la sangre. Después, la turbidez es medida a lo largo del tiempo. La frecuencia de uso de este procedimiento ha sido incrementada recientemente, pero este procedimiento todavía tiene las desventajas de los procedimientos anteriores para medir una turbidez.

### **Divulgación de la invención**

#### **Problema técnico**

El objeto de la presente invención es resolver los problemas mencionados y la presente invención proporciona un aparato de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo

mediante el cual es posible hacer una prueba múltiple que incluye el diagnóstico y pronóstico tempranos de enfermedades hemorrágicas y trombosis con una sola prueba, ahorrando así costos de prueba y aumentando la repetibilidad y exactitud de la misma.

- 5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un aparato de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluido centrífugo mediante el cual puede ser medido automáticamente el tiempo de cierre de un flujo sanguíneo.

### **Solución técnica**

- 10 Para lograr el objeto anterior, la invención proporciona un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluido centrífugo que comprende: un disco giratorio; una cámara de muestras que está situada en el centro del disco y que contiene en su interior una muestra de sangre; cámaras de agitación que están conectadas a la cámara de muestras en dirección radial, respectivamente, y que inducen un flujo de cizallamiento en la muestra de sangre; microcanales que están conectados a las cámaras de agitación y en los que se produce la agregación y adhesión de una plaqueta durante una migración de la muestra de sangre; y cámaras de desechos de la muestra para recibir la muestra de sangre que ha pasado por los microcanales.

- 15 El aparato de acuerdo con la invención comprende además una pieza de medición que está instalada en el disco y que mide una distancia de migración de la muestra de sangre de acuerdo con la obstrucción del microcanal (40) debido a la agregación y adhesión de la plaqueta.

De acuerdo con la invención, un agitador es instalado de forma giratoria en la cámara de agitación.

El agitador tiene la forma seleccionada de una barra cilíndrica recta, una barra cilíndrica cruzada y una placa circular.

- 20 De acuerdo con la invención, un fármaco que activa o inactiva la agregación de una plaqueta está contenido en el agitador en estado líquido o sólido.

El fármaco es al menos un agonista seleccionado de colágeno, difosfato de adenosina (ADP) y epinefrina.

El fármaco es al menos un antagonista seleccionado de aspirina, antagonista del receptor P2Y1 y antagonista del receptor P2Y12.

- 25 El antagonista del receptor P2Y1 es al menos uno seleccionado de MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS.

El antagonista del receptor P2Y12 es al menos uno seleccionado de clopidogrel, ticlopidina, prasugrel, AR-C67085MX, cangrelor, C1330-7, MRS 2395 y 2-metiltoadenosina-5'-monofosfato.

- 30 La velocidad mínima de cizallamiento en el flujo de cizallamiento generada por el agitador es de al menos 5.000 (s<sup>-1</sup>) o la tensión de cizallamiento mínima es de al menos 8 Pa.

El centro y ambos lados del agitador están abiertos y la porción abierta está provista con un sello.

El sello es un material de cambio de fase o una membrana acuosa.

El material de cambio de fase es cera de parafina y la membrana acuosa es almidón.

- 35 Una válvula microfluidica está instalada en la parte delantera del microcanal para controlar el flujo de la muestra de sangre.

El microcanal tiene la forma de al menos una de una línea recta, una curva o un zigzag, o la combinación de ambas.

Una pluralidad de cámaras intermedias está formada en una pluralidad de puntos del canal recto.

El microcanal está provisto con una pluralidad de piezas de expansión que son relativamente amplias.

- 40 También, es descrito un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluido centrífugo que comprende: un disco giratorio; cámaras de agitación dispuestas en el centro del disco de forma circunferencial, que contienen una muestra de sangre, respectivamente, y que inducen el flujo de cizallamiento en la muestra de sangre; microcanales que están conectados a las cámaras de agitación y en los que se produce la agregación y adhesión de una plaqueta durante la migración de la muestra de sangre; y cámaras de desechos de la muestra para recibir la muestra de sangre que ha pasado por los microcanales.

