

ANÁLISIS DE COAGULACIÓN UNIVERSAL MICROFLUÍDICO BASADO EN CHIPS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad sobre la Solicitud Provisional de Estados Unidos N°
5 62/048,183, presentada el 09 de septiembre 2014, toda la cual está incorporada por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un dispositivo de análisis universal de coagulación basado en chip microfluídico para diagnóstico inmediato que puede
10 utilizarse para medir el estado global de la coagulación de pacientes normales sanos, pacientes con la coagulación dañada, pacientes anticoagulados y pacientes con la anticoagulación revertida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La coagulación es el proceso por el cual la sangre
15 cambia de un líquido a un gel. El resultado potencial es la hemostasia, el cese de la pérdida de sangre de un vaso dañado, seguido de la reparación. El mecanismo de coagulación implica la activación, adhesión y agregación de plaquetas junto con la conversión de fibrinógeno a fibrina, que se
20 deposita y madura en una red sólida. Los trastornos de la coagulación son estados de enfermedad que pueden dar lugar a coagulación sangrante u obstructiva (trombosis).

La coagulación comienza muy rápidamente después de que una lesión en el vaso sanguíneo haya dañado el endotelio que cubre el vaso. La exposición de la sangre al espacio bajo el endotelio inicia dos categorías de procesos: los cambios en
5 las plaquetas y la exposición del factor del tejido subendotelial al Factor VII del plasma, que conduce finalmente a la formación de fibrina. Las plaquetas forman inmediatamente un tapón en el sitio de la herida; esto se llama hemostasia primaria. La hemostasia secundaria ocurre
10 simultáneamente: factores de coagulación adicionales o factores de coagulación aparte del Factor VII, responden en una cascada compleja para formar hilos de fibrina, que fortalecen el tapón plaquetario.

La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria
15 tiene dos vías que conducen a la formación de fibrina. Éstas son la vía de activación por contacto (también conocida como vía intrínseca) y la vía del factor tisular (también conocida como vía extrínseca). Anteriormente se pensaba que la cascada de coagulación consistía en dos vías de igual importancia
20 unidas en una vía común. Se sabe ahora que la vía primaria para la iniciación de la coagulación de la sangre es la vía del factor tisular. Las vías son una serie de reacciones en las que un zimógeno (precursor enzimático inactivo) de una serina proteasa y su cofactor glicoproteína se activan para
25 convertirse en componentes activos que luego catalizan la

siguiente reacción en la cascada, dando como resultado finalmente la reticulación de fibrina. Los factores de coagulación se indican generalmente mediante números romanos, con un "a" minúscula añadida para indicar una forma
5 activa.

Los factores de coagulación son generalmente serina proteasas que actúan por escisión de las proteínas aguas abajo. Hay algunas excepciones. Por ejemplo, el FVIII y el FV son glicoproteínas y el Factor XIII es una
10 transglutaminasa. Los factores de coagulación circulan como zimógenos inactivos. La cascada de coagulación se divide clásicamente en tres vías. El factor tisular y las vías de activación por contacto activan la "vía común final" del factor X, la trombina y la fibrina.

15 Vía del factor tisular (extrínseca)

El papel principal de la vía del factor tisular es generar una "ráfaga de trombina", un proceso por el cual la trombina, el componente más importante de la cascada de coagulación desde el punto de vista de sus funciones de
20 activación por retroalimentación, es liberada muy rápidamente. El FVIIa circula en una cantidad mayor que cualquier otro factor de coagulación activado. El proceso incluye las siguientes etapas:

Tras el daño al vaso sanguíneo, el FVII abandona la
25 circulación y entra en contacto con el factor tisular (TF)

expresado en las células portadoras del factor tisular (fibroblastos estromales y leucocitos), formando un complejo activado (TF-FVIIa).

El TF-FVIIa activa el FIX y el FX.

5 El FVII se activa a sí mismo mediante la trombina, el FXIa, el FXII y el FXa.

La activación del FX (para formar FXa) mediante TF-FVIIa es inhibida casi inmediatamente por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI).

10 El FXa y su cofactor FVa forman el complejo protrombinasa, que activa la protrombina a trombina.

La trombina activa entonces otros componentes de la cascada de coagulación, incluyendo el FV y el FVIII (que activan el FXI, que a su vez activa el FIX), y activa y libera el FVIII de estar unido a vWF.

El FVIIIa es el cofactor de FIXa, y juntos forman el complejo tenasa "tenase", que activa el FX; y de esta forma el ciclo continúa. ("Tenase" es una contracción de "diez" y el sufijo "-ase" usado para enzimas).

20 Vía de activación por contacto (intrínseca)

La vía de activación por contacto comienza con la formación del complejo primario sobre colágeno por el quinínógeno de alto peso molecular (QAPM), la precalicreína y el FXII (factor Hageman). La precalicreína se convierte en calicreína y el FXII se transforma en el FXIIa. El FXIIa

25

convierte el FXI en el FXIa. El Factor XIa activa el FIX, que con su cofactor FVIIIa forma el complejo tenasa que activa el FX a FXa. La función secundaria que la vía de activación por contacto tiene en el inicio de la formación de coágulos puede ilustrarse por el hecho de que los 5 pacientes con deficiencias graves de FXII, QAPM y precalicreína no tienen un trastorno hemorrágico. En su lugar, el sistema de activación por contacto parece estar más involucrado en la inflamación.

10 Ensayos de coagulación

Para la prueba de coagulación se utilizan varias técnicas, incluidas pruebas basadas en el coágulo, análisis cromogénicos o de color, mediciones químicas directas y ELISA. De estas técnicas, los análisis basados en el coágulo 15 y los análisis cromogénicos se utilizan con mayor frecuencia. Mientras que los análisis de coagulación proporcionan una evaluación global de la función de la coagulación, las pruebas cromogénicas están diseñadas para medir el nivel o la función de factores específicos.

20 Los análisis basados en el coágulo se usan a menudo para la evaluación de pacientes con sospecha de anormalidades hemorrágicas y para controlar la terapia anticoagulante. La mayoría de estas pruebas utilizan plasma citratado, que requiere decenas de minutos para la preparación y normalmente 25 requiere de horas a días para recibir resultados en un

entorno hospitalario. El punto final para la mayoría de los análisis de coagulación es la formación de coágulos de fibrina.

El tiempo de protrombina (PT) se realiza añadiendo un reactivo de tromboplastina que contiene factor tisular (que puede ser recombinante en origen o obtenerse de un extracto de cerebro, pulmón o placenta) y calcio al plasma y midiendo el tiempo de coagulación. El PT varía con el reactivo y el coagulómetro, pero normalmente oscila entre 10 y 14 segundos. El PT se prolonga con las deficiencias de los factores VII, X y V, protrombina o fibrinógeno y mediante anticuerpos dirigidos contra estos factores. Esta prueba también es anormal en pacientes con inhibidores de la reacción de fibrinógeno a fibrina, que incluyen altas dosis de heparina y la presencia de productos de degradación de fibrina. Normalmente, los reactivos PT contienen exceso de fosfolípido de forma que los inhibidores no específicos (es decir, los anticoagulantes lúpicos) que reaccionan con fosfolípidos aniónicos, no prolonguen el tiempo de coagulación. El PT se usa con mayor frecuencia para controlar la terapia con warfarina. Las mediciones del PT no son comparables entre dispositivos o centros y la mayoría de las clínicas de warfarina desarrollan su propia clasificación normal de pacientes, que es intransferible y altamente

específica para los reactivos exactos presentes en el análisis específico utilizado.

El análisis de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) se realiza añadiendo primero un activador de superficie (por ejemplo, caolín, celite, ácido elágico o sílice) y un fosfolípido diluido (por ejemplo, cefalina) al plasma citratado. En el diagnóstico inmediato, el aPTT también se puede medir en sangre total usando normalmente agentes activadores químicos similares. El fosfolípido en este análisis se llama tromboplastina parcial porque el factor tisular está ausente. Después de la incubación para permitir la activación óptima de los factores por contacto (factor XII, factor XI, precalicreína y quinínógeno de alto peso molecular), se añade entonces calcio y se mide el tiempo de coagulación. Las mediciones del aPTT no son comparables entre dispositivos u hospitales y la mayoría de los laboratorios clínicos desarrollan su propia clasificación normal de pacientes, que es intransferible y muy específica para los reactivos exactos presentes en el análisis específico utilizado.

