

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 559**

51 Int. Cl.:

G01N 33/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12783589 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2776840**

54 Título: **Método para determinar la propensión a la calcificación**

30 Prioridad:

07.11.2011 EP 11008849

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

19.05.2016

73 Titular/es:

**RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE AACHEN (100.0%)**

**Templergraben 55
52056 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

**JAHNEN-DECHENT, WILHELM;
PASCH, ANDREAS;
FARESE, STEFAN y
GRÄBER, STEFFEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 570 559 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la propensión a la calcificación

La presente invención se refiere a un método para determinar la propensión de un fluido a la calcificación.

5 En la naturaleza, la deposición de sales de calcio es un fenómeno abundante hallado en entornos vivos y no vivos, *in vivo* e *in vitro*. Puede producirse siempre que fluidos que comprenden sales de calcio entran en contacto con superficies o incluso puede producirse en disolución. Un alto grado de calcificación puede dañar dispositivos técnicos *in vitro* y puede dañar pacientes cuando se produce *in vivo*, en particular en el sistema cardiovascular y en tejidos blandos.

10 Hoy en día, las calcificaciones cardiovasculares y de tejidos blandos son un problema para la salud importante y una de las causas principales de muerte en todo el mundo. La calcificación es un proceso generalizado y sumamente importante caracterizado por la deposición de sales de calcio que puede producirse a lo largo de todo el cuerpo. Ejemplos típicos de la precipitación de sales de calcio son la precipitación de fosfatos de calcio, carbonatos de calcio y complejos de los mismos.

15 De manera interesante, *in vivo*, las concentraciones de calcio y fosfato están normalmente sobresaturadas en la mayoría de tejidos y líquidos corporales en todo el cuerpo, creando de ese modo una presión química continua hacia la calcificación. Sin embargo, en condiciones fisiológicas el calcio y el fosfato sólo precipitan en los huesos y los dientes, mientras que los tejidos blandos en un paciente sano no calcifican o lo hacen meramente de manera ligera y lenta. Esto indica que, *in vivo*, la precipitación de calcio es un proceso bien regulado y específico del sitio.

20 Sin embargo, también puede producirse calcificación en otros tejidos y órganos y puede ser, de ese modo, patológica. Por ejemplo, la calcificación puede hacer que se endurezcan tejidos blandos tales como la piel, tejido adiposo pardo, pulmón, riñón, corazón o una articulación. En este caso, la calcificación puede conducir a un tejido patológico y potencialmente a un estado patológico correspondiente, incluyendo los síntomas clínicos del mismo. Además, la calcificación puede producirse en la luz de determinados órganos tales como el riñón, en particular la pelvis renal, el uréter, la vejiga, la vesícula biliar y las vías biliares. En este caso, pueden producirse un cálculo renal (nefrolito) y un cálculo biliar, respectivamente.

25 No obstante, la calcificación patológica más común es la aterosclerosis. Se producen principalmente formas leves de aterosclerosis en ancianos sin provocar ningún síntoma clínico. Sin embargo, la calcificación cardiovascular puede aumentar el riesgo de presentar numerosas enfermedades tales como, por ejemplo, hipertensión, infarto de miocardio, isquemia de miembros y apoplejía cerebral (accidente cerebrovascular). Estas enfermedades cardiovasculares se han convertido en la principal causa de muerte y en un reto importante para los sistemas de atención sanitaria de todo el mundo (Yusuf *et al.*, 2001). Formas sumamente pronunciadas de calcificación pueden conducir además a la necesidad de amputación de una extremidad tal como, por ejemplo, una pierna, un brazo, un pie o una mano. El proceso de calcificación cardiovascular y de tejidos blandos *in vivo* no se entiende completamente por el momento. Se considera que varios factores químicos pueden desempeñar un papel importante en la calcificación. Tales factores químicos pueden ser, entre otros, la vitamina D, el ácido oxálico, el cortisol y los polipéptidos de unión a calcio.

30 La calcificación cardiovascular y de tejidos blandos puede considerarse como el resultado de procesos celulares regulados de manera activa que conducen a una transformación de células de músculo liso vascular en células de tipo osteoblastos (Reynolds *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2005). Se considera que estas células procesan y manejan los excedentes de calcio y fosfato y depositan estos de manera extracelular en forma de hidroxapatita cristalina ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que es también el principal componente de la sustancia ósea inorgánica.

35 Como opinión conceptual adicional sobre la biomineralización patológica, se considera que el proceso de calcificación también puede ser de naturaleza pasiva y no regulada y que tiene lugar preferentemente en situaciones caracterizadas por una interacción desfavorable de factores de calcificación unidos a suero (Jahnen-Dechent *et al.*, 2001; Schäfer *et al.*, 2003; Heiss *et al.*, 2008). Los componentes del suero sanguíneo pueden emprender conjuntamente la tarea de impedir que precipiten las concentraciones sobresaturadas de calcio y fosfato. El calcio puede estar unido en partículas que comprenden calcio (Wald *et al.*, 2011; Heiss *et al.*, 2003), que pueden convertirse espontáneamente en partículas que comprenden calcio secundarias en una etapa de maduración de transición asociada con un aumento en el diámetro de partícula (Wald *et al.*, 2011). En el presente documento, se sabe que la fetuina-A sirve como regulador del metabolismo de la matriz calcificada (Jahnen-Dechent *et al.*, 2011).

40 Debido a las graves consecuencias que puede tener la calcificación, es de considerable importancia tener un método fiable para determinar la propensión global de un líquido corporal a la calcificación, teniendo en cuenta todos los factores conocidos y desconocidos que inhiben y fomentan la calcificación en el fluido. Esto es de particular importancia para diagnosticar el riesgo de desarrollar calcificación en un paciente que ha desarrollado placas calcificadas o corre el riesgo de desarrollar placas calcificadas. El riesgo de desarrollar calcificación es

especialmente alto en pacientes con función reducida o ausente del riñón, el principal órgano de metabolismo mineral. Por tanto, los pacientes en diálisis corren un riesgo excepcionalmente alto de presentar calcificación vascular y valvular con una morbilidad sumamente aumentada.

5 En el estado de la técnica, se evalúa la propensión a la calcificación en un individuo que potencialmente corre el riesgo de desarrollar placas calcificadas determinando la concentración de fosfato o el producto de fosfato de calcio en el suero del paciente. Si esta concentración supera un determinado umbral, se administran quelantes de fosfato para disminuir la captación de fosfato e impedir de ese modo la precipitación de calcio.

10 Sin embargo, la concentración de fosfato en el suero no se correlaciona necesariamente con la propensión a la calcificación. De hecho, hay individuos que portan una concentración de fosfato normal en el suero pero, no obstante, tienen un riesgo gravemente aumentado de desarrollar placas calcificadas o incluso que han desarrollado ya placas calcificadas. Por otro lado, también hay individuos que portan una concentración aumentada de fosfato en el suero, pero que nunca desarrollan placas calcificadas.

El documento US2003/0027211 da un conocer la detección del nivel de un complejo mineral de fetuina en sangre para determinar el riesgo de desarrollar calcificación de arterias o tejidos blandos en un mamífero.

15 En la vista de lo anterior, los métodos conocidos en la técnica para determinar la propensión de un fluido a la calcificación no son fiables ya que no proporcionan ninguna información de la propensión global de dicho fluido a la calcificación.

20 Por tanto, hoy en día, existe la necesidad no satisfecha de métodos fiables para determinar la propensión global de un fluido a la calcificación. Esto es de particular importancia para diagnosticar el riesgo de desarrollar calcificación en un paciente que ha desarrollado placas calcificadas o corre el riesgo de desarrollar placas calcificadas.

De manera sorprendente, se halló que la propensión global de un fluido a la calcificación puede determinarse mediante un método basado en la determinación de la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias, la cantidad de PCP primarias y/o secundarias y/o la tasa de transición de PCP primarias en PCP secundarias.

25 La presente invención se refiere a un método para determinar la propensión de un fluido a la calcificación, en el que dicho método se caracteriza por las siguientes etapas:

(i) añadir una sal de calcio soluble y una sal de fosfato soluble a una muestra de dicho fluido;

(ii) incubar dicha muestras en condiciones que permiten la formación de partículas de calciproteína (PCP); y

(iii) determinar una o más de las siguientes:

(a) la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias;

30 (b) la cantidad de PCP primarias y/o secundarias; y/o

(c) la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias,

en el que un aumento en una o más de (a), (b) y/o (c) de la etapa (iii) indica una propensión aumentada de dicho fluido a la calcificación, y

en el que una o más de (a), (b) y/o (c) de la etapa (iii) se compara(n) con una o más muestra(s) de control.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "calcificación" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier deposición y/o precipitación de sales de calcio escasamente solubles o insolubles y/o la formación de partículas de calciproteína (PCP) *in vivo* e *in vitro*. Tal como se usa en el presente documento, los términos "calcificación", "calcinaciones", "deposición de calcio" y "precipitación de calcio" pueden entenderse de manera intercambiable. Opcionalmente, la calcificación puede conducir a la formación de placa(s) calcificada(s), puede ser
40 microcalcificación y/o puede ser la precipitación de sales de calcio en disolución, por tanto, la formación de partículas que comprenden calcio insolubles o escasamente solubles, incluyendo pero sin limitarse a PCP primarias y/o secundarias.

45 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "escasamente soluble" puede entenderse en el sentido de que la sal puede portar una solubilidad de menos de 10 mM, menos de 1 mM, menos de 0,1 mM, menos de 10 μ M, menos de 1 μ M, menos de 0,1 μ M o menos de 10 nM en agua a 20°C. El término "insoluble" puede entenderse en el sentido de que la sal puede portar una solubilidad de menos de 10 nM, menos de 1 nM o menos de 0,1 nM en agua a 20°C.

Preferiblemente, la calcificación es calcificación *in vivo*. Esto significa que la calcificación se produce en el fluido cuando el fluido está dentro del cuerpo de un sujeto y la propensión a dicha calcificación *in vivo* se determina mediante el presente método. El hecho de que la calcificación puede ser calcificación *in vivo* puede no excluir que el método pueda también realizarse *in vitro*. Tal como se usa en toda la invención, los términos “realizar” y “llevar a cabo” pueden entenderse de manera intercambiable. El propio método se realiza *in vitro*, por tanto, no se pone en práctica en el cuerpo humano o animal. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el método pueden usarse para el diagnóstico del paciente.

En el contexto de la calcificación *in vivo*, la calcificación también puede entenderse como la formación de una o más placa(s) calcificada(s). En este contexto, los términos “placa calcificada” y “lesión calcificada” pueden entenderse de manera intercambiable. Puede producirse la formación de placas en diversas zonas del cuerpo del paciente. Más preferiblemente, la calcificación es calcificación vascular, calcificación valvular, calcificación cardiovascular o calcificación de uno o más tejido(s) blando(s). Lo más preferiblemente, la calcificación es calcificación cardiovascular.

La calcificación cardiovascular tal como se usa en el presente documento puede entenderse en el sentido más amplio como la formación de una o más placa(s) localizada(s) en uno o más vaso(s) sanguíneo(s), más preferiblemente en la túnica íntima y/o la túnica media. La formación de placas en un vaso sanguíneo también puede designarse como la formación de placa intravascular. Esta placa intravascular puede ser un motivo para la calcificación de vasos sanguíneos en el cuerpo del paciente designada como “calcificación cardiovascular”. La calcificación cardiovascular, por tanto, la formación de lesión calcificadas en el sistema cardiovascular, puede aumentar el riesgo de presentar numerosas enfermedades tales como hipertensión, infarto de miocardio y apoplejía cerebral (accidente cerebrovascular). Formas sumamente pronunciadas de calcificación pueden conducir además a la necesidad de amputación de una extremidad tal como una pierna. Una forma grave de calcificación cardiovascular patológica es la “aterosclerosis de Mönckeberg”, también denominada “esclerosis calcificante de la media”. En este caso, los vasos se endurecen a medida que se forman depósitos de calcio en la capa media de las paredes de vasos de tamaño medio (túnica media). Por consiguiente, la presión de pulso aumenta de manera patológica. La formación de placas puede caracterizarse por estrías grasas. Estas estrías grasas se caracterizan normalmente por una acumulación de ácidos grasos, colesterol y/o uno o más de otros esteroide(s). A menudo, estas formaciones de placa (placas) se caracterizan además por la incorporación de lipoproteína de baja densidad (LDL) y/o glóbulos blancos, especialmente macrófagos que han captado lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada. Después de haber acumulado estos glóbulos blancos grandes cantidades de membranas citoplasmáticas, también se designan como células espumosas. En una fase posterior de la formación de placas, puede formarse un núcleo lipídico extracelular. Además, las partes externas y/o más antiguas de la placa pueden volverse más calcificadas, menos activas metabólicamente y más rígidas físicamente a lo largo del tiempo. La placa puede comprender además diversas cantidades de residuos celulares, calcio y/o tejido conjuntivo fibroso. Opcionalmente puede formarse una capa fibrosa. Finalmente, la placa puede conducir potencialmente a la coagulación de plaquetas, aterosclerosis y/o estenosis.

En el contexto de la presente invención, la calcificación *in vivo* también puede entenderse como calcificación en la luz de determinados órganos tales como el riñón, en particular en la pelvis renal, el uréter, la vejiga, la vesícula biliar y/o las vías biliares. Como resultado, pueden producirse un cálculo renal (nefrolito) y un cálculo biliar, respectivamente. Los cálculos renales y cálculos biliares se producen frecuentemente en toda la población y pueden conducir a graves síntomas. Además, la calcificación puede producirse en tejidos blandos y puede hacer que se endurezcan tejidos blandos. En este caso, la calcificación puede conducir a un tejido patológico y potencialmente a un estado patológico correspondiente incluyendo síntomas clínicos potencialmente graves. Varios tipos de tumores tales como determinados tipos de tumores cerebrales portan una calcificación local distintiva (manchas de calcio), aunque también pueden producirse manchas de calcio de diferentes tamaños en el cerebro sin provocar ningún síntoma clínico ni indicar ningún estado patológico.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, la calcificación también puede ser calcificación asociada con cualquier depósito compuesto principalmente por uno o más material(es) orgánico(s). A modo de ejemplo, este depósito puede ser, por ejemplo, un cálculo renal, un cálculo biliar, formación de placas y/o un precursor de uno de los mismos. Preferiblemente, estos depósitos puede ser formación de placas.

Alternativamente, la calcificación es calcificación *in vitro*. Tal como se usa en el presente documento, los términos “*in vitro*” y “*ex vivo*” pueden entenderse de manera intercambiable. La calcificación *in vitro* puede producirse en cualquier entorno fuera del cuerpo. A modo de ejemplo, la calcificación *in vitro* en el contexto de la presente invención puede producirse en cualquier dispositivo hueco que entre en contacto con un fluido, preferiblemente un fluido acuoso. En un contexto médico, dicho dispositivo hueco puede ser a modo de ejemplo una aguja, un acus, un tubo, una jeringa, una máquina de diálisis, una membrana de diálisis o una conservación de sangre o plasma. Alternativamente, dicho dispositivo hueco también puede ser un tubo, una tubería (por ejemplo, una tubería de agua), una máquina de lavado, un lavavajillas, un hervidor de agua, una caldera, una olla, una sartén, una máquina de café, una máquina de té, un lavabo, una bañera, un inodoro, un orinal o cualquier máquina o parte de una máquina que entra en contacto con un fluido de calcificación.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "fluido" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier fluido que puede conducir a calcificación. Tal como se usa en el presente documento, los términos "fluido", "líquido" y "disolución" pueden entenderse como intercambiable. Preferiblemente, el fluido es un fluido acuoso, por tanto, un fluido que comprende más del 50% (p/p) de agua, más del 60% (p/p) de agua, más del 70% (p/p) de agua, más del 80% (p/p) de agua, más del 90% (p/p) de agua, o más del 95% (p/p) de agua. El fluido puede ser un líquido corporal o puede ser un fluido técnico.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "propensión de un fluido a la calcificación" puede entenderse en el sentido más amplio como la tendencia de un fluido para portar calcificación. La propensión a la calcificación también puede entenderse en el sentido más amplio como la presión de calcificación y, por tanto, la potencia de un fluido para portar calcificación. Por tanto, en caso de que la propensión de un fluido a la calcificación sea alta, el fluido probablemente mostrará calcificación con el aumento de la concentración de calcio y/o de fosfato, mientras que en caso de que la propensión de un fluido a la calcificación sea baja, el fluido probablemente no mostrará calcificación o mostrará muy poca calcificación con el aumento de la concentración de calcio y/o de fosfato. En el contexto de la presente invención, la propensión de un fluido a la calcificación es preferiblemente la propensión global de un fluido a la calcificación, por tanto, la propensión a la calcificación mediada por el fluido como un todo en una vista macroscópica.

La propensión de un fluido a la calcificación es lo opuesto a la propensión de un fluido a impedir la calcificación. Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un método para determinar la propensión de un fluido a impedir la calcificación. En este contexto, la prevención o inhibición de la calcificación también puede designarse como "línea humoral de defensa". Esta línea humoral de defensa puede sobrepasarse mediante concentraciones aumentadas de calcio y/o fosfato.

Tal como se usa en el presente documento el término "determinar" puede entenderse en el sentido más amplio como la caracterización del estado y la intensidad de la propensión de un fluido a la calcificación. En este contexto, el término "determinar" puede incluir opcionalmente pero puede no limitarse a una cualquiera de las etapas de examinar, someter a prueba, medir, investigar, someter a ensayo, explorar y evaluar la propensión de un fluido a la calcificación. En el contexto de determinar la propensión de un fluido a la calcificación en una muestra obtenida de un paciente, dicha determinación también puede entenderse de manera intercambiable con el término "diagnosticar".

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "muestra de dicho fluido" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier composición que comprende el fluido. En el contexto de la presente invención, los términos "muestra de dicho fluido", "muestra del fluido" y "muestra" pueden entenderse de manera intercambiable. Preferiblemente, la muestra es una muestra fluida. Tal como se usa en el presente documento, los términos "líquido" y "fluido" pueden entenderse de manera intercambiable. Lo más preferiblemente, la muestra es una muestra acuosa. La muestra puede comprender menos del 5% (v/v), más del 5% (v/v), más del 10% (v/v), más del 20% (v/v), más del 30% (v/v), más del 40% (v/v), más del 50% (v/v), más del 60% (v/v), más del 70% (v/v), más del 80% (v/v), más del 90% (v/v) del fluido o incluso puede componerse sólo de fluido. Preferiblemente, la muestra puede comprender entre el 25% (v/v) y el 75% (v/v) de fluido, lo más preferiblemente puede comprender entre el 30% (v/v) y el 60% (v/v) de fluido. Sin embargo, el experto en la técnica se dará cuenta de que la cantidad de fluido en la muestra dependerá del tipo de fluido, el método de lectura aplicado así como la concentración de calcio y fosfato en la muestra.

El término "añadir una sal de calcio soluble y una sal de fosfato soluble" puede entenderse en el sentido más amplio como la adición de iones de calcio y fosfato a la muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sal de calcio soluble" se refiere a cualquier sal que comprende cationes de calcio (Ca^{2+}) que es soluble en agua.

Como en toda la presente invención, el término "sal soluble" puede entenderse en el sentido más amplio como una sal que tiene una solubilidad de más de 10 nM, más de 0,1 μM , más de 1 μM , más de 10 mM, más de 0,1 mM, más de 1 mM o más de 10 mM en agua a 20°C.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sal de calcio soluble" se refiere a cualquier sal soluble que comprende cationes de calcio (Ca^{2+}). A modo de ejemplo, el calcio soluble puede ser cloruro de calcio (CaCl_2). El experto en la técnica entenderá que la concentración aplicada de cationes de calcio dependerá de la cantidad de fluido en la muestra, del tipo del fluido, del método de lectura aplicado así como de la concentración de fosfato en la muestra. Preferiblemente, se añaden iones de calcio a la muestra como una disolución acuosa en agua o en un tampón apropiado, en los que la sal de calcio soluble es soluble, tal como, por ejemplo, en tampón Hepes a pH en gran medida neutro. Alternativamente, una sal de calcio también puede disolverse directamente en la muestra del fluido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sal de fosfato soluble" se refiere a cualquier sal soluble que comprende al menos uno de los cationes fosfato (PO_4^{3-}), hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y/o dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-).

5 A modo de ejemplo, la sal de fosfato soluble puede ser hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4) y/o dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4). Preferiblemente, la sal de fosfato soluble se añade a la muestra como una disolución acuosa en agua o en un tampón apropiado, en los que también son solubles los cationes de calcio, tal como, por ejemplo, en tampón Hepes a pH en gran medida neutro. Alternativamente, la(s) sal(es) de fosfato soluble(s) también puede(n) disolverse directamente en la muestra del fluido.

10 De hecho, las concentraciones usadas de sales de calcio y fosfato solubles se eligen en un intervalo en el que pueden observarse bien diferencias entre diferentes muestras. Por tanto, las concentraciones globales de calcio y fosfato, es decir, las concentraciones de calcio y fosfato intrínsecas y añadidas en suma, pueden superar preferiblemente el producto de solubilidad de fosfato de calcio en agua o tampón. Por otro lado, dichas concentraciones globales de calcio y fosfato no deben superar preferiblemente la capacidad máxima de las propiedades de inhibición de la precipitación del fluido contenido en la muestra en más de cinco órdenes de magnitud, más de cuatro órdenes de magnitud, más de tres órdenes de magnitud, más de dos órdenes de magnitud o más de una orden de magnitud. Preferiblemente, se añaden calcio y fosfato a la muestra independientemente para evitar la formación de precipitados de fosfato de calcio en una disolución antes de entrar en contacto con la muestra.

15 Preferiblemente, las concentraciones de calcio y fosfato pueden estar sobresaturadas en la muestra. Por tanto, el producto de calcio x fosfato está sobresaturado en la muestra.

20 Junto al fluido y las sales de calcio y fosfato solubles, la muestra puede comprender además cualquier otro componente inorgánico y/u orgánico que no perturbe el método. La muestra puede comprender además un tampón que no perturbe el método tal como, por ejemplo, tampón Hepes. El pH puede ajustarse a cualquier pH. Preferiblemente, el pH puede ser un pH en gran medida neutro, es decir, entre pH 5,5 y pH 8,0, más preferiblemente entre pH 6,0 y pH 8,0, incluso más preferiblemente entre pH 6,5 y pH 7,8, incluso más preferiblemente entre pH 7,2 y pH 7,6, lo más preferiblemente a un pH fisiológico, es decir a un pH de aproximadamente pH 7,4.

25 La muestra puede mezclarse manual o automáticamente. El volumen de muestra puede depender del método de detección aplicado y normalmente variará entre el rango de los nanolitros para configuraciones de micromatrices pequeñas hasta el rango de los mililitros para matrices macroscópicas tales como, por ejemplo, métodos basados en centrifugación o en columnas.

30 Las muestras normalmente se usarán directamente obtenidas de su fuente (por ejemplo, de un paciente o de un dispositivo técnico) o en el plazo de unos cuantos minutos o unos cuantos días. Cuando las muestras se almacenan durante más de unas cuantas horas, las muestras pueden almacenarse preferiblemente a temperatura ambiente o en la nevera. Alternativamente, las muestras también pueden almacenarse en un estado congelado, ultracongelado o secado por congelación y pueden almacenarse entonces a cualquier temperatura por debajo del punto de congelación, tal como, por ejemplo, a -20° , -80°C o en nitrógeno líquido. Un polvo secado por congelación también puede almacenarse a la temperatura ambiental.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "incubar" puede entenderse en el sentido más amplio como someter la muestra del fluido a condiciones que permiten la formación de PCP.

Tal como se usa en el presente documento, el término "condiciones que permiten la formación de PCP" se refiere a cualquier condición en las que pueden formarse PCP. Normalmente dichas PCP pueden comprender fosfato de calcio escasamente soluble.

40 Preferiblemente, la muestra puede incubarse a un pH en gran medida neutro, es decir, en condiciones entre pH 5,5 y pH 8,0, más preferiblemente entre pH 6,0 y pH 8,0, incluso más preferiblemente entre pH 6,5 y pH 7,8, incluso más preferiblemente entre pH 7,2 y pH 7,6, lo más preferiblemente a un pH fisiológico, es decir a un pH de aproximadamente pH 7,4.