- 45 Además, es descrito un procedimiento de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluido centrífugo que comprende las siguientes etapas: introducir una muestra de sangre; hacer girar un disco en el que fue introducida la muestra de sangre; migrar la muestra de sangre descargada a través de un

microcanal y detener la muestra de sangre por una agregación de una plaqueta; y detener el disco y medir un grado de migración de la muestra de sangre.

**Efecto ventajoso**

5 De acuerdo con la invención, es posible hacer una sola prueba para una gran cantidad de muestra de sangre a través de una pluralidad de canales rápidamente.

Además, con una sola prueba, es posible hacer una prueba múltiple con respecto a una función plaquetaria compleja realizando una prueba de múltiples fármacos para una sola muestra de sangre en una pluralidad de canales, ahorrando así tiempo y costos de prueba.

10 Además, no es requerido un dispositivo impulsor de la migración de la sangre tal como una bomba de vacío, etc., sino que es sustituido por el uso de una fuerza centrífuga.

Además, los elementos que están en contacto con la sangre pueden ser desechables y desechados después de su uso. Por lo tanto, es fácil de usar y evitar una infección de transmisión sanguínea.

Además, es fácil realizar una prueba a granel mediante un sistema que tiene un tiempo de medición corto y que permite una prueba simultánea en diversas muestras.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 2 muestra un proceso de una muestra de sangre de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 La Fig. 3 muestra una parte interior de un agitador de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 4 muestra otro ejemplo de un microcanal y su distribución de presión de flujo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Fig. 5 muestra un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con otra realización de la presente invención.

25 La Fig. 6 es un diagrama de flujo de un procedimiento de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con una realización de la presente invención.

**Modo de llevar a cabo la invención**

30 En adelante en la presente memoria, es descrita detalladamente, con referencia a los dibujos adjuntos, una realización de un aparato de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de las plaquetas en base a un microfluído centrífugo de acuerdo la invención.

La Fig. 1 muestra la disposición de un aparato de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con una realización de la invención. La Fig. 2 muestra un proceso de la muestra de sangre de acuerdo con una realización de la invención. La Fig. 3 muestra una parte interna de un agitador de acuerdo con una realización de la invención.

35 Como es mostrado en las figuras, el aparato de prueba multifuncional y respuesta farmacológica de las plaquetas en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con la invención comprende un disco giratorio 10; una cámara de muestras 20 que está situada en el centro del disco y que contiene una muestra de sangre; cámaras de agitación 30 que están conectadas a la cámara de muestras en dirección radial, respectivamente, y que introducen un flujo de cizallamiento en la muestra de sangre; microcanales 40 que están conectados a las cámaras de agitación 30 y en los que se produce la adhesión y agregación de la plaqueta; y cámaras de desechos de muestras 24 que reciben la muestra de sangre que ha pasado por los microcanales 40.

40 El microcanal 40 puede tener una sección transversal en forma de polígono tal como un rectángulo, un círculo o un óvalo. Por ejemplo, en el caso de una sección transversal de un cuadrado, la longitud de un lado puede estar en el intervalo de 1 a 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 10 a 200  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 20 a 50  $\mu\text{m}$ . En el caso de una sección transversal de un círculo, el diámetro puede tener el mismo rango de dimensiones anterior.

45 En una realización, cuando el disco 10, que es desechable, gira, la muestra de sangre migra en dirección radial por una fuerza centrífuga. En este caso, la distancia de migración de la muestra difiere dependiendo de la agregación y adhesión de una plaqueta y la agregación y adhesión relativa de una plaqueta son medidas por la diferencia de las distancias de migración.

La Fig. 1 representa una realización de la invención. Una pluralidad de cámaras de agitación 30 están dispuestas de manera circunferencial con respecto a una cámara de muestras de sangre 10. Cada cámara de agitación 30 contiene un fármaco de prueba específico y pueden ser realizadas diversas pruebas de respuesta farmacológica con una sola prueba. En este caso, la medición de la distancia de migración de una muestra de sangre es llevada a cabo mediante una pieza de medición 50 dispuesta en el disco 10. La pieza de medición 50 puede estar configurada como una microcámara para obtener y analizar una imagen o puede estar configurada como la combinación de sensores tal como un sensor de fotodiodo y un LED en una ubicación específica para medir la distancia de migración de una muestra de sangre.

