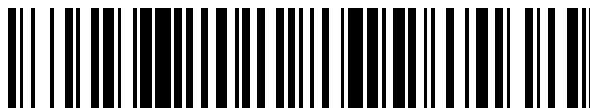


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 030**

21 Número de solicitud: 201300866

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

A61B 5/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avda de Séneca, s/n
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**TEJERINA SÁNCHEZ, María Teresa;
REDONDO BLASCO, Santiago;
MEDINA MORENO, Úrsula Fabiola;
NAVARRO DORADO, Jorge;
RAMAJO MATESANZ, Marta;
CANTIZANO GONZÁLEZ, Alexis y
CASTRO PONCE, Mario**

74 Agente/Representante:

TIRADO FERNÁNDEZ, José Francisco

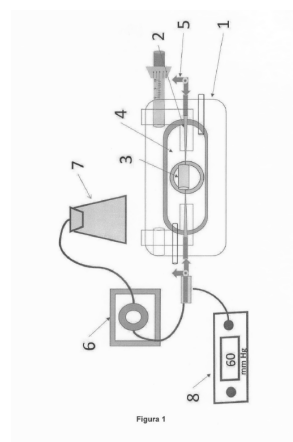
54 Título: **Método de medición del tono vascular ex vivo y cámara de flujo**

57 Resumen:

Método de medición del tono vascular ex vivo y cámara de flujo.

La presente invención se refiere a un método de medición del tono vascular ex vivo que comprende: perfundir un flujo constante de una suspensión celular en un circuito abierto que incluye un vaso cuyo tono se desea estudiar, cerrar el circuito, perfundir una solución nutritiva de Krebs en el circuito cerrado y aplicar una presión transmural constante, añadir una sustancia vasoactiva y registrar las variaciones de diámetro del vaso mediante un sistema de captación de imágenes situado perpendicularmente al vaso y acoplado a un microscopio.

La invención también se refiere a una cámara de flujo en la que realizar el método de medición del tono vascular que incluye dos capilares de vidrio, un baño, una bomba de infusión, un sistema de presión hidrostática, un manómetro, un sistema de termorregulación de la temperatura del baño y de las soluciones y/o suspensiones utilizadas, un sistema de captación de imágenes y un microscopio.



DESCRIPCIÓN

Método de medición del tono vascular *ex vivo* y cámara de flujo.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se relaciona con la medición del tono vascular mediante contracción de un segmento vascular. Utiliza una medición del diámetro externo del vaso antes del paso de una suspensión celular por el mismo. La presurización se realiza por
10 presión hidrostática. El dispositivo permite relacionar la adhesión y flujo celular con la vasodilatación y vasoconstricción.

Antecedentes de la invención

15 El tono vascular determina la vasodilatación o vasoconstricción en respuesta a diferentes estímulos. En las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial, se produce una disfunción de los mecanismos reguladores del vaso que produce un aumento basal del tono vascular, y una respuesta incrementada a sustancias vasoconstrictoras, perdiendo el vaso la capacidad de relajarse en respuesta a sustancias
20 normalmente vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO).

De forma específica, se ha demostrado que la disfunción endotelial está relacionada con un aumento del tono vascular. Curiosamente, la mayoría de los factores de riesgo cardiovascular se han demostrado lesivos para el endotelio humano. Este daño endotelial
25 podría suponer la pérdida de la capacidad de formación de sustancias vasodilatadoras derivadas de endotelio como el NO, así como la capacidad de respuesta a las sustancias que estimulan al endotelio, la síntesis y liberación del NO, como es la acetilcolina.

En diversos estudios se ha relacionado la buena función endotelial con la conservación
30 de una adecuada capacidad vasodilatadora, lo que supone una buena regulación del tono vascular. El tono vascular puede medirse *ex vivo* con muestras de vasos sanguíneos, y los dispositivos que se utilizan para realizar esta medición han supuesto una poderosa herramienta en la investigación de fármacos/mediadores, mecanismos reguladores del tono vascular en la fisiología y farmacología experimental.

35 Existen distintos modelos experimentales que permiten estudiar el efecto de sustancias biológicas en los vasos. El más utilizado es el baño de órganos y anillos vasculares. En este dispositivo, conocido y utilizado desde hace décadas, existe una copa con líquido nutritivo a 37°C y perfundido con gas carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂), en el que se montan
40 anillos vasculares en dos alambres, dando una tensión transmural fija, y observando los cambios en la misma tras la adición en la copa de sustancias vasodilatadoras o vasoconstrictoras (Furchgott *et al.*, Nature 1980; 288:373-376). Aunque este procedimiento permite medir contracciones isométricas con cambios en la fuerza pero no en el diámetro, supone una tensión no fisiológica, y el corte de los anillos vasculares
45 puede alterar la geometría existente en el vaso *in vivo*.