45 Como una reacción de precipitación normalmente será sensible a la temperatura, para la comparación de diferentes muestras entre sí y/o para la comparación con una curva de calibración, se fija la temperatura o el perfil de temperatura para que esté en un intervalo comparable. Lo más preferiblemente, la muestra se incuba a una temperatura constante y la diferencia en temperatura entre muestras que van a compararse entre sí debe ser de menos de 5°C , menos de 4°C , menos de 3°C , menos de 2°C , menos de 1°C , menos de $0,5^\circ\text{C}$, menos de $0,25^\circ\text{C}$ o incluso menos de $0,1^\circ\text{C}$. Preferiblemente, la temperatura constante puede estar en el intervalo de desde 0°C hasta 100°C , más preferiblemente en el intervalo de desde 0°C hasta 45°C , incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 4°C hasta 42°C , incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 20°C hasta 40°C , incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 36°C hasta 38°C , incluso más preferiblemente en el intervalo de desde $36,0^\circ\text{C}$ hasta $37,5^\circ\text{C}$ y lo más preferiblemente en el intervalo de desde $36,5^\circ\text{C}$ hasta $37,0^\circ\text{C}$.

Alternativamente, la temperatura puede variarse durante la medición en forma de un perfil de temperatura. Este perfil de temperatura también puede ser comparable en todas las muestras que van a compararse entre sí.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, los términos “partícula de calciproteína”, “partícula de proteína de calcio”, “partícula de proteína calcificada” y “PCP” pueden entenderse en el sentido más amplio como cualquier partícula que comprende cationes de calcio. Los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” pueden entenderse de manera intercambiable en toda la invención. En el contexto de la presente invención, los términos “partícula”, “nanoesfera”, “precipitado”, “coloide” y “agregado” pueden entenderse de manera intercambiable. En el contexto de la formación de PCP, las partículas se forman preferiblemente mediante la acumulación de moléculas en una disolución de muestra. Preferiblemente, en las PCP, los cationes de calcio forman una sal escasamente soluble. A modo de ejemplo, dicha sal escasamente soluble puede ser fosfato de calcio y/o uno o más complejo(s) del mismo. Opcionalmente, dicha sal escasamente soluble puede formar cristales, preferiblemente cristales en el rango nanométrico o micrométrico, lo más preferiblemente en el rango nanométrico. La estructura cristalina regular puede interrumpirse opcionalmente mediante la incorporación de uno o más polipéptido(s) u otras moléculas. Sin embargo, la PCP puede comprender además cualquier otra molécula y/o ion inorgánico u orgánico que se encuentre en el fluido y/o añadido a la muestra tal como, por ejemplo, uno o más polipéptido(s) que puede(n) interactuar con calcio (por ejemplo, un polipéptido de fetuína (por ejemplo, fetuína-A), un polipéptido de albúmina (por ejemplo, albúmina sérica), calbindina, proteína(s) S-100, osteocalcina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, lactoferrina, lactoferrina), aniones orgánicos (por ejemplo, oxalato), aniones inorgánicos (por ejemplo, carbonato y/o pirofosfato), cationes orgánicos, cationes inorgánicos (por ejemplo, iones de magnesio y/o H⁺), vitaminas (por ejemplo, vitamina D), hormonas (por ejemplo, esteroideas, tiroxina). Un experto en la técnica entenderá que una PCP puede comprender en general preferiblemente componentes que interactúan con aniones de calcio y/o sales de calcio y otros componentes que interactúan con dichos componentes que interactúan con aniones de calcio y/o sales de calcio. Sin embargo, otras moléculas, en particular moléculas hidrófobas, también pueden acumularse en un precipitado.

En el contexto de la presente invención, una PCP es preferiblemente una partícula sólida o semisólida. Por tanto, la formación de PCP en una muestra fluida conduce a una suspensión. Una PCP puede tener cualquier tamaño. Preferiblemente, una PCP tiene un tamaño en el rango nanométrico o micrométrico. Tal como se usa en este contexto, el término “tamaño” significa el diámetro promedio de los precipitados.

Opcionalmente, las PCP pueden teñirse además de manera fluorescente, tal como por ejemplo, mediante la mezcla de un polipéptido fluorescente (por ejemplo, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente roja (RFP), mCherry, etc.), un colorante de molécula pequeña (por ejemplo, un colorante Cy (por ejemplo, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy 7), un colorante Alexa (por ejemplo, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 750), un colorante de Visen (por ejemplo VivoTag680, VivoTag750), un colorante S (por ejemplo, S0387), un fluoróforo Dylight (por ejemplo, Dylight 750, Dylight 800), un colorante IRDye (por ejemplo, IRDye 680, IRDye 800), un colorante de fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, carboxifluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC)), un colorante de rodamina (por ejemplo, rodamina, tetrametilrodamina (TAMRA)) o un colorante de HOECHST), un punto cuántico o una combinación de dos o más de los mismos. Sin embargo, preferiblemente, las PCP no se tiñen de manera fluorescente.

Dependiendo de sus componentes, una PCP puede ser una partícula en gran medida esférica, una partícula de conformación ahusada, una partícula de forma al azar o una partícula cristalina. Las PCP primarias son en gran medida esféricas (remítase a la figura 5A), mientras que las PCP secundarias portan una conformación ahusada o al azar (remítase a la figura 5B). Dependiendo del método usado, la diferente conformación puede tener o no influencia sobre las propiedades de dispersión de luz de la partícula. Preferiblemente, tiene influencia sobre la dispersión de luz.

En el contexto de las PCP, el experto en la técnica discriminará entre PCP primarias y secundarias (remítase a Jahnen-Dechent *et al.*, 2011). Las PCP primarias tienen un menor diámetro que las PCP secundarias. Además, las PCP primarias portan una conformación en gran medida esférica, mientras que las PCP secundarias portan una conformación más bien al azar.

En este contexto, los términos “partículas de calciproteína primarias” y “PCP primarias” pueden entenderse en el sentido más amplio como partículas que se forman inicialmente en un corto periodo de tiempo de unos cuantos segundos o unos cuantos minutos después de añadir la sal de calcio soluble y la sal de fosfato soluble a la muestra del fluido. El diámetro promedio de las PCP primarias es inferior a 100 nm. Preferiblemente, el tamaño de las PCP primarias estará en el intervalo de entre 50 nm y 100 nm, lo más normalmente en el intervalo de aproximadamente 60 nm a 75 nm. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que el tamaño también dependerá de las concentraciones y condiciones específicas usadas en el método. Normalmente, como componentes proteicos, las PCP primarias comprenden principalmente fetuína-A y albúmina.

En este contexto, los términos “partículas de calciproteína secundarias” y “PCP secundarias” pueden entenderse en el sentido más amplio como partículas que se forman tras incubación mediante la transición espontánea de PCP primarias en una etapa de maduración de transición. Esta etapa también puede tener lugar de manera sincronizada y coordinada. Normalmente, esta transición también estará asociada con un aumento en el diámetro de partícula (Wald *et al.*, 2011). Esta etapa de transición puede requerir considerablemente más tiempo que la formación inicial

de las PCP primarias. El experto en la técnica se dará cuenta de que la tasa de transición depende de las condiciones de reacción. Normalmente, el que se complete de manera extensa la etapa de transición puede requerir un tiempo en el intervalo de varios minutos, varias horas, varios días, varias semanas o incluso varios meses. El que se complete de manera extensa la etapa de transición puede requerir más de 1 min, más de 5 min, más de 10 min, más de 30 min, más de 1 h, más de 2 h, más de 6 h, más de 12 h, más de un día, más de dos días, más de una semana, más de un mes, más de seis meses o incluso más de un año. El diámetro promedio de las PCP secundarias es mayor de 100 nm. Normalmente, las PCP secundarias pueden tener un tamaño en el intervalo de entre 100 nm y 500 nm, lo más normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 nm a 200 nm. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que el tamaño también dependerá de las concentraciones y condiciones específicas usadas en el método. Normalmente, como componentes proteicos, las PCP secundarias comprenden fetuína-A, albúmina y componentes adicionales de alto y bajo peso molecular. Preferiblemente, estos componentes adicionales proteicos tienen una masa molecular de entre 5 y 150 kDa, más preferiblemente de entre 10 y 100 kDa. Además, pueden producirse complejos del alto peso molecular que tienen una masa molecular mayor de 150 kDa.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "tasa de formación de PCP primarias" puede entenderse en el sentido más amplio como la tasa de generación de PCP primarias en un fluido a lo largo del tiempo. Esto puede cuantificarse a modo de ejemplo como la cantidad de PCP primarias, como el volumen de PCP primarias o como la masa de PCP primarias en un volumen de fluido o muestra específico. Normalmente, las PCP primarias se formarán inicialmente en el fluido o la muestra y pueden desaparecer o disminuir en cantidad tras la transición de PCP primarias a PCP secundarias. La formación de PCP primarias dependerá normalmente de la concentración de calcio, fosfato, magnesio y protones del fluido así como de la concentración de inhibidores y promotores de la calcificación.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "tasa de formación de PCP secundarias" puede entenderse en el sentido más amplio como la tasa de generación de PCP secundarias en un fluido a lo largo del tiempo. Esto puede cuantificarse a modo de ejemplo como la cantidad de PCP secundarias, como el volumen de PCP secundarias o como la masa de PCP secundarias en un volumen de fluido o muestra específico. Normalmente, las PCP secundarias se formarán mediante la transición de PCP primarias a PCP secundarias. Como la formación de PCP primarias, también la formación de PCP secundarias dependerá normalmente de la concentración de calcio, fosfato, magnesio y protones del fluido así como de la concentración de inhibidores y promotores de la calcificación.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "determinar la tasa de formación" puede entenderse en el sentido más amplio como la observancia y cuantificación de alteraciones en la generación de las PCP. Tal como se indicó anteriormente la formación de las PCP puede conducir normalmente a una turbidez aumentada de la disolución. La absorción de la disolución y las propiedades de dispersión de la luz de la disolución aumentan. La tasa de formación puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. A modo de ejemplo, puede determinarse por medio de cualquier método conocido en la técnica.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "cantidad de PCP primarias y/o secundarias" se refiere al número de PCP primarias y/o secundarias comprendidas en un volumen específico del fluido o la muestra, la masa de las PCP primarias y/o secundarias comprendidas en un volumen específico del fluido o la muestra o el volumen de las PCP primarias y/o secundarias comprendidas en un volumen específico del fluido o la muestra. La masa de PCP primarias y/o secundarias comprendidas en un volumen específico puede determinarse como la masa de las partículas secas o la masa de las partículas en disolución.

Tal como se usa en el contexto de la transición de PCP primarias a PCP secundarias, el término "transición" puede entenderse en el sentido más amplio como la redistribución de las partículas que comprenden calcio, es decir, las partículas de calciproteína (PCP), tras incubación, concretamente, la conversión de un tipo de PCP, es decir, PCP primarias, en otro tipo de PCP, es decir, PCP secundarias. En el presente documento, los términos "transición", "conversión" y "redistribución" pueden entenderse de manera intercambiable. La transición también puede entenderse como una etapa de maduración de transición. Esta etapa puede tener lugar de manera sincronizada y coordinada. Normalmente, la transición estará asociada con un aumento en el diámetro de partícula.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "tasa de transición" puede entenderse en el sentido más amplio como la cinética de la transición de PCP primarias a PCP secundarias. Normalmente, la tasa de transición se cuantifica como el punto de tiempo del tiempo de transición mitad del máximo (T_{50}) de la transición de PCP primarias a PCP secundarias. En el contexto de la presente invención, se demuestra que la tasa de transición se retrasa preferiblemente en presencia de magnesio (Mg^{2+}) y se acelera en presencia de fosfato (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$) (remítase a la figura 2A).

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "determinar la tasa de transición" puede entenderse en el sentido más amplio como la observancia y cuantificación de alteraciones en el tamaño promedio de las PCP. Tal como se mencionó anteriormente, en el contexto de la presente invención, transición significará normalmente un aumento en el tamaño de las PCP. La tasa de transición puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. A modo de ejemplo, puede determinarse por medio de un método óptico (por ejemplo, medición de la absorción, detección de cambios en la dispersión de luz, detección de cambios en la difracción láser

y/o espectroscopía de correlación).

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “tasa de formación aumentada” puede entenderse en el sentido más amplio como la aparición de una formación más rápida de PCP primarias y/o secundarias.

- 5 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “cantidad aumentada” puede entenderse en el sentido más amplio como la aparición de un mayor número, cantidad o volumen de PCP primarias y/o secundarias.

10 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “tasa de transición aumentada” puede entenderse en el sentido más amplio como la aparición de una transición más rápida de PCP primarias a PCP secundarias. En este contexto, la tasa de transición T_{50} determinada para una muestra del fluido puede compararse con una o más muestra(s) de control.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “propensión a la calcificación aumentada” puede entenderse en el sentido más amplio como la aparición de una mayor propensión de un fluido a la calcificación. Por tanto, un fluido con propensión a la calcificación aumentada tendrá una mayor tendencia a precipitar sal(es) de calcio insoluble(s) o escasamente soluble(s). Por tanto, propensión a la calcificación aumentada también significa que aumenta la probabilidad de aparición de calcificación y/o la intensidad de calcificación.

Preferiblemente, la etapa (iii) del método de la presente invención comprende al menos determinar la tasa de transición de la transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (c)).

20 En una realización preferida, la etapa de determinar una o más de la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias, la cantidad de PCP primarias y/o secundarias y/o la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) se realiza mediante un método óptico, en particular un método óptico seleccionado del grupo que consiste en:

absorciometría,

detección de dispersión de luz,

espectroscopía de correlación,

- 25 o una combinación de dos o más de los mismos.

30 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “método óptico” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método en el que se usa luz para la detección, caracterización y/o cuantificación de PCP primarias y secundarias. El método óptico puede ser un método visual tal como por ejemplo, un método microscópico, o puede ser un método no visual tal como, por ejemplo, la detección de dispersión de luz o difracción láser o espectroscopía de correlación.

35 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “absorciometría” puede entenderse en el sentido más amplio como la determinación de la absorción o extinción del fluido usado en la presente invención. Normalmente, la absorción de la disolución aumentará tras la formación de PCP primarias y secundarias a medida que aumenta la turbidez. Esta turbidez puede evaluarse a simple vista mediante comparación con una o más muestra(s) de calibración o puede medirse mediante un dispositivo técnico. También la transformación de PCP primarias en PCP secundarias puede tener una influencia sobre la absorción. La absorciometría puede realizarse mediante cualquier dispositivo conocido en la técnica tal como, por ejemplo, un fotómetro usando una cubeta o un lector de placas usando una placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de 96 pocillos o una placa de 386 pocillos). La absorciometría puede realizarse usando luz de cualquier longitud de onda adecuada en la técnica. 40 Preferiblemente, la longitud de onda estará en el intervalo de entre 100 nm y 2000 nm, más preferiblemente en el intervalo de entre 200 nm y 1500 nm, incluso más preferiblemente en el intervalo de entre 250 nm y 1000 nm, más preferiblemente en el intervalo de entre 280 nm y 1000 nm, más preferiblemente en el intervalo de entre 300 nm y 900 nm, más preferiblemente en el intervalo de entre 400 nm y 800 nm. El experto en la técnica reconocerá que la longitud de onda elegida está preferiblemente en el intervalo en el que ni la cubeta o placa de microtitulación, ni el propio fluido de muestra muestran una absorción considerable. 45

50 Tal como se usa en toda la invención, la longitud de onda de la luz de excitación puede elegirse mediante la elección de una fuente de luz particular (por ejemplo, un láser que porta líneas láser específicas), mediante la conducción de la luz de excitación a través de uno o más filtro(s), uno o más espejo(s) semipermeable(s) y/o uno o más divisor(es) de haz acusto-óptico(s) y/o mediante división de la luz a una(s) longitud(es) de onda particular(es) por medio de uno o más prisma(s) y/o una o más rejilla(s) óptica(s). Asimismo, la luz que ha pasado la muestra puede conducirse a través de uno o más filtro(s), uno o más espejo(s) semipermeable(s) y/o uno o más divisor(es) de haz acusto-óptico(s) y/o mediante división de la luz a una(s) longitud(es) de onda particular(es) por medio de uno o más

prisma(s) y/o una o más rejilla(s) óptica(s) para permitir la detección de una o más longitud(es) de onda específica(s).

5 Puede detectarse luz mediante cualquier dispositivo conocido en la técnica. A modo de ejemplo, el/los detector(es) puede(n) ser fotodiodo(s) de avalancha (APD(s)), un(os) tubo(s) fotomultiplicador(es) (PMT(s)) y/o una red de diodos. Una red de diodos puede comprender más de cuatro, más de diez, más de 100, más de 1000 o incluso más de 10000 diodos.

10 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "dispersión de luz" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier forma de dispersión en la que luz es la forma de energía de propagación que se dispersa. La dispersión de luz es un fenómeno que conocen bien los expertos en la técnica. Por tanto, la dispersión de luz puede ser la desviación de un rayo de una trayectoria recta. A modo de ejemplo, puede estar provocado por irregularidades en el medio de propagación. En el contexto de la presente invención, dichas irregularidades en el medio de propagación están producidas preferiblemente por las PCP en la muestra y la superficie de contacto entre el fluido de muestra y dichas PCP. La dispersión detectada en el contexto de la presente invención es principalmente un dispersión difusa debida a la distribución al azar y densa de las PCP por toda la muestra. La conformación de las partículas puede tener influencia sobre las propiedades de dispersión de luz de las partículas. La dispersión de luz puede depender además de la longitud de onda de la luz que está dispersándose, por tanto, de la frecuencia de la luz excitada. Tal como se usa en el presente documento, los términos "luz excitada" y "luz incidente" pueden entenderse de manera intercambiable.

20 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "detección de dispersión de luz" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método conocido en la técnica para la identificación, determinación y cuantificación de luz dispersada. Normalmente, un haz de luz de una luz de cualquier fuente de luz se excita en la muestra y se detecta la luz dispersada en uno, dos o más ángulo(s) con respecto al haz de luz de irradiación.

25 La detección de dispersión de luz puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo, la detección de dispersión de luz puede ser detección de dispersión de Rayleigh, dispersión Raman, dispersión de Mie, dispersión de Tyndall, dispersión de Brillouin. Preferiblemente, la dispersión de luz es principalmente dispersión de Rayleigh.

30 En el contexto de la presente invención, la dispersión de Rayleigh es la dispersión elástica de luz por las partículas de las PCP, en la que la longitud de onda de la luz dispersada normalmente es menor que la longitud de onda de la luz excitada. La intensidad de la dispersión de Rayleigh depende del tamaño de las partículas. Normalmente, es en gran medida proporcional a la sexta potencia de su diámetro y en gran medida inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz excitada. La longitud de onda de la luz de excitación usada será normalmente una longitud de onda comparativamente corta por debajo de 400 nm, por debajo de 350, por debajo de 300 nm, por debajo de 250 nm, por debajo de 200 nm o incluso por debajo de 150 nm. Sin embargo, un experto en la técnica se dará cuenta de que con respecto a la configuración experimental también pueden aplicarse otras longitudes de onda.

35 La dispersión Raman la conocen bien los expertos en la técnica y se basa en la dispersión inelástica de luz, en la que la luz interacciona con fonones ópticos, que son predominantemente rotaciones y vibraciones intramoleculares. Pueden usarse espectrómetros convencionales que usan monocromadores de barrido para medir la dispersión Raman. La dispersión de Mie es una clase amplia de dispersión de luz por partículas esféricas, en particular partículas esféricas mucho mayores que la longitud de onda de la luz excitada. La intensidad de dispersión generalmente no depende fuertemente de la longitud de onda, pero es sensible al tamaño de partícula. La intensidad de dispersión de Mie para partículas grandes es en gran medida proporcional al cuadrado del diámetro de partícula. La dispersión de Tyndall es similar a la dispersión de Mie sin la restricción a la geometría esférica de las partículas. 45 Puede aplicarse particularmente a las suspensiones coloidales en el contexto de la presente invención.

La dispersión de Brillouin se produce a partir de la interacción de fotones con fonones acústicos en sólidos, que son cuantos vibracionales de vibraciones de la red cristalina, o con ondas elásticas en líquidos.

Más preferiblemente, la muestra se excita mediante un rayo láser y se mide la detección de la luz dispersada en uno, dos o más ángulo(s). Lo más preferiblemente, se detecta la dispersión de luz mediante nefelometría.

50 Puede detectarse luz dispersada frontal (medida a un ángulo de entre 160° y 180°) y/o luz dispersada lateral (medida a un ángulo de <160°). En el presente documento, la luz dispersada frontal puede ser luz detectada a un ángulo de aproximadamente 180° con referencia al rayo láser excitado, a un ángulo de aproximadamente 170° con referencia al rayo láser excitado o a un ángulo de entre aproximadamente 160° con referencia al rayo láser excitado. La luz dispersada lateral puede ser luz detectada a cualquier otro ángulo con referencia al rayo láser excitado. A modo de ejemplo, la luz dispersada lateral puede detectarse a un ángulo de aproximadamente 30°, 40°, 45°, 70°, 75° y/o 90°. Sin embargo, el experto en la técnica se dará cuenta de que también puede usarse la detección a cualquier otro

ángulo en el contexto de la presente invención. La detección también puede realizarse a ángulos variables, es decir, a ángulos variables a lo largo del tiempo durante el método. Alternativamente, la detección también puede realizarse a dos o más ángulos diferentes al mismo tiempo. Cuando se mide dispersión de luz en diferentes ángulos, esto puede designarse como dispersión dinámica de luz. La excitación puede ser excitación continua o puede ser excitación pulsada, en la que el tiempo de excitación está en el intervalo de nanosegundos, microsegundos o segundos. La excitación pulsada puede repetirse cualquier número de veces. La medición puede realizarse una vez o más de una vez. A modo de ejemplo, la medición puede repetirse dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces o más a menudo. A modo de ejemplo, un ciclo de medición puede durar menos de 1 μ s, aproximadamente 10 μ s, 0,1 s, 0,5 s, 1,0 s, 1,5 s, 2 s, 5 s, 10 s o más tiempo.

La longitud de onda y la intensidad del láser pueden ajustarse según la muestra. Tal como se usa en el presente documento, puede realizarse la detección de difracción láser mediante cualquier método conocido en la técnica adecuado para la detección de difracción de luz. En general, la difracción de luz se basa en la teoría cuántica. La longitud de onda asociada con una partícula es la longitud de onda de Broglie:

$$15 \quad \text{momento de la partícula (p)} = [\text{constante de Planck (h)}] / [\text{longitud de onda } (\lambda)]$$

En el presente documento, para partículas de movimiento lento, el momento de la partícula corresponde a su masa multiplicada por su velocidad.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, técnicas de sedimentación pueden entenderse en el sentido más amplio como cualquier método basado en la sedimentación de las PCP.

Una técnica de sedimentación puede basarse en la gravedad natural sólo o puede acelerarse mediante una fuerza centrífuga. Preferiblemente, una técnica de sedimentación en el contexto de la presente invención puede acelerarse mediante una fuerza centrífuga. Opcionalmente, puede determinarse el volumen y/o el peso del precipitado, en particular puede determinarse la razón volumétrica y/o razón en peso del precipitado y el sobrenadante. Alternativa y/o adicionalmente, puede determinarse la constante de sedimentación de los precipitados. Alternativa y/o adicionalmente, puede determinarse el peso específico de los precipitados, tal como, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

Se entenderá que pueden combinarse entre sí dos o más de los métodos descritos anteriormente. Además, también se entenderá que pueden combinarse dos o más de los métodos descritos anteriormente con uno o más métodos ópticos.

La luz de excitación puede ser cualquier fuente de luz conocida en la técnica. Preferiblemente, la luz de excitación es un rayo láser o una lámpara de Hg.

En una realización preferida, la luz de excitación usada en el método óptico es un rayo láser.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, un láser puede ser cualquier láser conocido en la técnica. Un láser muestra normalmente un grado comparativamente alto de coherencia espacial y temporal, que no puede lograrse usando otras tecnologías. Preferiblemente, la luz láser es además monocromática y/o se selecciona una línea láser para la emisión. A modo de ejemplo, el láser puede ser un láser de HeNe o un láser de ion argón. Un láser de HeNe normalmente emite luz de una longitud de onda de aproximadamente 633 nm, un láser de ion argón normalmente emite luz de una longitud de onda de aproximadamente 488 nm. Puede ajustarse la intensidad del láser a la muestra. Para nefelometría, la intensidad del láser puede estar a modo de ejemplo en el intervalo de desde 0,1 hasta 1000 mW, preferiblemente en el intervalo de desde 1 hasta 100 mW, más preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 50 mW.

