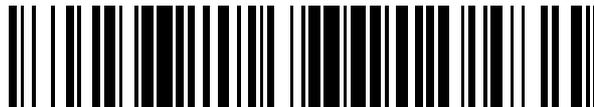


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 991**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/US2014/071001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095426**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14872376 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 3084437**

54 Título: **Detección de enfermedad endotelial**

30 Prioridad:

18.12.2013 US 201361917783 P

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

04.06.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**PUGIA, MICHAEL y
MARFURT, KAREN L.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 670 991 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

Detección de enfermedad endotelial

Antecedentes

5 La invención se refiere a métodos de determinación de un nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. Más particularmente, la invención se refiere a métodos de determinación el potencial de un sujeto mamífero de mostrar coagulación prematura.

10 El análisis celular es importante en aplicaciones médicas, tales como diagnóstico de muchas enfermedades. Sin embargo, muchas aplicaciones médicas de análisis celular requieren el aislamiento de determinadas células de interés, que están habitualmente presentes solo en una pequeña fracción de la muestra analizada. Por ejemplo, las células endoteliales circulantes ("CEC" resultan de interés particular en el diagnóstico de cáncer metastásico y trastornos cardiovasculares. Mientras que las CEC pueden medirse, el valor clínico de tales mediciones no es claro. Las CEC han demostrado estar presentes en pacientes con o sin enfermedad cardiovascular o cáncer. El aumento en CEC o cambio en morfología no es suficiente para predecir el infarto de miocardio; por tanto, el uso de tales enfoques no tiene el suficiente valor clínico.

15 La medición y mantenimiento de la hemostasia es necesario en la prevención de trombosis incluyendo, por ejemplo, coágulos sanguíneos tal como trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada (CID), embolia pulmonar, infarto de miocardio y apoplejía. Puesto que la hemostasia es una función que detiene el sangrado y protege la integridad de la circulación sanguínea, la hemostasia resulta importante en pacientes propensos a la coagulación debido a vasos sanguíneos lesionados o una variedad de afecciones que activan la coagulación tales como, por ejemplo, aterosclerosis, septicemia, cirugía, fibrilación auricular, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión no controlada, trombocitopenia, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, Lupus) y otras afecciones que conllevan a la coagulación. La hemostasia es causada y/o impactada por una variedad de afecciones clínicas y no se considera que está únicamente relacionada con enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, cáncer u otra enfermedad primaria. La trombosis es la formación de un coágulo sanguíneo dentro de un vaso sanguíneo, que obstruye el flujo sanguíneo a través del sistema circulatorio. Cuando un vaso sanguíneo está lesionado, el organismo usa plaquetas y fibrina para formar un coágulo sanguíneo para evitar la pérdida de sangre. La trombosis es una extensión patológica de hemostasia normal. La hemostasia es la detención de la hemorragia como respuesta a una lesión vascular. La trombosis es una formación de un coágulo sanguíneo en circulación. De este modo, es importante mantener la hemostasia en los pacientes cuyo potencial para padecer trombosis es superior al normal.

20 La hemostasia se mide habitualmente mediante la detección de coagulación a través de la formación de un coágulo de fibrina con ensayos de coagulación (por ejemplo, tiempo de protrombina), agregación de plaquetas o mediante la presencia de proteasas activadas en el plasma en la ausencia o presencia de cofactores e inhibidores. Sin embargo, tales métodos no proporcionan una imagen completa puesto que la hemostasia depende de las proteínas plasmáticas, plaquetas y tejido vascular (endotelio), que se encuentra en el sitio de la lesión y formación del coágulo. Por lo tanto, la información sobre la hemostasia es la principal información necesaria para la acción terapéutica. El tejido vascular no está fácilmente disponible para muchos pacientes. Se ha evaluado la salud cardiovascular de pacientes sometiendo CEC aisladas a análisis morfológico.

35 Un problema importante con las CEC es que el marcador para el tipo celular de las CEC no es específico para las células endoteliales. CD105, CD51/61, CD73, S-ENDO/ MUC18, CD31/PECAM-1, CD36, AAMP, E u P selectina y CD54 también están presentes en los linfocitos, monocitos y macrófagos. Por lo tanto, los resultados pueden alterarse por inflamación e infección. Adicionalmente, HEMCAM, Sca-1 y CD34 se expresan en células precursoras hematopoyéticas. Por lo tanto, la medición de enfermedades cardiovasculares mediante recuentos de CEC no es específica. Los pacientes normales habitualmente se recuentan como positivo debido a CEC no específicas, lo que se produce sin impacto de la enfermedad.