Para mejorar ese dispositivo, se desarrolló un miógrafo por Mulvanny *et al.*, Circ. Res. 1977; 41:19-26. En este dispositivo, se monta un segmento vascular más largo, y además de la tensión transmural se mide la circunferencia interna del vaso mediante un
50 microscopio, aplicando una presión transmural fija. Este aparato permite medir la relación

entre tensión transmural, diámetro interno y diámetro externo en diferentes lechos vasculares.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tono vascular se regula *in vivo* en condiciones de flujo. Y al mismo tiempo, más que la propia tensión transmural isométrica, el factor más importante para la regulación del tono vascular *in vivo* es el diámetro interno del vaso. Por ello, en el dispositivo descrito en Henrion *et al.*, J Clin Invest 1997; 100: 2909-2914, el tono vascular se mide mediante un sistema abierto de flujo. La presión transmural necesaria para que el vaso se dilate o contraiga, y con ello haya registro, se consigue con un servocontrol de presión de entrada y salida. Este sistema está recogido en los miógrafos modelos 110P y 111P, comercializados por la casa Danish Myotechnology (DMT).

Los sistemas existentes en la actualidad: baño de órganos (Furchgott), miógrafo de presión (Mulvanny) cerrados y abiertos y con servocontrol de presión (DMT) presentan limitaciones. La tensión conseguida en el sistema de anillos es suprafisiológica.

Las limitaciones de los miógrafos descritos pueden ser paliadas con la aplicación de un sistema isovolumétrico, como el descrito en la solicitud de patente WO2006/119143. Este sistema se basa en un sistema cerrado en el que se aplica un volumen constante de una solución dentro del vaso, en condiciones estáticas. En esta solución, se diluye una sustancia vasoactiva, y se permite registrar tanto la diferencia de presión como el diámetro del vaso. Este sistema patentado presenta además la ventaja de que, al aplicarse la sustancia vasoactiva por dentro del vaso, pueden utilizarse moléculas de alto peso molecular que no atraviesen el endotelio. Sin embargo, presenta la limitación, ya comentada, de no poder valorar el efecto de una perfusión en flujo, que es como tiene lugar la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas.

De hecho, en los últimos tiempos se ha descrito la existencia de células provenientes de la médula ósea, denominadas células progenitoras endoteliales (EPCs), que se adhieren al vaso dañado y permiten regenerar la función endotelial del mismo. Se ha relacionado el tropismo de estas células (formación de colonias, adhesión, proliferación), con la vasorrelajación dependiente de endotelio en pacientes humanos (Hill *et al.*, N Engl J Med 2003 Feb 13; 348:593-600).

Dada la importancia de la adhesión de las EPCs en el mantenimiento del tono vascular, se han desarrollado dispositivos para la medición del tono vascular en condiciones de bajo flujo, lo que permite la adhesión de elementos celulares reguladores del tono vascular como se describirá más abajo, similares a las que se producen *in vivo* en los vasos pequeños. Un ejemplo es la cámara de flujo patentada por Weber (DE 1 0328277). En este dispositivo se pasa una suspensión de células progenitoras endoteliales en cultivo y resuspendidas a 350.000/ml en medio HBSS suplementado con Ca^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM) a un flujo laminar de 0,1 ml/min, midiéndose la adhesión sobre una placa de cultivo sobre la que se ha añadido previamente una matriz de fibronectina, colágeno, o una monocapa de cultivo de células endoteliales o de cualquier otro linaje. En un experimento típico la adhesión se mide contando el número de células adheridas a los 5 minutos, usando una videocámara acoplada a un microscopio.

Otro ejemplo es la cámara de los hermanos Badimón, descrita en Ruiz *et al.*, Front Biosci. 2009; 14:3608-3618, que mimetiza la forma cilíndrica de los vasos sanguíneos y se basa en una cámara de flujo, sobre la que se coloca una arteria abierta longitudinalmente. La

suspensión celular (células resuspendidas en medio HHMC - HEPES-buffered HBSS, 1 mM Mg^{2+}/Ca^{2+} , 0,5% BSA -) a 37°C pasa sobre dicha arteria a un flujo laminar de 0,3 ml/min y la adhesión se cuantifica *a posteriori* mediante inmunohistoquímica a diversos tiempos.

5

Dados estos antecedentes, el objetivo de la presente invención es desarrollar un sistema que permita medir la adhesión en flujo de células en suspensión sobre un vaso, y el efecto de las mismas en la reactividad vascular.

10 Descripción de la invención

Método de medición del tono vascular *ex vivo* y cámara de flujo.

15 La presente invención se refiere a un método para la medición del tono vascular *ex vivo* que incluye:

- a) perfundir con un flujo constante, es decir, sin aplicar presión externa, una suspensión celular en un circuito abierto que comprende el vaso sanguíneo cuyo tono se desea estudiar;
- 20 b) cambiar el circuito abierto del paso a) a circuito cerrado;
- c) perfundir una solución nutrida de Krebs por el vaso en el circuito cerrado del paso b) al que se aplica una presión transmural;
- 25 d) añadir a la solución nutricia una sustancia vasoactiva o un fármaco objeto de estudio;
- e) registrar las variaciones de diámetro del vaso mediante un sistema de captación de imágenes situado perpendicularmente al vaso.