Además, la luz emitida por el láser y/o la luz dispersada puede(n) conducirse a través de uno o más filtro(s), uno o más espejo(s) semipermeable(s) y/o uno o más divisor(es) de haz acusto-óptico(s) y/o puede(n) dividirse en longitud(es) de onda particular(es) por medio de uno o más prisma(s) y/o una o más rejilla(s) óptica(s). Puede detectarse luz mediante cualquier dispositivo conocido en la técnica. A modo de ejemplo, el/los detector(es) puede(n) ser fotodiodo(s) de avalancha (APD), un(os) tubo(s) fotomultiplicador(es) (PMT) y/o una red de diodos. Una red de diodos puede comprender más de cuatro, más de diez, más de 100, más de 1000 o incluso más de 10000 diodos.

En una realización más preferida, el método óptico se realiza mediante la detección de dispersión de luz, preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz, más preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz por correlación cruzada, incluso más preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz por correlación cruzada tridimensional, en particular mediante nefelometría.

Tal como se usa en el presente documento, la detección de dispersión de luz puede ser la detección de dispersión

estática de luz o la detección de dispersión dinámica de luz. Preferiblemente, la detección de dispersión de luz es la detección de dispersión dinámica de luz.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “dispersión dinámica de luz” puede entenderse de manera intercambiable con los términos “espectroscopía de correlación de fotones” y “dispersión cuasielástica de luz” como técnica de la física, que puede usarse para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión en disolución por medio de la observancia de una fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad de dispersión. Normalmente, estas fluctuaciones se producirán debido al hecho de que las moléculas pequeñas en disoluciones están experimentando un movimiento browniano y de modo que la distancia entre los dispersores en la disolución está cambiando constantemente con el tiempo dando como resultado una interferencia constructiva y destructiva alterna por las partículas circundantes. Dentro de esta fluctuación de la intensidad, puede obtenerse información sobre la escala temporal de movimiento de los dispersores.

La dispersión dinámica de luz puede basarse en cualquier tipo de dispersión de luz. Normalmente, esta dispersión de luz comprende dispersión de Rayleigh. Preferiblemente, la luz de emisión es láser. A modo de ejemplo, la dispersión dinámica de luz puede ser dispersión de luz láser cuasielástica. Entonces, la información dinámica de las partículas puede derivarse a partir de una autocorrelación del perfil de intensidad registrado durante el experimento.

En el contexto de la presente invención, el término “correlación cruzada” puede entenderse en el sentido más amplio como una medida de similitud de dos formas de onda en el procesamiento de señales. Se usa comúnmente para la búsqueda de una señal de larga duración para una característica más corta.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “dispersión dinámica de luz por correlación cruzada tridimensional”, “dispersión dinámica de luz por correlación cruzada 3D” y “dispersión dinámica de luz 3D” pueden entenderse de manera intercambiable.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “nefelometría” puede entenderse en el sentido más amplio como un método realizando midiendo la turbidez en una muestra en gran medida acuosa midiendo la intensidad de luz de luz que pasa a través de la muestra a un ángulo basándose en el principio de que una suspensión diluida de partículas pequeñas dispersará la luz que pase a su través en vez de simplemente absorberla. La nefelometría puede medirse manualmente o de manera semiautomatizada o automatizada.

En este contexto, la luz dispersada puede medirse a cualquier ángulo tal como, por ejemplo, a aproximadamente 30°, 40°, 45°, 70°, 75° y/o 90°. Lo más preferiblemente, la luz se detecta en una geometría a 90°. Normalmente, la fuente de luz es un láser. Los resultados obtenidos para la muestra pueden compararse opcionalmente con uno o más valor(es) obtenido(s) para muestras(s) de calibración o puede compararse con una o más curva(s) patrón.

La nefelometría puede ser nefelometría de punto final o puede medirse a lo largo del tiempo como nefelometría cinética. Tal como se usa en el presente documento, nefelometría de punto final significa que la formación o redistribución en tamaño de las PCP puede completarse en gran medida y no cambia o casi no cambia nada más. En nefelometría cinética, la dispersión de luz se mide a lo largo del tiempo. Normalmente, la medición de dispersión de luz se inicia justo después de añadirse el calcio y/o fosfato y entonces se continúa durante un cierto tiempo. La nefelometría cinética permite observar cambios en la distribución de tamaño de partícula y el tamaño de partícula promedio a lo largo del tiempo. Preferiblemente, la nefelometría, tal como se usa en el contexto de la presente invención, es nefelometría cinética. Para permitir la detección de partículas grandes, que pueden haber sedimentado en el fondo de la muestra, opcionalmente puede agitarse o mezclarse la muestra antes de cada medición. Siempre que el reactivo sea constante, puede considerarse la tasa de cambio como directamente relacionada con la cantidad de la propensión del líquido corporal a la calcificación.

Alternativamente para realizar la etapa de determinar la tasa de transición de la transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) mediante un método óptico, también puede realizarse mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente tal método se basa en la detección del tamaño promedio o la masa promedio de las partículas presentes en la muestra.

En el contexto de la presente invención, la etapa de determinar una o más de la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias, la cantidad de PCP primarias y/o secundarias y/o la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) también puede ser cualquier otro método conocido en la técnica, por tanto, también un método no óptico o una combinación de dos o más métodos no ópticos o una combinación de uno o más método(s) óptico(s) y uno o más método(s) no óptico(s).

En una realización preferida de la presente invención, la etapa de determinar una o más de la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias, la cantidad de PCP primarias y/o secundarias y/o la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) se realiza mediante cualquier método seleccionado del grupo que consiste en:

técnicas de sedimentación,

análisis por filtración,

cromatografía de exclusión molecular,

granulometría,

5 espectroscopía acústica,

o una combinación de dos o más de los mismos.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “técnica de sedimentación” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método basado en la deposición de las PCP primarias y/o secundarias. Preferiblemente, las PCP primarias y las PCP secundarias pueden portar diferentes constantes de sedimentación y pueden sedimentar, por tanto, en diferentes puntos de tiempo.

Normalmente, las PCP secundarias pueden sedimentar en primer lugar. Una técnica de sedimentación puede basarse en la fuerza gravitacional sólo o también puede incluir fuerza centrífuga. Preferiblemente, la técnica de sedimentación también puede incluir fuerza centrífuga. Puede formarse un sedimento que comprende las PCP secundarias y/o las PCP primarias. Alternativa o adicionalmente, puede usarse centrifugación de equilibrio (por ejemplo, centrifugación en gradiente de sacarosa). En el presente documento, las PCP primarias y las PCP secundarias pueden separarse unas de otras debido a su diferente densidad de masa. En general, las PCP primarias y las PCP secundarias separadas pueden investigarse adicionalmente determinando el volumen o la masa de las mismas o mediante la observación de estas mediante métodos ópticos tales como, por ejemplo, microscopía. Opcionalmente, pueden determinarse el volumen y/o el peso del precipitado. Para observar un perfil cinético de la transición de PCP primarias a PCP secundarias, pueden investigarse varias muestras.

Tal como se usa en el presente documento, un método microscópico puede ser a modo de ejemplo microscopía óptica (por ejemplo, microscopía de campo claro), microscopía de fluorescencia (por ejemplo, microscopía láser de barrido (LSM) (confocal), microscopía de agotamiento de emisión estimulada (microscopía STED)), microscopía electrónica (por ejemplo, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transición (TEM), microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM), microscopía de efecto túnel (STM)), microscopía de barrido con iones de helio (SHIM), microscopía de sonda de barrido (SPM) y/o microscopía de fuerza atómica (AFM).

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “análisis por filtración” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método basado en el tamizado molecular y/o particulado de la muestra. Tal como se usa en el presente documento, los términos “tamizado” y “filtración” pueden entenderse de manera intercambiable. La filtración puede ser filtración en línea o continua. Opcionalmente, la filtración también puede ser filtración tangencial. Las partículas pueden separarse y/o aislarse debido a su tamaño. Preferiblemente, el filtro tiene un tamaño que permite que las PCP primarias pasen a su través, mientras que las PCP secundarias se retardan. Opcionalmente, pueden determinarse el volumen y/o el peso del precipitado, en particular pueden determinarse la razón volumétrica y/o razón en peso del precipitado y el sobrenadante.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, cromatografía de exclusión molecular puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método cromatográfico adecuado para separar las PCP de la muestra del líquido corporal. Preferiblemente, las PCP primarias y las PCP secundarias muestran diferentes perfiles de elución. La cromatografía de exclusión molecular también puede designarse como cromatografía de peso molecular. Opcionalmente, pueden determinarse el volumen y/o el peso del precipitado, en particular pueden determinarse la razón volumétrica y/o razón en peso de las fracciones particulares.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, granulometría óptica puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método para la determinación óptica del tamaño de las partículas. En el contexto de la presente invención, la granulometría óptica será normalmente un método basado en microscopio. Opcionalmente, puede usarse un método asistido por ordenador, preferiblemente basado en una máscara binaria, para identificar estructuras particulares y caracterizar y cuantificar estas en cuanto a tamaño y número. El experto en la técnica sabrá cómo aplicar una macro correspondiente.

Esta macro puede ejecutarse en cualquier programa informático adecuado tal como, por ejemplo, mediante el programa de código abierto *ImageJ* basado en *Java*.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “espectroscopía acústica” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método que emplee sonido para recopilar información sobre las partículas que están dispersas en el fluido. En el contexto de la presente invención, este sonido serán normalmente ultrasonidos. Las partículas dispersas absorberán y dispersarán los ultrasonidos de manera similar a la luz. La espectroscopía

acústica puede basarse en la medición de la energía dispersada frente al ángulo o la medición de la energía transmitida frente a la frecuencia. Los espectros de frecuencia de atenuación de ultrasonidos resultantes son los datos sin procesar para calcular la distribución de tamaño de partícula. Un ejemplo de espectroscopía acústica es espectroscopía de atenuación de ultrasonidos. Puede determinarse el tamaño promedio de las partículas.

5 Además, la etapa (iii) de la presente invención también puede realizarse mediante recuento de electrorresistencia. Tal como se usa en el contexto de la presente invención, recuento de electrorresistencia puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método basado en la detección de cambios en la resistencia eléctrica de la muestra. Preferiblemente, la muestra se conduce a través de una aguja delgada de un tamaño que permite que pase sólo una partícula individual o unas cuantas partículas a su través de una vez. Un ejemplo de recuento de electrorresistencia es el contador Coulter, que mide los cambios momentáneos en la conductividad de un líquido que pasa a través de un orificio que tiene lugar cuando partículas no conductoras individuales pasan a su través. El recuento de partículas se obtiene contando pulsos, y el tamaño depende del tamaño de cada pulso. Preferiblemente, el paso de una de las PCP secundarias más grandes mostrará una señal más intensa que el paso de una de las PCP primarias más pequeñas. Ajustando un umbral determinado en tamaño, puede determinarse el número de PCP primarias y secundarias.

Preferiblemente, el recuento de electrorresistencia es espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Tal como se usa en el presente documento, los términos "espectroscopía de impedancia electroquímica", "EIS", "espectroscopía de impedancia" y "espectroscopía dieléctrica" pueden entenderse en el sentido más amplio como un método de medición de las propiedades dieléctricas de un medio en función de la frecuencia basado en la interacción de un campo externo con el momento dipolar eléctrico de la muestra, a menudo expresado mediante la permitividad. Opcionalmente, los datos obtenidos que se obtienen mediante EIS pueden expresarse gráficamente en un diagrama de Bode o un diagrama de Nyquist.

Se entenderá que pueden combinarse entre sí dos o más de los métodos descritos anteriormente. Además, también se entenderá que pueden combinarse dos o más de los métodos no ópticos descritos anteriormente con uno o más método(s) óptico(s).

En una realización preferida, se combina al menos un método óptico con recuento de electrorresistencia. En una realización más preferida, un método basado en dispersión de luz se combina con recuento de electrorresistencia. En una realización incluso más preferida, un método basado en dispersión dinámica de luz se combina con recuento de electrorresistencia. En la realización más preferida, se combina nefelometría con espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Esto puede realizarse mediante cualquier dispositivo. De manera particularmente preferible, esto se realiza usando uno o más dispositivo(s) microfluídico(s).

Preferiblemente, el/los método(s) empleado(s) puede(n) incluir al menos un método óptico y/o un método acústico. Más preferiblemente, el método de la presente invención incluye al menos un método óptico.

En el contexto de la presente invención, el fluido puede ser cualquier fluido que puede conducir a calcificación. El fluido puede ser un líquido corporal o puede ser un fluido técnico.

En una realización preferida, el fluido es un líquido corporal, en particular en el que el fluido es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, linfa y/u orina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "líquido corporal" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier fluido que puede obtenerse de un cuerpo tal como, por ejemplo, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, linfa, saliva y/o una o más secreción/secreciones de cualquier glándula. El término "líquido corporal" también puede incluir cualquier fluido que puede obtenerse de un cuerpo después de una o más etapa(s) de procesamiento (por ejemplo, centrifugación, filtración, filtración tangencial, precipitación y/o cualquier otro método conocido para fraccionar líquidos biológicos) tal como, por ejemplo, de suero sanguíneo o plasma sanguíneo. Tal como se usa en el presente documento, los términos "suero sanguíneo" y "suero" pueden entenderse de manera intercambiable. Asimismo, los términos "plasma sanguíneo" y "plasma" pueden entenderse de manera intercambiable. Preferiblemente, el líquido corporal es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo o linfa.

El líquido corporal normalmente se usará directamente obtenido del paciente o en el plazo de unos cuantos minutos o unos cuantos días. Cuando las muestras se almacenan durante más de unas cuantas horas, las muestras pueden almacenarse preferiblemente a temperatura ambiente o en la nevera. Tal como se usa en el contexto de la presente invención, los términos "temperatura ambiente" y "temperatura ambiental" pueden entenderse de manera intercambiable. Alternativamente, las muestras también pueden almacenarse en un estado congelado, ultracongelado o secado por congelación y pueden almacenarse entonces a cualquier temperatura por debajo del punto de congelación, tal como, por ejemplo, a -20°, -80°C o en nitrógeno líquido. Un polvo secado por congelación también puede almacenarse a la temperatura ambiental. La obtención del líquido corporal de un paciente no es normalmente un riesgo para la salud del paciente y también puede llevarse a cabo por personas que no son expertos médicos tales como, por ejemplo, incluso el paciente en su domicilio.

En una realización más preferida, el fluido es un líquido corporal obtenido de un paciente, preferiblemente en el que dicho paciente ha desarrollado calcificación y/o corre el riesgo de desarrollar calcificación, en particular en el que dicho paciente es un paciente en diálisis.

5 Preferiblemente, el paciente que ha desarrollado calcificación y/o corre el riesgo de desarrollar calcificación, ha desarrollado placas calcificadas y/o corre el riesgo de desarrollar placas calcificadas. Sin embargo, la calcificación también puede ser microcalcificación o puede ser precipitación de calcio en disolución, por tanto, la formación de cualquier precipitado de calcio, opcionalmente que incluye PCP primarias y/o secundarias.

El líquido corporal puede obtenerse de un paciente o puede obtenerse de una muestra conservada o puede ser un líquido corporal artificial.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "obtenido de un paciente" puede entenderse en el sentido más amplio como recibir un líquido corporal del cuerpo de un paciente mediante cualquier medio. A modo de ejemplo, puede extraerse sangre de un vaso sanguíneo, puede recogerse linfa de un vaso linfático, puede obtenerse líquido cefalorraquídeo de la luz cefalorraquídea y/o puede recogerse orina y/o sudor. Se entenderá que el líquido corporal también puede procesarse adicionalmente. A modo de ejemplo, puede extraerse plasma sanguíneo o suero

15 sanguíneo de la sangre mediante cualquier medio conocido en la técnica. El líquido corporal puede usarse en un método de la presente invención o puede almacenarse en condiciones apropiadas durante hasta una hora, hasta dos horas, hasta seis horas, hasta doce horas, hasta un día o incluso más tiempo. Una muestra de líquido corporal almacenada durante más de un día puede designarse como una muestra conservada.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra conservada" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier muestra que se ha almacenado durante más de más de un día, más de dos días, más de una semana, más de dos semanas, más de un mes, más de dos meses, más de seis meses o más de un año.

25 La muestra de líquido corporal puede almacenarse como líquido corporal puro o puede almacenarse como una muestra que comprende además otros componentes de la muestra tal como se resumió en detalle anteriormente. En general, pueden usarse todas las condiciones de almacenamiento adecuadas para el líquido corporal. A modo de ejemplo, la muestra de líquido corporal puede almacenarse a temperatura ambiente, a 4°C, a -20°C, a -80°C o en nitrógeno líquido. Por tanto, la muestra de líquido corporal puede almacenarse en un estado líquido o congelado. Alternativamente, la muestra de líquido corporal puede almacenarse en un estado secado por congelación o secado. La muestra conservada puede ser a modo de ejemplo una conservación de sangre, una conservación de suero o plasma o una conservación de linfa.

30 El paciente puede ser un paciente sano o un paciente que corre un riesgo de calcificación particular. Preferiblemente, el paciente porta una propensión aumentada a desarrollar placas calcificadas. Esta propensión aumentada puede tener motivo(s) congénito(s) y/o adquirido(s).

35 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "paciente" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier sujeto o individuo del que puede obtenerse un líquido corporal, independientemente de que se produzcan o no síntomas clínicos. El paciente puede ser cualquier animal, incluyendo seres humanos. Preferiblemente, el paciente es un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano.

40 El paciente que ha desarrollado placas calcificadas y/o que corre el riesgo de desarrollar placas calcificadas puede estar sano o puede portar un riesgo de calcificación particular. El paciente puede padecer o no cualquier síntoma clínico tal como, por ejemplo, hipertensión, diabetes, disfunción renal o una enfermedad reumatoide. A modo de ejemplo, la disfunción renal puede ser enfermedad renal crónica (ERC).

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "cuerpo" puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier sujeto vivo o sujeto que ha vivido hace menos de diez años, hace menos de cinco años, hace menos de cuatro años, hace menos de tres años, hace menos de dos años, hace menos de un año, hace menos de seis meses, hace menos de cinco meses, hace menos de cuatro meses, hace menos de tres meses, hace menos de dos meses, hace menos de un mes, hace menos de dos semanas, hace menos de una semana, hace menos de dos días, hace menos de un día, hace menos de doce horas, hace menos de seis horas o hace menos de una hora. Preferiblemente, el cuerpo es el cuerpo de cualquier animal incluyendo ser humano. Un animal es preferiblemente un vertebrado, más preferiblemente un animal endotérmico, incluso más preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano.

50 Opcionalmente, puede añadirse un compuesto que es un inhibidor o promotor de la calcificación potencial o conocido al líquido corporal. Entonces, puede someterse a prueba la potencia de dicho compuesto para inhibir o fomentar la calcificación, en particular cuando se compara una muestra que comprende dicho compuesto con una muestra correspondiente sin el inhibidor. Ventajosamente, el método de la presente invención proporciona la posibilidad de caracterizar la acción del compuesto en su contexto natural, es decir, en el líquido corporal.

55 Inhibidores de calcificación son a modo de ejemplo fetuina (por ejemplo, fetuina-A) y albúmina (por ejemplo,

albúmina sérica). *In vitro*, también pueden usarse agentes quelantes tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o intercambiador catiónico inmovilizado para inhibir la calcificación.

5 Además, adicional o alternativamente, también pueden usarse quelantes de fosfato para inhibir la calcificación. A modo de ejemplo, los quelantes de fosfato comunes comprenden hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alucaps), carbonato de calcio (por ejemplo, Calcichew, Titalac), acetato de calcio (por ejemplo, Phosex, PhosLo), carbonato de lantano (Fosrenol), sevelámero (por ejemplo, Renagel, Renvela) y acetato de calcio/carbonato de magnesio (por ejemplo, Renepho, OsvaRen).

El líquido corporal también puede ser un líquido corporal artificial obtenido mezclando y disolviendo uno o más componente(s) en una disolución acuosa.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “paciente en diálisis” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier paciente que necesita soporte o reposición artificial de la función renal perdida o limitada. Se entenderá que un paciente en diálisis es normalmente un paciente que corre un riesgo particular de desarrollar placas calcificadas.

15 En otra realización más preferida, el paciente padece calcificación vascular, valvular y/o de tejidos blandos, preferiblemente en el que dicho paciente padece además una enfermedad reumatoide, una enfermedad maligna y/o una enfermedad infecciosa, en particular en el que el paciente muestra al menos uno de los síndromes seleccionados del grupo que consiste en:

disfunción renal,

hipertensión,

20 diabetes mellitus,

dislipidemia,

una falta de mineralización adecuada, en particular osteoporosis y/o osteomalacia, y aterosclerosis.

25 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “enfermedad reumatoide” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier problema médico que afecta a las articulaciones y el tejido conjuntivo, normalmente producido principalmente por artritis. En el presente documento, los términos “enfermedad reumatoide”, “reumatismo”, “trastorno reumático” y “enfermedad reumática” pueden entenderse de manera intercambiable. Enfermedad reumatoide puede incluir pero puede no limitarse a esclerodermia, síndrome de fibromialgia, espondilitis anquilosante, bursitis, tendinitis, capsulitis de muñeca, osteoartritis, artritis psoriásica, fiebre reumática, cardiopatía reumática, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, arteritis temporal, polimialgia reumática, tenosinovitis, reumatismo palindrómico y miositis. Sin embargo, la enfermedad reumatoide también puede incluir reumatismo no articular (por ejemplo, síndrome de dolor regional, reumatismo de tejidos blandos).

30 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “enfermedad maligna” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier trastorno maligno conocido en la técnica. Una enfermedad maligna puede ser un trastorno que conduce a neoplasia, en particular uno o más tumor(es). Una enfermedad maligna puede portar por tanto un trastorno oncolítico incluyendo cáncer. El término “cáncer” puede entenderse en el sentido más amplio. Puede incluir la aparición de tumores primarios y secundarios, metástasis y otras clases de neoplasias patológicas. Sin embargo, una enfermedad maligna también puede ser un trastorno no oncológico tal como, por ejemplo, hipertensión maligna, hipertermia maligna, otitis externa maligna, fiebre terciana maligna (normalmente producida por *Plasmodium falciparum*) o síndrome maligno neuroléptico.

40 Una enfermedad infecciosa puede ser cualquier enfermedad por infección conocida en la técnica.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “síndrome” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier asociación de una o más de varias característica(s), signo(s), síntoma(s), fenómeno(s) clínicamente reconocibles y/o característica(s) que a menudo se produce(n) en el contexto de una enfermedad o un trastorno particular, de modo que la presencia de una o más característica(s) puede indicar la presencia de la enfermedad o el trastorno. Un síndrome puede observarlo un experto médico, es decir, un doctor o un enfermero y/o puede observarlo y potencialmente notificarlo el paciente.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “disfunción renal” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier mal funcionamiento del sistema renal, en particular el/los riñón/riñones. A modo de ejemplo, la disfunción renal puede ser enfermedad renal crónica (ERC). Opcionalmente, la disfunción renal también puede ser nefropatía. El término “nefropatía” tal como se usa en el presente documento se refiere a una disfunción o una ausencia de función de uno o ambos riñones.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “hipertensión” e “hipertonía” pueden entenderse de manera intercambiable en el sentido más amplio como un estado de alta tensión arterial y se conocen bien en la técnica.

5 Tal como se usa en el presente documento, los términos “diabetes mellitus” y “diabetes” pueden entenderse en el sentido más amplio como un grupo de trastornos caracterizados por un fallo en la regulación del nivel de glucemia. Comprende un grupo de enfermedades metabólicas en las que una persona tiene alta glucemia. Normalmente, se produce diabetes mellitus cuando el cuerpo del paciente no produce suficiente insulina y/o cuando las células en el cuerpo del paciente no responden de manera adecuada a la insulina que se produce. La diabetes mellitus puede conducir opcionalmente a numerosos síntomas clínicos y no clínicos tales como, por ejemplo, poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed) y/o polifagia (aumento del hambre).

10 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, los términos “dislipidemia” y “dislipemia” pueden entenderse de manera intercambiable en el sentido más amplio como cualquier trastorno caracterizado por una cantidad anómala de lípidos (por ejemplo, colesterol y/o triglicérido(s)) en la sangre.

15 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “osteoporosis” puede entenderse en el sentido más amplio como un trastorno caracterizado por una reducción de la densidad mineral ósea (DMO), que deteriora la arquitectura ósea y/o con alteración de la cantidad y variedad de proteínas en el hueso.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “osteomalacia” puede entenderse en el sentido más amplio como un trastorno caracterizado por el ablandamiento de los huesos. Puede estar producido por una mineralización ósea defectuosa secundaria a cantidades inadecuadas de fósforo y calcio disponibles y/o puede estar producido por una resorción hiperactiva de calcio del hueso como resultado de hiperparatiroidismo.