40 Existe, por lo tanto, la necesidad de desarrollar un método no morfológico, mínimamente invasivo para analizar CEC para evaluar el potencial de hemostasia de un paciente o potencial de enfermedad endotelial y además identificar y tratar un paciente para la coagulación prematura.

Sumario

50 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a métodos de determinación de un nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. El método comprende la examinación de células endoteliales circulantes del sujeto para la presencia de uno o más factores de coagulación y correlacionar una cantidad de células endoteliales circulantes que muestren uno o más factores de coagulación con el nivel de enfermedad endotelial en el sujeto.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documentos están dirigidos a métodos de determinación de un potencial de un sujeto mamífero para mostrar coagulación prematura. En los métodos, una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida a partir de un sujeto mamífero se mejora y las células endoteliales circulantes se examinan para la presencia de un factor de coagulación. La presencia de la coagulación está correlacionada con el potencial de un sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documentos están dirigidos a métodos de identificación y tratamiento de un sujeto mamífero para la coagulación prematura. El método comprende mejorar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida a partir del sujeto mamífero, examinar las células endoteliales circulantes para la presencia de un factor de coagulación, correlacionar la presencia de la coagulación con respecto el potencial del sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura y administrar al sujeto mamífero una terapia de factor de anticoagulación.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

Ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento implican una determinación de si las CEC aisladas muestran o no muestras uno o más factores de coagulación sobre una superficie de las mismas. La presencia y/o cantidad de CEC que tienen uno o más factores de coagulación puede usarse para medir el alcance de disfunción o daño endotelial y puede usarse también como una indicación de coagulación prematura (falta de hemostasia). La hemostasia de un paciente se mantiene dirigiendo el tratamiento a el/los factor(es) de coagulación detectado(s). Entre los factores de coagulación se incluyen, pero sin limitación, factores I, II, III de factor tisular, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, trombina, protombina, antitrombina, trombomodulina, plasmina, plasminógeno, urocinasa, fibronectina, proteína C de célula endotelial, factor von Willebrand (vWF), enzima convertidora de la angiotensina, fibrina, dímero D, activador del plasminógeno tisular, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, inhibidores de la vía del factor tisular, inhibidor activador del plasminógeno, bikunina, cofactor II de la heparina, procoagulante de cáncer, proteína C, proteína Z y proteína S, por ejemplo.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a métodos de determinación de un nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. La enfermedad endotelial incluye enfermedades cardiovasculares, que incluyen, pero sin limitación, cardiopatía, enfermedad vascular del cerebro y riñón y enfermedad arterial periférica, por ejemplo. La enfermedad cardíaca incluye, pero sin limitación, trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada (CID), embolia pulmonar, trombosis de miocardio, aterosclerosis, septicemia, cirugía, fibrilación auricular (FA), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), hipertensión no controlada (HTA), hipertensión pulmonar, trombocitopenia (TTP) y apoplejía, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el método comprende mejorar una concentración de CEC en una muestra obtenida a partir del sujeto. La muestra a someter a ensayo normalmente es biológica. La frase "muestra biológica" se refiere a cualquier material tal como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos orgánicos y medio de cultivo. La muestra puede ser un sólido, un semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente biológica. En algunos ejemplos la muestra puede ser del cuerpo de un sujeto incluyen una excreción corporal, un aspirante corporal, un excisante corporal o un extractante corporal. El sujeto puede ser, por ejemplo, mamífero, reptil, pez, planta, fúngico o bacteriano. En algunos ejemplos, la muestra es de un mamífero y en algunas muestra el sujeto es un humano. En algunos ejemplos, la muestra a someter a ensayo es una muestra sanguínea de un mamífero tal como, pero sin limitación, un sujeto humano, por ejemplo. La muestra sanguínea es una que contiene células tales como, por ejemplo, células no raras y células raras. En algunos ejemplos la muestra sanguínea es sangre completa o plasma.