30

A continuación, el vaso puede fijarse y utilizarse para diversas aplicaciones como, por ejemplo, técnicas de inmunohistoquímica con marcajes específicos y/o de microscopía electrónica.

35 El flujo del paso a) es entre 0,1 y 0,3 ml/min. La suspensión de células puede contener entre 10 y 10^{10} células/ml diluidas en un medio tamponado. Las células pueden seleccionarse entre: células progenitoras endoteliales, leucocitos, plaquetas, hematíes y/o células cuyo efecto sobre el tono vascular se desee evaluar. Por otro lado, como medio tamponado puede utilizarse un medio suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} ,
40 preferentemente a una concentración de 1 mM cada uno de ellos, por ejemplo el medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*).

La presión transmural que se aplica en el circuito cerrado (paso c) puede ir de 10 a 100 mmHg. En una realización preferida, la presión transmural constante en el circuito
45 cerrado es de 40 mmHg para vasos con diámetro menor a 1200 μm y de 60 mmHg para vasos con un diámetro igual o superior a 1200 μm . Se consideran presiones de 40 y 60 mmHg como las más adecuadas para realizar los experimentos ya que no desarrollaron un tono miogénico inducido por la presión.

50 Este método *ex vivo* es aplicable para el estudio del efecto de distintas suspensiones celulares procedentes de distintos pacientes o sometidas a diferentes tratamientos, sobre

muestras de vasos sanguíneos procedentes también de diferentes pacientes, o de diferentes modelos animales experimentales.

En la presente invención, los términos "vaso" y "vaso sanguíneo" se utilizan indistintamente y con ellos se entiende una estructura hueca y tubular que conduce la sangre impulsada por la acción del corazón, incluyendo arterias, venas y capilares.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende células seleccionadas del grupo de las células progenitoras endoteliales, leucocitos, plaquetas y/o hematíes, las soluciones tamponadas necesarias para llevar a cabo el método de medición del tono vascular *ex vivo* que se describe en esta memoria, así como los iones, las sustancias vaso activas y los elementos necesarios para medir el tono vascular *ex vivo* según dicho método.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cámara de flujo para la medición del tono vascular en vaso *ex vivo*. Esta cámara de flujo (figura 1, 1) comprende dos capilares de vidrio abiertos (figura 1, 2) con un diámetro externo de entre 1 y 3 mm, separados por una distancia de entre 1 y 50 mm, lo que permite acoplar entre ellos el vaso sanguíneo (figura 1, 3) objeto del estudio *ex vivo*. De este modo, los dos capilares de vidrio y el vaso sanguíneo forman una estructura tubular conjunta, que es resistente a los flujos experimentales y presiones tras su fijación con ligadura quirúrgica. La estructura tubular está rodeada por un baño de órganos (figura 1, 4) que puede contener distintos medios. El dispositivo también comprende dos llaves de tres vías (figura 1, 5) y una bomba de infusión (figura 1, 6), acoplada a un reservorio (figura 1, 7). El sistema de presión hidrostática está compuesto por dos columnas (figura 2, 9) con un tubo (figura 2, 10) cada una de ellas y un tornillo de elevación de cada tubo para conseguir la presión hidrostática deseada; además, la cámara de flujo incluye un manómetro (figura 2, 8) para la medición de dicha presión hidrostática de un modo exacto y continuo. También se incluye un sistema de captación de imágenes (2, 11). Adicionalmente, se incluye un sistema de termorregulación para mantener constante la temperatura del baño de órganos y de los medios perfundidos en el vaso sanguíneo por medio de la cámara de flujo.

A través del vaso pasa de forma regular un flujo constante (0,1 a 0,3 ml/min) de una suspensión de células en medio tamponado, por medio de una bomba de infusión. Se realiza una perfusión en diferentes tiempos (1-2 horas), en circuito abierto, de un reservorio estéril (figura 1, 7) que contiene la suspensión celular a temperatura constante de 37°C y bajo agitación suave. Posteriormente se evalúa el efecto de estas células en la reactividad vascular.

Finalmente, una vez perfundida la suspensión celular, se procede a la medición del tono vascular. En una realización preferida, se procede a cambiar el circuito, pasando a un circuito cerrado (paso b), a una presión constante de 40 mmHg para vasos con diámetro menor a 1200 μm y de 60 mmHg para vasos con un diámetro igual o superior a 1200 μm . De esta manera, se asegura una presión transmural estable sin necesidad de someter el vaso a flujos suprafisiológicos que podrían despegar los elementos celulares adheridos a las paredes del vaso. En este momento se añaden sustancias vasoactivas al baño de órganos (como pueden ser, por ejemplo, noradrenalina -NA- o acetilcolina -Ach-). Las variaciones de diámetro del vaso se registran mediante el sistema de captación de imágenes, perpendicular al vaso (figura 3), acoplado a un microscopio. En una realización

preferida, el sistema de captación de imágenes es una cámara fotográfica de alta tasa de disparo.