Aunque el tiempo de coagulación varía según el reactivo y el coagulómetro utilizados, el aPTT oscila normalmente entre 22 y 40 segundos. El aPTT puede prolongarse con deficiencias de factores de contacto; factores IX, VIII, X, o V; protrombina; o fibrinógeno. Los inhibidores específicos

de factor, así como los inhibidores inespecíficos, también pueden prolongar el aPTT. Los productos de degradación de la fibrina y los anticoagulantes (por ejemplo, la heparina, los inhibidores directos de la trombina o la warfarina) también
5 prolongan el aPTT, aunque el aPTT es menos sensible a la warfarina que el PT.

El tiempo de coagulación de trombina (TCT) se realiza añadiendo trombina en exceso al plasma. El TCT se prolonga en pacientes con niveles bajos de fibrinógeno o
10 disfibrinogenemia y en aquellos con niveles elevados de productos de degradación de la fibrina. Estas anormalidades se observan comúnmente con la coagulación intravascular diseminada. El TCT también se prolonga mediante la heparina y los inhibidores directos de la trombina.

15 El tiempo de coagulación activada (ACT) es una prueba de coagulación de la sangre total de diagnóstico inmediato utilizada para controlar la terapia con heparina en dosis altas o el tratamiento con bivalirudina. La dosis de heparina o bivalirudina requerida en estos ajustes está por encima
20 del rango que puede medirse con el aPTT. Normalmente, la sangre total se recoge en un tubo o cartucho que contiene un activador de coagulación (por ejemplo celite, caolín, o partículas de vidrio) y una barra de agitación magnética, y se mide, a continuación, el tiempo necesario para que la
25 sangre coagule. El valor de referencia para el ACT oscila

entre 70 y 180 segundos. El intervalo deseable para la anticoagulación depende de la indicación y del método de análisis utilizado. El ACT no se correlaciona bien con otras pruebas de coagulación.

5 Para el tiempo de coagulación con ecarina (ECT), el veneno de la serpiente *Echis carinatus* se utiliza para convertir la protrombina en meizotrombina, un intermedio de protrombina que es sensible a la inhibición por inhibidores directos de la trombina. El ECT no puede usarse para detectar
10 estados de coagulación alterada y es útil solamente para el control terapéutico de fármacos. Este análisis es insensible a la heparina porque el impedimento estérico evita que el complejo heparina-antitrombina inhiba la meizotrombina. Debido a que la ecarina también activa la protrombina no
15 carboxilada encontrada en el plasma de los pacientes tratados con warfarina, los niveles de inhibidores directos de trombina pueden analizarse incluso con el tratamiento concomitante con warfarina. Aunque el ECT se ha utilizado en la investigación preclínica, la prueba aún no ha sido
20 estandarizada y no está ampliamente disponible.

 Los análisis anti-factor Xa se usan para medir los niveles de heparina y heparina de bajo peso molecular (HBPM). Estos son análisis cromogénicos que utilizan un sustrato de factor Xa sobre el cual se ha unido un cromóforo. El Factor
25 Xa escinde el sustrato cromogénico, liberando un compuesto

coloreado que puede ser detectado con un espectrofotómetro y es directamente proporcional a la cantidad de factor Xa presente. Cuando se añade una cantidad conocida de factor Xa al plasma que contiene heparina (o HBPM), la heparina aumenta la inhibición del factor Xa mediante la antitrombina que deja menos factor Xa disponible para escindir el sustrato. Mediante la correlación de este resultado con una curva estándar producida con cantidades conocidas de heparina, podemos calcular la concentración de heparina en el plasma.

10 El uso de los análisis anti-Xa requiere conocer qué anticoagulante está tomando el paciente para usar el calibrador apropiado y no puede usarse para controlar terapias anticoagulantes anti-IIa.

Los fármacos anticoagulantes para uso clínico incluyen la warfarina, las heparinas (heparina no fraccionada y HBPM) y los inhibidores directos de trombina (bivalirudina, hirudina y argatroban).

15

La warfarina es eficaz para la prevención primaria y secundaria del tromboembolismo venoso; para la prevención de eventos cardioembólicos en pacientes con fibrilación auricular o válvulas cardíacas protésicas; para la prevención del derrame cerebral, el infarto recurrente o la muerte cardiovascular en pacientes con infarto agudo de miocardio; y para la prevención primaria del infarto agudo de miocardio en hombres de alto riesgo. Debido a la

20

25

variabilidad en la respuesta anticoagulante a la warfarina, que refleja las variaciones genéticas en el metabolismo y los factores ambientales como los medicamentos, la dieta y las enfermedades concomitantes, el control regular de la coagulación y el ajuste de las dosis es necesario para mantener el Índice Normalizado Internacional (INR) dentro del rango terapéutico. Las heparinas son anticoagulantes indirectos que activan la antitrombina y promueven su capacidad para inactivar la trombina y el factor Xa. Para catalizar la inhibición de la trombina, la heparina se une tanto a la antitrombina a través de una secuencia de pentasacáridos de alta afinidad como a la trombina. Por el contrario, para promover la inhibición del factor Xa, la heparina sólo necesita unirse a la antitrombina a través de su secuencia de pentasacáridos. Las moléculas de heparina que contienen <18 unidades sacáridas son demasiado cortas para unirse tanto a la trombina como a la antitrombina y, por tanto, no pueden catalizar la inhibición de la trombina. Sin embargo, estos fragmentos de heparina más cortos pueden catalizar la inhibición del factor Xa, siempre que contengan la secuencia de pentasacáridos. La respuesta anticoagulante a la heparina es impredecible debido a la unión variable no específica a células endoteliales, monocitos y proteínas plasmáticas. Debido a esta variable respuesta anticoagulante, el control de la coagulación se realiza

rutinariamente cuando se administra heparina en dosis mayores de las profilácticas. El aPTT es la prueba más utilizada para controlar la heparina. Desafortunadamente, los reactivos aPTT varían en su capacidad de respuesta a heparina, y el intervalo terapéutico aPTT difiere, dependiendo de la sensibilidad del reactivo y del coagulómetro utilizados para la prueba. El aPTT ha demostrado ser más difícil de estandarizar que el PT, y el rango terapéutico comúnmente citado de 1.5 a 2.5 veces el valor de control a menudo conduce a la administración sistemática de dosis subterapéuticas de heparina. La evidencia que apoya el concepto de un intervalo terapéutico aPTT que predice la eficacia y la seguridad (con respecto al sangrado) es algo tenue. Aproximadamente el 25% de los pacientes requieren dosis de heparina > 35,000 U/d para obtener un aPTT terapéutico y se les llama resistentes a la heparina. La mayoría de estos pacientes tienen niveles terapéuticos de heparina cuando se miden con el análisis anti-Xa, y la discrepancia entre las 2 pruebas es el resultado de altas concentraciones de procoagulantes como el fibrinógeno y el factor VIII, que acortan el aPTT. Aunque la respuesta del aPTT es lineal con los niveles de heparina dentro del intervalo terapéutico, el aPTT se vuelve inmensurable con dosis más altas de heparina. Por lo tanto, una prueba menos sensible a la anticoagulación global como el ACT se utiliza

para controlar el nivel de anticoagulación en pacientes que se someten a intervenciones coronarias percutáneas o cirugía de bypass aortocoronario.

La HBPM se obtiene de la heparina no fraccionada
5 mediante despolimerización química o enzimática. La HBPM ha reemplazado gradualmente la heparina para la mayoría de las indicaciones. La HBPM suele administrarse en dosis fijas cuando se administra con fines profilácticos o en dosis ajustadas al peso cuando se administra para tratamiento. Las
10 inconvenientes en el control de la HBPM mediante los niveles del anti-factor Xa incluyen la escasa comparabilidad entre los análisis cromogénicos anti-Xa comercialmente disponibles, las diferencias en las proporciones de anti-Xa y anti-IIa entre las diversas preparaciones de HBPM y la
15 importancia del momento del muestreo de sangre en relación con la dosificación. Aunque el aPTT puede prolongarse con altas dosis de HBPM, este análisis no se utiliza para el control. Hasta la fecha, no se dispone de ningún análisis clínicamente disponible de diagnóstico inmediato para el
20 control de los millones de pacientes que reciben HBPM.