20 Tal como se usa en el presente documento, los términos “aterosclerosis”, “arteriosclerosis”, “aterosclerosis cardiovascular”, “arteriosclerosis cardiovascular” y “placa cardiovascular” pueden entenderse de manera intercambiable en el sentido más amplio como la deposición de placa en los vasos sanguíneos. La placa puede depositarse en la luz de los vasos sanguíneos o en la capa media de las paredes de los vasos de tamaño medio (túnica media). La placa puede comprender sales de calcio en combinación con otros minerales, proteínas, ácidos grasos, triglicéridos, colesterol, lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y/o azúcares. Además, células o fragmentos celulares tales como, por ejemplo, macrófagos, glóbulos rojos (RBC) y plaquetas, pueden formar parte de la placa. Formas patológicas de aterosclerosis también pueden designarse como enfermedad vascular arteriosclerótica o (EVA). La placa cardiovascular puede aumentar el riesgo de presentar numerosas enfermedades tales como hipertonía, infarto de miocardio y apoplejía cerebral (accidente cerebrovascular). Formas sumamente pronunciadas de calcificación pueden conducir además a la necesidad de amputación de una extremidad tal como una pierna. Una de las formas más pronunciadas de aterosclerosis es la aterosclerosis de Mönckeberg. Los términos “aterosclerosis de Mönckeberg”, “aterosclerosis de Monckeberg” y “esclerosis calcificante de la media” pueden usarse de manera intercambiable. La aterosclerosis de Mönckeberg es una de las formas más graves de aterosclerosis. En este caso, los vasos se endurecen a medida que se forman depósitos de calcio en la capa media de las paredes de vasos de tamaño medio (túnica media). Tal como se usa en el presente documento, la aterosclerosis también puede incluir calcifilaxis, un grave síndrome de calcificación vascular, trombosis y necrosis de la piel.

En una realización preferida, el fluido es un líquido corporal artificial y/o una disolución de infusión.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “líquido corporal artificial” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier complemento para cualquier líquido corporal conocido en la técnica. A modo de ejemplo, puede ser un sustituto sanguíneo, un sustituto del plasma o un sustituto sanguíneo del suero. A modo de ejemplo, un sustituto sanguíneo puede comprender pero puede no limitarse a un sustituto sanguíneo basado en perfluorocarbono (por ejemplo, Oxygent (Alliance Pharmaceuticals), Oxycyte (Oxygen Biotherapeutics), PHER-O2 (Sanguine Corp), Perftoran), un sustituto sanguíneo basado en hemoglobina (por ejemplo, Hemopure (Biopure Corp), Oxyglobin (Biopure Corp), PolyHeme (Northfield Laboratories), Hemospan (Sangart), dextrano-hemoglobina (Dextro-Sang Corp), Hemotech (HemoBiotech)), Fluorasol-DA, HemAssist (Baxter International) o Hemolink (Hemosol, Inc.). Además, un sustituto sanguíneo puede obtenerse de células madre, en el que las células madre son preferiblemente células madre embrionarias no humanas. Además, pueden usarse dendrímeros, micelas biodegradables, sangre placentaria de cordón umbilical o hemeritina para obtener un sustituto sanguíneo.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “disolución de infusión” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier disolución adecuada para infusión conocida en la técnica. A modo de ejemplo, una disolución de infusión puede ser una disolución electrolítica isotónica, solución salina isotónica, disolución electrolítica completa isotónica, disolución de glucosa, solución de Ringer o una disolución coloidal. Se entenderá que una disolución de infusión puede portar además uno o más agente(s) farmacéuticamente activo(s), uno o más portador(es) o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). En general, la disolución de infusión puede comprender cualquier componente farmacéuticamente aceptable, puede estar cargada o no cargada, ser polar o apolar, una molécula pequeña o de alto peso molecular.

Se entenderá que un líquido corporal artificial o una disolución de infusión puede comprender o no cualquier inhibidor o promotor de la calcificación conocidos en la técnica. Puede comprender dicho(s) inhibidor(es) o promotor(es) de la calcificación naturalmente o dicho(s) inhibidor(es) o promotor(es) de calcificación pueden añadirse a tal líquido corporal artificial o disolución de infusión. Normalmente, el fluido técnico puede comprender cualquier inhibidor de la calcificación conocido en la técnica. A modo de ejemplo, tal inhibidor de la calcificación puede ser un polipéptido de fetuína (por ejemplo, fetuína-A) y albúmina (por ejemplo, albúmina sérica), un agente quelante tal como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un intercambiador catiónico inmovilizado o un quelante de fosfato (por ejemplo, hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alucaps), carbonato de calcio (por ejemplo, Calcichew, Titalac), acetato de calcio (por ejemplo, Phosex, PhosLo), carbonato de lantano (Fosrenol), sevelámero (por ejemplo, Renagel, Renvela), acetato de calcio/carbonato de magnesio (por ejemplo, Renepho, OsvaRen)).

En otra realización preferida, el fluido es un fluido técnico, preferiblemente en el que dicho fluido es un fluido acuoso, en particular en el que dicho fluido es un fluido de proceso industrial, un fluido que comprende un agente para el lavado de ropa o un agente para el lavado de la vajilla, un agua jabonosa, un baño de ducha, un aditivo para el baño, un fluido refrigerante, un artículo comestible o que pretende usarse para la producción de un artículo comestible.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fluido técnico” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier fluido que puede usarse en el contexto de instalaciones industriales, la producción de artículos comestibles y/o fines domésticos. Un uso en una instalación industrial puede ser, por ejemplo, el uso como fluido de proceso industrial, como limpiador de uso general, como aditivo para agua (por ejemplo, como ablandador de agua) o como agente refrigerante. Un uso para la producción de artículos comestibles puede comprender cocción, horneado, tostado, fritura, condensación, espesamiento, conservación, secado, secado por congelación, infusión, destilación. Un artículo comestible puede comprender, pero puede no limitarse a una bebida (por ejemplo, agua, zumo, limonada, una bebida obtenida mediante infusión (por ejemplo, café, té), una bebida instantánea (por ejemplo, café instantáneo, té instantáneo), leche, cerveza, vino, licor, licor fuerte), producto alimenticio (por ejemplo, productos de panadería (por ejemplo, pan, tarta, galletas), dulces, fruta, un alimento instantáneo (por ejemplo, sopa de sobre). Un fluido para fines domésticos puede ser a modo de ejemplo un agente para el lavado de ropa, un agente para el lavado de la vajilla, un agua jabonosa, un baño de ducha, un agente de limpieza de inodoros, un ablandador, un agente de aclarado, un agente de impregnación, un limpiador de cuartos de baño, un limpiador de uso general, un aditivo para agua (por ejemplo, un ablandador de agua) o un aditivo para el baño.

El fluido técnico puede comprender o no detergentes y puede usarse o no para limpiar la ropa, los platos u otros artículos domésticos. Además, el fluido también puede ser un agente de limpieza doméstico, un agente de limpieza de retretes, un agente de limpieza de acuarios o cualquier aditivo para agua conocido en la técnica que impide o fomenta la calcificación. Alternativamente, el fluido técnico puede usarse en el contexto de una instalación industrial. Normalmente, el fluido técnico pretende evitar la calcificación en forma de residuos que comprenden sal de calcio en forma o bien líquida o bien secada. Esto puede ser de particular importancia cuando se usan tuberías o tubos delgados. Además, esto puede ser de particular importancia cuando se usa agua que porta un alto grado de dureza.

El método de la presente invención puede realizarse a una temperatura variable, siguiendo un perfil de temperatura particular o a una temperatura constante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fluido de proceso industrial” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier fluido usado en cualquier proceso industrial que puede portar una propensión a la calcificación. Preferiblemente, el fluido de proceso industrial puede ser agua de proceso industrial. Tal como se usa en el presente documento, los términos “agua de proceso industrial”, “agua industrial”, “agua de proceso” “agua de servicio” y “agua de procesamiento” pueden entenderse de manera intercambiable. A modo de ejemplo, un fluido de proceso industrial puede usarse como fluido refrigerante, como fluido de limpieza, para desalación o como fluido usado en una turbina (por ejemplo, una turbina de vapor).

Se entenderá que un fluido técnico puede comprender o no cualquier inhibidor o promotor de la calcificación conocido en la técnica. Puede comprender dicho(s) inhibidor(es) o promotor(es) de la calcificación naturalmente o dicho(s) inhibidor(es) o promotor(es) de calcificación puede(n) añadirse a tal fluido técnico. Normalmente, el fluido técnico puede comprender cualquier inhibidor de la calcificación conocido en la técnica. A modo de ejemplo, tal inhibidor de la calcificación puede ser un polipéptido de fetuína (por ejemplo, fetuína-A) y albúmina (por ejemplo, albúmina sérica), un agente quelante tal como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un intercambiador catiónico inmovilizado o un quelante de fosfato (por ejemplo, hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alucaps), carbonato de calcio (por ejemplo, Calcichew, Titalac), acetato de calcio (por ejemplo, Phosex, PhosLo), carbonato de lantano (Fosrenol), sevelámero (por ejemplo, Renagel, Renvela), acetato de calcio/carbonato de magnesio (por ejemplo, Renepho, OsvaRen)).

En una realización preferida, dicho método se realiza a una temperatura constante y/o a un pH constante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “constante” significa que la temperatura permanece en gran medida igual durante la etapa (iii) del método de la presente invención. Lo más preferiblemente, la diferencia en

temperatura entre muestras que van a compararse entre sí debe ser de menos de 5°C, menos de 4°C, menos de 3°C, menos de 2°C, menos de 1°C, menos de 0,5°C, menos de 0,25°C o incluso menos de 0,1°C. Preferiblemente, la temperatura constante puede estar en el intervalo de desde 0°C hasta 100°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 0°C hasta 45°C, incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 4°C hasta 42°C, incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 20°C hasta 40°C, incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 36°C hasta 38°C, incluso más preferiblemente en el intervalo de desde 36,0°C hasta 37,5°C y lo más preferiblemente en el intervalo de desde 36,5°C hasta 37,0°C. Opcionalmente, el dispositivo usado puede comprender un sensor de temperatura.

Tal como se usa en el presente documento, el pH (*potentia hydrogenii*) puede entenderse tal como se entiende comúnmente en la técnica, es decir, como el logaritmo decimal negativo de la actividad de ion de hidrógeno en un fluido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “constante” significa que el pH permanece en gran medida igual durante la etapa (iii) del método de la presente invención. Lo más preferiblemente, la diferencia en pH entre muestras que van a compararse entre sí debe ser de menos de 3 unidades de pH, menos de 2 unidades de pH, menos de 1 unidad de pH, menos de 0,8 unidades de pH, menos de 0,6 unidades de pH, menos de 0,4 unidades de pH, menos de 0,2 unidades de pH, menos de 0,1 unidades de pH o menos de 0,05 unidades de pH. El pH puede ajustarse a cualquier pH. Preferiblemente, el pH puede ser un pH en gran medida neutro, es decir, entre pH 5,5 y pH 8,0, más preferiblemente entre pH 6,0 y pH 8,0, incluso más preferiblemente entre pH 6,5 y pH 7,8, incluso más preferiblemente entre pH 7,2 y pH 7,6, lo más preferiblemente a un pH fisiológico, es decir a un pH de aproximadamente pH 7,4.

Tal como se mencionó anteriormente, la muestra es preferiblemente una muestra de fluido. El método puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado para realizar el método de la presente invención. Se entenderá que la elección del portador dependerá del método específico. A modo de ejemplo, el método puede realizarse usando una o más cubeta(s), usando uno o más portaobjeto(s) microscópico(s), usando un formato de múltiples pocillos, usando una micromatriz, usando uno o más tubo(s) de reacción de plástico, usando uno o más vial(es) de vidrio, usando una columna cromatográfica, usando una jeringa, usando una aguja o usando una combinación de dos o más de los mismos. Se entenderá que la superficie del dispositivo usado no debe interferir o casi no hacerlo en el método, por tanto, en particular en la propensión a la calcificación.

En una realización preferida, el método se realiza en uno de los siguientes:

(a) un formato de múltiples pocillos, más preferiblemente en una placa de cámara de 8 pocillos, en una placa de cámara de 16 pocillos, en una placa de microtitulación de 96 pocillos o en una placa de microtitulación de 384 pocillos, en particular en una placa de microtitulación de 96 pocillos;

(b) una celda de flujo directo; o

(c) un dispositivo microfluídico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “celda de flujo directo” puede entenderse en el sentido más amplio como un dispositivo en el que la muestra del líquido corporal se conduce a su través, en el que se determina la propensión a la calcificación. En el presente documento, el flujo puede ser un flujo estacionario o puede interrumpirse para la medición.

Los datos obtenidos del método de la presente invención pueden analizarse manualmente, de manera semiautomática o de manera automática.

En general, el método puede realizarse fuera de línea o en línea.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fuera de línea” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método en el que se proporciona una muestra de líquido corporal en una primera etapa (por ejemplo, el cuerpo del paciente, una muestra conservada o una muestra de un fluido técnico) y las etapas (i) a (iii) del método de la presente invención se realizan posteriormente. Entonces, el método se realiza de manera discontinua. A modo de ejemplo, la propensión a la calcificación de un líquido corporal obtenido de un paciente en diálisis puede diagnosticarse fuera de línea antes, mientras o después de que se conecte la circulación sanguínea del paciente con la máquina de diálisis. Lo mismo puede aplicarse para una muestra medida fuera de línea antes de usarla en un dispositivo técnico (por ejemplo, un fluido refrigerante usado en un circuito de refrigeración o un agente para el lavado de ropa en una lavadora).

Tal como se usa en el presente documento, el término “en línea” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier método en el que la provisión de la muestra de líquido corporal y las etapas (i) a (iii) del método de la presente invención se realizan en gran medida simultáneamente. Entonces, el líquido corporal se proporciona, se

conduce a través de un dispositivo y se mide simultáneamente. En el presente documento, el flujo puede ser un flujo estacionario o puede interrumpirse para la medición. Opcionalmente, el líquido corporal se extrae directamente de un paciente. Opcionalmente, el líquido corporal analizado o una fracción del mismo se conduce de vuelta al cuerpo del paciente. Un dispositivo en línea puede incorporarse incluso opcionalmente en el cuerpo del paciente. Lo mismo puede aplicarse para una muestra medida en línea de un dispositivo técnico (por ejemplo, un circuito de refrigeración). Normalmente, una medición en línea es una medición a lo largo del tiempo. A modo de ejemplo, la propensión a la calcificación de un líquido corporal obtenido de un paciente en diálisis puede diagnosticarse en línea cuando se conecta la circulación sanguínea del paciente con la máquina de diálisis. El método de la presente invención puede realizarse entonces de manera automática o semiautomática. La máquina de diálisis puede comprender incluso un dispositivo que realiza el método de la presente invención como una unidad intrínseca o como un complemento.

La medición puede realizarse a lo largo del tiempo o puede ser una medición en el punto final. Preferiblemente, la medición es una medición a lo largo del tiempo.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “a lo largo del tiempo” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier medición, en la que se realizan mediciones en una muestra en diferentes puntos de tiempo. Una medición a lo largo del tiempo también puede designarse como una medición cinética. A modo de ejemplo, la medición a lo largo del tiempo puede ser nefelometría cinética. El experto en la técnica se dará cuenta de que el intervalo de tiempo elegido entre dos mediciones dependerá normalmente de la tasa de formación y/o redistribución de partículas. Para determinar la rápida formación y/o redistribución de partículas el experto en la técnica elegirá normalmente cortos intervalos de tiempo, mientras que normalmente elegirá intervalos de tiempo más largos para procesos más lentos. Los intervalos de tiempo pueden estar normalmente en el intervalo de unos cuantos minutos hasta varias horas. Tal como se mencionó anteriormente, la tasa dependerá normalmente de las concentraciones y diluciones insertadas. A modo de ejemplo, puede realizarse una medición a lo largo de un tiempo total de varios segundos, varios minutos, varias horas, varios días o incluso varias semanas. Preferiblemente, en el contexto de la medición a lo largo del tiempo, la medición se inicia justo después de añadirse el calcio y/o fosfato. Siempre que el reactivo sea constante, la tasa de cambio puede considerarse como directamente relacionada con la cantidad de la propensión del líquido corporal a la calcificación. Para detectar también las partículas grandes, que pueden haber sedimentado en el fondo de la muestra, opcionalmente puede agitarse o mezclarse la muestra antes de cada medición.

Tal como se usa en el presente documento, el término “punto final” puede entenderse en el sentido más amplio como una medición en un punto de tiempo en el que la formación o redistribución en tamaño de las PCP se completa en gran medida y no cambia o casi no cambia nada más. Para detectar también las partículas grandes, que pueden haber sedimentado en el fondo de la muestra, opcionalmente puede agitarse o mezclarse la muestra antes de la medición.

El método de la presente invención puede realizarse mediante cualquier principio adecuado para este método conocido en la técnica. La etapa de determinar la tasa de transición de la transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente tal método se basa en la detección del tamaño promedio o la masa promedio de las partículas presentes en la muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dispositivo microfluídico” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier herramienta de diagnóstico miniaturizada. El dispositivo microfluídico puede ser cualquier dispositivo microfluídico conocido en la técnica adecuado en el contexto de la presente invención. La micromatriz también puede entenderse como un laboratorio en un chip. Normalmente, el dispositivo microfluídico será una matriz bidimensional sobre un sustrato sólido tal como, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio, un portaobjetos de cerámica, un portaobjetos de metal, una celda de película delgada de silicio, un portaobjetos de plástico o un formato de disco compacto (CD). Para permitir el método óptico de la presente invención, al menos una parte del dispositivo microfluídico puede ser preferiblemente permeable a la luz usada para el método de la presente invención. El dispositivo microfluídico puede comprender una o más cámara(s) o canal(es) microfluídico(s). Estos canales también pueden usarse para mezclar la muestra. En un dispositivo microfluídico, pueden acelerarse uno o ambos de los procesos de formación de PCP primarias y/o secundarias y la transición de PCP primarias a PCP secundarias. El dispositivo microfluídico también puede ser una celda de flujo directo. Un dispositivo microfluídico también puede ser una varilla de inmersión médica de diagnóstico, en particular en el contexto de orina como fluido.

El método puede realizarse manualmente, de manera semiautomatizada o automatizada.

En una realización preferida, al menos la etapa de determinar una o más de la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias, la cantidad de PCP primarias y/o secundarias y/o la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapa (iii)) está automatizada, más preferiblemente al menos la etapa de incubar dicha muestra en condiciones que permiten la formación de partículas de calpoteína (PCP) y la etapa de determinar la tasa de transición de la transición de PCP primarias a PCP secundarias (etapas (ii) y (iii)) están automatizadas, en particular todas las etapas (i), (ii) y (iii) están automatizadas.

5 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, los términos “automatizado” y “automático” pueden entenderse de manera intercambiable en el sentido más amplio como el uso de cualquier sistema de control y/o tecnología de la información, en particular proceso asistido por ordenador, para reducir la necesidad de trabajo humano en el método. A modo de ejemplo, automatización tal como se usa en el presente documento puede comprender el uso de pipetas automáticas y/o métodos de lectura asistidos por ordenador. Opcionalmente, automatización puede incluir incluso diseño experimental asistido por ordenador y/o análisis asistido por ordenador de los datos obtenidos. También puede incluirse la presentación gráfica de los resultados obtenidos.

En una realización preferida, las PCP primarias tienen un diámetro promedio menor de 100 nm y las PCP secundarias tienen un diámetro promedio de mayor de 100 nm.

10 Más preferiblemente, el tamaño de PCP primarias está en el intervalo de entre 50 nm y 100 nm, lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 60 nm a 75 nm. Las PCP secundarias pueden tener más preferiblemente un tamaño en el intervalo de entre 100 nm y 500 nm, lo más normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 nm a 200 nm. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente un experto en la técnica entenderá que el tamaño de las PCP primarias así como el tamaño de las PCP secundarias dependerán normalmente de las concentraciones y condiciones específicas usadas en el método.

La tasa de transición de la transición de PCP primarias a PCP secundarias determinada para el líquido corporal puede analizarse comparando diferentes muestras de líquido corporal entre sí o pueden compararse con una o más muestra(s) de calibración.

20 En el método de la invención, una o más de determinar la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias (a), determinar la cantidad de PCP primarias y/o secundarias (b) y/o determinar la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (c) etapa (iii) se compara(n) con una o más muestra(s) de control.

25 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “muestra de control” puede entenderse en el sentido más amplio como cualquier muestra que puede usarse como muestra de referencia. Tal como se usa en el presente documento, los términos “muestra de control” y “muestra de calibración” pueden entenderse de manera intercambiable. La muestra de control puede ser una muestra normalizada (por ejemplo, una muestra con propiedades conocidas) o puede ser un control intrínseco, es decir, una de las muestras sometidas a prueba. Normalmente, en condiciones de reacción en gran medida idénticas (por ejemplo, medidas en gran medida a la misma temperatura, en gran medida en el mismo tampón, en gran medida al mismo pH, en gran medida con las mismas concentraciones de sal de calcio soluble y sal de fosfato soluble) y el empleo de un método en gran medida idéntico, la muestra de control también mostrará resultados en gran medida idénticos. La propensión a la calcificación de la(s) muestra(s) en cuestión y la(s) muestra(s) de control puede medirse concomitantemente en un ensayo (por ejemplo, en una placa de microtitulación o sobre o en un dispositivo microfluídico), puede medirse posteriormente el mismo día (por ejemplo, en una cubeta) o puede medirse incluso en diferentes días (por ejemplo, el dispositivo usado para determinar la propensión a la calcificación se ha calibrado mediante una muestra de control o se calibra mediante una muestra de control después de eso).

35 El uso de una muestra de control puede conducir a la normalización de la medición y, por tanto, vuelve el método independiente del dispositivo ya que los resultados obtenidos se comparan con y se refieren a esta muestra de control en el dispositivo en el que también se lleva a cabo la medición. Entonces pueden cuantificarse los cambios como cambios con relación a la muestra de control. La(s) muestra(s) de calibración puede(n) comprender uno o más líquido(s) corporal(es) o puede(n) ser una muestra artificial. Opcionalmente, una muestra artificial puede portar una concentración definida de inhibidores de la transición de PCP primarias a PCP secundarias tales como, por ejemplo, un polipéptido de fetuína (por ejemplo, fetuína-A) o un polipéptido de albúmina (por ejemplo, albúmina sérica).

45 Cuando el fluido es un líquido corporal, la muestra de control en el contexto de la presente invención puede ser preferiblemente una muestra obtenida de un paciente sano. Cuando el fluido es un fluido técnico, un líquido corporal artificial o una disolución de infusión, la muestra de control en el contexto de la presente invención puede ser preferiblemente una muestra que porta una propensión a la calcificación aceptable. En caso de que la propensión a la calcificación sea considerablemente mayor que la obtenida para la muestra de control, esto puede indicar que la propensión a la calcificación es indeseablemente alta y que pueden desearse opcionalmente acciones adicionales (por ejemplo, la administración o el uso de inhibidores de la calcificación). En caso de que la propensión a la calcificación sea considerablemente menor que la obtenida para la muestra de control, esto puede indicar que la propensión a la calcificación es indeseablemente baja y que pueden desearse opcionalmente acciones adicionales (por ejemplo, la administración o el uso de promotores de la calcificación, calcio y/o fosfato).

Los datos obtenidos de cualquier método de la presente invención pueden analizarse mediante cualquier medida conocida en la técnica.

55 En una realización preferida, determinar la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias (c) de la etapa (iii) se determina determinando el punto de tiempo del tiempo de transición mitad del máximo (T_{50}) de la transición de

PCP primarias a PCP secundarias.

5 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “tiempo de transición mitad del máximo” o “ T_{50} ” puede entenderse en el sentido más amplio como el punto de tiempo en el que se logra la mitad de la transición (50% de la transición) de PCP primarias a PCP secundarias. La dimensión de la T_{50} es el tiempo, por tanto, dado en la unidad segundo (s o sec), minuto (min), hora (h), día (d), semana (sem), mes o año (a). Lo más normalmente, la T_{50} se dará en minutos.

10 El valor de T_{50} puede determinarse representando gráficamente la dispersión de luz medida de la muestra (por ejemplo, en unidades nefelométricas relativas (RNU)) frente al tiempo (por ejemplo, en [min]), a modo de ejemplo representando gráficamente una gráfica XY (remítase a la figura 1B.). Los datos representados gráficamente pueden ajustarse mediante una regresión no lineal (por ejemplo, en una pendiente variable de log(agonista) frente a la respuesta). Entonces, se determina la dispersión de luz en la muestra en la que sólo están presentes PCP primarias así como la dispersión de luz en la muestra en la que sólo están presentes PCP secundarias. Se calcula la media aritmética entre las dispersiones de luz. Finalmente, se determina el punto de tiempo (T_{50}) en que la dispersión de luz global representa tal media aritmética. En este contexto, el valor de T_{50} también puede designarse como valor de $RNU_{T_{50}}$.