Posteriormente, se pueden realizar diversos estudios con el vaso que ha sido sometido al método aquí descrito. Se sustituye la solución de Krebs por solución fijadora y el vaso así fijado se estudia con técnicas de inmunohistoquímica, con técnicas específicas de marcaje (peroxidasas-antiperoxidasas, fluoresceína, etc.), para cuantificar la adhesión de las células perfundidas, y de este modo establecer una correlación entre la adhesión y el tono vascular, dentro del mismo vaso sanguíneo.

De esta manera puede evaluarse el efecto, sobre el tono vascular, de las células utilizadas. Esta invención presenta interesantes aplicaciones en los modelos experimentales de biología vascular (por ejemplo en el estudio del efecto de células sanguíneas con efectos vasculares), y en la farmacología cardiovascular.

Breve descripción de los dibujos

Para una mejor descripción de la presente invención, se han incluido las siguientes figuras que se detallan a continuación.

Figura 1. Circuito abierto para la medición del tono vascular.

- 1 Cámara de flujo
- 2 Capilares abiertos
- 3 Vaso sanguíneo
- 4 Baño de órganos
- 5 Llave de tres vías
- 6 Bomba de infusión
- 7 Reservorio estéril
- 8 Manómetro

Figura 2. Sistema de presión hidrostática que comprende dos columnas con un tubo cada una de ellas y un tornillo de elevación para conseguir la presión hidrostática deseada.

- 1 Cámara de flujo
- 3 Vaso sanguíneo
- 8 Manómetro
- 9 Columnas
- 10 Tubo

11 Sistema de captación de imágenes

Figura 3. Sistema de captación de imágenes conformado por una cámara fotográfica de alta tasa de disparo, perpendicular al vaso, acoplado a un microscopio.

3 Vaso sanguíneo

11 Sistema de captación de imágenes

Figura 4. Se muestra un detalle del dispositivo descrito en la figura 1, con el sistema de captación de imágenes colocado de forma perpendicular.

2 Capilares abiertos

3 Vaso sanguíneo

5 Llave de tres vías

11 Sistema de captación de imágenes

Figura 5. Fotografía representativa de un vaso en sistema cerrado a una presión de 40 mmHg.

Figura 6. Fotografía representativa de un vaso en sistema cerrado a una presión de 40 mmHg, posterior a añadir la sustancia vasoactiva NA (10^{-5} M).

Figura 7. Representación gráfica de las variaciones en diámetro en diferentes etapas del protocolo de experimentación.

1 Basal sin presión

2 Basal Presión 40 mmHg

3 Contracción NA

4 Relajación Ach

5 Basal post 1hr EPCs

6 Contracción NA

7 Relajación Ach

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no pretende ser limitativo de su alcance.

Previo a la realización del protocolo de experimentación se procedió a cultivar células progenitoras endoteliales procedentes de residuos leucoplaquetarios de donantes humanos (Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid). Al día 7 de cultivo de

las células en medio microvascular MV-2 se levantaron las células con Accutase (Laboratorios PAA, Linz, Austria), y se resuspendieron a una concentración de 350.000 células/mi en medio HBSS suplementado con Ca^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM).

5 En esta realización se procedió a montar una arteria mesentérica humana, obtenida como muestra de vaso sanguíneo del desecho de una cirugía abdominal (Hospital Clínico San Carlos, Madrid), en la cámara de flujo (1). La arteria tenía una longitud de 15 mm, se procedió a denudar el endotelio del vaso y a anudar a los capilares abiertos de vidrio mediante sutura quirúrgica de 6-0, consiguiendo una estructura tubular abierta que
10 permitía el paso de una solución (Figura 4). La arteria se encontraba sumergida en un baño de órganos que contenía 10 ml de solución de Krebs a 37°C, que se mantuvo a temperatura constante empleando un baño termostático con bomba de infusión (Figura 1).

15 Con el circuito abierto se procedió a perfundir tampón de Krebs a 37°C (se mantuvo la temperatura del tampón empleando un baño termostático) y se dejó estabilizar la arteria durante 40 minutos.

20 Se registró el diámetro externo del vaso (que fue de 800 μm) mediante una cámara Nikon Digital Sight DS-Vi1 (7), de alta tasa de disparo, acoplada a un microscopio Leica DM IL LED, registrándose como se aprecia en la figura 3, siendo fotografías de imágenes representativas las incluidas en las figuras 5 y 6.

25 Se procedió a cerrar el circuito para obtener la presión deseada que, para una arteria de 800 μm de diámetro externo (en condiciones basales, sin presión), fue de 40 mmHg. La presión se obtuvo elevando el tubo (6) acoplado a la columna de presión (9) hasta que el manómetro (8) indicó que la presión transmural era de 40 mmHg, se dejó estabilizar durante 15 minutos y se midió el diámetro externo que resultó ser de 1000 μm (después de aplicar presión) con el sistema anteriormente descrito.