Los inhibidores directos de la trombina se unen directamente a la trombina y bloquean la interacción de la trombina con sus sustratos. Tres inhibidores de la trombina directa parenteral han sido autorizados para indicaciones
25 limitadas en Norteamérica. La hirudina y el argatroban están

aprobados para el tratamiento de pacientes con trombocitopenia inducida por heparina, mientras que la bivalirudina está autorizada como una alternativa a la heparina en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea (ICP). La hirudina y el argatroban requieren control rutinario. El TCT es demasiado sensible a pequeñas cantidades de hirudina y argatroban para ser utilizado para este propósito. Aunque el ACT se ha utilizado para controlar las dosis más altas de inhibidores directos de trombina requeridos en entornos de intervención, no proporciona una respuesta lineal óptima a altas concentraciones. El aPTT se recomienda para el control terapéutico; sin embargo, cada inhibidor directo de la trombina tiene su propia respuesta a la dosis, y la sensibilidad de la prueba a los niveles de fármaco varía entre los reactivos de la aPTT. Cuando la terapia con hirudina se controla con el aPTT, la dosis se ajusta para mantener un aPTT que sea 1.5 a 2.5 veces el control, mientras que para el argatroban, el aPTT objetivo es 1.5 a 3 veces el control (pero sin exceder 100 segundos). El aPTT parece menos útil en pacientes que requieren dosis mayores de inhibidor directo de trombina en procedimientos de bypass cardiopulmonar debido a que esta prueba se hace menos sensible a concentraciones crecientes de fármaco. El ECT parece ser útil tanto para concentraciones bajas como altas de inhibidores directos de trombina y está menos

afectado por sustancias interferentes que el aPTT. Sin embargo, como se indicó anteriormente, no está disponible rutinariamente. La capacidad de respuesta del INR a diferentes concentraciones de fármaco difiere con el
5 reactivo de análisis y con el tipo de inhibidor directo de la trombina. Esta característica complica la transición de pacientes con trombocitopenia inducida por heparina de argatroban a antagonistas de la vitamina K.

Como es evidente a partir de lo anterior, la coagulación
10 y la inhibición de la coagulación, es un proceso complejo. El tipo de anticoagulante puede dar resultados engañosos y peligrosos si se determina usando el análisis de coagulación incorrecto. Esto crea un escenario potencialmente desastroso cuando un paciente anticoagulado llega a una sala de
15 emergencia sin información respecto a los medicamentos que toma, así como sobre la condición que está siendo tratada. A veces es imposible esperar más diagnósticos para determinar el anticoagulante o trastorno que causa sangrado prolongado. La necesidad de una prueba rápida, precisa y universal para
20 la coagulación, especialmente una prueba de diagnóstico inmediato ("POC"), es bien conocida; las opciones, sin embargo, son extremadamente limitadas.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una prueba rápida, precisa y universal para la
25 coagulación.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una prueba de diagnóstico inmediato para la coagulación.

Otro objetivo más de la presente invención es
5 proporcionar una prueba que sea precisa, reproducible, fácil de realizar y que requiera una cantidad muy pequeña de muestra.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha desarrollado un dispositivo microfluídico de análisis basado en chips para medir las propiedades físicas
10 de un analito (en particular sangre total o derivados de sangre total). Las tecnologías pueden aplicarse, en particular, para medir los tiempos de coagulación de sangre total o derivados de sangre, determinar los efectos de los fármacos anticoagulantes sobre la cinética de coagulación,
15 así como evaluar el efecto de los agentes anticoagulantes reversión. Estas tecnologías pueden utilizarse adicionalmente para optimizar la dosificación de fármacos anticoagulantes y/o sus agentes de reversión. El análisis es independiente de la presencia de anticoagulante puesto que
20 la coagulación se activa mediante la exposición de la muestra de sangre en el dispositivo a una superficie de vidrio (u otro material cargado negativamente tal como el silicio oxidado), que activa la vía intrínseca y puede acelerarse adicionalmente mediante la aplicación de flujo cortante a

través de la superficie de los materiales activadores. La ausencia de agentes activadores químicos y un microambiente altamente controlado y reproducible produce un análisis de coagulación universal de diagnóstico inmediato.

5 La muestra se maneja en un sistema microfluídico. El volumen de la muestra introducida en la cámara de análisis está en el intervalo de nano, micro o mililitro (más preferiblemente 1-10 microlitros). La muestra se introduce en el pozo de recogida directamente de una muestra de sangre
10 o del individuo (tal como de una prueba de pinchazo en el dedo). En una forma de realización, la muestra, tal como la sangre o el plasma, se recoge y se transfiere al microdispositivo calentado inmediatamente después de la recogida mediante jeringa en un tubo o tubo capilar de tapa
15 roja sin aditivos. La coagulación de las muestras, preferiblemente por duplicado, se inicia mediante la exposición de la sangre o plasma a la superficie de vidrio dentro del dispositivo y la muestra expuesta a medios para el análisis de la coagulación. La muestra de sangre se extrae
20 entonces desde el pozo de recogida hasta la cámara de análisis ya sea pasivamente por acción capilar o con una bomba, lo que induce la transparencia y expone la muestra de sangre a la superficie de los materiales activadores, al tiempo que se suministra una cantidad geoméricamente
25 controlada de la muestra de sangre en la cámara de prueba.

El sistema microfluídico junto con los electrodos integrados, las estructuras de calentamiento u otras partes de sensores o actuadores están diseñados para ser desechables. El sistema microfluídico se inserta en una carcasa analítica reutilizable (denominada en la presente memoria "lector") que forma parte de un instrumento de análisis, que conecta el sistema microfluídico y proporciona interfaces fluídicas, eléctricas, ópticas y térmicas para medir la coagulación y transmitir el tiempo y las características de la medición a un lector, monitor o grabador externo.

La coagulación se evalúa mediante un cambio en la viscosidad, la transmisión óptica, la impedancia eléctrica y/o la presión. En la forma de realización preferida, la coagulación se detecta a través de la medición de la impedancia de la sangre a través de electrodos integrados y/o a través de la medición de la transmisión óptica usando LED infrarrojos (IR) y fotodiodos, respectivamente. Una estructura térmica resistiva calentadora/enfriadora integrada, tal como una bomba de calor de estado sólido o refrigerador Peltier, mantiene la muestra de sangre a una temperatura definida, más preferiblemente aproximadamente 37°C (temperatura corporal), y asegura la repetibilidad y comparabilidad de las mediciones. A medida que el fibrinógeno se convierte en fibrina, la absorbancia de IR aumenta hasta

que alcanza un pico de una manera medible. La determinación del tiempo de coagulación de la sangre total se hace en o alrededor del pico de la absorbancia de IR. Después de completar las mediciones, el chip microfluídico que contiene
5 la muestra de sangre se retira del lector y se desecha.

El desarrollo de la coagulación se puede controlar midiendo la impedancia eléctrica. El desarrollo de la fibrina aumenta la impedancia eléctrica hasta que alcanza un pico de una manera medible. En o alrededor del pico de impedancia
10 eléctrica, se realiza la determinación del tiempo de coagulación de la sangre total. El tiempo de coagulación de la sangre total se puede medir por la absorción de IR y la impedancia eléctrica medida sola o simultáneamente como base de comparación. La impedancia eléctrica y las curvas de
15 absorción de IR son esencialmente coincidentes, y proporcionan confirmación a través de modos de medición independientes.