20 El método de la presente invención puede comprender opcionalmente además el cálculo del radio hidrodinámico (Rh) a partir de los ajustes acumulados de segundo orden mediante la ecuación de Stokes-Einstein bien conocida en la técnica. Entonces, también puede determinarse el valor de T_{50} representando gráficamente los tamaños de diámetro promedio determinados de las PCP en la muestra (por ejemplo, en [nm]) frente al tiempo (por ejemplo, en [min]), a modo de ejemplo representando gráficamente una gráfica XY (remítase a la figura 1A). Los datos representados gráficamente pueden ajustarse mediante una regresión no lineal (por ejemplo, en una pendiente variable de log(agonista) frente a la respuesta). Entonces, se determinan el tamaño de partícula promedio de las PCP primarias y el tamaño de partícula promedio de las PCP secundarias. Se calcula la media aritmética entre el tamaño de partícula promedio de las PCP primarias y el tamaño de partícula promedio de las PCP secundarias. Finalmente, se determina el punto de tiempo (T_{50}) en el que el tamaño de partícula promedio de todas las PCP representa tal media aritmética.

30 La representación gráfica de los datos, el ajuste de los datos y/o el cálculo del/de los valor(es) de la T_{50} (o $RNU_{T_{50}}$), pueden realizarse manualmente o pueden realizarse mediante un método asistido por ordenador. El método asistido por ordenador puede realizarse mediante cualquier programa adecuado, por ejemplo, mediante Excel[®] y/o GraphPad Prism[®].

35 El método de la presente invención puede usarse para fines científicos, industriales y/o clínicos. A modo de ejemplo, puede usarse para obtener más información sobre la interacción entre predisposición congénita y/o adquirida de la propensión a la calcificación en un paciente. Además, el método también puede usarse para identificar y caracterizar inhibidores y promotores de la calcificación. El método puede usarse incluso para el examen primario y/o secundario de compuestos para determinar su influencia sobre la calcificación. Este examen puede ser un examen libre de células y opcionalmente un examen de alto rendimiento.

40 En el contexto de identificar y caracterizar inhibidores y promotores de la calcificación, puede administrarse un inhibidor o promotor a un paciente o puede mezclarse en el líquido corporal *in vitro*. Cuando el inhibidor o promotor puede administrarse a un paciente, entonces, después de un determinado tiempo, se obtiene una muestra de dicho paciente y se somete a prueba mediante el método de la presente invención. Cuando el inhibidor o promotor se mezcla con el líquido corporal *in vitro*, entonces la muestra se incuba durante un determinado tiempo después de mezclar el inhibidor o promotor y, posteriormente, se lleva a cabo el método de la presente invención.

45 El método de la presente invención puede servir para identificar inhibidores y promotores de la calcificación desconocidos y para someter a prueba inhibidores y promotores de la calcificación ya conocidos y caracterizarlos en más detalle. Además, puede investigarse la interacción entre uno o más inhibidor(es) y/o uno o más promotor(es) diferentes. El/los inhibidor(es) y promotor(es) puede(n) ser compuesto(s) activo(s) en un paciente o en un producto médico o composición (por ejemplo, una conservación de sangre, en la superficie de un dispositivo médico). Alternativamente, el/los inhibidor(es) y promotor(es) también puede(n) ser compuesto(s) activo(s) en un contexto distinto al médico. A modo de ejemplo, puede(n) usarse inhibidor(es) de la calcificación en bienes de consumo (por ejemplo, agentes para el lavado de ropa, agentes para el lavado de la vajilla, agentes de limpieza domésticos, agentes de limpieza de inodoros, agentes de limpieza de acuarios, etc.) y aditivo(s) para agua.

55 Además, el método de la presente invención también puede usarse para determinar el riesgo de un paciente de desarrollar calcificación. Entonces, el doctor y/o personal médico pueden obtener más información sobre si y cómo debe tratarse al paciente con inhibidores de la calcificación, por tanto, pueden tomar decisiones informadas sobre la terapia.

Las siguientes figuras y ejemplos pretenden ilustrar la invención pero no limitar el alcance de protección conferido

por las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Detección de la transición de las PCP. (A) Detección mediante 3D-DLS de la transición de las PCP en presencia de fetuína-A y suero humano. (B) Detección mediante nefelometría de la transición de las PCP en presencia de suero humano. (C) Aspecto visual macroscópico de las disoluciones de suero que contenían PCP en disolución del ensayo en nefelómetro convencional (arriba) y después de centrifugación brusca de las disoluciones (abajo). Se realizó el experimento a 37°C en viales para fotometría convencional y con las mismas disoluciones usadas en las proporciones respectivas que en el ensayo en nefelómetro final.

10 Figura 2. Determinación de las condiciones de ensayo en nefelómetro. (A) Impacto de concentraciones variables de calcio y fosfato. Finalmente se eligieron calcio 10 mM y fosfato 6 mM como concentraciones convencionales para el ensayo. (B) Dependencia con la temperatura del pH. Se calentaron disoluciones de calcio o fosfato tamponadas mediante Hepes o Tris desde temperatura ambiente hasta 40°C y se registraron los valores de pH. Se eligió el tampón Hepes menos sensible a la temperatura para el ensayo. (C) Impacto del pH. Se sometieron a prueba disoluciones de calcio y fosfato ajustadas a valores de pH de desde 7,1 hasta 7,6. Se eligió un pH de 7,40 a 37°C para el ensayo. (D) Impacto de la cantidad de suero. Se sometieron a prueba cantidades de suero de desde 60 µl hasta 100 µl (reponiendo con NaCl 140 mM el volumen que se pierde hasta una cantidad 200 µl en todos los viales), y finalmente se eligieron 80 µl de suero para el ensayo.

20 Figura 3. Condiciones de ensayo en nefelómetro. (A) Resultados del ensayo cuando se realiza con suero reunido de voluntarios sanos con el instrumento Nephelostar® que se ejecuta a temperatura ambiente y el radiador interno fijado a 37°C. (B) Resultados del ensayo cuando se realiza con suero reunido de voluntarios sanos con el radiador del instrumento Nephelostar® apagado y el ensayo se ejecuta en una sala de temperatura controlada fijada a 34,5°C. La temperatura de medición resultante dentro del compartimento de soporte de placas del instrumento Nephelostar® en estas condiciones fue de 36,5 a 37°C.

25 Figura 4. Ensayo en nefelómetro en modelos animales de calcificación. (A) Radiografías representativas ilustrativas de ratones de 10 a 16 semanas de edad dba2 deficientes en fetuína-A (-/-) y de tipo natural (+/+) ratones que muestran calcificaciones patológicas excesivas de ratones deficientes en fetuína-A. Los ratones heterocigotos tienen el mismo fenotipo que los ratones de tipo natural. (B) Discriminación de sueros de ratón de tipo natural (wt), heterocigotos (het) y deficientes (ko). (C) Resultados de ensayo en nefelómetro realizados con suero de ratones deficientes en fetuína-A, heterocigotos y de tipo natural. (D) Histología representativa ilustrativa de aortas de ratas de 16 semanas de edad urémicas tratadas con adenina con calcificaciones del vaso medio (tinción con alizarina para calcio), y sanas sin calcificaciones. (E) Comparación entre muestras de animales urémicos y no urémicos. (F) Ensayo de nefelometría con sueros de 20 pacientes en hemodiálisis (en negro) y 20 voluntarios sanos (en gris).

35 Figura 5. Caracterización de partículas, aspecto microscópico y composición molecular de las PCP. (A) Microscopía electrónica de barrido (SEM) (izquierda) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (derecha) de PCP primarias. (B) SEM (izquierda) y TEM (derecha) de PCP secundarias. (C) Tinción con azul de Coomassie del contenido proteico de las PCP primarias y secundarias (izquierda) e inmunotransferencias de tipo Western de albúmina y fetuína-A de PCP primarias y secundarias (derecha). (D) Desaparición de fosfato de la disolución tras la formación de las PCP.

40 Figura 6. Dependencia del ensayo de componentes del suero añadidos de manera conocida. (A) Nefelometría en ausencia de suero: sólo con la adición de manera conocida de fetuína A, el inhibidor de la calcificación en suero intrínseco más fuerte influye significativamente en el ensayo. (B) Nefelometría en presencia de suero: todas las sustancias añadidas de manera conocida influyen en el ensayo. (C) Presentación alternativa de los datos mostrados en B. Las concentraciones de sustancias usadas en (A) y (B) fueron las mismas facilitadas en la leyenda de (C).

45 Figura 7. Correlación de unidades nefelométricas relativas mitad del máximo (RNU₅₀) y T₅₀ con las concentraciones en suero de fetuína-A. Se midieron las concentraciones de fetuína-A medida en sueros obtenidos de 20 pacientes en hemodiálisis y se representaron gráficamente frente a los valores de RNU₅₀ y T₅₀ obtenidos del ensayo de la presente invención. Las concentraciones de fetuína-A se correlacionaron altamente con (A) RNU₅₀ (p = 0,0006) y (B) T₅₀ (p = 0,0413). Los sueros de paciente fueron los mismos usados para el experimento mostrado en la figura 4F. Se midieron las concentraciones en suero de fetuína-A mediante ELISA tal como se describe por Ketteler M, *et al.* (Kettler *et al.*, 2003).

Ejemplos

Métodos

Muestreo y preparación de muestras de suero

Se extrajo sangre venosa de ocho voluntarios sanos en viales Monovette® de Sarstedt. Después de coagulación durante 30 min, se centrifugaron las muestras a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se reunió suero de todos los individuos y se tomaron alícuotas. Se muestreó sangre de ratones de 10 a 16 semanas de edad DBA/2 deficientes en fetuína-A, heterocigotos y de tipo natural (Schäfer *et al.*, 2003; Jahnen-Dechent *et al.*, 1997), del corazón en el momento del sacrificio.

Se extrajo sangre de ratas Wistar macho (Charles River, Sulzfeld, Alemania), que habían recibido alimentos complementados con el 0,75% de adenina y el 1,05% de calcio, el 0,8% de fósforo, el 18,5% de proteína durante cuatro semanas para inducir uremia y calcificaciones vasculares, en el sacrificio a la edad de 16 semanas de la vena cava inferior (Pasch *et al.*, 2008). Asimismo, se extrajo sangre de control de ratas sanas, no urémicas, sin calcificaciones de igual edad y sexo, que se habían tratado con tiosulfato de sodio (0,4 g/kg de peso corporal) en solución salina normal (al 0,9%) por vía i.p. tres veces a la semana durante 6 semanas. Cabe destacar que el tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) no tuvo ningún impacto sobre el ensayo cuando se añadió de manera conocida al suero en cantidades de hasta 40 mM.

Después de coagulación a temperatura ambiente, se centrifugaron muestras de sangre de seres humanos, ratones o ratas a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el suero de las células sanguíneas. Se congeló bruscamente el suero en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Antes de su uso en el ensayo en nefelómetro, se descongelaron las muestras, y se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 min a temperatura ambiente para retirar partículas pequeñas potenciales que podrían haberse formado durante la congelación y descongelación de las muestras (crioprecipitados) y que podrían interferir en el ensayo al proporcionar nidos acelerantes de la precipitación.

Dispositivos, materiales de plástico y productos químicos

Se adquirió el nefelómetro Nephelostar® de bmg labtech, Offenburg, Alemania, el sistema de pipeteo de mesa Liquidator96™ de Mettler Toledo GmbH, Giessen, Alemania. Las placas de 96 pocillos eran de Brand GmbH, Wertheim, Alemania, y las cubiertas de plástico de 96 pocillos de Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania. Se adquirieron todos los productos químicos (por ejemplo, NaCl, Hepes, CaCl₂, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ y NaOH) de AppliChem, Darmstadt, Alemania, en calidad de grado "pro analysi".

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas en disoluciones, se usó el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce según las instrucciones del fabricante. Se usó BSA (2 mg/ml, Pierce) como patrón. Se realizaron inmunotransferencias de tipo Western según protocolos convencionales con SDS-PAGE (al 4%-12%), con 1 mg de proteína o 0,4 mg de fetuína-A o albúmina puras cargados por carril. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios contra fetuína-A y albúmina: antisuero 5359 policlonal de conejo anti-fetuína-A humana (Behring AG, Marburgo, Alemania) y anticuerpo de ratón anti-albúmina humana (1:2500, número de catálogo 0300-0080; AbD Serotec). Para la detección mediante fluorescencia, se usaron los siguientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa del rábano: anticuerpo de cerdo anti-IgG de conejo (1:5000, número de catálogo P0217; Dako) y anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (1:2000, número de catálogo P0260; Dako). Se realizaron tinciones de proteínas con la tinción de proteínas Imperial según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific); se cargaron 6,0 mg de proteína total o 2,5 mg de fetuína-A o albúmina puras por carril.

Dispersión dinámica de luz por correlación cruzada tridimensional (3D-DLS)

La dispersión múltiple en disoluciones con alta densidad de partículas impide la caracterización mediante métodos de dispersión dinámica de luz convencionales. Por tanto, se usó una configuración de dispersión dinámica de luz por correlación cruzada 3D (3D-DLS) para el análisis de muestras de PCP turbias. Se realizaron 50-52 mediciones usando un dispositivo de dispersión de luz convencional (ALV GmbH, Langen, Alemania) con láser de He-Ne (JDS Uniphase, Koheras GmbH, 632,8 nm, 25 mW, tipo LGTC 685-35), dos fotodiodos de avalancha (Perkin Elmer, tipo SPCM-AQR-13-FC) y un correlador ALV 5000. Se detectó la luz dispersada en una geometría a 90°. Se ajustó la temperatura de muestra mediante un termostato externo equipado con un sensor de temperatura Pt-100. Se calculó el radio hidrodinámico Rh a partir de ajustes acumulativos de segundo orden mediante la ecuación de Stokes-Einstein. Las mediciones cubrieron un periodo de tiempo de 1400 minutos a intervalos de 2 minutos. Investigaciones previas mediante TEM revelaron que PCP secundarias envejecidas tienen una conformación elipsoide con una razón entre ejes de aproximadamente b/a z 0,3. Por motivos de claridad, se calcularon los radios hidrodinámicos, no los semiejes, para caracterizar las fases de PCP individuales.

Ensayo en nefelómetro

La dispersión dinámica de luz por correlación cruzada tridimensional (3D-DLS) es un método, que detecta dispersión láser en disoluciones e integra estos datos para producir información sobre el desarrollo del tamaño de partícula a lo largo del tiempo.

Disoluciones madre: 1. Disolución de NaCl: NaCl 140 mM, 2. Disolución de calcio: CaCl₂ 40 mM + Hepes 100 mM + NaCl 140 mM, pH ajustado con NaOH 10 mM a 7,40 a 37°C, 3. Disolución de fosfato: Na₂HPO₄ 19,44 mM + NaH₂PO₄ 4,56 mM + Hepes 100 mM + NaCl 140 mM, pH ajustado con NaOH 10 mM a 7,40 a 37°C. Preparación de placas de 96 pocillos: se precalentaron todas las disoluciones hasta 34,5°C en una sala de temperatura constante en la que también se realizaron todas las etapas de pipeteo con el sistema de pipeteo de mesa Liquidator96™ usando un conjunto de nuevas puntas de pipeteo para cada etapa de pipeteo. Se realizaron estas etapas de pipeteo en el siguiente orden: 1. Disolución de NaCl: 20 µl/pocillo, 2. suero 80 µl/pocillo, 3. agitación durante 1 minuto, 4. disolución de fosfato 50 µl/pocillo, 5. agitación durante 1 minuto, 6. disolución de calcio 50 µl/pocillo, agitación durante 1 minuto. Se disgregaron las burbujas de aire en los pocillos con un encendedor de bolsillo y se cubrieron los 96 pocillos con una película de sellado adhesiva ThinSeal™ para microplacas. Como la línea "A" de la placa de 96 pocillos mostró a menudo resultados poco fiables, generalmente se dejó fuera. Condiciones de ensayo y ajustes del instrumento Nephelostar®: medición en una sala de temperatura constante a 34,5°C con la radiación interna del dispositivo apagada. Esto condujo a una temperatura de medición interna de 36,5°C a 37°C. Se hizo funcionar el instrumento Nephelostar® y se controló mediante el software Galaxy del proveedor de Nephelostar en una plataforma informática de Windows. Se realizó el ensayo con 200 ciclos de tiempo de medición de 1,5 segundos por pocillo y un retardo de posición de 0,1 segundos en el modo de lectura de placa horizontal, sumando hasta un tiempo de ciclo de 180 segundos/ciclo para el ensayo convencional. Esto suma un tiempo de ejecución de ensayo total de 10 horas por ensayo. Para algunas mediciones, se extendió el tiempo de ciclo hasta 360 ó 540 segundos, que suma tiempos de ensayo de 20 y 30 horas, respectivamente. Se fijaron la ganancia y el ajuste del láser al valor requerido del 90%, ganancia de 50 con un enfoque de rayo láser de 1,5 mm y una intensidad del láser del 50%.

Procesamiento de datos

Después de completarse la ejecución, se transfirieron los datos a Excel® y se transpusieron de líneas a columnas. Se copiaron las columnas de datos en el programa GraphPad Prism® para generar una gráfica XY. Entonces se procesaron los datos calculando una regresión no lineal en el modo "pendiente variable de log(agonista) frente a respuesta (cuatro parámetros)" usando el método de ajuste de "ajuste robusto". Se procesaron adicionalmente los valores resultantes obtenidos para T₅₀ y RNU_{T50} según se requiriese.

Resultados

En este caso, se sometió a prueba si también se generarían PCP primarias cuando se usó suero humano en vez de disolución de fetuína-A (figura 1A, parte inferior). En efecto, en ambos casos, se generaron PCP primarias de tamaño comparable (diámetro de aproximadamente 50 nm), que experimentaron transición espontánea a PCP secundarias (diámetro de aproximadamente 150 nm), aunque en el plazo de lapsos de tiempo muy diferentes (figura 1A). Dados estos tiempos de transición tremendamente diferentes, se razonó que el retardo de la transición podría reflejar la estabilidad de las PCP primarias y que la medición de esta etapa podría proporcionar una estimación cuantitativa para la propensión inhibitoria de la calcificación inherente en suero.

Ya que la 3D-DLS no está ampliamente disponible y puede medirse sólo una muestra al día, se tenía como objetivo establecer un ensayo alternativo práctico y de amplia aplicación para la detección de la etapa de transición mencionada. La nefelometría se basa en los mismos principios que la DLS y cuantifica la cantidad de dispersión de luz láser en disoluciones turbias. Por consiguiente, la transición también podía detectarse mediante nefelometría (figura 1B), y cabe destacar que incluso es visible a simple vista (figura 1C).

Para el establecimiento del ensayo basado en nefelometría, se aprovechó el nefelómetro para microplacas basado en láser automatizado Nephelostar® que se hizo funcionar en el modo de placa de 96 pocillos. Se analizaron los datos resultantes usando software Excel® y GraphPad prism® para producir curvas de regresión no lineal y se determinaron los valores resultantes de tiempo de transición mitad del máximo (T₅₀, figura 1A) y de unidades nefelométricas relativas (RNU_{T50}, figura 1B) en este punto en el tiempo.

Se eligieron condiciones fisiológicas para la temperatura (37°C) y el pH (7,40 a 37°C), y se diseñó el ensayo para un volumen final de 200 µl por pocillo. Estos 200 µl consistían en 20 µl de NaCl 140 mM, 80 µl de suero, 50 µl de disolución de fosfato 24 mM y 50 µl de calcio 40 mM que se mezclaron en este orden. Se complementaron las disoluciones de fosfato y calcio con NaCl 140 mM y Hepes 100 mM, se ajustó el pH a 7,40 a 37°C. Esta mezcla dio como resultado las concentraciones finales representadas a continuación:

Ca²⁺: 10 mM

PO₄²⁻: 6 mM

NaCl: 140 mM

Hepes: 50mM

a un pH de 7,40 y 37°C

Se introdujeron los 20 µl de NaCl como un volumen extra utilizable para experimentos de adiciones de manera conocida. Se sometieron a prueba sistemáticamente un amplio intervalo de concentraciones de calcio y fosfato (figura 2A) y se eligieron finalmente concentraciones finales de calcio 10 mM (es decir, 40 mM en la disolución madre) y fosfato 6 mM (es decir, 24 mM en la disolución madre) en este ensayo por tres motivos: (i) la transición se produjo en una posición central en el sistema de coordenadas de tiempo y RNU dejando margen para cambios en todas las direcciones, (ii) estas concentraciones representan la relación numéricamente óptima de calcio y fosfato con respecto a la formación de hidroxapatita, (iii) los experimentos previos que investigaron las PCP se han realizado con estas concentraciones.

Desafortunadamente, los primeros intentos para normalizar el ensayo mostraron una enorme variación incluso dentro de una placa de 96 pocillos dada (figura 3A), indicando que la etapa de transición es un proceso físicoquímico extremadamente sensible, que es sensible a variaciones sutiles en el pH (figura 2C) y las cantidades de suero usadas (figura 2D).

Se logró la estabilización del ensayo (figura 3B) introduciendo tres modificaciones importantes: (i) se estabilizó la temperatura del ensayo ejecutando el ensayo en una sala de temperatura constante especial con el radiador intrínseco del instrumento Nephelostar® apagado, (ii) se estabilizaron los volúmenes de pipeteo usando un dispositivo de pipeteo de 96 pocillos de alta precisión (el instrumento Liquidator96™) en vez de pipetas de múltiples canales, y (iii) se disminuyó la sensibilidad a la temperatura de la prueba usando Hepes en vez del tampón Tris más sensible a la temperatura (figura 2B). En estas condiciones, el ensayo era estable y produjo resultados altamente reproducibles (figura 3B) con una variabilidad intra-día de +/- 5,2% y una variabilidad inter-día de +/- 11,6% en estas medidas.

Para confirmar la correlación entre los resultados del ensayo y calcificaciones *in vivo*, se compararon sueros de ratones deficientes en fetuina-A (ko), heterocigotos (het) y de tipo natural (wt) (figuras 4A, B y C) y se encontró que T₅₀ era más corto en el suero del ratón deficiente (ko), en comparación con ratones heterocigotos y de tipo natural. Se encontró el mismo patrón cuando se comparó suero de ratas urémicas con calcificación y de ratas sanas sin calcificación (figuras 4D y E). En este caso de nuevo la transición (T₅₀) se produjo antes en los animales con calcificación que en aquéllos sin calcificación.

También se sometieron a prueba sueros de voluntarios sanos y pacientes en hemodiálisis. De nuevo, la prueba discriminó los individuos propensos a la calcificación de los no propensos a la calcificación (es decir, los pacientes en hemodiálisis de los voluntarios sanos) (figura 4F), indicando que la prueba refleja propensión a la calcificación en suero.

Estos resultados confirman que el ensayo en nefelómetro presentado en este caso proporciona una estimación de la propensión a la calcificación relacionada con suero intrínseca.

La prueba de la presente invención aumenta la sobresaturación de suero añadiendo Ca (10 mM) y fosfato (6 mM). El efecto específico de la sobresaturación depende de las concentraciones intrínsecas de fetuina-A, albúmina, fosfato etc. en un suero dado. Como regla general, cuanto mayor es la sobresaturación de calcio y fosfato, menor es T₅₀ y mayor es RNU₅₀. Esto se aplica también a sueros de pacientes en HD y voluntarios sanos. RNU₅₀ depende enormemente del contenido en proteínas (fetuina-A, albúmina) de las PCP con cierta contribución de fosfato. T₅₀ depende enormemente de Mg y fosfato con cierta contribución de fetuina-A y albúmina. Un bajo T₅₀ se asocia por tanto a menudo con una alta RNU₅₀ y viceversa. Sin embargo, no puede determinarse una razón de RNU₅₀ con respecto a T₅₀ universal ya que ambas variables dependen de determinantes diferentes, aunque solapantes.

En resumen, se presenta un ensayo basado en nefelómetro, que mide la propensión a la calcificación de un líquido corporal, a modo de ejemplo mostrado en suero sanguíneo. Dada la amplia área de posibles aplicaciones de este ensayo, este método es una herramienta útil para la investigación y elucidación de asuntos relacionados con la biomineralización en investigación clínica así como científica y en diagnóstico *in vivo* y *ex vivo*.