30 Se corroboró la funcionalidad del vaso (3) sustituyendo el tampón de Krebs del baño de órganos por Krebs alto potasio (K^+ 80 mM), la respuesta positiva indicó que el vaso era funcional, y se realizaron tres lavados con tampón Krebs a 37°C para que el vaso volviera a su estado inicial, finalmente se dejó estabilizar durante 30 minutos.

35 Posteriormente, se expuso el vaso (3) a una serie de sustancias vasoactivas que se añadieron al baño de órganos (10 ml). Primero se añadió una sustancia vasoconstrictora ($\text{NA } 10^{-5} \text{ M}$) y se registró la contracción obtenida (500 μm diámetro externo). Posteriormente se añadió una sustancia vasodilatadora ($\text{Ach } 10^{-5} \text{ M}$) y se registró la
40 relajación obtenida (600 μm diámetro externo). Se realizaron tres lavados con tampón Krebs a 37°C para que el vaso volviera a su estado inicial y se dejó estabilizar durante 30 minutos.

45 Se abrió el circuito para permitir el paso del flujo a una velocidad de entre 0,1 y 0,3 ml/min de la suspensión de células progenitoras endoteliales a 37°C (350.000 células/mi) en medio suplementado con Ca^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM), por medio de una bomba de infusión (5), por un periodo de 1 hora.

50 A continuación, se cerró el circuito y se procedió a realizar nuevamente los protocolos de experimentación con las sustancias NA y Ach, registrando los nuevos valores de

contracción y relajación obtenidos (600 y 800 μm de diámetro externo, respectivamente) para poder comprobar el efecto de reparación de la suspensión celular perfundida.

- 5 Los resultados más representativos del experimento se resumen en la figura 7. Brevemente, se observó una clara precontracción del vaso inducida por K^+ 80 mM lo que indica que es funcional, una vasoconstricción inducida por NA (10^{-5} M), y una vasodilatación inducida por Ach (10^{-5} M), las cuales se vieron modificadas posteriormente a haber permitido el flujo de EPCs durante 1 hora, la vasoconstricción fue menor y la vasodilatación se vio mejorada.

10

REIVINDICACIONES

1. Método para la medición del tono vascular *ex vivo* que incluye:
 - 5 a) perfundir un flujo constante de una suspensión celular en un circuito abierto que comprende el vaso cuyo tono se desea estudiar;
 - b) cambiar el circuito abierto (paso a) a circuito cerrado;
 - 10 c) perfundir una solución nutritiva de Krebs en el circuito cerrado y aplicar una presión transmural constante;
 - d) añadir la sustancia vasoactiva bajo estudio
 - 15 e) registrar las variaciones de diámetro del vaso mediante un sistema de captación de imágenes situado perpendicularmente al vaso y acoplado a un microscopio.
2. Método según la reivindicación 1 en el que la suspensión celular contiene células seleccionadas del siguiente grupo: células progenitoras endoteliales, leucocitos,

20 plaquetas, hematíes y/o células cuyo efecto sobre el tono vascular se desee evaluar.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que la suspensión celular contiene entre 10 y 10^{10} células/mi de medio.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la presión transmural constante del paso c) es de 40 mmHg para vasos con diámetro menor a 1200 μm y de 60 mmHg para vasos con un diámetro igual o superior a 1200 μm .
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la sustancia vasoactiva

30 del paso d) es noradrenalina o acetilcolina.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que el sistema de captación de imágenes del paso e) comprende una cámara fotográfica de alta tasa de disparo.
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que se añade un paso f) que incluye la fijación del vaso y una técnica inmunohistoquímica y/o de microscopía electrónica.
8. Kit que comprende células seleccionadas del grupo de las células progenitoras

40 endoteliales, leucocitos, plaquetas y/o hematíes así como las soluciones tamponadas, los iones, las sustancias vasoactivas y los elementos necesarios para medir el tono vascular *ex vivo* según se define en el método de las reivindicaciones 1-7.
9. Cámara de flujo en vaso *ex vivo* para la medición del tono vascular que incluye:

45
 - dos capilares de vidrio separados por una distancia de entre 1 y 50 mm para insertar entre ellos un segmento de vaso sanguíneo *ex vivo* de entre 200 y 2000 μm de diámetro externo y entre 2 y 70 mm de longitud;
 - 50 ▪ un baño de órganos;

- una bomba de infusión;
 - 5 ▪ un sistema de presión hidrostática que comprende dos columnas con un tubo cada una de ellas y un tornillo de elevación de cada tubo con el que modificar la presión entre 10 y 100 mmHg;
 - un manómetro;
 - 10 ▪ un sistema de termorregulación de la temperatura del baño de órganos y de los medios perfundidos en el vaso sanguíneo;
 - un sistema de captación de imágenes;
 - 15 ▪ un microscopio.
10. Cámara de flujo según la reivindicación 9 en la que el sistema de captación de imágenes comprende una cámara fotográfica de alta tasa de disparo.