El sistema microfluídico se fabrica mediante la aplicación de microtecnologías y el procesado y la unión de
20 obleas fabricadas de silicio, vidrio u otros materiales adecuados. El sistema microfluídico también puede ser fabricado a través de medios alternativos, por ejemplo, mediante la aplicación de tecnologías de litografía blanda o mediante la generación de partes del lector (fabricadas,
25 por ejemplo, de plástico o de un material adecuado diferente,

en esencia, opaco al IR) que puede usarse solo o en combinación con las microestructuras de chips para formar un sistema microfluídico. El sistema microfluídico consiste normalmente en una entrada, una salida y una o más cámaras
5 que están conectadas a través de canales, que oscilan en longitud desde decenas de micrómetros a milímetros, con alturas y profundidades en el rango de decenas de micrómetros a cientos de micrómetros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un esquema de la cascada de coagulación.

10 La figura 2A es una vista en sección transversal de una forma de realización del dispositivo microfluídico en el que se vierte con pipeta sangre en una cámara y el chip se inserta, a continuación, en el embalaje.

La figura 2B es una vista en sección transversal de una
15 forma de realización del dispositivo microfluídico en el que se puede introducir sangre a través del lado de la cámara; "una pajita" sobresale del lector, parecido a la medición de la glucosa en sangre.

La figura 3A es una vista de la versión abierta de los
20 dispositivos con dos cámaras de muestra.

La figura 3B es una vista de la versión cerrada de los dispositivos con dos cámaras de muestra.

Las figuras 4A-4H son vistas de las cámaras que muestran las cámaras, los canales de conexión, las almohadillas de contacto eléctrico y los termistores.

La figura 5 es una vista en perspectiva desde la parte superior del fondo del lector de versión cerrado.

La figura 6 es una vista en sección transversal del lado del fondo del lector de versión cerrada.

La Figura 7 es una vista en perspectiva en sección transversal de la parte superior del lector de versión cerrada que muestra el dispositivo de análisis de muestras en su sitio.

La figura 8 es una vista en perspectiva en sección transversal desde la parte superior de la parte superior del lector de versión cerrada.

La figura 9A es una vista en perspectiva en sección transversal desde la parte superior de la parte inferior del lector de versión abierta.

La figura 9B es una vista en perspectiva en sección transversal desde el lado de la parte inferior del lector de versión abierta.

La figura 10A es una vista en perspectiva en sección transversal desde el lado y la parte inferior de la parte superior del lector de versión abierta.

La Figura 10B es una vista en perspectiva en sección transversal desde el lado y la parte superior de la parte superior del lector de versión abierta.

La figura 11 es un esquema del sistema que muestra una
5 caja que contiene las cámaras de análisis desechables de un solo uso, el lector y las conexiones a un procesador y monitor informáticos.

Las Figuras 12A-12F son gráficas de la impedancia (12A, 12C y 12E) y la transmisión infrarroja (12B, 12D, 12F) en
10 función del tiempo en minutos para el control sin anticoagulante, con 300 ng de anticoagulante edoxabán/ml de sangre y 300 ng de edoxabán y ciraparantag (PER977, un agente anticoagulante de reversión)/ml de sangre, respectivamente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

15 I. Definiciones

Microfluídica

La microfluídica es un campo altamente interdisciplinar extraído a partir de la ingeniería, la física, la química, la bioquímica, la micro/nanotecnología y la biotecnología.
20 Pequeños volúmenes de líquido, que oscilan desde femto a mililitros se manejan normalmente en un sistema microfluídico. Los métodos para la fabricación de un sistema microfluídico permiten normalmente la integración de sensores y/o actuadores, de manera que los líquidos pueden
25 ser transportados, manipulados y analizados eficazmente

dentro del sistema microfluídico. Las interfaces entre el sistema microfluídico y su entorno permiten la implementación de mecanismos externos de transporte, manipulación y análisis.

5 Micro/Nanotecnologías

Las Micro/Nanotecnologías se usan normalmente para fabricar microsistemas, incluyendo los sistemas microfluídicos. Las micro/nanotecnologías normalmente permiten la generación de estructuras con dimensiones en el

10 rango micro o nanométrico. Dichas tecnologías pueden basarse en tecnologías de procesamiento de obleas de silicio, originalmente desarrolladas para la fabricación de circuitos electrónicos integrados.

Acción capilar

15 Una forma conveniente de cargar una muestra líquida en un sistema microfluídico es por acción capilar. Se humedece un orificio de recogida de muestra con la muestra y la muestra se introduce eficazmente en los estrechos canales y cámaras hidrófilos del sistema microfluídico por fuerzas de

20 capilaridad.

Anticoagulante

Un anticoagulante es una sustancia que interfiere la capacidad de la sangre para coagular. Administrado como fármaco terapéutico, un anticoagulante puede, por ejemplo,

ayudar a reducir o prevenir la aparición de embolias o trombos potencialmente peligrosos para la salud y/o la vida.

Agente anticoagulante de reversión

Un agente anticoagulante de reversión puede
5 administrarse como un fármaco terapéutico con el fin de revertir parcial o totalmente el efecto de un anticoagulante. La restauración de la capacidad de la sangre para coagular puede salvar la vida, por ejemplo, un paciente que toma un anticoagulante y está sufriendo una lesión grave puede ser
10 tratado con un reactivo de reversión para la restauración de la capacidad de coagulación sanguínea y la prevención de la pérdida de sangre excesiva.

Dispositivos "abiertos" y "cerrados"

Un dispositivo "abierto" tiene un canal hacia el
15 exterior desde una cámara interior, que permite el acceso directo de la sangre a la cámara. Un dispositivo "cerrado" no tiene canales exteriores y se llena antes de ser sellado del exterior excepto por los pequeños orificios asociados con sensores, electrodos, LED y otros elementos utilizados
20 para evaluar la coagulación dentro de la cámara. La "versión abierta" del sistema microfluídico está diseñada para que el chip pueda ser insertado primero en su embalaje, calentado, pero aún así accesible (abierto). Una muestra puede ser cargada en el sistema a través del humedecido del orificio

lateral, con el chip que ya está en su embalaje. La muestra se introducirá en el chip por fuerzas de capilaridad.

La "versión cerrada" del sistema microfluídico no será accesible para el usuario después de que se coloque en su embalaje. Se debe cargar una muestra en el sistema antes de
5 colocar el chip en su embalaje a través de un humedecido o vertiendo con pipeta en uno de los orificios laterales traseros.

II. Dispositivo

10 Las formas de realización del chip microfluídico y su lector se muestran en las figuras 2-10, incluyendo el sistema con ambas partes reflejadas en la figura 11. Como se indica en las figuras 2A y 2B, los chips microfluídicos 10 se fabrican mediante el grabado en húmedo anisotrópico de obleas
15 de silicio y la oxidación posterior, el grabado en húmedo isotrópico de obleas de PYREX® (un vidrio de borosilicatos de baja expansión térmica, transparente), la deposición rociada de películas delgadas de metal sobre ambas obleas
través de plantillas, la unión anódica de obleas de silicio
20 y PYREX® y la posterior separación de los chips individuales al cortar las obleas.

Los chips microfluídicos se pueden fabricar por medios alternativos, utilizando cualquier método que sea adecuado para generar estructuras microfluídicas y cualquier material

cargado negativamente que sea adecuado para activar la cascada de coagulación de la sangre.

Las dimensiones en sección transversal y las geometrías de las cámaras 12a y 12b y el canal 14 que conecta las cámaras pueden modificarse y el número de cámaras puede 5 variar. La relación superficie a volumen influirá globalmente en el tiempo de coagulación. El acceso a las cámaras es directo ("cerrado", Figura 2B), antes del sellado del dispositivo de cámara o a través de un canal lateral 16 10 que permite el acceso desde el exterior de las microcámaras.

Según se muestra en las figuras 3A y 3B, los chips están diseñados para permitir:

- Calentamiento a través de la resistencia o de la estructura de calentamiento eléctrica trasera (en el lado 15 inferior de las cámaras 12a y 12b)

- Medición de la temperatura para el control del calentamiento a través de un termistor 18 (exterior) en el lado superior.