Con referencia a la Fig. 2, es suministrada una muestra de sangre a la cámara de muestras 20 y después es introducida la muestra de sangre en la cámara de agitación 30 por medio de un canal de conexión 22. En este caso, para evitar que la muestra de sangre migre corriente abajo, es instalada una válvula microfluidica 42 en la parte delantera del microcanal 40. Después, la muestra de sangre es introducida en una cámara de desechos de muestras 24 a través del microcanal 40.

Con referencia a la Fig. 3, un agitador 32 es instalado en la cámara de agitación 30 para agitar la muestra de sangre. El agitador 32 puede girar sin contacto, tal como una fuerza magnética, y puede generar eficazmente un flujo de agitación y cizallamiento mediante el control de las rpm.

Además, el agitador 32 puede tener diversas formas, tal como una barra cilíndrica recta que es usada generalmente, una barra cilíndrica cruzada o una placa circular, etc. Cuando el agitador 32 gira por una fuerza sin contacto, en la cámara de agitación 30 se produce un flujo de agitación y de cizallamiento en función de las rpm. El flujo de cizallamiento puede ser un flujo de cizallamiento intermitente para una barra cilíndrica recta o puede ser un flujo de cizallamiento continuo para una placa circular. Por ejemplo, el agitador 32 puede estar fabricado por un metal delgado, de manera que pueda ser magnetizado por la fuerza magnética de un dispositivo de inducción de agitación separado (no mostrado) y ser influenciado sin una conexión mecánica.

Preferentemente, el diámetro o espesor del agitador 32 puede ser la mitad de la profundidad de la cámara de agitación 30 y la longitud o diámetro del agitador 32 puede ser de 80 a 90 % del diámetro de la cámara de agitación 30.

Mientras tanto, el fármaco 34 para activar o desactivar la agregación de una plaqueta está almacenado en el agitador 34 en estado líquido o sólido. Es decir, el agitador 32 puede ser hueco y el fármaco en forma líquida o en forma de polvo de partículas puede estar almacenado en el agitador 34.

En un ejemplo, para el agitador 32 en forma de barra cilíndrica recta, el centro y ambos lados del agitador 32 están abiertos y la porción abierta está provista con un sello 36. Preferentemente, el sello 36 puede ser un material de cambio de fase tal como cera de parafina o una membrana acuosa tal como almidón. La cera de parafina cambia una fase de sólido a líquido cuando es expuesta a una temperatura predeterminada y es retirado el sello del agitador 32. En este momento, el fármaco 34 en el agitador 32 es descargado en la cámara de agitación 30 mediante una fuerza centrífuga. Además, el almidón es fundido fácilmente cuando es expuesto a la sangre y el sello es retirado para que el fármaco 34 sea descargado en la cámara de agitación 30.

Además, en caso de que sea usado el sello 36 del material de cambio de fase, la aplicación de un láser o una onda electromagnética al sello 36 hace que el material de cambio de fase resulte calentado y fundido, de modo que el sello sea retirado. Además, en caso de que sea usado el sello 36 de la membrana acuosa, la rotación del agitador 32 para facilitar la fusión en la sangre hace que sea retirado el sello para que el fármaco 34 sea descargado en el agitador 34. Por lo tanto, con respecto a la descarga del fármaco 34, una fuerza centrífuga mediante la rotación del agitador 32 puede ser la principal fuerza impulsora.

Para probar si una plaqueta es activada por una fuerza mecánica, es preferente que la velocidad mínima de cizallamiento por la rotación del agitador 32 sea de al menos  $5.000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  o que la tensión de cizallamiento mínima sea de al menos 8 Pa. También, es preferente que el tiempo en la que muestra de sangre está expuesta al campo de flujo de cizallamiento sea de al menos 30 segundos. Esto es para lograr una activación suficiente de una plaqueta y del factor von Willebrand (FvW) usando la velocidad de cizallamiento.