La presencia y/o cantidad de CEC puede detectarse a partir de otras células raras usando marcadores característicos de células endoteliales para la tipificación celular. Los marcadores de tipificación celular endotelial incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, CD136, CD105/Endogлина, CD144/VE-caderina, CD145, CD34, Los documentos Cd41 CD136, CD34, CD90, CD31/PECAM-1, ES- AM, VEGFR2/Flk-1, Tie-2, CD202b/TEK, CD56/NCAM, CD73/VAP-2, claudina 5, ZO-1 y vimentina, por ejemplo. Además, Los marcadores de tipificación celular endotelial que también proporcionan el origen de la célula endotelial pueden usarse como una medición adicional como la medición principal para las CEC. Marcadores de origen endotelial incluyen, pero sin limitación, CD36, HEMCAM para origen microvascular, SCA-1, o D34 para origen progenitor hematopoyético, VEGFR-2, NRP1, DII4, Notch, Efrina B2, Conexina Cx37, Cx40 para origen arterial, VEGFR-3, NRP2, COUP-TFII, EphB4, Msr/Apj para origen venular, VEGR-3, NRP-2, LYVE-1, podoplanina, prox1, efrina-B2, CCL21 para origen linfático y LuECAM para origen venular pulmonar, por ejemplo.

Los glóbulos blancos (GB) pueden excluirse del ensayo mediante la exclusión de GB positivos para uno o más marcados de cúmulo de diferenciación (CD) que son específicos para células inmune (también denominado como "cúmulo de designación" a menudo abreviado como CD). Los ejemplos incluyen, a modo de ilustración y no de

limitación, marcadores tales como CD45, CTLA-4, CD4, CD68 y/o CD8 presentes en los glóbulos blancos pueden usarse para indicar que una célula no es una célula cancerígena. En un ejemplo no limitante particular, el antígeno CD45 (también conocido como PTPRC, proteína tirosina fosfatasa receptor tipo C y originalmente denominada antígeno común de leucocito (todos los términos pueden usarse en el presente documento indistintamente)) es útil en la detección de todos los glóbulos blancos. De manera adicional, CD45 puede usarse para diferenciar entre distintos tipos de glóbulos blancos cuando se combina con otros marcadores de CD. Por ejemplo, los granulocitos se indican mediante CD45+, CD15+; los monocitos se indican mediante CD45+, CD14+; los linfocitos T se indican mediante CD45+, CD3+; los linfocitos T auxiliares se indican mediante CD45+, CD3+, CD4+; los linfocitos T citotóxicos se indican mediante CD45+, CD3+, CD8+; los linfocitos B se indican mediante CD45+, CD19+ o CD45+, CD20+; los trombocitos se indican mediante CD45+, CD61 +; y los linfocitos citolíticos naturales se indican mediante CD16+, CD56+, CD3-. De manera adicional, dos moléculas de CD comúnmente usadas son CD4 y CD8, que se usan, en general, como marcadores para linfocitos T auxiliares y citotóxicos, respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3+, ya que algunos otros leucocitos también expresan estas moléculas de CD (algunos macrófagos expresan bajos niveles de CD4; las células dendríticas expresan altos niveles de CD8).

15 Las células raras son aquellas que están presentes en una muestra en cantidades relativamente pequeñas cuando se comparan con la cantidad de células no raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células raras están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^{-8} % a aproximadamente 10^{-2} % en peso de una población celular total en una muestra que se sospecha que contiene células raras. Las CEC están incluidas en la categoría de células raras.

20 Las células no raras son aquellas que están presentes en cantidades relativamente grandes cuando se comparan con la cantidad de células raras tales como CEC en una muestra. En algunos ejemplos, las células no raras son al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 10^2 veces, o al menos aproximadamente 10^3 veces, o al menos aproximadamente 10^4 veces, o al menos aproximadamente 10^5 veces, o al menos aproximadamente 10^6 veces, o al menos aproximadamente 10^7 veces, o al menos aproximadamente 10^8 veces superior a la cantidad de células raras en la población total celular en una muestra que se sospecha que contiene células no raras y células raras. Las células no raras pueden ser, pero sin limitación, glóbulos blancos (GB), plaquetas y glóbulos rojos (GR), por ejemplo.