- Detección de la coagulación mediante mediciones de la 20 presión del aire

- Detección de la coagulación mediante la medición de la impedancia a través de la muestra de sangre a través de electrodos integrados 20a y almohadillas de contacto 20b

- Detección de la coagulación mediante mediciones 25 ópticas

Según se muestra en las Figuras 4A-4H, las estructuras de resistencia 22 se depositan sobre la parte posterior de una oblea de silicio 24 (para formar estructuras de calentamiento resistivas 32, Figuras 4G, 4H) sobre el lado frontal 26 de la oblea de silicio (para formar los electrodos 20a, 20b para las mediciones de impedancia y los termistores 18, respectivamente, en el piso de cada cámara), y sobre el lado frontal de la oblea PYREX® (para formar los termistores 18 en la parte superior de una o ambas cámaras 12a, 12b). El calentador y el termistor pueden ser externos al "chip", y pueden integrarse en la estructura del lector. Si las paredes de la cavidad en las que se coloca el chip son de un tamaño significativamente mayor que el chip, altamente conductoras del calor y forman una envolvente casi completa, entonces la cavidad se aproxima a un "cuerpo negro" y el chip debe llegar a un equilibrio térmico con la cavidad. Si el chip está en contacto con la cavidad, o estrechamente separados, la constante de tiempo de equilibrio puede ser muy corta. Esto puede establecerse por medición pirométrica durante el desarrollo. Esto debería reducir la complejidad de la parte desechable del sistema y el costo. La conexión de canal 14 y del orificio de entrada 36 se puede grabar utilizando hidróxido de potasio (KOH) en la oblea de silicio 26.

El dispositivo en la Figura 2B, 3B (llamado "dispositivo cerrado") tiene dos orificios de entrada 28a,

28b grabados a través de la parte de silicio 30. Una muestra puede ser vertida con pipeta en uno de los orificios 28a, 28b antes de que el dispositivo 10 sea insertado en un embalaje sellado. El dispositivo en las figuras 2a, 3b tiene un orificio de entrada 28b grabado a través de la parte de silicio y un orificio de entrada lateral 16, realizado como el canal grabado en el PYREX® (llamado "dispositivo abierto"). En los casos de un sustrato de silicio, la estructura ondulada superficial se puede integrar directamente en el diseño microfluídico mediante técnicas de microfabricación bien conocidas. Un chip de dispositivo abierto (figuras 2A, 3A) puede insertarse en un embalaje sellado y/o el lector con el borde con el orificio lateral que sobresale del lector primero. La humectación del orificio lateral 16 dará lugar, a continuación, a la introducción de la muestra en la cámara 12a por acción capilar.

El sistema de control combinado de calentamiento/enfriamiento y el termistor pueden ser externos al "chip" y pueden ser integrados en la estructura del lector. Si las paredes de la cavidad, en la que se coloca el chip, son de tamaño significativamente mayor que el chip, altamente conductoras del calor y forman una envolvente casi completa, entonces la cavidad se aproxima a un "cuerpo negro" y el chip debe llegar a un equilibrio térmico con la cavidad. Si el chip está en contacto con la cavidad, o estrechamente

separados, la constante de tiempo de equilibrio puede ser muy corta. Esto puede establecerse mediante medición pirométrica durante el desarrollo. Esto debería reducir la complejidad de la parte desechable del sistema y (esperemos) el costo.

Los embalajes de chips o "lectores", según se muestra en las figuras 5-10, proporcionan interfaces eléctricas, ópticas y fluídicas al chip. Un lector consiste en una parte inferior (figuras 5, 6, 9A, 9B) y una parte superior (figuras 10 7, 8, 10A, 10B) que se fabrican mediante impresión en 3D de alta precisión, moldeo, mecanizado u otros procesos de fabricación. Ambas partes se unen y se presionan una contra otra mediante el bloqueo de los conectores guía de metal que encajan en los agujeros 56. El lector puede incluir medios 15 para la visualización, el almacenamiento de información y la capacidad de comunicación.

Las figuras 5 y 6 muestran la parte inferior 50 del lector para el chip dispositivo cerrado desde dos ángulos diferentes. Los canales 52a, 52b que se encuentran en el rebaje 54, dentro del lector conectan las cámaras 2 y 1, 20 respectivamente, a los orificios de entrada del chip. En un lado del lector, una válvula de solenoide (no mostrada) se puede unir al lector en los extremos 58 del canal para controlar la conexión entre el canal lector y un conector de tubo punzante que se atornilla en la parte inferior del 25

lector. En el lado opuesto, un sensor de presión (no
mostrado) se puede unir al lector en los orificios 60 para
controlar la presión aplicada al orificio de entrada al chip
y al canal de lectura. Cada orificio de entrada 62a, 62b se
5 gobierna/controla mediante su propia válvula de
solenoides/sensor de presión fijado en los orificios 70a,
70b, 70c y 70d. La parte inferior del lector muestra un
rebaje 54 para el chip microfluídico. Los pequeños agujeros
64a, 64b verticales tienen conectores pogo para contactar
10 con la estructura de calentamiento en la parte inferior del
chip. Un orificio 66 en el centro de la parte lector contiene
un chip LED IR en un lector de caja metálica, que pasa a lo
largo de la trayectoria de la luz 68.

Los componentes IR se pueden moldear o integrar en una
15 forma "chipstrate".

Aunque se muestra como un único punto de medición
óptica, una medición óptica multipunto podría ser utilizada.

Las figuras 7 y 8 muestran la parte superior del lector
80 para el chip dispositivo cerrado desde dos ángulos
20 diferentes. El gran tamaño (por ejemplo, 5 mm) del agujero
82 en el centro contiene un chip de fotodiodos IR (no
mostrado) en un lector de caja metálica que dirige la luz a
través del agujero 86. Los tres pequeños (por ejemplo, menos
de un mm) agujeros 84 verticales contienen tres conectores
25 pogo (no mostrados) para contactar tres electrodos para las

mediciones de impedancia (un electrodo de tierra común para ambas cámaras y un electrodo opuesto en cada cámara), de forma que las mediciones de impedancia puedan llevarse a cabo en ambas cámaras. Otros dos agujeros 88 verticales
5 contienen conectores pogo para contactar con el termistor en la parte superior del chip. Otras formas de realización de estos dispositivos son conocidas y fácilmente disponibles para la misma función. El LED IR y el fotodiodo se colocan de manera que interrogan la región central de 1 mm de
10 diámetro de una cámara.

El lector de chip en sí está unido a la cubierta de una caja de proyecto 100 que contiene circuitos electrónicos, válvulas y bombas necesarias para realizar mediciones automatizadas, según se muestra en la figura 11. La caja de
15 proyecto 100 está conectada a un PC 102, donde las mediciones son controladas por un programa LabView y el procesador 110 y los resultados se muestran en el monitor 104.

Las figuras 9A y 9B muestran la parte inferior 120 del lector para el chip dispositivo abierto desde dos ángulos
20 diferentes. Los agujeros conectores guía 122 se utilizan para fijar el dispositivo. Los canales 124 en el interior del lector conectan las cámaras 2 y 1, respectivamente, a los orificios de entrada del chip. En un lado del lector, una válvula de solenoide (no mostrada) se puede unir al
25 lector en los extremos del canal para controlar la conexión

entre el canal del lector y un conector de tubo punzante que se atornilla en la parte inferior del lector. En el lado opuesto, un sensor de presión (no mostrado) se puede unir al lector en los orificios 126a, 126b para controlar la presión aplicada al orificio de entrada al chip y al canal de lectura. Cada orificio de entrada se gobierna/controla mediante su propia válvula de solenoide/sensor de presión fijado en los agujeros. La parte inferior del lector muestra un rebaje 128 para el chip microfluídico. Un agujero 130 en el centro de la parte del lector contiene un chip LED IR en un lector de caja metálica.

Las figuras 10A y 10B muestran la parte superior del lector para el chip dispositivo abierto desde dos ángulos diferentes. El agujero 142 grande (por ejemplo, 5 mm) en el centro contiene un chip de fotodiodos IR (no mostrado) en un lector de caja metálica que dirige la luz a través del agujero 144. Tres pequeños agujeros 146 verticales (por ejemplo, menos de un mm) contienen tres conectores pogo (no mostrados) para contactar tres electrodos para las mediciones de impedancia (un electrodo de tierra común para ambas cámaras y un electrodo opuesto en cada cámara), de forma que las mediciones de impedancia puedan llevarse a cabo en ambas cámaras. Otros dos agujeros 148 verticales contienen conectores pogo para contactar con el termistor en la parte superior del chip. El LED IR y el fotodiodo se

colocan de manera que interrogan la región central de 1 mm de diámetro de una cámara.