El fármaco 34 que es llenado en el agitador 32 puede ser un agonista que activa la agregación de una plaqueta tal como difosfato de adenosina (ADP), epinefrina, etc., un antagonista que desactiva la agregación o adhesión de una plaqueta, o la combinación de ambos.

Además, el fármaco 34 puede ser llenado en el agitador 32 en forma de líquido y de líquido y en forma de líquido y sólido, respectivamente, y puede estar dividido en espacios separados, y almacenado en estos. Además, cuando el fármaco 34 es llenado sólo en forma de sólido, las partículas finas pueden ser mezcladas entre sí y almacenadas.

De este modo, si el fármaco 34 es descargado del agitador 32 y después es introducido en una muestra de sangre, el fármaco es mezclado uniformemente por la rotación del agitador 32 y se produce una respuesta plaquetaria del fármaco 34. En particular, si el fármaco es un agonista, la agregación de una plaqueta es facilitada de manera tal que sean formados grandes agregados.

Si la mezcla del fármaco 34 y la muestra de sangre es completada por el agitador 32, el dispositivo de rotación (no mostrado) conectado al disco 10 que comprende la cámara de agitación 30, el microcanal 40, etc., comienza a girar gradualmente y gira a unas rpm predeterminadas. En este caso, la muestra de sangre contenida en la cámara de agitación 30 intenta ser descargada en dirección radial por una fuerza centrífuga. Pero, la cámara de agitación es obstruida con un sello 36 tal como un material de cambio de fase y, por lo tanto, el flujo es impedido. Sin embargo, si es transferido calor al material de cambio de fase por medio de una onda electromagnética, un láser u otro medio de calentamiento, es abierta una vía de flujo y entonces la muestra de sangre migra en dirección radial.

Con respecto a las Figs. 1 y 2, cuando es completada la mezcla del fármaco 34 y la agitación por cizallamiento, es abierta la válvula microfluidica 42 y el disco 10 gira. En este momento, una fuerza es aplicada a la muestra de sangre en dirección radial mediante una fuerza centrífuga de la rotación y la muestra de sangre migra a lo largo del microcanal 40. En este caso, la velocidad de migración de la muestra de sangre que se ha hecho reaccionar con el fármaco 34 difiere en función del grado de agregación de una plaqueta y, por lo tanto, la distancia de migración difiere. En base a estas características, es realizada una prueba de respuesta farmacológica para una plaqueta.

El progreso de la muestra de sangre es detenido en el microcanal 40 por la agregación de una plaqueta. En este momento, puede ser medida relativamente una relación de migración de la muestra de sangre. Además, en otro ejemplo para el microcanal 40, como es mostrado en la Fig. 1, la cámara intermedia 44 es formada en una pluralidad de puntos del canal recto. La cámara intermedia 44 disminuye la velocidad de flujo de la muestra de sangre para inducir la agregación de una plaqueta y facilita la obstrucción de la plaqueta agregada cuando esta vuelve a entrar en el microcanal 40.

En el microcanal 40, que está conectado a la cámara de agitación 30 y que comprende una pluralidad de cámaras intermedias 44, puede ser determinado el grado de migración de la sangre en función del grado de respuesta farmacológica. Es decir, la muestra de sangre que responde bien a un agonista forma una serie de grandes agregados plaquetarios y estos agregados causan una resistencia sustancial al flujo en el microcanal 40 para disminuir la relación de migración de la sangre al grupo de control. Sin embargo, la muestra de sangre que no responde bien a un agonista tiene un bajo grado de agregación plaquetaria y, por lo tanto, la distancia de migración de la sangre puede aumentar considerablemente de modo que la muestra de sangre pueda migrar al curso inferior por una fuerza centrífuga. De este modo, el grado de migración de la muestra de sangre mezclada con un fármaco 34 puede ser comparado con la distancia de migración del grupo de control para medir la relación de migración.

Además, el microcanal 40 está situado corriente abajo de la cámara de agitación 30 y el microcanal está dispuesto en dirección radial en forma de línea recta, curva o zigzag, o la combinación de ambas, como es mostrado en la Fig. 1.