Bibliografía

1. Heiss, A. *et al.* (2003), Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal CPPs, *J Biol Chem* 278, 13333-13341.
2. Heiss, A. *et al.* (2008), Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles, *J Biol Chem* 283, 14815-14825.
3. Jahnen-Dechent, W. *et al.* (1997), Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene, *J Biol Chem* 272, 31496-31503.

4. Jahnen-Dechent, W., Schäfer, C, Heiss, A. y Grotzinger, J. (2001), Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, *Z Kardiol* 90 Supl. 3,47-5.
5. Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Kettler, M. (2011), Fetuin-A Regulation of Calcified Matrix Metabolism, *Circulation Research* 108, 1494-1509.
- 5 6. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J (2003), Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study, *Lancet* 361: 827-833.
7. Pasch, A. *et al.* (2008), Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats, *Kidney Int* 74, 1444-1453.
- 10 8. Reynolds, J.L., *et al.* (2005), Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in Inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification, *J Am Soc Nephrol* 16, 2920-2930
9. Reynolds, J.L., *et al.* (2004), Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD, *J Am Soc Nephrol* 15, 2857-2867.
- 15 10. Schäfer, C. *et al.* (2003), The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, *J Clin Invest* 112, 357-366.
11. Wald, J., *et al.* (2011), Formation and stability kinetics of calcium phosphate-fetuin-A colloidal particles probed by time-resolved dynamic light scattering, *Soft Matter*.
12. Wu, C.Y., Martel, J., Young, D. y Young, J.D. (2009), Fetuin-A/albumin-mineral complexes resembling serum calcium granules and putative nanobacteria: demonstration of a dual inhibition-seeding concept, *PLoS One* 4, e8058.
- 20 13. Young, J.D., *et al.* (2009), Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis, *PLoS One* 4, e4417.
14. Young, J.D., *et al.* (2009), Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One* 4, e5421.
- 25 15. Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S. y Anand, S. (2001), Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization, *Circulation* 104, 2746-2753.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la propensión de un fluido a la calcificación, en el que dicho método se caracteriza por las siguientes etapas:
- (i) añadir una sal de calcio soluble y una sal de fosfato soluble a una muestra de dicho fluido;
- 5 (ii) incubar dicha muestras en condiciones que permiten la formación de partículas de calciproteína (PCP); y
- (iii) determinar una o más de las siguientes:
- (a) la tasa de formación de PCP primarias y/o secundarias;
 - (b) la cantidad de PCP primarias y/o secundarias; y/o
 - (c) la tasa de transición de PCP primarias a PCP secundarias,
- 10 en el que un aumento en una o más de (a), (b) y/o (c) de la etapa (iii) indica una propensión aumentada de dicho fluido a la calcificación, y
- en el que una o más de (a), (b) y/o (c) de la etapa (iii) se compara(n) con una o más muestra(s) de control.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (iii) se realiza mediante un método óptico, en particular un método óptico seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 absorciometría,
- detección de dispersión de luz,
- espectroscopía de correlación,
- o una combinación de dos o más de los mismos.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la luz de excitación usada en el método óptico es un rayo láser.
- 20 4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que el método óptico se realiza mediante la detección de dispersión de luz, preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz, más preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz por correlación cruzada, incluso más preferiblemente mediante dispersión dinámica de luz por correlación cruzada tridimensional, en particular mediante nefelometría.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (iii) se realiza mediante cualquier método seleccionado del grupo que consiste en:
- técnicas de sedimentación,
- análisis por filtración,
- cromatografía de exclusión molecular,
- granulometría,
- 30 espectroscopía acústica,
- o una combinación de dos o más de los mismos.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fluido es un líquido corporal, en particular en el que el fluido es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, linfa y/u orina.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, en el que el fluido es un líquido corporal obtenido de un paciente, preferiblemente en el que dicho paciente ha desarrollado calcificación y/o corre el riesgo de desarrollar calcificación, en particular en el que dicho paciente es un paciente en diálisis.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el paciente padece calcificación vascular, valvular y/o de tejidos

blandos, preferiblemente en el que dicho paciente padece además una enfermedad reumatoide, una enfermedad maligna y/o una enfermedad infecciosa, en particular en el que el paciente muestra al menos uno de los síndromes seleccionados del grupo que consiste en:

disfunción renal,

5 hipertensión,

diabetes mellitus,

dislipidemia,

una falta de mineralización adecuada, en particular osteoporosis y/u osteomalacia, y

aterosclerosis.

10 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fluido es un líquido corporal artificial y/o una disolución de infusión.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método se realiza a una temperatura constante y/o a un pH constante.

15 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho método se realiza en uno de los siguientes:

(a) un formato de múltiples pocillos, más preferiblemente en una placa de cámara de 8 pocillos, en una placa de cámara de 16 pocillos, en una placa de microtitulación de 96 pocillos o en una placa de microtitulación de 384 pocillos, en particular en una placa de microtitulación de 96 pocillos;

(b) una celda de flujo directo; o

20 (c) un dispositivo microfluídico.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que se automatiza al menos la etapa (iii), preferiblemente en el que se automatizan al menos las etapas (ii) y (iii), en particular en el que se automatizan todas las etapas (i), (ii) y (iii).

25 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las PCP primarias tienen un diámetro promedio menor de 100 nm y las PCP secundarias tienen un diámetro promedio de mayor de 100 nm.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que se determina (c) de la etapa (iii) determinando el punto de tiempo de transición mitad del máximo (T_{50}) de la transición de PCP primarias a PCP secundarias.

Fig. 1A

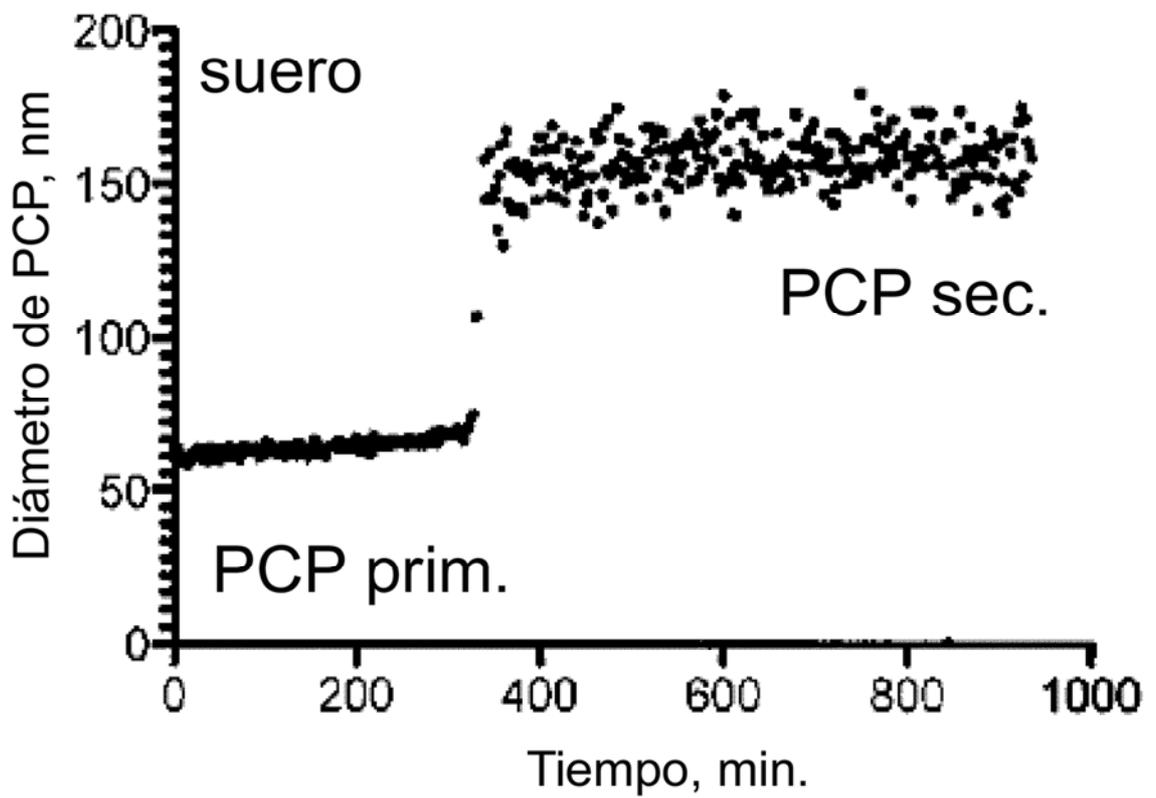
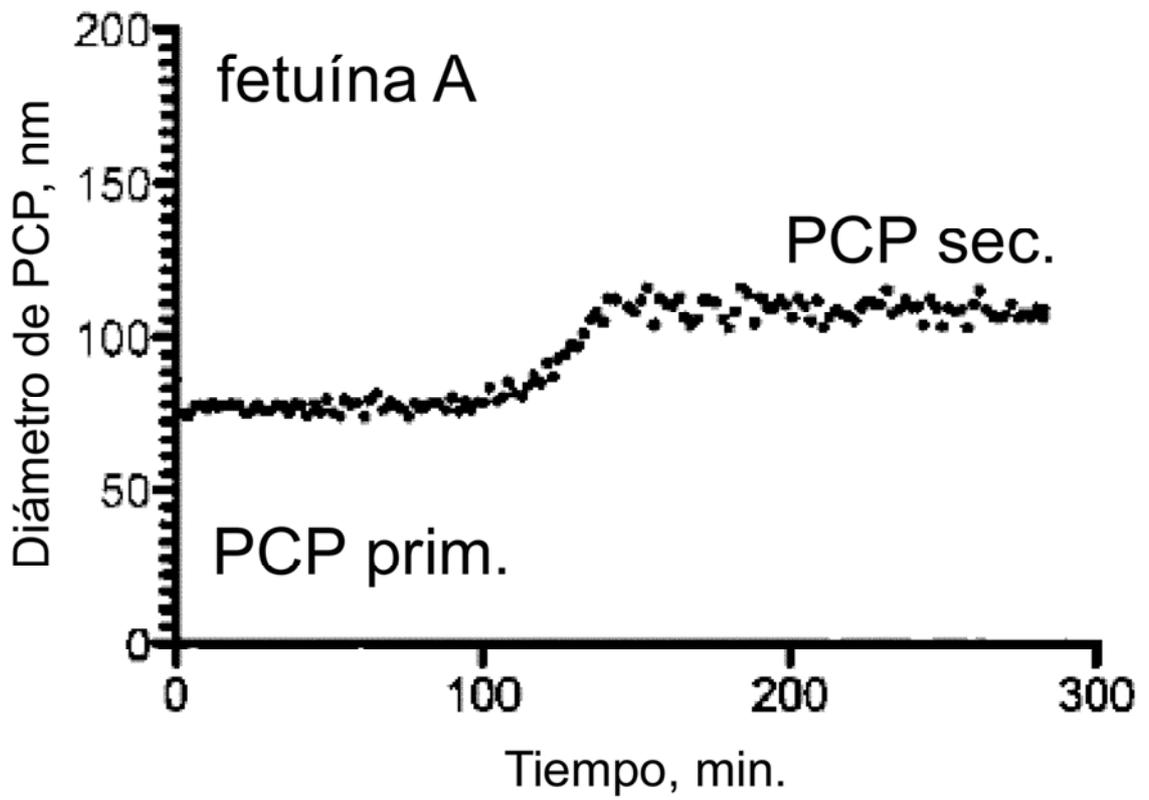


Fig. 1B

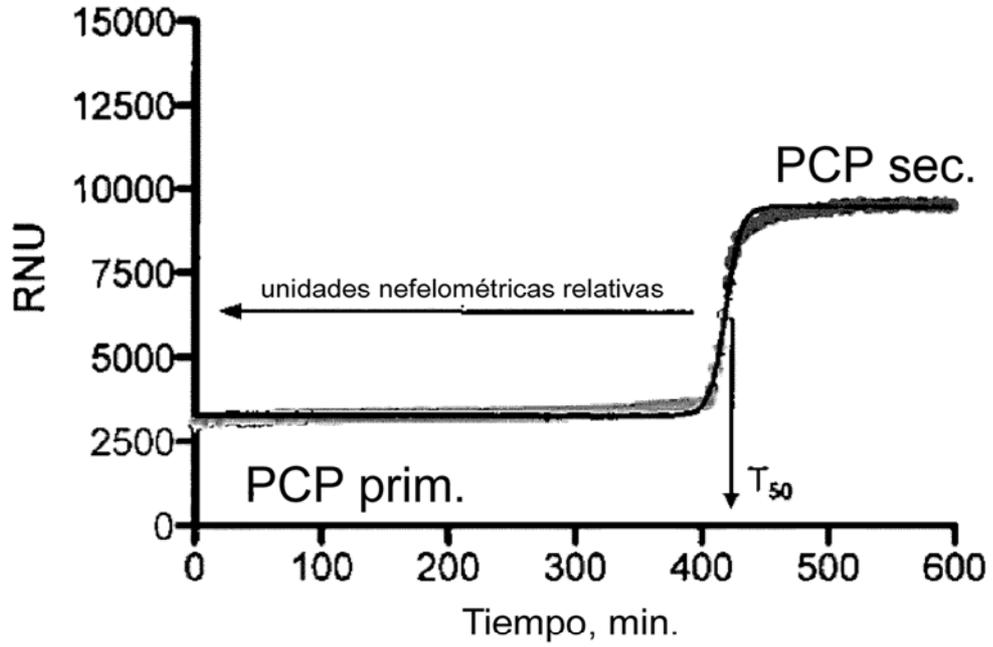


Fig. 1C

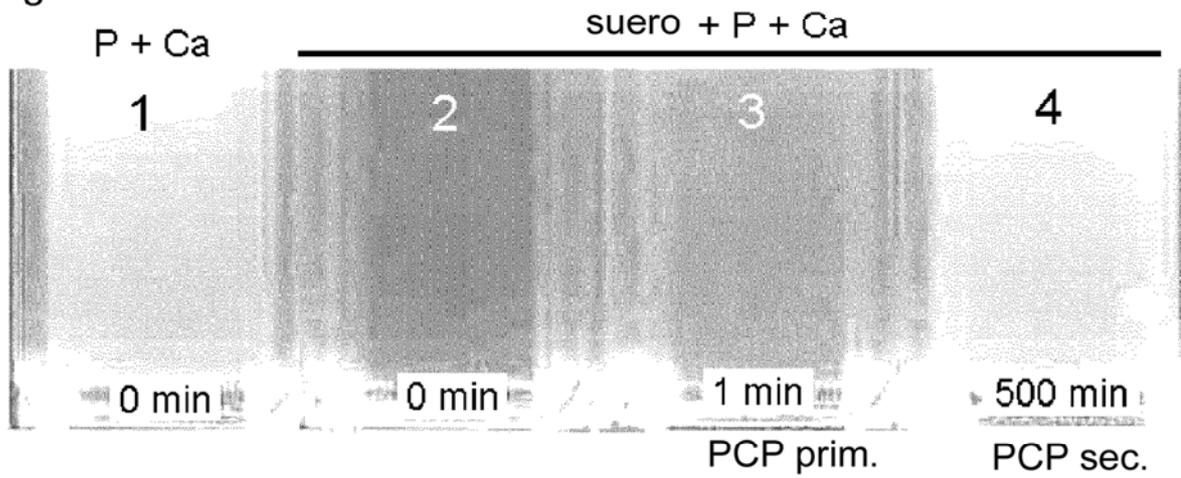
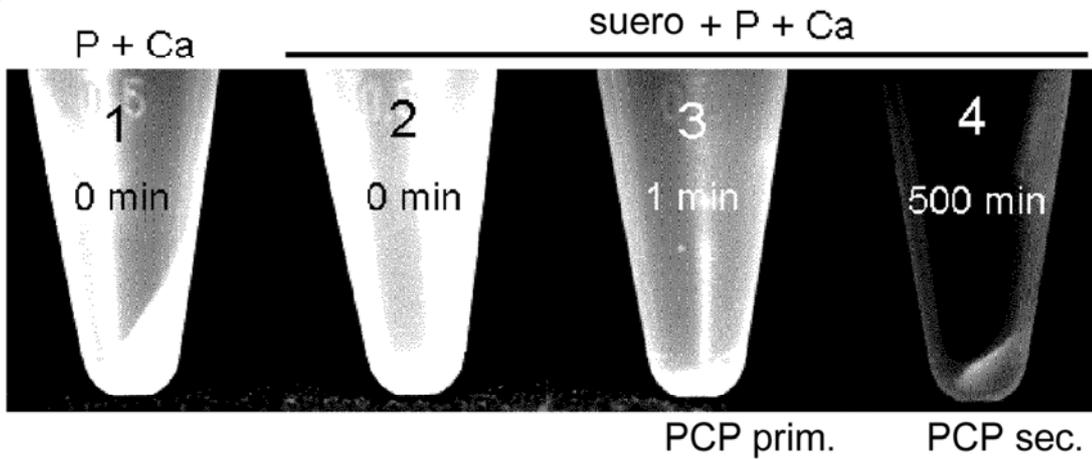