Aunque se ha descrito con referencia a la interrogación de las dos cámaras con un solo haz, es posible interrogar a las dos cámaras utilizando haces separados. Un haz se muestra a modo de ilustración solamente.

El lector de chips está unido a la placa de cubierta de una caja de proyecto según se describió anteriormente utilizando orificios de tornillo 150, según se muestra en la figura 11.

A. Superficies para activación de la coagulación sanguínea

El sistema microfluídico se fabrica de modo que la muestra de sangre o plasma introducida este en contacto con una superficie de vidrio, la parte superior del chip microfluídico y/o la superficie de la parte inferior del chip microfluídico, formado de un material tal como el PYREX® o silicio oxidado térmicamente, tales como SiO₂ amorfo, óxido de silicio y nitruro de silicio. El vidrio sirve para activar la cascada de coagulación sin el uso de reactivos químicos o biológicos adicionales. La activación se logra ya sea mediante simple contacto de la muestra con la superficie de vidrio o a través del movimiento activo (por ejemplo, a través de un impulso de presión de aire aplicado

externamente) de la muestra a lo largo de las superficies de vidrio dentro del sistema microfluídico.

El sistema microfluídico se fabrica de modo que la muestra de sangre o plasma introducida este en contacto con las superficies de vidrio (u otras superficies cargadas negativamente), que sirven para activar la cascada de coagulación sin el uso de reactivos químicos o biológicos adicionales. Las superficies de vidrio se generan mediante el uso de obleas de vidrio y obleas de silicio oxidado, respectivamente, para la fabricación de sistemas de microfluídicos. Alternativamente, las superficies de vidrio se pueden realizar mediante el uso de chips de vidrio que se integran en las partes del lector que forman un sistema microfluídico, a través de la deposición de vidrio sobre las superficies interiores del sistema microfluídico (por ejemplo, mediante el uso de productos "spin-on glass") o mediante la integración de objetos pequeños con superficies de vidrio (por ejemplo, microperlas de vidrio) dentro del sistema microfluídico. Además las superficies de vidrio se pueden introducir mediante la oxidación de las superficies de silicio.

B. Características eléctricas de las películas delgadas de metal depositado.

Las películas delgadas de metal depositado pueden estar formadas por capas de adhesión de cromo (aproximadamente 20

nm de espesor) capas superiores de oro (aproximadamente 50 nm de espesor para los electrodos interiores para las mediciones de impedancia, 100 nm de espesor para los termistores y 150 nm de espesor para las estructuras de calentamiento). Los conectores pogo con resorte en el lector de plástico se utilizaron para realizar contactos eléctricos para todos los electrodos de película delgada en el chip microfluídico. Las resistencias normales entre dos conectores conectados a cualquiera de los extremos de una estructura de prueba de película de metal, con una longitud aproximada de 2 mm y la anchura de 1 mm, son 1.8 Ohm, con los conectores contactando las películas de metal para las estructuras de calentamiento, 2.7 Ohm, contactando las películas de metal para termistores y 22 Ohm, contactando las películas de metal para electrodos interiores para las mediciones de impedancia. La resistencia notablemente mayor entre los conectores de electrodos interiores es probablemente debida a una capa de oro más delgada y, posiblemente, la degradación del contacto durante la unión anódica a aproximadamente 300°C. Las estructuras de calentamiento y los termistores son depositados después de la unión anódica.

Para la medición de los coeficientes de temperatura de las resistencias de las películas delgadas de metal depositado, se utilizó un chip que exhibió estructuras

resistoras/termistoras en lugar de electrodos de circuito abierto para las mediciones de impedancia. El chip se insertó en su lector y se calentó dentro de un horno. Se midieron las resistencias eléctricas de calentamiento, termistoras y las resistencias del electrodo interior a diferentes temperaturas y se calcularon los coeficientes de temperatura α de las resistencias:

- película delgada de calentamiento: $\alpha = 0.0016 \text{ K}^{-1}$
- película delgada de termistores: $\alpha = 0.00115 \text{ K}^{-1}$
- 10 - película delgada de electrodo interior: $\alpha = 0.000108 \text{ K}^{-1}$

C. electrodos internos para posicionamiento de la muestra

Aparte de para las mediciones de impedancia, los electrodos integrados también se pueden utilizar para detectar la presencia del analito, tal como la fibrina, en el sistema microfluídico y/o para seguir el movimiento del analito, por ejemplo, debido a pulsos de presión de aire aplicados externamente. Dicha detección y seguimiento se pueden utilizar para iniciar el procedimiento de análisis una vez añadido el analito al sistema microfluídico, para posicionar el analito en una ubicación específica dentro del sistema microfluídico, y para moverlo repetidamente hacia atrás y adelante entre las localizaciones definidas, respectivamente.

Aunque se ejemplifica con referencia a dos cámaras y dos electrodos, se pueden utilizar electrodos múltiples para confirmar de llenado de múltiples cámaras, en el lugar de medición de la coagulación o en un punto previo de la cámara en la que se mide la coagulación, tal como más cerca de la entrada.

El movimiento repetido de sangre total o plasma sanguíneo a lo largo de las superficies de vidrio se puede aplicar para aumentar la activación de la sangre, para acelerar la coagulación sanguínea y/o para disminuir los tiempos de medición.

D. Integración de estructuras de filtro

Las estructuras mecánicas de filtro pueden ser integradas en el chip microfluídico, de modo que sólo el plasma sanguíneo llegue a las cámaras de análisis. Los filtros se pueden realizar como una matriz de microcolumnas o como microcanales grabados en el silicio o el vidrio. De esta manera, el plasma (sin el uso de un anticoagulante tal como el citrato de sodio o el EDTA) se puede producir in situ y probar muy rápidamente de la misma manera que la sangre total, sin la interferencia de los glóbulos rojos en el análisis. Las matrices de microcolumnas se pueden disponer en patrones de desplazamiento para inhibir el tránsito de glóbulos rojos, al tiempo que se reduce al mínimo la

probabilidad de "taponamiento" una fracción excesiva de la sección transversal del canal disponible.

E. Medios para detectar la coagulación

Se pueden aplicar diferentes modalidades para
5 determinar los tiempos de coagulación sanguínea.

Viscosidad

La viscosidad de la sangre puede servir como una medida para caracterizar los tiempos de coagulación. Dos principios generales pueden aplicarse para producir una medida directa
10 o indirecta de la viscosidad. La muestra se puede mover a través de un canal con geometría conocida. La viscosidad se puede medir mediante el seguimiento de la velocidad de penetración a través de un canal "largo", ya sea de forma óptica o mediante toma de imágenes o "puntos de control" de
15 múltiples haces o eléctricamente mediante sensores de impedancia de electrodos múltiples. La viscosidad se puede medir indirectamente, por ejemplo a través de la medición de la distancia que la muestra ha viajado en el interior de un canal durante un intervalo de tiempo específico, el volumen
20 de la muestra que ha sido desplazado durante un intervalo de tiempo específico o el cambio en la fuerza de accionamiento durante un intervalo de tiempo específico (por ejemplo, si la muestra se mueve por un volumen a presión de aire atrapado, el cambio en la presión del aire puede servir como
25 una medida indirecta del desplazamiento del volumen de

muestra). Alternativamente, se pueden mover objetos a través de la muestra de sangre, por ejemplo, impulsados mediante de fuerzas electrostáticas o magnéticas. El seguimiento del movimiento del objeto puede producir una medida indirecta de la viscosidad de la muestra.