El microcanal 40 puede estar dispuesto en forma de un canal en línea recta. Alternativamente, con referencia a la Fig. 4, el microcanal está provisto con una pieza de expansión 46 que es relativamente amplia para disminuir el caudal de la muestra de sangre y para aumentar la agregación y adhesión de una plaqueta. Si la pieza de expansión 46 está dispuesta adecuadamente en el centro del microcanal, la muestra de sangre tiene la característica de que migra con una presión pulsada y una tensión de cizallamiento y el flujo en el cuerpo puede ser simulado. El microcanal 40 conectado a la pieza de expansión 46 puede describir una estenosis en el vaso sanguíneo.

Además, la pieza de expansión 46 tiene una superficie en la que un agonista está revestido para aumentar la adhesión de una plaqueta, de manera tal que el grado de migración de la sangre pueda ser discriminado más fácilmente. La muestra de sangre pasada por el microcanal 40 es recogida en la cámara de desechos de muestras 24.

Con respecto al fármaco, un agonista tal como colágeno, ADP, epinefrina, etc., puede ser usado para facilitar la adhesión de una plaqueta, o un antagonista tal como aspirina, antagonista del receptor P2Y1, antagonista del receptor P2Y12, etc., puede ser usado para interrumpir o restringir la agregación de una plaqueta.

El antagonista del receptor P2Y1 puede ser seleccionado de al menos uno de MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P, A3P5PS, etc. El antagonista del receptor P2Y12 puede ser seleccionado de al menos uno de clopidogrel, ticlopidina, prasugrel, AR-C67085MX, cangrelor, C1330-7, MRS 2395, 2-metiloadenosina-5'-monofosfato, etc.

En particular, para un individuo que toma los medicamentos mencionados, la función de agregación de la plaqueta y la resistencia a los medicamentos puede ser medida por el aparato de prueba de acuerdo con la invención.

Para la medición de la función plaquetaria, la sangre de una persona normal o de un individuo que toma aspirina y clopidogrel es recogida en tubos citratados. Después, son tomados 50 a 100 microlitros de sangre entera y se hacen reaccionar a 37°C durante 10 a 30 minutos usando la concentración óptima de ADP, prostaglandina E, fibrinógeno y ácido araquidónico, respectivamente. Después de la reacción, la sangre migra en el microcanal por la aplicación de una fuerza centrífuga. Si la función plaquetaria es normal, la trayectoria del flujo en el microcanal es obstruida en poco tiempo y entonces el flujo es detenido o la distancia de migración es corta. Por el contrario, si la función plaquetaria es anormal, el tiempo de obstrucción se alarga o la distancia de migración aumenta en comparación con cuando la función plaquetaria es normal.

Con respecto a la prueba de tolerancia farmacológica, en particular cuando se toma aspirina, clopidogrel, ticlopidina, etc., la función de agregación de las plaquetas es disminuida. Por lo tanto, la trayectoria del flujo en el microcanal no es obstruida fácilmente, de modo que el tiempo de obstrucción aumenta y la distancia de migración también aumenta. Dado que una persona normal reacciona bien a los fármacos, el tiempo de obstrucción es corto. Si la relación del tiempo de obstrucción disminuye notablemente en comparación con una persona normal, es determinado que se trata de la tolerancia a la aspirina y clopidogrel.

En adelante en la presente memoria, es descrito un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de las plaquetas en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con otra realización de la presente invención.

La Fig. 5 muestra la disposición de un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con una realización no reivindicada.

Con referencia a la figuras, en la realización, es ventajoso que la prueba para cuatro muestras de sangre diferentes pueda ser llevada a cabo con una sola prueba introduciendo cuatro muestras de sangre diferentes en un solo disco 10. En la realización, la cámara de agitación 30 también funciona como una cámara de muestras para contener la muestra de sangre. Es decir, la cámara de agitación en esta realización está configurada para actuar tanto como la cámara de muestras 20 como la cámara de agitación 30 de la Fig. 1. El número de la cámara de agitación 30 no está limitado a cuatro, como es mostrado en la figura. Por ejemplo, puede ser proporcionada una pluralidad de cámaras de agitación 30 y microcanales 40 con el mismo número de cámaras de agitación para permitir una prueba para una pluralidad de muestras de sangre. En este caso, una pluralidad de cámaras de agitación 30 pueden ser dispuestas circunferencialmente en el centro del disco 10 y las muestras de sangre introducidas en cada cámara de agitación 30 pueden migrar radialmente, respectivamente.