Fig. 1D



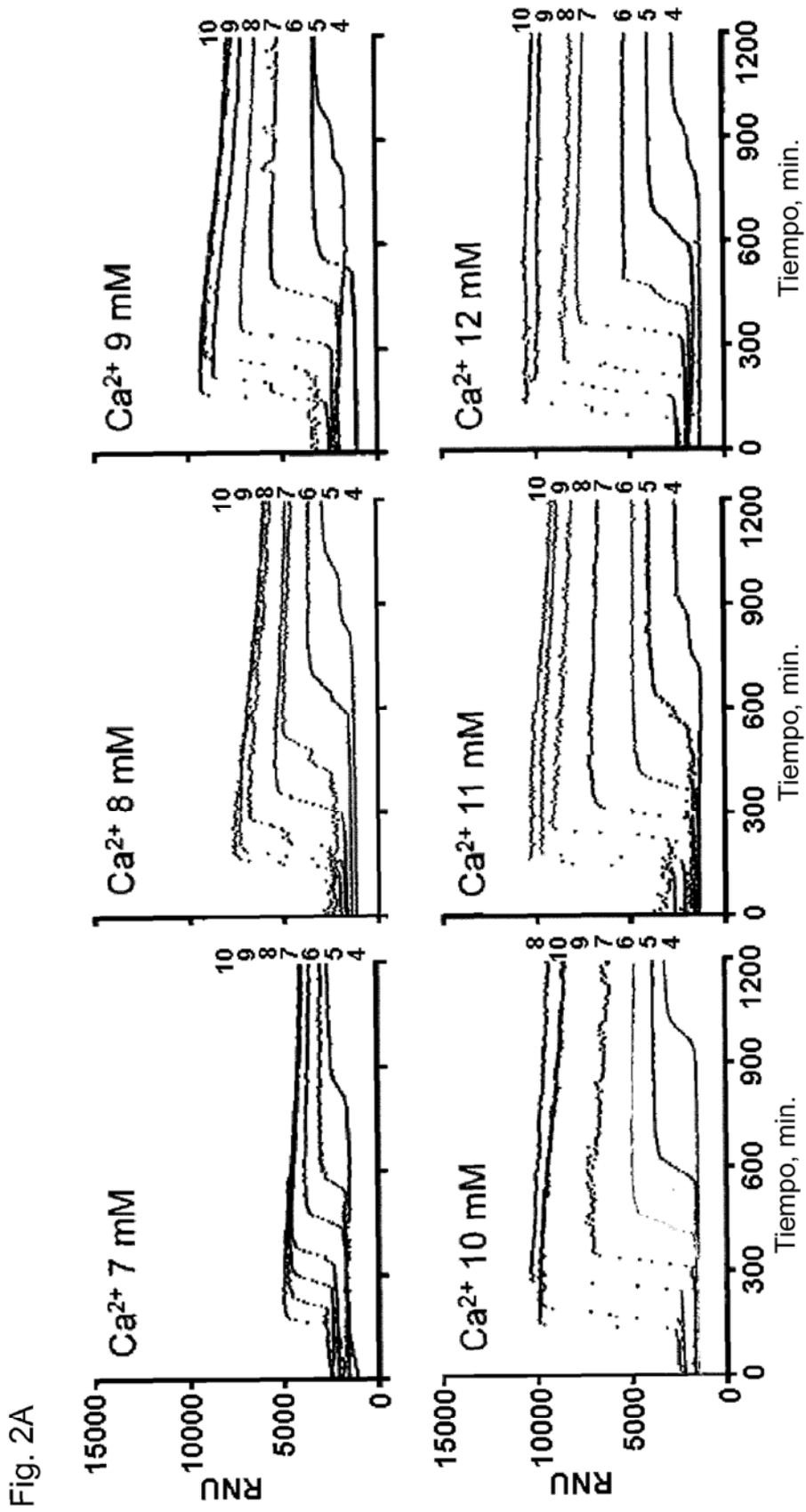


Fig. 2B

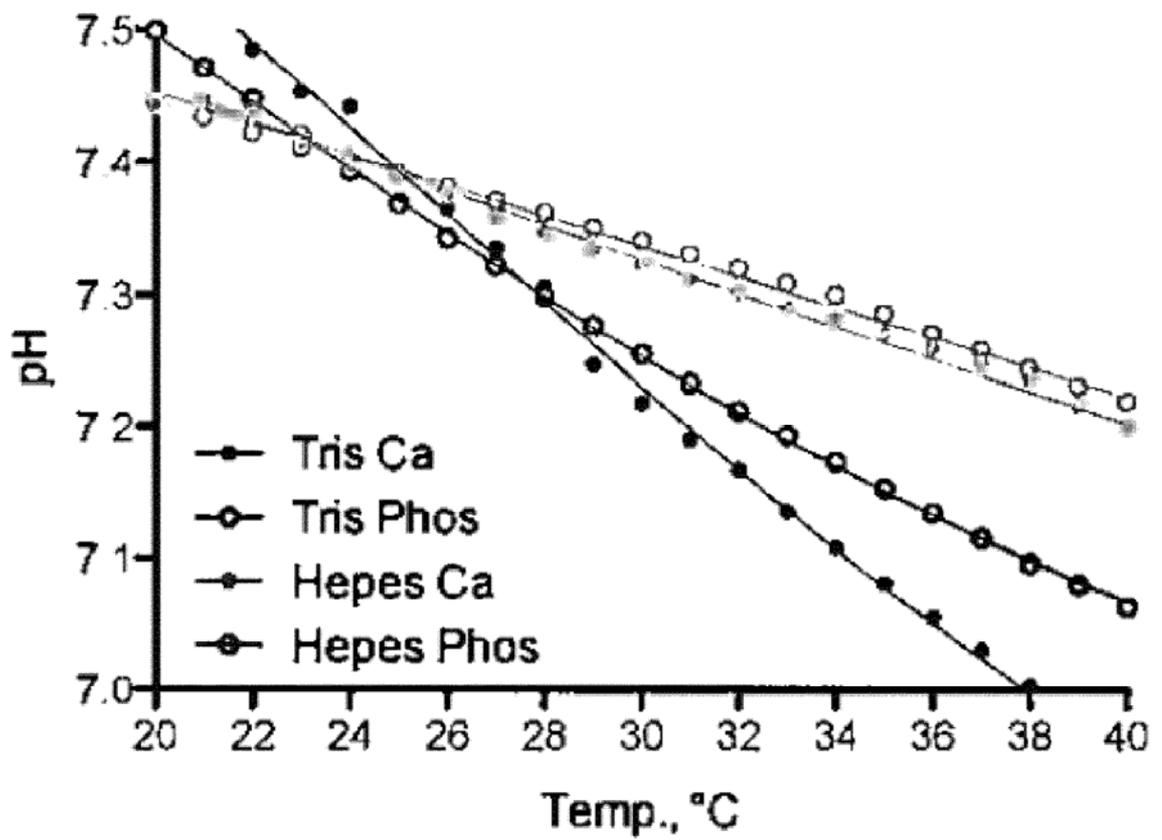


Fig. 2C

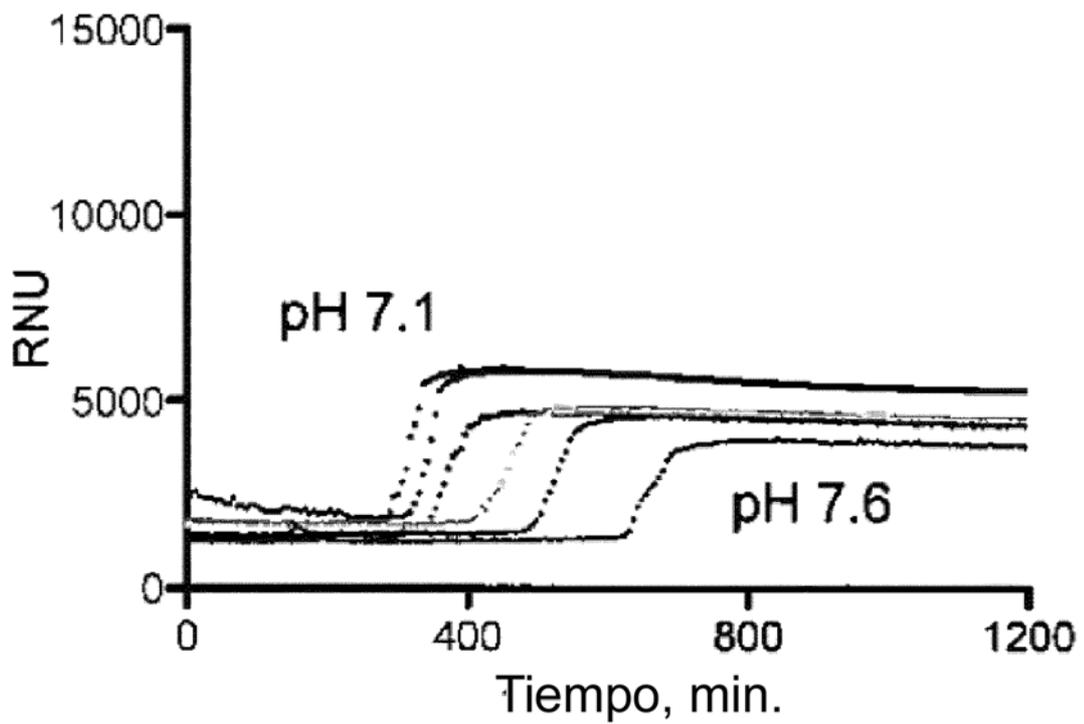
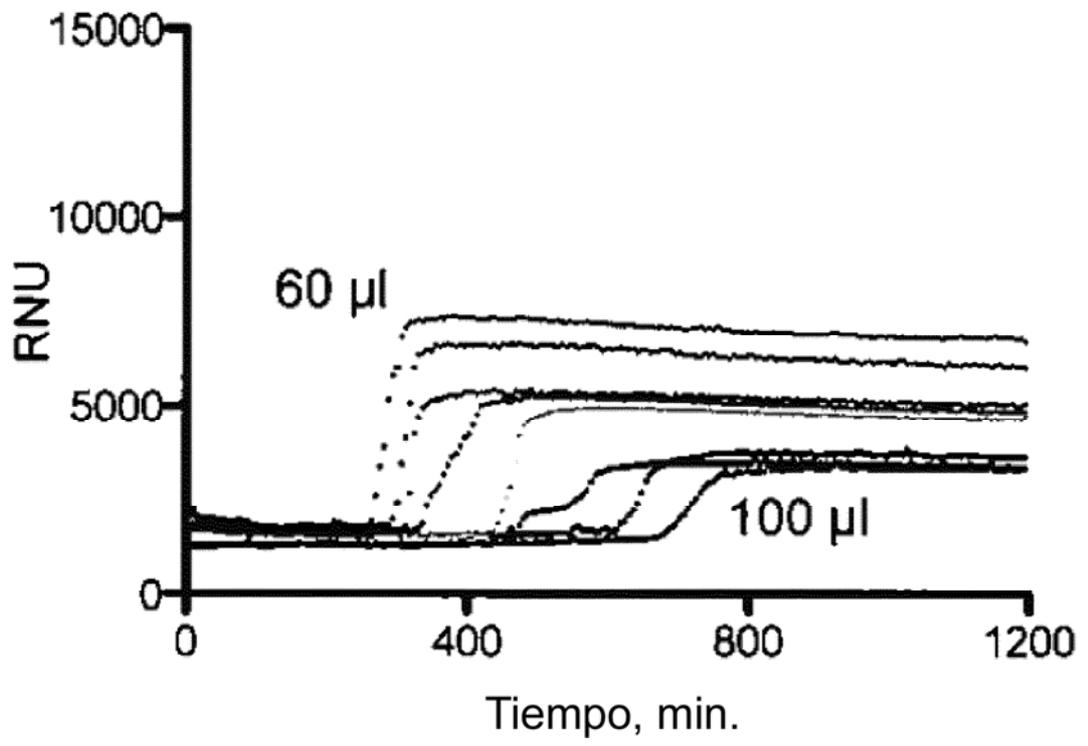
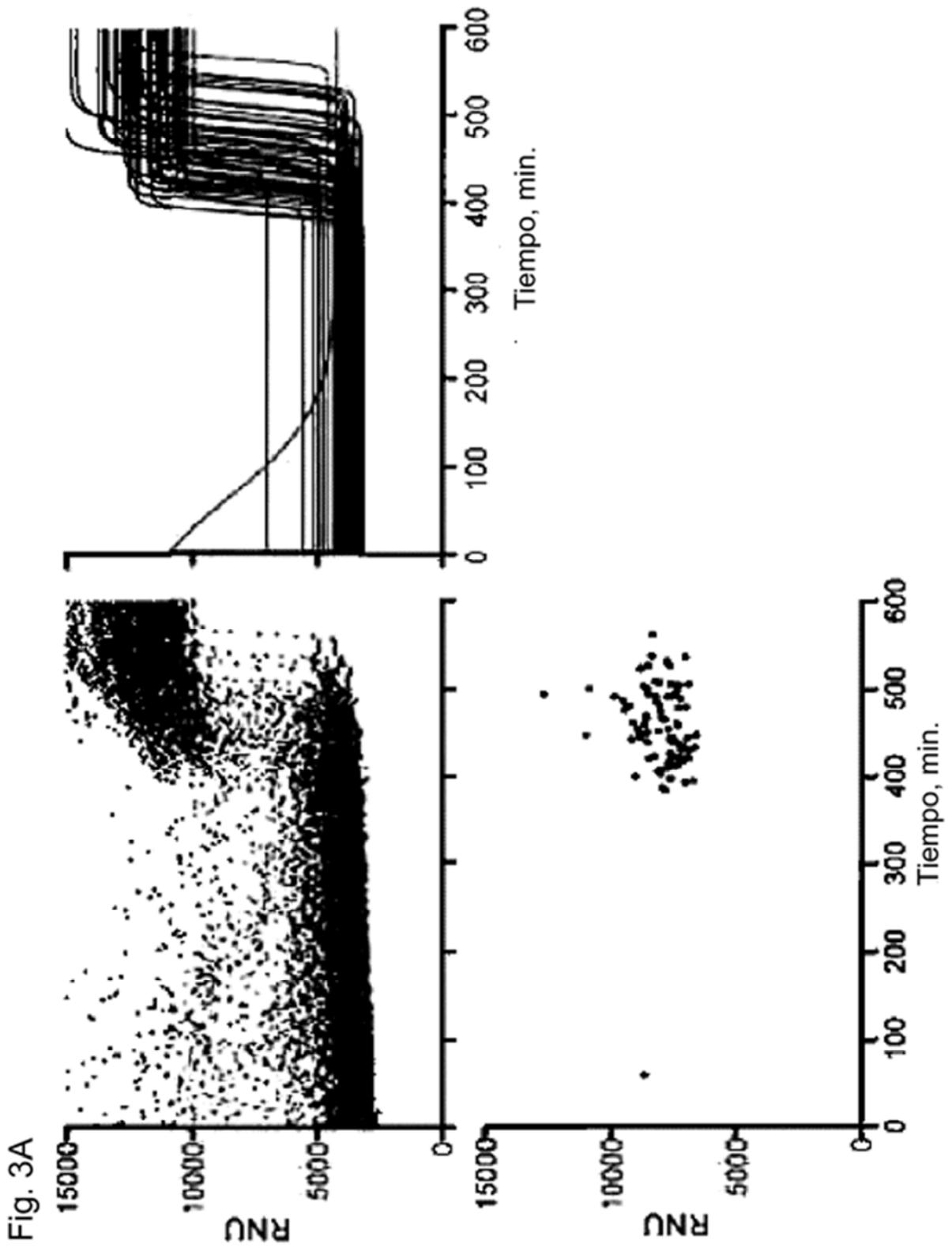