La mejora de la concentración de CEC (o aislamiento de CEC) en una muestra de un sujeto puede conseguirse mediante filtración usando una o más de las siguientes fuerzas: centrifugación, presión, vacío, fuerzas capilares hidrostáticas, ultracentrifugación, gradiente térmico diferencial y fuerzas electroforéticas, por ejemplo. La filtración implica poner en contacto la muestra con una matriz porosa normalmente a presión al vacío. Las técnicas de filtración incluyen, pero sin limitación, microfiltración, ultrafiltración y filtración tangencial, por ejemplo. En algunos ejemplos, la matriz porosa puede ser parte de un módulo de filtración en el que la matriz es parte de un conjunto para su uso conveniente durante la filtración ("conjunto de filtración de matriz porosa"). La matriz porosa puede ser una membrana, una película o una estructura microfluidica que tiene poros u obstáculos a través del cual el líquido con células fluye a lo ancho o a través.

Un ejemplo de un conjunto de filtración de matriz porosa, a modo de ilustración y no de limitación, se describe por Friedrich, y col., en la publicación de solicitud de patentes de los EE.UU. n.º 2012/0315664 ("publicación de solicitud de patente 664"). La publicación de solicitud de patente 664 desvela un conjunto y método para la filtración de un líquido. Un cuerpo de apoyo se diseña en un rebaje de un vehículo y una membrana de filtro se mantiene plana sobre el cuerpo de apoyo. La membrana de filtro y el cuerpo de apoyo están diseñados para que sean permeables a líquido y, por lo tanto, sirvan como filtros, en particular para filtrar células raras a partir de la sangre. Como un resultado del nivel tendido de la membrana de filtro sobre el cuerpo de apoyo, el resto de filtración puede examinarse particularmente bien microscópicamente.

45 En algunos ejemplos se recogen muestra a partir del cuerpo de un sujeto en un recipiente adecuado tal como, pero sin limitación, una bolsa, una botella, una aguja o un recipiente ACUTAINER®, por ejemplo. El contenedor puede contener un medio de colección en el cual se suministra la muestra. El medio de colección es normalmente un medio seco y puede comprender una cantidad de agente de desactivación de plaquetas eficaz para lograr la desactivación de plaquetas en la muestra de sangre cuando se mezcla con la muestra de sangre. El medio de colección puede también comprender otros agentes tales como, por ejemplo, un anticoagulante, un agente de fijación o un agente de detención de formación de fibrina, cada uno de los cuales está presente en una cantidad suficiente para lograr la función deseada de los agentes. En algunos ejemplos, puede tratarse una muestra para aglutinar preferentemente CEC por encima de células no raras para facilitar la separación de CEC de células no raras durante la filtración.

La matriz porosa es un material sólido o semisólido y puede comprender un material no soluble en agua orgánico o inorgánico. La matriz porosa puede tener cualquiera de una cantidad de formas tales como, por ejemplo, tubular (por ejemplo, fibra hueca, enrollado en espiral y fibra fina hueca), con surcos grabados o con superficie plana o lisa (por ejemplo, una tira, disco, película, membrana y placa). La matriz puede fabricarse a partir de una variedad de materiales, que pueden ser naturales o sintéticos, polimérico o no poliméricos, fibrosos o no fibrosos. Ejemplos, a modo de ilustración y no de limitación, de tales materiales para la fabricación de matriz porosa incluyen celulosa

(incluyendo papel), nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon y poli(butirato de vinilo), material cerámico, material metálico, por ejemplo, bien usados por sí mismos o en conjunto entre sí y/o con otros materiales.

- 5 El tamaño de los poros de la matriz porosa es la que es suficiente para preferencialmente retener CEC mientras que permite el pase de otras células que incluyen células no raras a través de los poros. El tamaño de los poros de la matriz porosa depende del tamaño de los CEC y las células no raras, la presión aplicada a la muestra tal como una muestra de sangre, por ejemplo. En algunos ejemplos el tamaño promedio de los poros de la matriz porosa es de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 75 μm , o de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 20 μm , o de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 10 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 75 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 20 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 10 μm , por ejemplo. La densidad de los poros en la matriz porosa es de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 80 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 80 %, o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 %, o de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 % o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 70 %, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la presión se aplica a la muestra sobre la matriz porosa para facilitar el pase de células no raras a través de la membrana. La expresión "presión" se refiere a las diferencias de presión de la presión atmosférica normal y puede bien ser presión positiva (aumento en la presión en relación con la presión atmosférica normal) o presión negativa (al vacío) (disminución en la presión en relación con la presión atmosférica normal). El nivel de presión aplicada depende de uno o más de la naturaleza y tamaño de las células no raras, el tamaño de las CEC, la naturaleza de la matriz porosa y el tamaño de los poros de la matriz porosa, por ejemplo. En algunos ejemplos, el nivel de presión positiva aplicada es de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 500 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 400 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 300 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 200 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 100 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 50 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 25 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 20 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 15 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 30 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 25 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 20 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 15 milibar o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 10 milibar, por ejemplo. El nivel de presión negativa (al vacío) aplicada es el negativo de los intervalos anteriores.