Además, el microcanal 40 puede tener al menos una forma recta, una forma curva, una forma de zigzag, etc., o la combinación de ambas.

En adelante en la presente memoria, es descrito en detalle un procedimiento de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo con la característica anterior.

La Fig. 6 es un diagrama de flujo de un procedimiento de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluído centrífugo de acuerdo con una realización de la presente invención.

Como es mostrado en la figura, un probador introduce una muestra de sangre recogida por venopunción en la cámara de muestras 20 (S10). Después, la muestra de sangre es introducida en una cámara de agitación 30 a través del canal de conexión 22 conectado a la cámara de muestras 20 y el agitador 32 de la cámara de agitación 30 gira por una fuerza electromagnética tal que el fármaco 34 del agitador 32 sea descargado y mezclado con la muestra de sangre (S20).

En este caso, en el caso de una prueba de activación por un estímulo mecánico a una plaqueta, la rotación rápida a un determinado número de rpm permite la activación de la plaqueta y del factor von Willebrand (FvW). Si no se trata de la prueba de activación mecánica, la rotación puede ser realizada a una velocidad predeterminada durante un tiempo predeterminado con el fin de agitar el fármaco y la muestra de sangre.

Después, el disco 10 en el que está instalada la cámara de muestras 20 gira (S30). En adelante, si es abierta la válvula microfluídica 42, la muestra de sangre migra corriente abajo por el microcanal 40. La velocidad de migración y la distancia difieren dependiendo del grado de agregación y el grado de adhesión y la muestra de sangre son detenidos o migran hasta el extremo (S40).

Después, el disco 10 es detenido y el grado de migración de la muestra es medido por una pieza de medición 50 tal como un dispositivo de video, una fuente de luz y un sensor de detección de luz, etc. (S50).

Como un procedimiento de activación de una plaqueta por aplicación de una tensión de cizallamiento a la muestra de sangre, además del procedimiento de generación de un flujo de cizallamiento por la rotación del agitador, una plaqueta puede ser activada con un alto flujo de cizallamiento de la sangre por una fuerza centrífuga. Con más detalle, la velocidad de rotación es aumentada a un valor predeterminado mientras la válvula microfluídica 42 está siendo cerrada después de la introducción de la muestra de sangre. En adelante, si la válvula microfluídica 42 está abierta, se produce un alto flujo de cizallamiento a través del microcanal 40. Una plaqueta que es activada a través de este se hace reaccionar con un fármaco tal como un agonista que es revestido en la pieza de expansión 46 o en una porción específica. Esta reacción causa la agregación y adhesión que resulta en la interrupción del progreso de flujo. En este caso, puede ser realizada una prueba de respuesta farmacológica por la relación de migración del flujo de muestra, el tiempo para llegar al extremo del microcanal 40, etc.

El ámbito de la presente invención no está limitado a las realizaciones descritas con anterioridad y está determinado por las reivindicaciones adjuntas. Es evidente que diversas variaciones o modificaciones pueden ser realizadas dentro del ámbito de las reivindicaciones por los expertos en la técnica.



**Lista de números de referencia**

- 10: disco
- 20: cámara de muestras
- 22: canal de conexión
- 5 30: cámara de agitación
- 32: agitador
- 34: fármaco
- 36: sello
- 40: microcanal
- 10 42: válvula microfluídica
- 44: cámara intermitente
- 46: pieza de expansión
- 50: pieza de medición