La viscosidad del analito se puede detectar a través del movimiento del analito dentro del sistema microfluídico a través de un volumen de aire a presión, atrapado. El aire puede ser presurizado, por ejemplo, a través de bombas de aire eléctricas que están conectadas al sistema microfluídico. El aire presurizado puede ser atrapado mediante el cierre de válvulas de solenoide conectadas al sistema microfluídico. La disminución de la presión del aire atrapado en un orificio de entrada al chip indica el movimiento del analito. El conocimiento de la geometría del sistema microfluídico y la magnitud de la presión aplicada permiten el cálculo de la viscosidad del analito y la detección de los cambios de viscosidad (por ejemplo, un aumento de la viscosidad debido a la coagulación en el caso de la sangre).

La detección de coágulos mediante el control de la viscosidad implica la medición de la presión diferencial a través de una entrada y salida en el chip, conectadas a los orificios fluídicos en el lector (hechos estancos al fluido/aire usando juntas tóricas).

La viscosidad del analito se puede detectar a través del movimiento del analito dentro del sistema microfluídico a través de un volumen de aire a presión, atrapado. El aire puede ser presurizado, por ejemplo, a través de bombas de
5 aire eléctricas que están conectadas al sistema microfluídico. El aire presurizado puede ser atrapado mediante el cierre de válvulas de solenoide conectadas al sistema microfluídico. La disminución de la presión del aire atrapado en un orificio de entrada del chip indica el
10 movimiento del analito. El conocimiento de la geometría del sistema microfluídico y la magnitud de la presión aplicada permiten el cálculo de la viscosidad del analito y la detección de los cambios de viscosidad (por ejemplo, un aumento de la viscosidad debido a la coagulación en el caso
15 de la sangre).

Impedancia

La coagulación de una muestra puede estar relacionada con su impedancia eléctrica, o su resistencia compleja cuando se aplica una corriente o voltaje eléctricos. La impedancia
20 eléctrica resulta de las resistencias óhmicas, así como los componentes capacitivos de la muestra. La impedancia eléctrica puede, por ejemplo, medirse a través de electrodos que se integran directamente en el chip microfluídico o integrados en el lector que forma, junto con otras partes,
25 un sistema microfluídico. Los electrodos pueden estar

parcialmente en contacto directo con la muestra o separados de la muestra sólo a través de un aislante fino (con un espesor que oscila desde nanómetros hasta cientos de micrómetros).

5 Los electrodos y las líneas conductoras pueden formarse como películas delgadas de metal estampadas que se depositan sobre sustratos que forman el sistema microfluídico. Los electrodos y las líneas conductoras también se pueden realizar mediante la integración de chapas metálicas
10 estampadas o películas que se insertan e intercalan entre las partes del lector. Si se utilizan obleas de semiconductor para fabricar los chips microfluídicos, el material semiconductor en sí mismo puede contener electrodos integrados fabricados por difusión, implantación, grabado,
15 micromecanizado o cualquier combinación de técnicas adecuadas similares a las técnicas utilizadas en los circuitos integrados u otra producción de dispositivos micro. Los electrodos integrados se pueden usar para medir directamente las propiedades eléctricas del analito (por
20 ejemplo, la resistencia, la capacitancia, la impedancia). Los circuitos electrónicos adecuados también se pueden utilizar para traducir los cambios del analito (y los cambios relacionados en las propiedades eléctricas) en tensiones, corrientes, frecuencias u otros parámetros adecuados
25 eléctricos medibles. Las partes también pueden ser

insertadas durante la construcción mediante la impresión en 3D o directamente integradas. Por ejemplo, un elemento de resistencia de calentamiento se fabricaría mediante un canal dopado en un sustrato semiconductor (por ejemplo, por
5 implantación de haces de iones).

La detección de coágulos mediante el control de la impedancia se lleva a cabo mediante la inserción del chip en el lector, haciendo contacto entre las almohadillas de oro (conectadas a los electrodos en el chip) y los conectores
10 pogo en el lector de donde la señal eléctrica es leída por un medidor LCR, por ejemplo, o cualquier otro sistema de medición apropiado.

Para la detección de la coagulación a través de la medición de impedancias, se cargó una muestra en el chip, se
15 insertó el chip en su lector y los conectores pogo que conectan a los electrodos de impedancia internos se conectaron a través terminales pinza tipo Kelvin a un medidor LCR QuadTech 1920. La magnitud y la fase de la impedancia compleja de la muestra de sangre se registraron a intervalos
20 de 15 segundos. Las mediciones a 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz y 100 kHz mostraron picos o mesetas característicos tanto de la magnitud como de la fase o de ambos. Los picos o mesetas indicaron una medida para el tiempo de coagulación.

Haciendo referencia a las figuras 3A-3B, para las
25 mediciones de impedancia, el medidor LCR externo aplica una

tensión de CA (20 mV RMS) entre los dos electrodos 20b, 20a a cada lado de la cámara 12a y mide la corriente eléctrica entre los electrodos. La magnitud y la fase de la impedancia son entonces analizadas por ordenador y la coagulación
5 calculada.

Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de la muestra pueden estar relacionadas con los eventos de coagulación. La luz con longitud de onda en el intervalo de 500 nm a 10,000 nm
10 (preferiblemente 1,300 nm) se puede utilizar para iluminar la muestra a través del lector y chip microfluídicos. Los siguientes parámetros se pueden utilizar para realizar un seguimiento de la coagulación: luz transmitida, reflejada y dispersa. Si se utiliza una fuente de luz coherente, la
15 polarización se puede usar como parámetro adicional.

La detección de coágulos mediante la transmisión IR se lleva a cabo mediante la inserción del chip en el lector y la medición de la transmisión infrarroja a través del espesor del chip (a través del vidrio, cámara llena de fluido y el
20 silicio subyacente). Esto se logra a través de la colocación de una fuente de IR (LED) por encima del chip y el detector fotodiodo alineado inmediatamente a continuación.

Para la detección óptica de coágulos, el LED IR y un fotodiodo se insertan en sus partes del lector como se
25 describió anteriormente. Una muestra de sangre se vierte con

pipeta en el chip y el chip se coloca en el lector. La muestra se ilumina de forma continua con la luz IR a 1,300 nm. Se registró, a intervalos de tiempo de normalmente 100 ms, la caída de tensión a través de una resistencia de 1 MOhm provocada por la fotocorriente del fotodiodo. Las tensiones normalmente median varios voltios. La coagulación de la muestra provocó que la luz transmitida y la fotocorriente variasen con el tiempo. Los picos característicos de la curva de luz transmitida indicaban una medida del tiempo de coagulación.

La medición de iluminación continua se presenta como una simple ilustración. Pueden utilizarse técnicas de medición más sofisticadas. Por ejemplo, si el emisor IR se iluminara durante el 50% de duración, a una velocidad de repetición de 1 kHz, y un detector síncrono se utilizara para procesar la salida del fotodetector, seguido de un periodo de integración de 1 segundo, la relación señal a ruido en el ejemplo anterior puede mejorarse tanto como treinta veces. Además, el procesamiento de la señal activa permitiría el procesamiento de señales mucho más pequeñas, permitiendo un acabado del fotodetector con impedancia relativamente baja, la reducción del ruido intrínseco y la cancelación de la deriva. La sensibilidad al ruido eléctrico ambiental se reduciría sustancialmente.

Propiedades acústicas

La medición de la propagación del sonido en la muestra o a lo largo de la superficie de la muestra puede servir como una medida adicional para la coagulación. Transductores de ultrasonidos externos pueden ser utilizados para medir el tiempo que tarda el ultrasonido para atravesar la muestra. Además, los dispositivos de ondas acústicas de superficie se pueden utilizar para medir las propiedades acústicas de la muestra y para detectar la coagulación.

10 III. Métodos de fabricación de dispositivos

Además de los procesos estándar tales como la fotolitografía, tecnologías especiales tales como la unión anódica o el grabado en húmedo con hidróxido de potasio anisotrópico de las obleas de silicio se pueden poner en práctica para formar microsistemas. Aparte de la litografía con luz ultravioleta estándar, técnicas tales como la microablación o erosión por escritura láser directa, la litografía por haz de electrones o el fresado centrado por haz de iones pueden utilizarse para definir estructuras de tamaño micro o nanométrico. La litografía blanda es una manera relacionada para fabricar sistemas microfluídicos y se basa en la generación de microestructuras o patrones, por ejemplo, a través de técnicas estándar de fotolitografía y la utilización posterior de estos patrones en los procesos de moldeo/fundición. El material elastomérico, tal como el

polidimetilsiloxano (PDMS) se utilizan normalmente para la generación de sistemas microfluídicos mediante litografía blanda. Las películas estructuradas generadas por litografía blanda se pueden unir entre sí o a cualquier otro sustrato estructurado o no estructurado para formar sistemas microfluídicos complejos. Además, otras tecnologías tales como el taladrado, el fresado, el moldeo o la impresión en 3D pueden usarse solas o en combinación con otras micro/nanotecnologías para fabricar microsistemas.