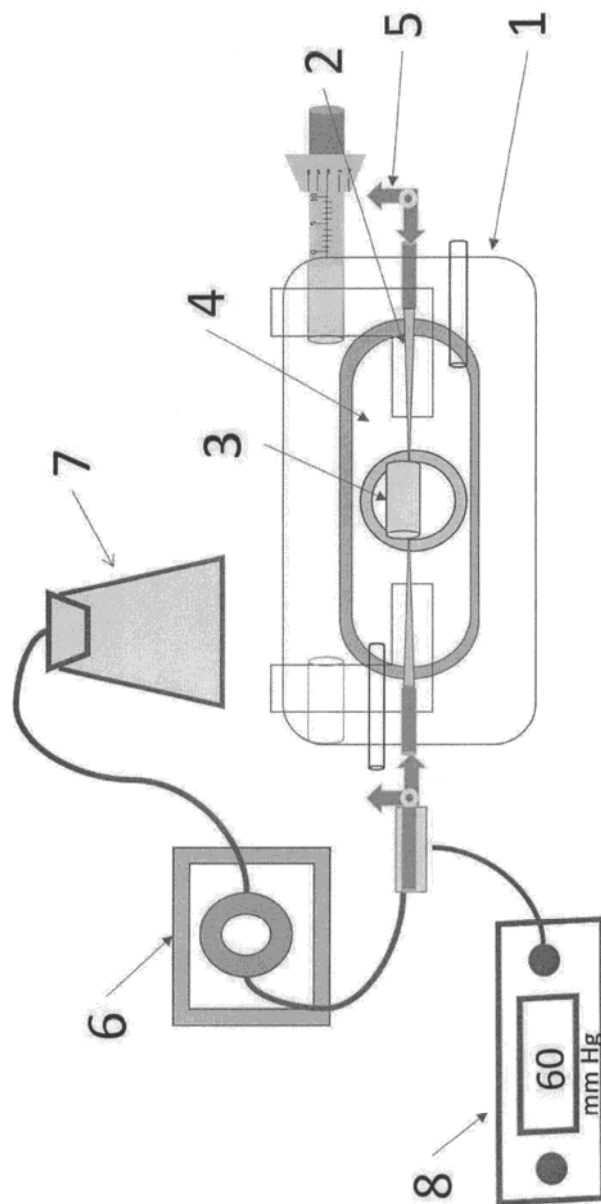


Figura 1

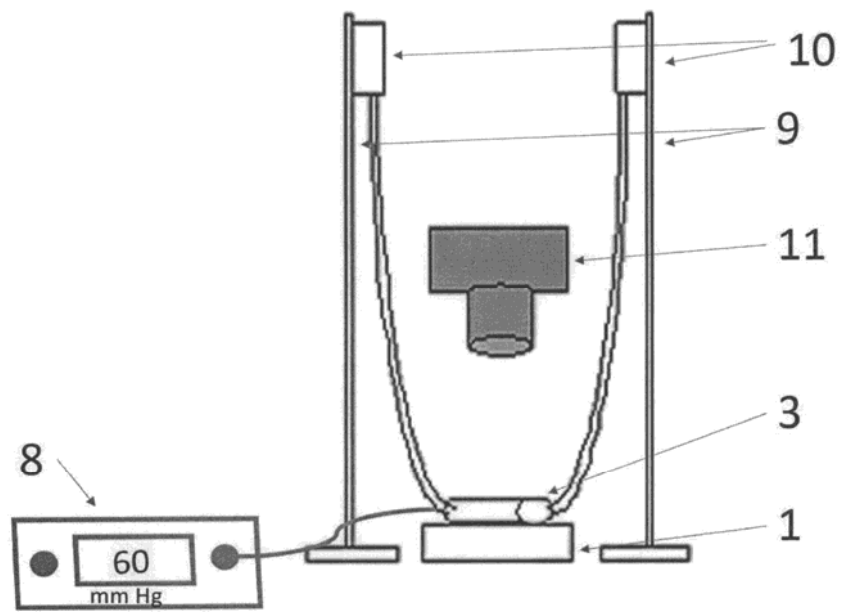


Figura 2

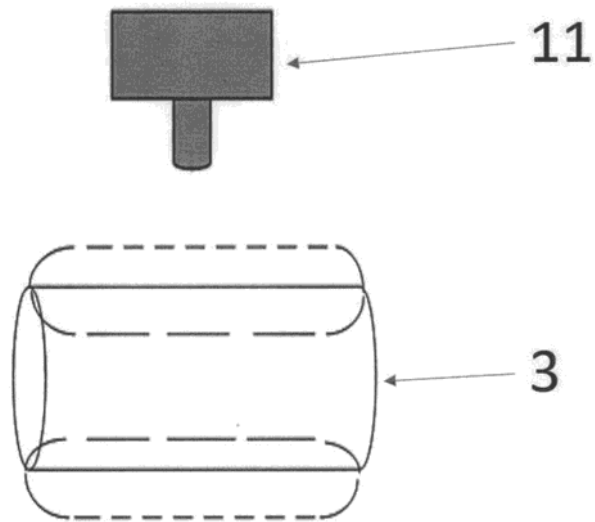


Figura 3

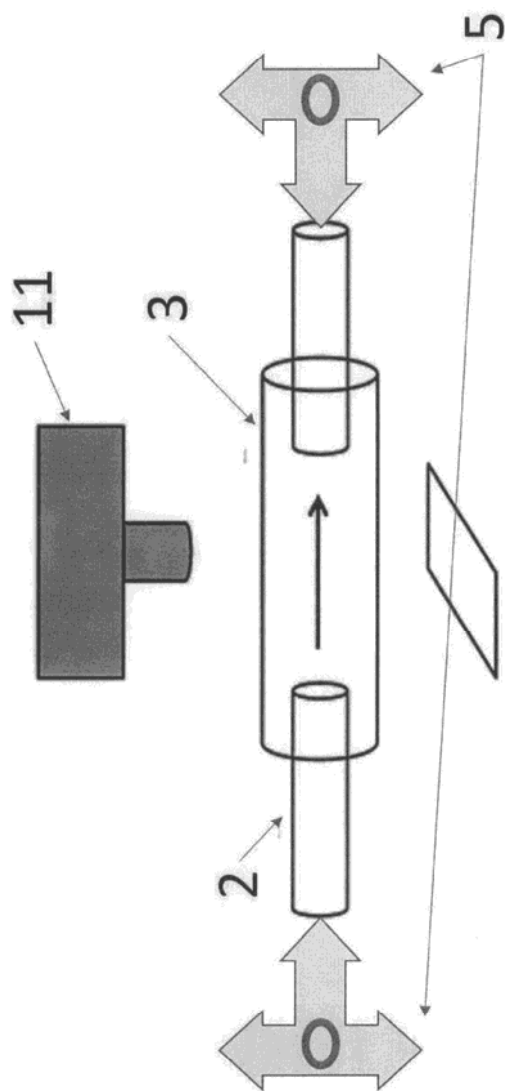


Figura 4

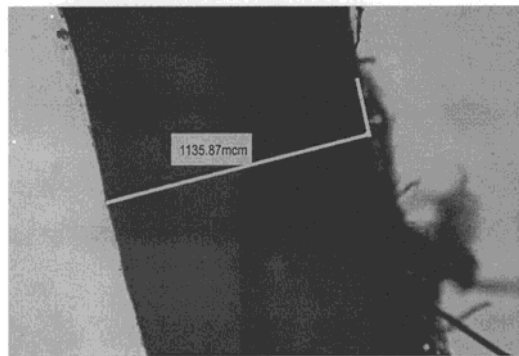


Figura 5

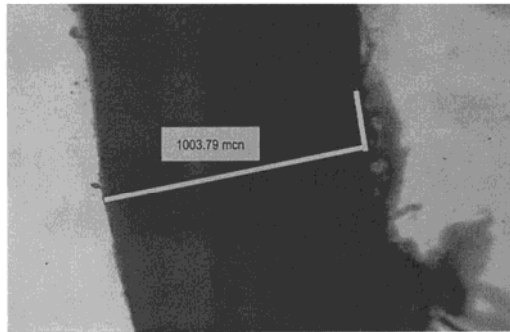


Figura 6

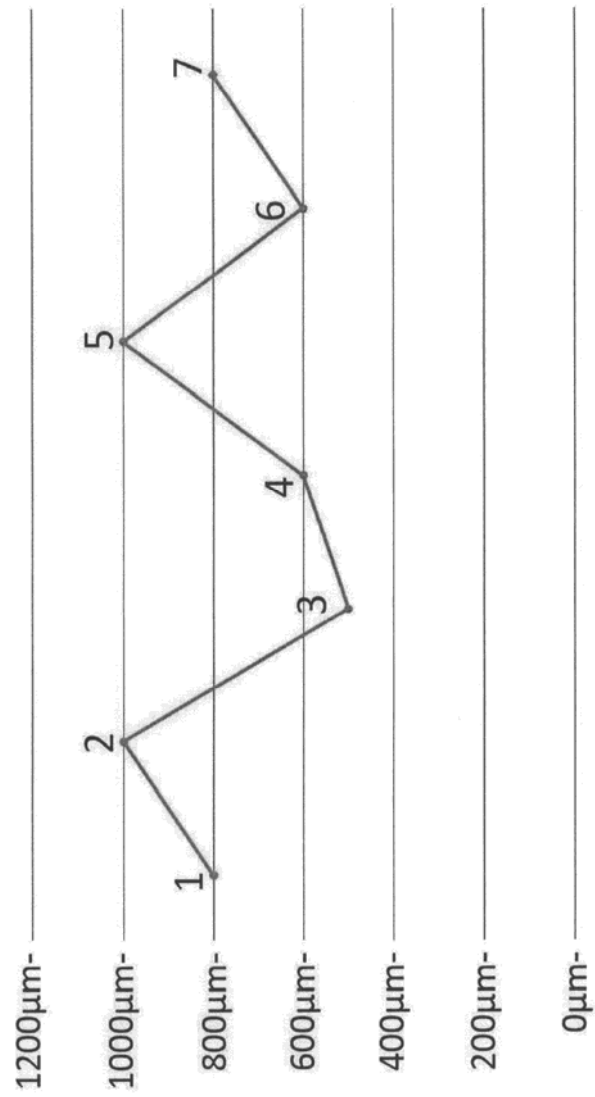


Figura 7



- ②① N.º solicitud: 201300866
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.09.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/49** (2006.01)
A61B5/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4535786 A (JOHN A. R. KATER) 20.08.1985, todo el documento.	1-10
A	US 4841974 A (WALTER GUMBRECHT et al.) 27.96.1989, todo el documento.	1-10
A	WO 9014791 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 14.12.1990, página 3, línea 4 – página 9, línea 20.	1-10
A	US 2002188240 A1 (REYNOLDS G. GORSUCH) 12.12.2002, página 2, columna1, línea 60 – página 4, columna 2, línea 60.	1-10
A	WO 2006119143 A2 (KASSAB, GHASSAN) 09.11.2006, página 11, línea 20 – página 18, línea 10.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.04.2014

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4535786 A (JOHN A. R. KATER)	20.08.1985
D02	US 4841974 A (WALTER GUMBRECHT et al.)	27.06.1989
D03	WO 9014791 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)	14.12.1990
D04	US 2002188240 A1 (REYNOLDS G. GORSUCH)	12.12.2002
D05	WO 2006119143 A2 (KASSAB, GHASSAN)	09.11.2006

El documento D01 reivindica un método y su aparato en el que la química de fluido corporal se mide ya sea en el modo diferencial o no diferencial utilizando un aparato del tipo empleado en la infusión de fluidos en flujos de sangre de los pacientes, ya sea con o sin combinación con tal de infusión, a fin de que la medición de cuerpo química de los fluidos es convenientemente y se mide de forma automática a la frecuencia seleccionada.