15

## REIVINDICACIONES

1. Un aparato de prueba multifuncional y una respuesta farmacológica de una plaqueta en base a un microfluido centrífugo que comprende:
  - un disco giratorio (10);
  - 5 una cámara de muestras (20) que está ubicada en el centro del disco (10) y que está adaptada para contener una muestra de sangre;
    - cámaras de agitación que están conectadas a la cámara de muestras (20) en una dirección radial, respectivamente, y que inducen un flujo de cizallamiento en la muestra de sangre al agitar la muestra de sangre, en el que un agitador (32) está instalado de forma giratoria en las cámaras de agitación (30) y en el
 10 que un medicamento (34) que activa o inactiva la agregación de una plaqueta está contenido en el agitador (32) en un estado líquido o sólido,
      - microcanales (40) que están conectados a las cámaras de agitación (30) y que están adaptados para que la agregación y la adhesión de una plaqueta se produzca durante una migración de la muestra de sangre;
      - 15 cámaras de desechos de muestras (24) para recibir la muestra de sangre que ha pasado por los microcanales (40); y una pieza de medición que está instalada en el disco (10) y que mide una distancia de migración de la muestra de sangre en la que el progreso de la muestra de sangre es detenido en el microcanal (40) por la agregación de la plaqueta.
  2. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agitador (32) tiene la forma seleccionada de una barra cilíndrica recta, una barra cilíndrica cruzada y una placa circular.
  - 20 3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fármaco (34) es al menos un agonista seleccionado de colágeno, difosfato de adenosina (ADP) y epinefrina.
  4. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fármaco (34) es al menos un antagonista seleccionado de aspirina, antagonista del receptor P2Y1 y antagonista del receptor P2Y12.
  - 25 5. El aparato de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el antagonista del receptor P2Y1 es al menos uno seleccionado de MRS 2179, MRS 2279, MRS 2500, A2P5P, A3P5P y A3P5PS.
  6. El aparato de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el antagonista del receptor P2Y12 es al menos uno seleccionado de clopidogrel, ticlopidina, prasugrel, AR-C67085MX, cangrelor, C1330-7, MRS 2395 y 2-metiloadenosina-5'-monofosfato.
  - 30 7. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agitador (32) está adaptado para generar una velocidad de cizallamiento mínima en el flujo de cizallamiento de al menos 5.000 (s<sup>-1</sup>) o una tensión de cizallamiento mínima de al menos 8 Pa.
  8. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un centro y ambos lados del agitador (32) están abiertos y la porción abierta está provista con un sello (36).
  - 35 9. El aparato de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sello (36) es un material de cambio de fase o una membrana acuosa.
  10. El aparato de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el material de cambio de fase es una cera de parafina y la membrana acuosa es un almidón.
  11. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una válvula microfluidica (42) está instalada en la parte delantera del microcanal (40) para controlar el flujo de la muestra de sangre.
  - 40 12. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microcanal (40) tiene la forma de al menos una línea recta, una curva o un zigzag, o la combinación de ambas.
  13. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una pluralidad de cámaras intermedias están formadas en una pluralidad de puntos en el canal recto.