10 IV. Colección de muestra

Recogida de sangre

En la mayoría de los casos, los individuos a analizar se presentarán en una clínica o un hospital, posiblemente con estado desconocido en cuanto al tratamiento con anticoagulantes. La sangre puede ser obtenida por el uso de una jeringa, una lanceta o directamente a partir de una línea que contiene la sangre. Debido a la utilización de la vía de coagulación alternativa en la que la coagulación se activa mediante una superficie de tipo vidrio, la sangre puede contener anticoagulantes tales como warfarina, heparina, heparina de bajo peso molecular, inhibidores del factor IIa, inhibidores del factor Xa y otros inhibidores de factores o sangre con factores dañados.

La warfarina y moléculas afines que contienen 4-hidroxycumarina disminuyen la coagulación de la sangre

mediante la inhibición de la vitamina K epóxido reductasa, una enzima que recicla la vitamina K₁ oxidada a su forma reducida después de que ha participado en la carboxilación de varias proteínas de la coagulación sanguínea, principalmente la protrombina y el factor VII. La warfarina no antagoniza la acción de la vitamina K₁, sino más bien antagoniza el reciclaje de la vitamina K₁, agotando la vitamina K activa. Por lo tanto, la acción farmacológica siempre puede ser revertida mediante vitamina K nueva. Cuando se administran, estos fármacos no anticoagulan la sangre inmediatamente. En su lugar, el inicio de su efecto requiere alrededor de un día antes que los factores de coagulación activos restantes hayan tenido tiempo para desaparecer de forma natural en el metabolismo y la duración de acción de una dosis única de warfarina es de 2 a 5 días. La reversión del efecto de la warfarina cuando se interrumpe o se administra la vitamina K₁ requiere un tiempo similar.

La heparina es un compuesto que se produce en el hígado y otros tejidos que inhibe la coagulación de la sangre. Un polisacárido que contiene azufre se utiliza como anticoagulante en el tratamiento de la trombosis. La heparina de bajo peso molecular, un producto más altamente procesado, es útil ya que no necesita ser controlada por un parámetro aPTT de coagulación (tiene niveles de plasma más predecibles) y tiene menos efectos secundarios. Sin embargo, en

situaciones de sangrado de emergencia la capacidad de controlar la HBPM es una importante necesidad clínica no satisfecha ya que ningún análisis de diagnóstico inmediato está clínicamente aceptado para el control anticoagulante de

5 la HBPM.

Los fármacos tales como el rivaroxaban, el apixaban y el edoxabán trabajan mediante la inhibición del factor Xa directamente (a diferencia de las heparinas y el fondaparinux que funcionan a través de la activación de la antitrombina).

10 Otro tipo de anticoagulante es el inhibidor directo de la trombina. Los elementos actuales de esta clase incluyen los fármacos bivalentes hirudina, lepirudina y bivalirudina; y los fármacos monovalentes argatroban y dabigatrán.

La muestra se puede analizar como la sangre o como el

15 plasma. El plasma se puede preparar mediante filtración o centrifugación. Además, el área superficial de vidrio adicional puede ser añadida a uno o más de los canales microfluídicos mediante la introducción de perlas de vidrio en el canal usando, por ejemplo un chip de profundidad doble

20 o el envasado de perlas en canal.

Otras muestras biológicas

El dispositivo se puede utilizar con otros tipos de muestras que se activan con la exposición al vidrio.

V. Métodos de Uso

Las muestras se recogen y se administran en el dispositivo. Los medios para la determinación de la coagulación se inician cuando la muestra se coloca en el dispositivo. Los resultados se compararon con los resultados estándar para muestras no coaguladas, normalmente a partir de plasma agrupado o sangre agrupada, o por referencia al tiempo de coagulación en el inicio del tratamiento, como en el caso en el que se administra anticoagulante a un individuo, o un agente terapéutico para neutralizar el anticoagulante y restaurar más normal la coagulación sanguínea.

La presente invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

15 Ejemplo 1. Demostración del calentamiento en el chip

Un chip se utilizó para demostrar el efecto de la estructura de calentamiento integrada (o el calentador/enfriador integrado, preferiblemente una bomba de calor de estado sólido o un "enfriador Peltier"). Una tensión 12 V DC se aplicó a la resistencia de calentamiento en la parte posterior de la parte de silicio del chip microfluídico. Las resistencias de los termistores se midieron dentro de cada cámara (termistores interiores, en la superficie de silicio frontal) y en la parte superior de cada cámara (termistores exteriores, en la parte superior

del PYREX®) antes de la aplicación de una tensión de calentamiento y durante el calentamiento. Se calcularon los incrementos de las temperaturas locales debido al calentamiento utilizando las resistencias medidas y los
5 coeficientes de temperatura de las resistencias según se informó anteriormente. La temperatura ambiente fue de aproximadamente 27°C. Los incrementos de la media de temperatura local después de aprox. 2 min de calentamiento no regulado fueron:

- 10 - termistores exteriores: $\Delta T = 20.3 \text{ K}$
 - termistores interiores: $\Delta T = 23.8 \text{ K}$.

Ejemplo 2: Medición de la coagulación de la sangre

Materiales y métodos

La sangre se extrajo de un paciente utilizando
15 dispositivos de lanceta disponibles comercialmente. Se obtuvieron 10 μl de sangre y se vertieron con pipeta en un tubo Eppendorf. El salino se utilizó como una solución tampón. La muestra de sangre se mezcló en el tubo de Eppendorf a través de extraer y verter con la pipeta cinco
20 veces con uno de los siguientes reactivos:

- 1 μl de solución tampón (llamada control simulado),
- 1 μl de solución tampón que contiene el anticoagulante edoxabán a una concentración de 300 ng/ml,

- 1 μ l de solución tampón que contiene el anticoagulante edoxabán y el agente de reversión anticoagulante PER977, ambos a una concentración de 300 ng/ml.

El edoxabán es un anticoagulante disponible
5 comercialmente. El PER977 (ciraparantag) es un fármaco en investigación que está diseñado para neutralizar el efecto del Edoxabán. Inmediatamente después de la mezcla, de 2.5 μ l de cada muestra de sangre se vertió con pipeta en un chip dispositivo de cerrado. El chip se insertó en su lector y
10 las mediciones tanto de luz IR y de impedancia se registraron inmediatamente a temperatura ambiente (aproximadamente 27°C). Se omitió el calentamiento de la muestra de sangre.

Se obtuvieron resultados tanto mediante IR, la viscosidad y la impedancia.

15 Resultados

Como se desprende de las figuras 12A-12F, las mediciones IR (Figuras 12B, 12D y 12F) y las mediciones de impedancia (12A, 12C y 12E) se correlaciona bien entre sí. Ambas mediciones muestran para el control simulado un pico
20 característico alrededor de 2 minutos que es indicativo del tiempo de coagulación de la muestra. La adición del anticoagulante Edoxabán desplaza este pico a aproximadamente 4 minutos. Además del pico, las curvas Edoxabán muestran un mínimo local característico alrededor de 12 minutos. La
25 adición del agente de reversión anticoagulante PER977 a una

muestra de sangre que contiene edoxabán desplaza el pico en cada curva de nuevo a 2 minutos y suprime la aparición de un mínimo local alrededor de 12 minutos. Estas mediciones indican el efecto retardante de la coagulación del Edoxabán y la reversión de este efecto mediante la administración adicional de PER977.

Las modificaciones y variaciones de los dispositivos, sistemas y métodos de uso de los mismos serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada anterior y están destinadas a entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.