El documento D02 nos describe un canal de medición se proporciona, que está conectado a un catéter. El canal incluye un sensor de medición y un sensor de referencia. El catéter incluye varios lúmenes que tienen una abertura común para el medio de medición de líquido. La dirección del flujo de una solución de infusión en la apertura es reversible. Un segundo lumen del catéter está conectado al canal de medición que se proporciona con al menos un sensor de medición y con al menos un sensor de referencia, así como con un dispositivo para el ajuste del flujo de salida del aparato a una velocidad predeterminada. El flujo de un fluido de infusión y los suplentes de un medio líquido en una manera tal que, durante un primer intervalo de tiempo el sensor de medición está acoplado al medio líquido y el sensor de referencia está acoplado a la solución de infusión. En un segundo intervalo de la situación se invierte de manera que el sensor de medición original se acopla a la solución de infusión y el sensor de referencia original está conectado al medio líquido.

La disposición única es efectiva para el examen de sangre. Problemas de deriva y problemas de toxicidad no pueden ocurrir y no se requiere electrodo de referencia electroquímica.

El documento D03 nos presenta un aparato que combina una microdiálisis con un espectrómetro de masas para hacer un seguimiento farmocinético de las drogas medidas directamente en la sangre o los tejidos de un animal vivo. Después de una inyección intramuscular de una droga a estudiar, se estudia en el espectrómetro de masas incluido en la microdiálisis. La medida de la concentración de la droga usada o de otros compuestos de interés pueden ser usados para ajustar las concentraciones para la administración de la droga.