Fig. 1

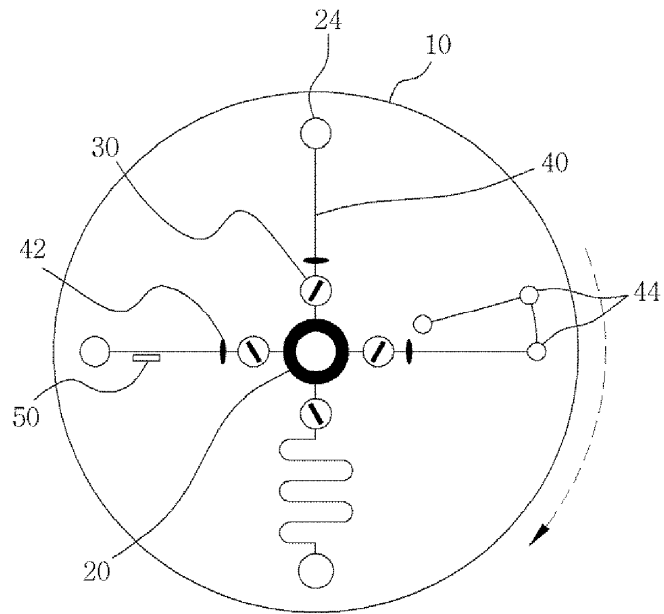


Fig. 2

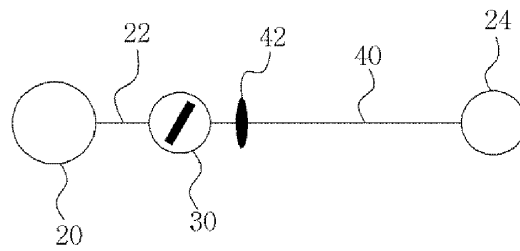


Fig. 3

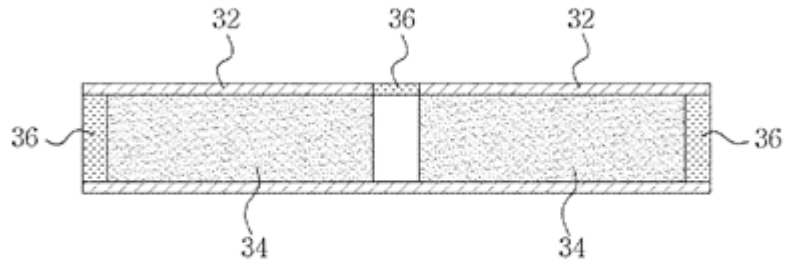


Fig. 4

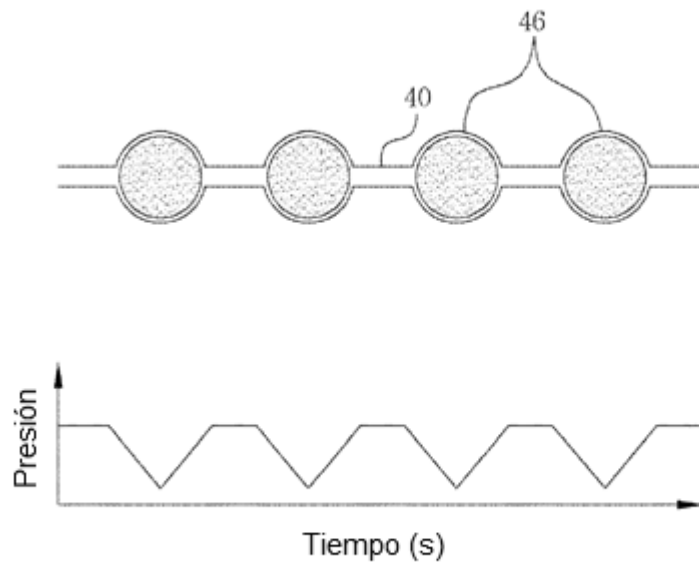


Fig. 5

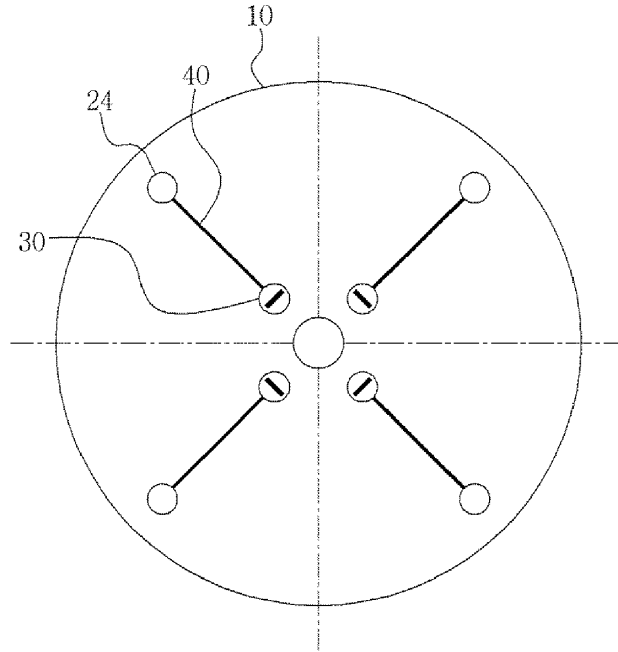


Fig. 6