Fig. 2D





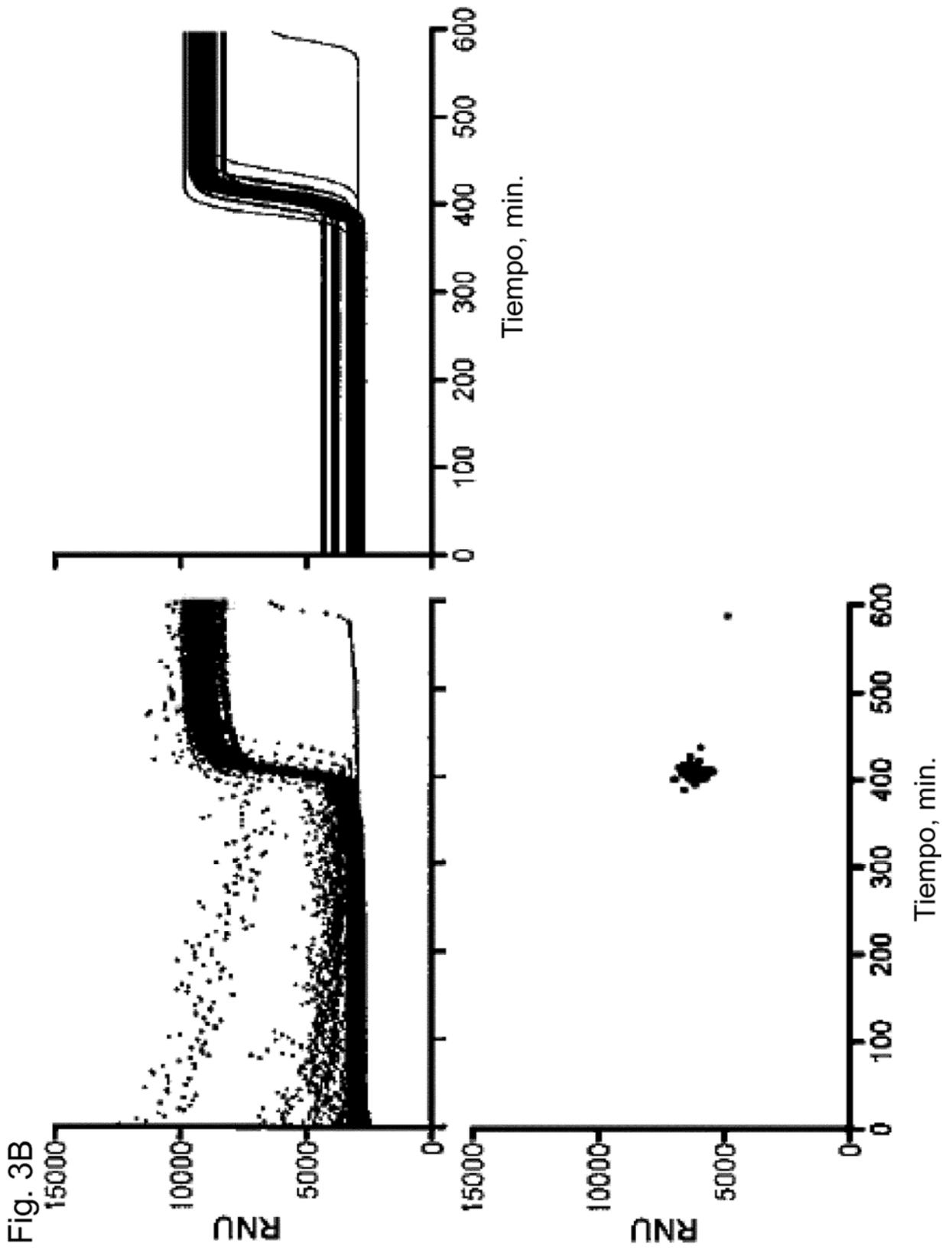


Fig. 4A

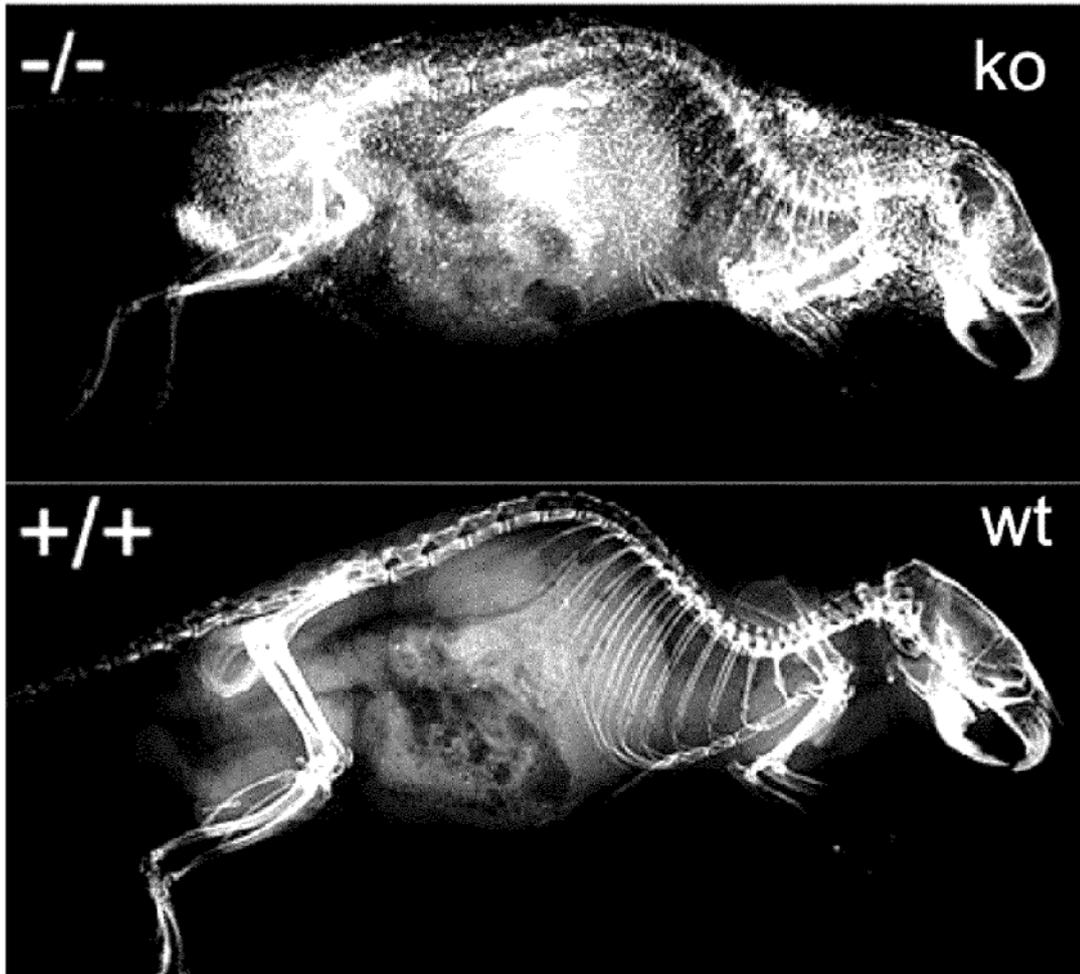


Fig. 4B

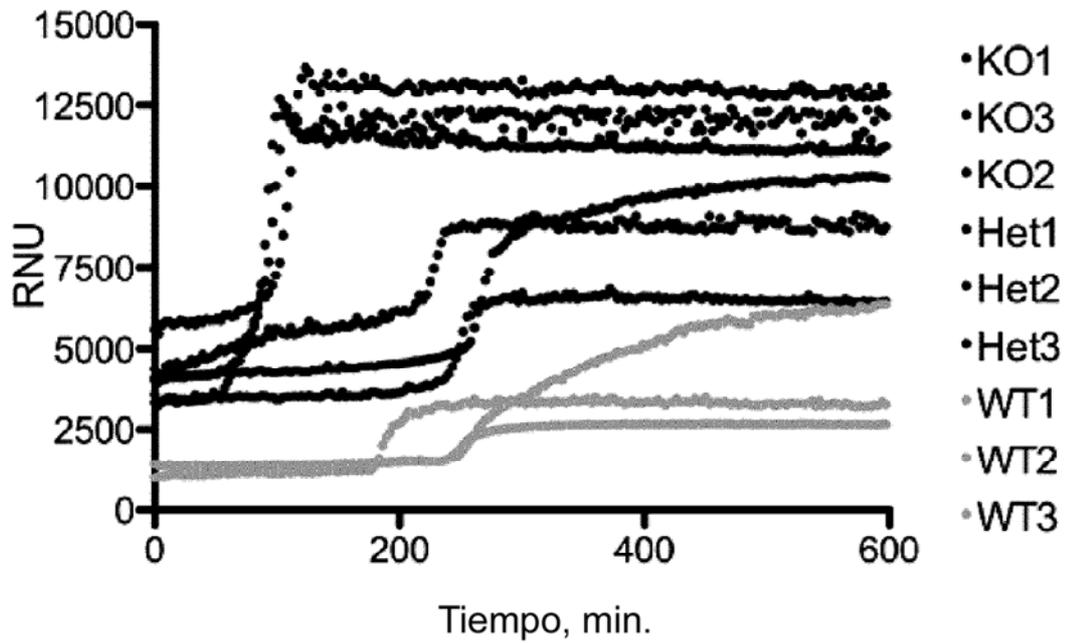


Fig. 4C

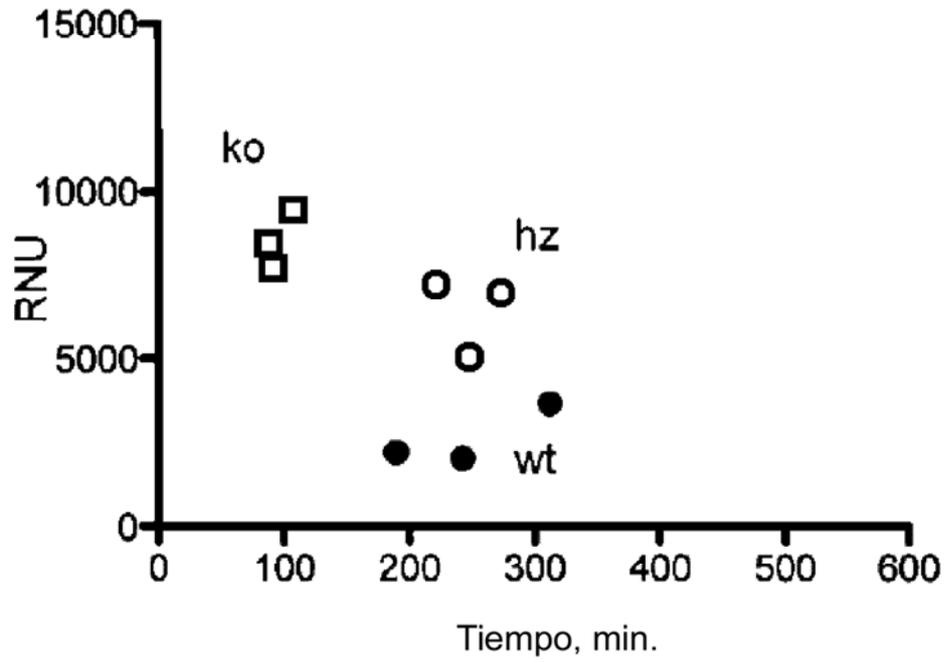


Fig. 4D

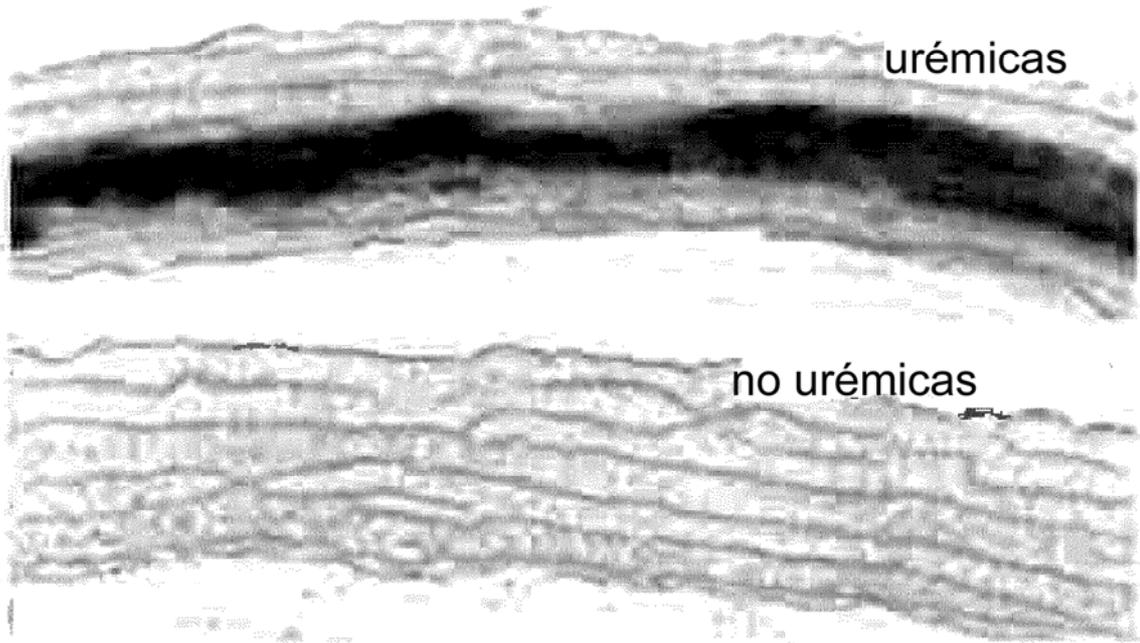


Fig. 4E

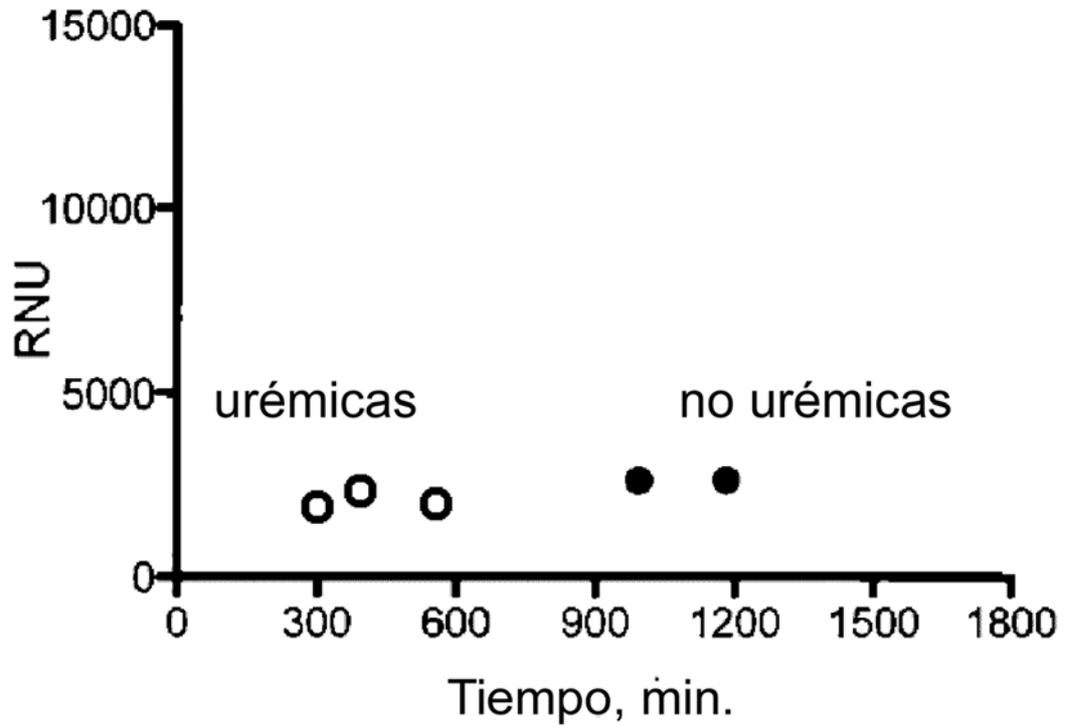


Fig. 4F

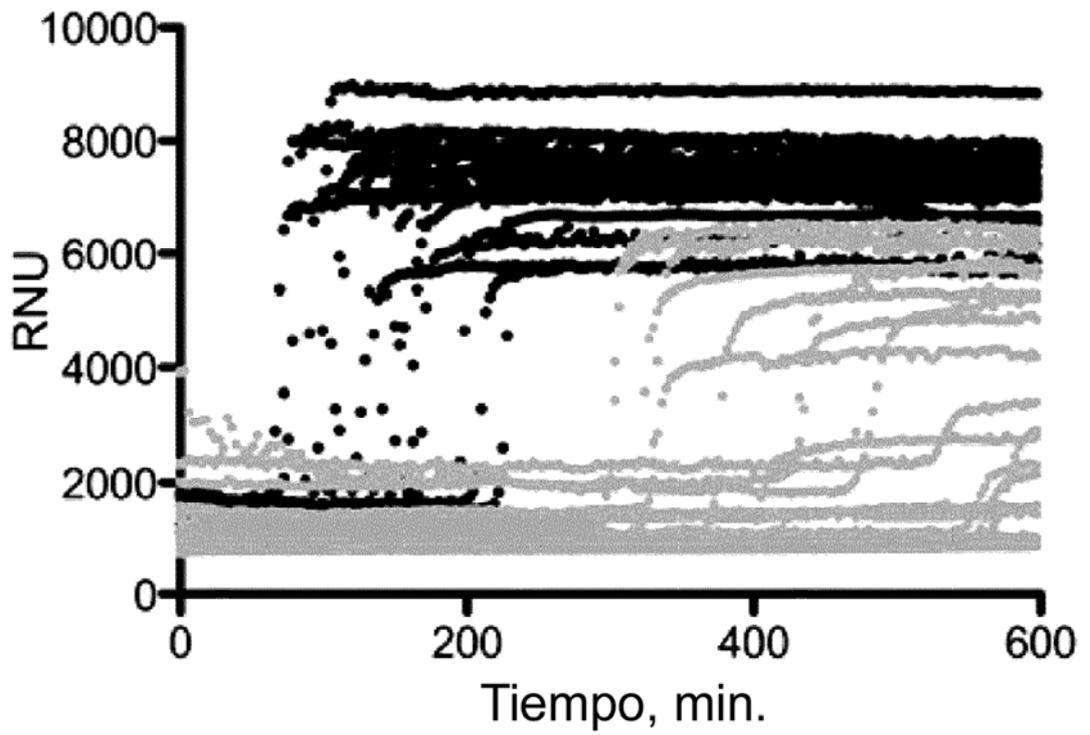


Fig. 5A

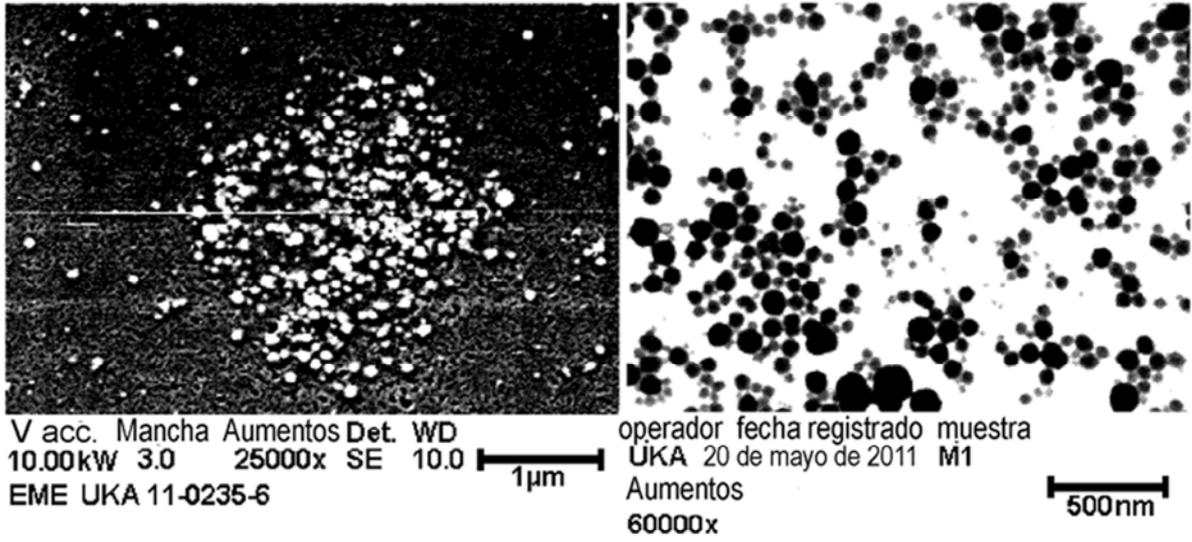


Fig. 5B

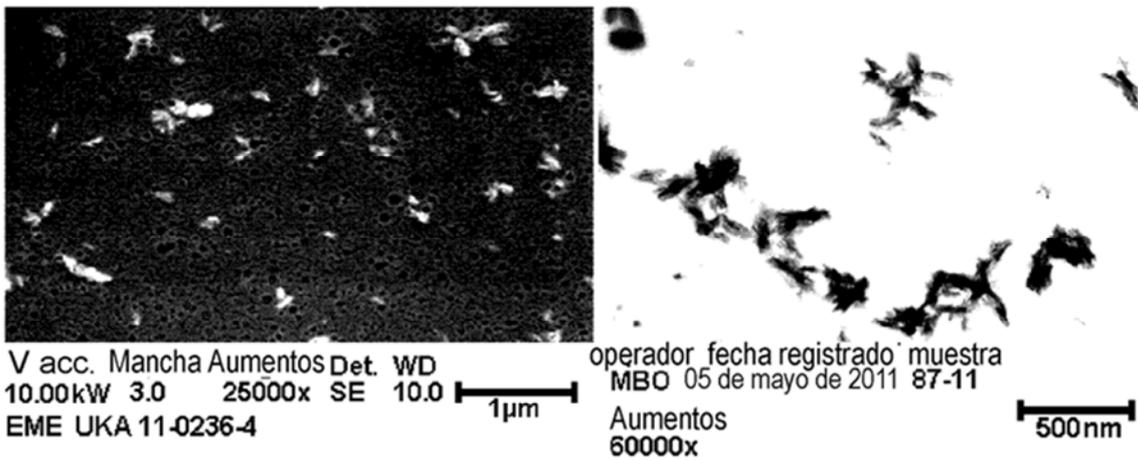


Fig. 5C

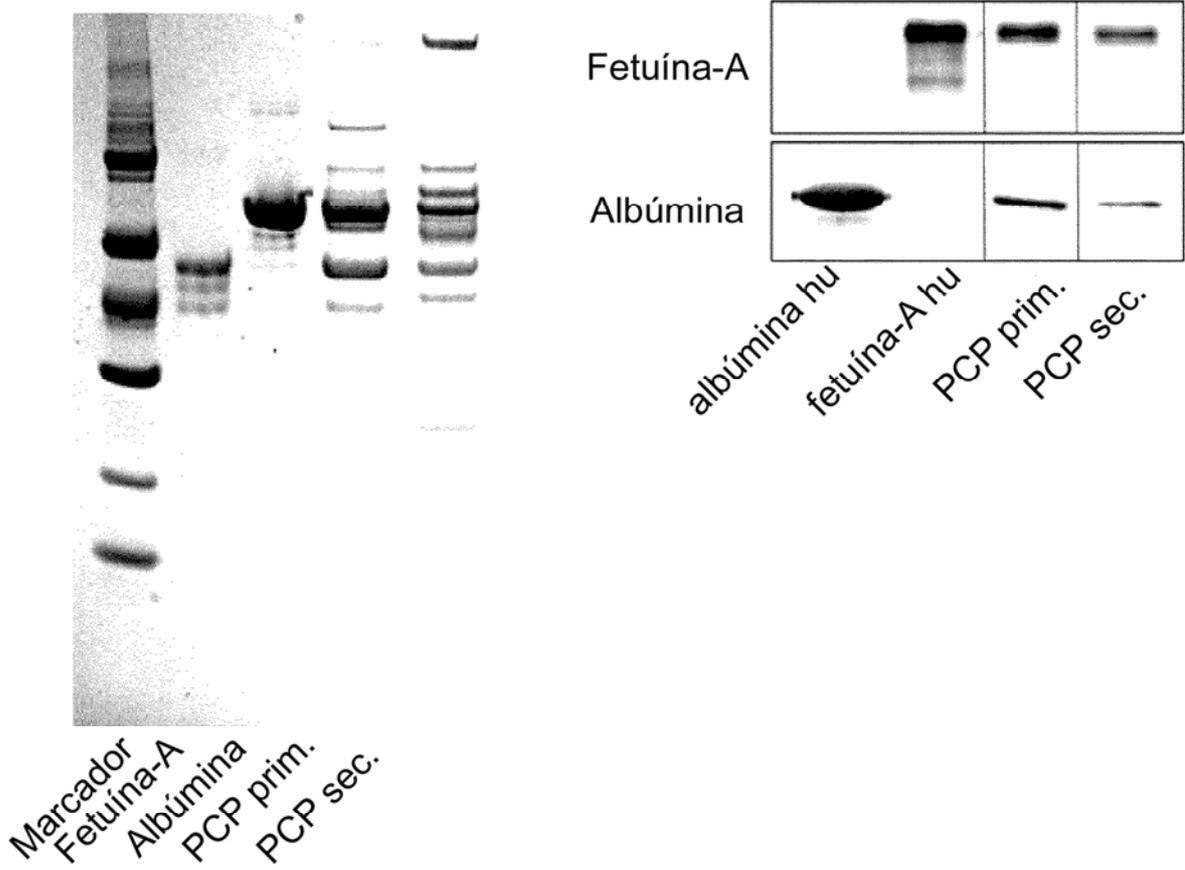


Fig. 5D

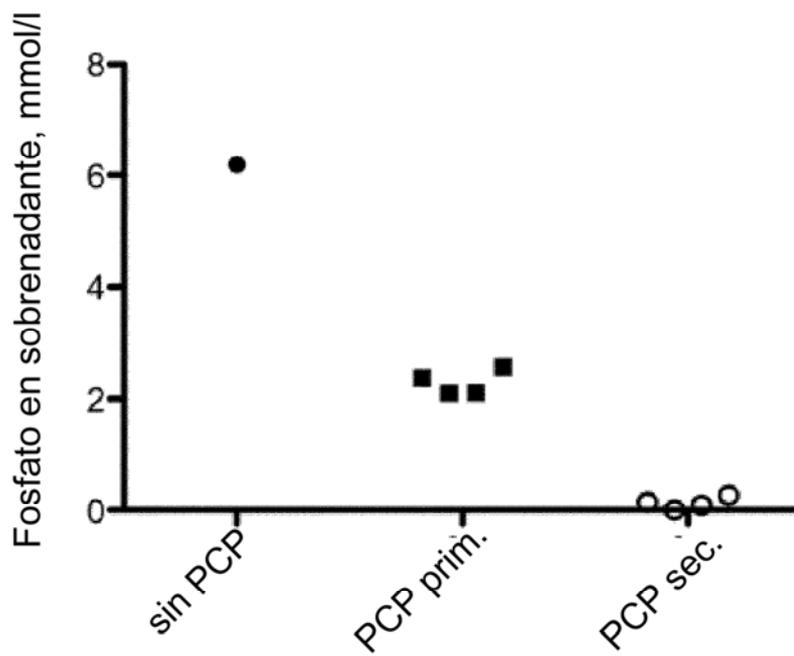
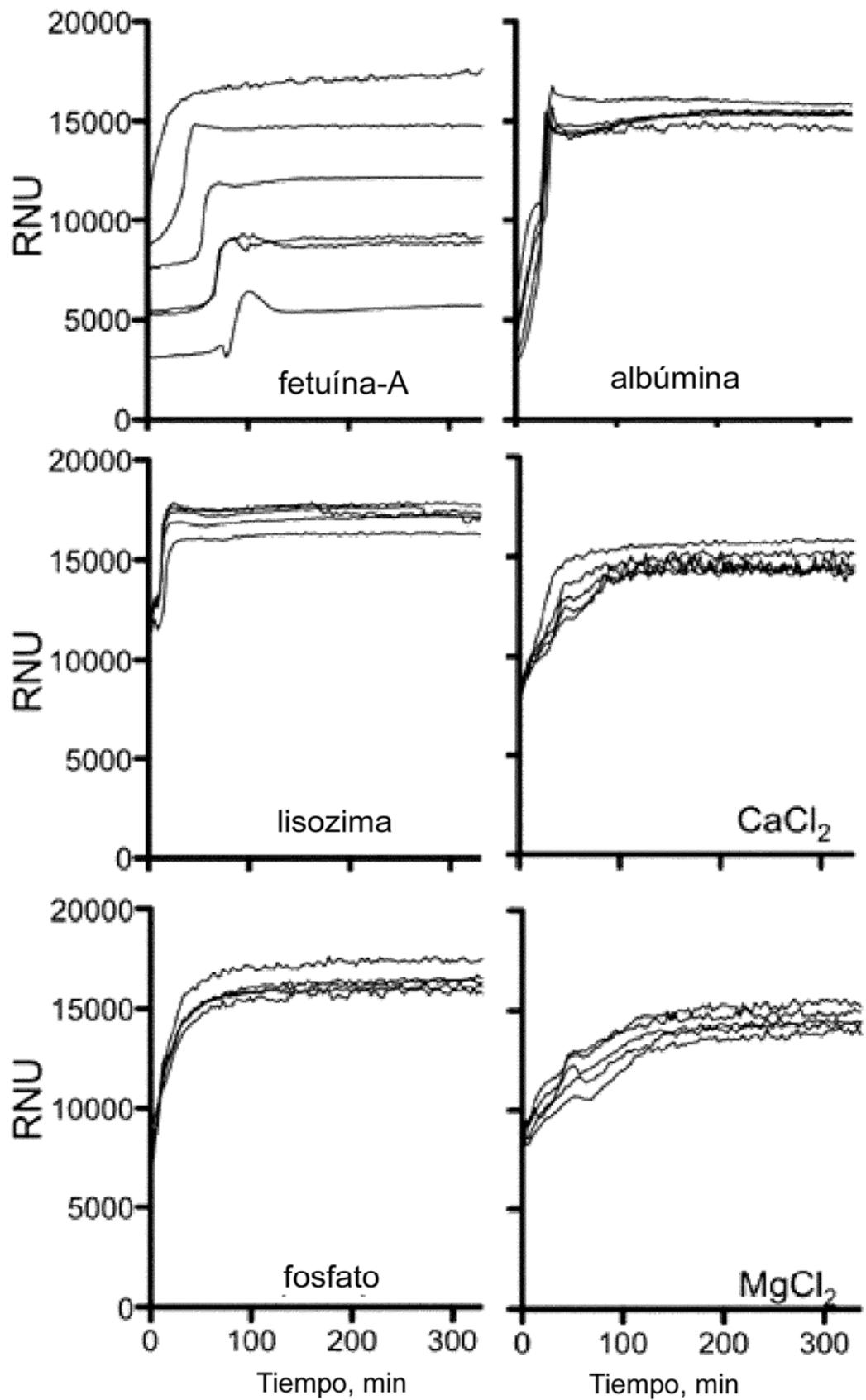


Fig. 6A



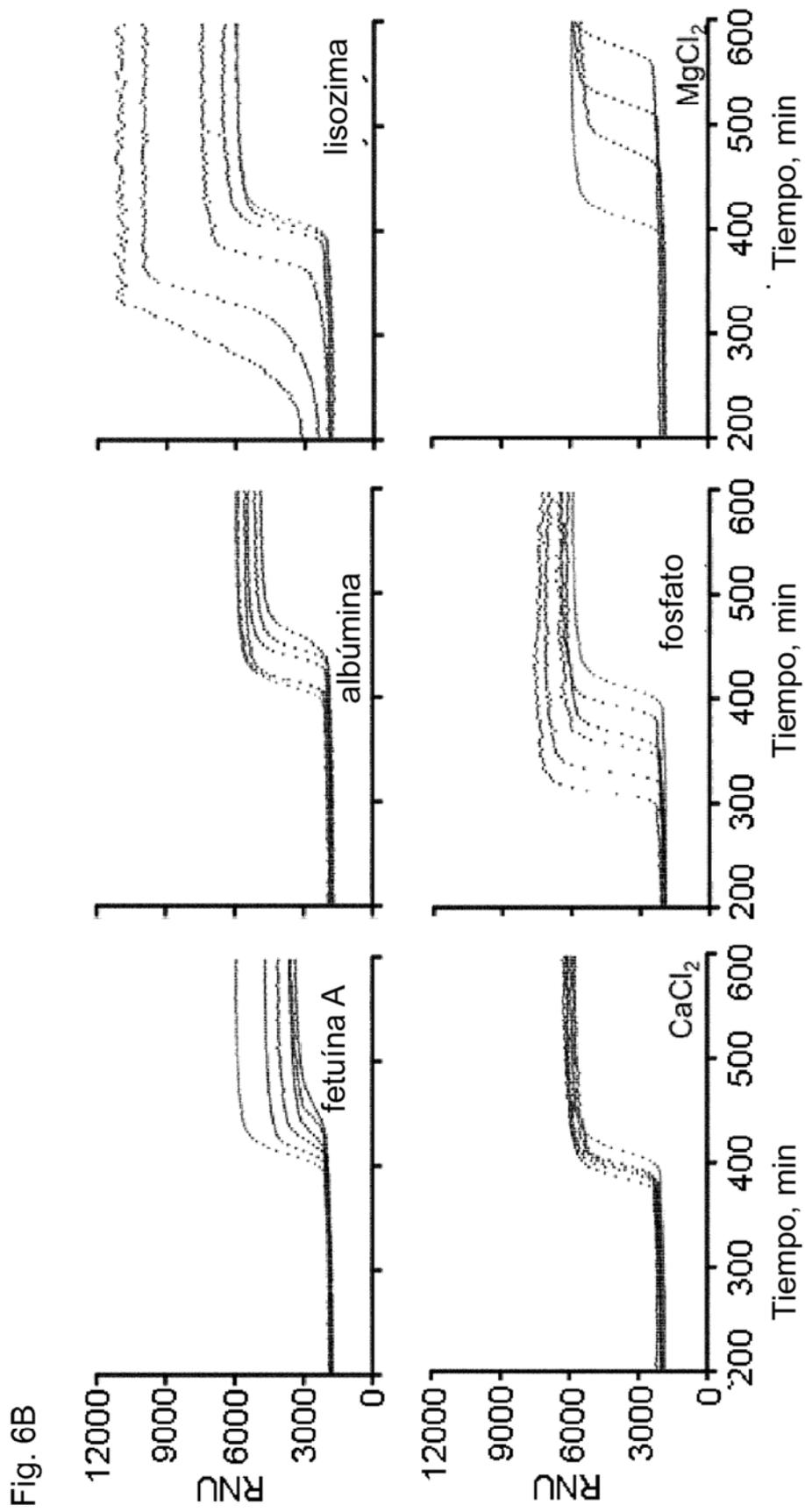


Fig. 6C

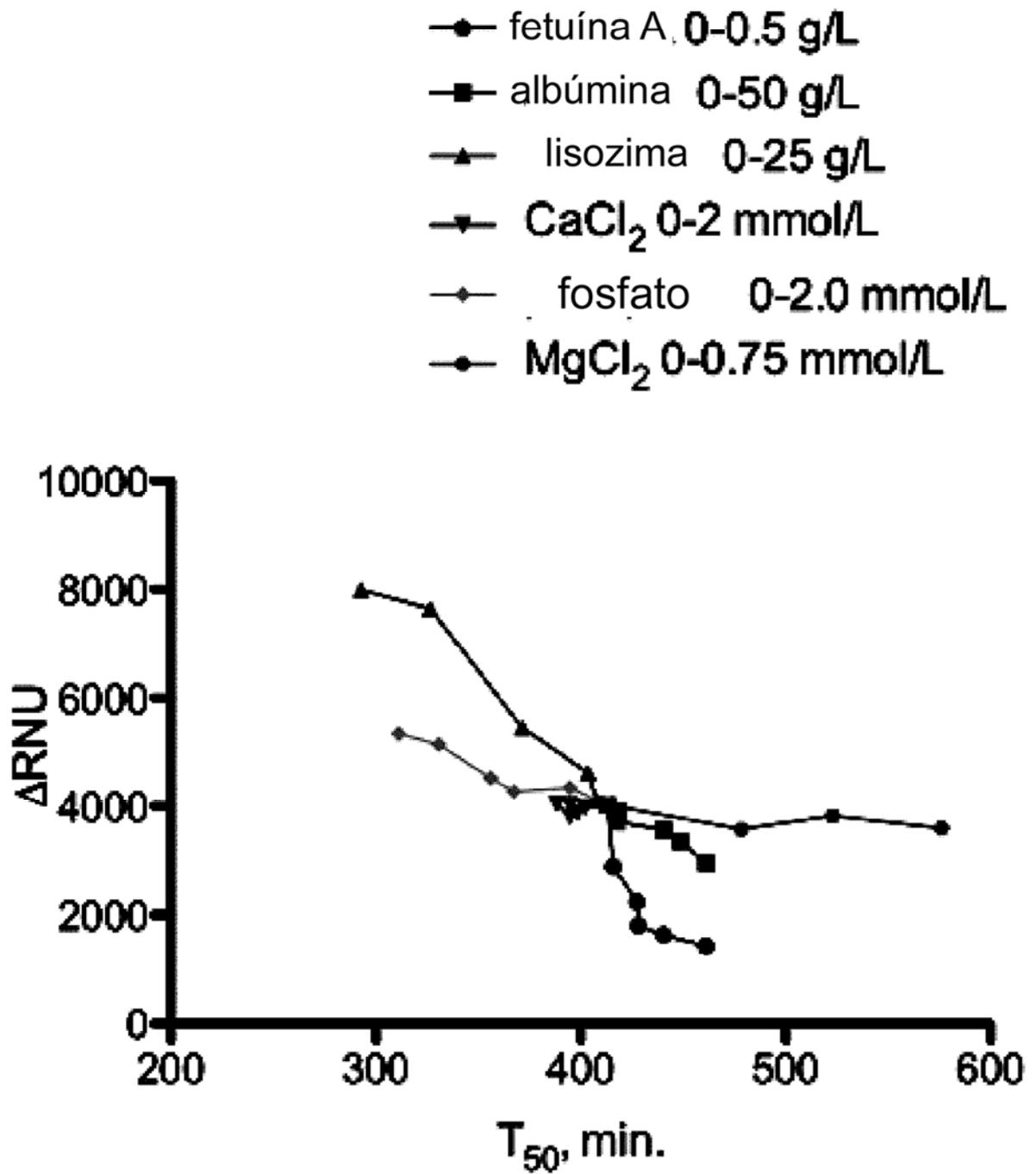


Fig. 7A

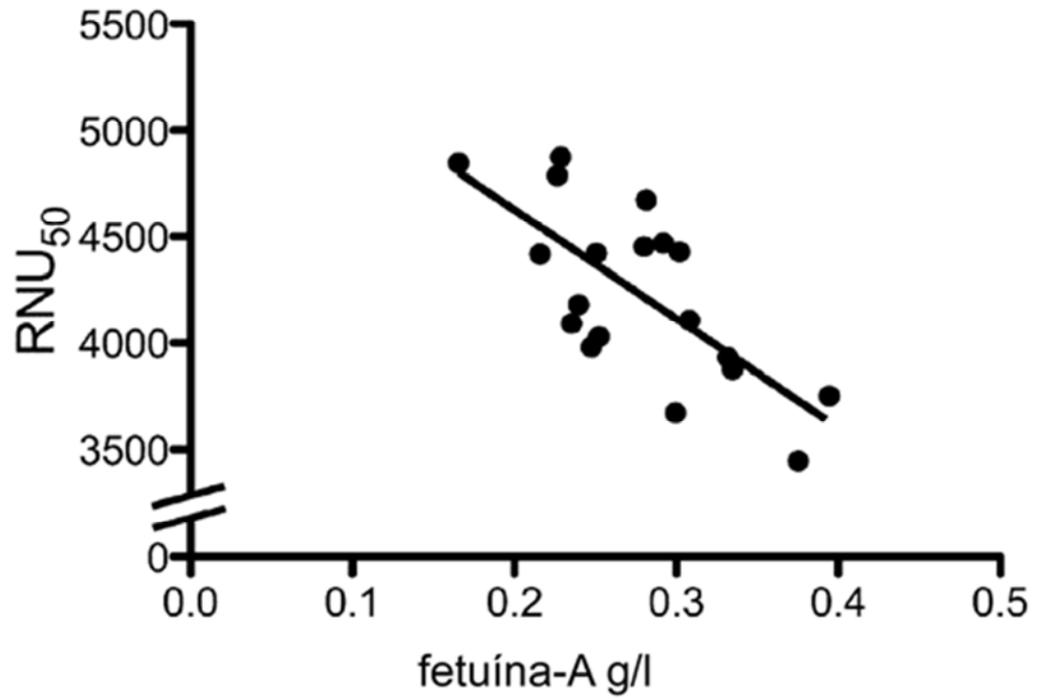


Fig. 7B