El documento D04 reivindica una invención está dirigida a un método de tratamiento de células, tejidos u órganos utilizando en la separación de plasma in vivo mediante la implantación de un dispositivo de separación de plasma de filtro dentro de un vaso sanguíneo de un paciente, o alogénico, xenogénico o donante, separar continuamente el plasma sanguíneo de la sangre total en in vivo, dirigiendo el plasma desde el dispositivo de filtro de separación de plasma a un biorreactor, y exponiendo el plasma a las células, tejido o un órgano dentro del biorreactor de la utilización de membranas de separación de inmunes cuando sea necesario.

El documento D05 describe dispositivos, sistemas y métodos para la medición isovolumétrica de vasoactividad en un vaso sanguíneo. La longitud y el volumen del vaso sanguíneo se mantienen constantes, mientras que un producto químico o la presión está expuesta al vaso sanguíneo. La reacción del vaso sanguíneo a los estímulos químicos o físicos se mide por los cambios de presión lumen interno.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Ninguno de los documentos citados describe el objeto reivindicado en nuestra patente, por lo que constituyen el estado de la técnica. Por lo que los documentos citados no llevarías al experto en la materia a modificar el conocido dispositivo, por lo que el objeto de estas reivindicaciones cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva según la Ley de Patentes 11/86 (artículos 6.1 y 8.1).