En algunos ejemplos la presión aplicada a la muestra de la matriz porosa es una presión oscilante, lo que significa que la presión se aplica de forma intermitente a intervalos regulares o irregulares, que pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 500 segundos o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 250 segundos, por ejemplo. En este enfoque, la presión se oscila a aproximadamente 0 milibar a aproximadamente 10 milibar, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibar, o aproximadamente de 1 milibar a aproximadamente 7,5 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 5,0 milibar o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 2,5 milibar, por ejemplo, durante alguna o toda la aplicación de presión a la muestra de sangre. La presión oscilante se consigue usando un interruptor de encendido-apagado, por ejemplo, y puede llevarse a cabo de forma manual o automática. Se pueden permitir elevadas caídas de presión dependiendo de uno o más del volumen del depósito, el volumen de la muestra y la velocidad de filtración.

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra se pone en contacto con una matriz porosa de modo que las CEC se retienen preferiblemente sobre la matriz porosa y las células no raras pasan a través de la matriz porosa. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la muestra se diluye en un medio de dilución antes de entrar en contacto con la matriz porosa. En algunos ejemplos, el medio de dilución es un medio acuoso, que puede estar tamponado. El pH para un medio acuoso tamponado normalmente es un pH moderado. En algunos ejemplos el pH del medio de dilución es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 o pH fisiológico, por ejemplo. Pueden usarse

diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante cualquier periodo de incubación. Los tampones ilustrativos incluyen, pero sin limitación, borato, fosfato (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), carbonato, TRIS, barbitol, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINA, por ejemplo.

5 La cantidad de medio de dilución combinado con la muestra depende de uno o más de una cantidad de factores
tales como, por ejemplo, la naturaleza de la matriz porosa y la naturaleza de la muestra. En algunos ejemplos de
acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la cantidad de medio de dilución es de
aproximadamente 5 ml a aproximadamente 100 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 80 ml, o de
aproximadamente 5 ml a aproximadamente 60 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 50 ml, o de
aproximadamente 5 ml a de aproximadamente 30 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 20 ml, o de
10 aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 100 ml, o de
aproximadamente 10 ml a aproximadamente 80 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 60 ml, o de
aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 30 ml, o de
aproximadamente 10 ml a aproximadamente 20 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 100 ml, o de
aproximadamente 20 ml a aproximadamente 80 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 60 ml, o de
15 aproximadamente 20 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 30 ml, por
ejemplo, basándose en 10 ml de la muestra.

El contacto de la muestra con la matriz porosa se continúa durante un período de tiempo suficiente para conseguir
un enriquecimiento de las CEC con respecto a las células no raras sobre la matriz porosa. El período de tiempo
depende de uno o más de la naturaleza y tamaño de las células no raras, el tamaño de las CEC, la naturaleza de la
20 matriz porosa, el tamaño de los poros de la matriz porosa, el nivel de presión aplicada a la muestra de sangre sobre
la matriz porosa, el volumen a filtrar, el área de superficie del filtro, por ejemplo. En algunos ejemplos, el periodo de
contacto es de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a
aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente
5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o de
25 aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1
hora, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 10 minutos a
aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, por ejemplo.

En algunos ejemplos un aumento deseado en la relación de CEC con respecto a células raras en una muestra que
se sospecha de contiene CEC y células no raras es de al menos aproximadamente 10 veces o al menos
30 aproximadamente 20 veces o al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 75 veces o al
menos aproximadamente 100 veces por encima de la relación de CEC con respecto a las células no raras en la
muestra original. En algunos ejemplos, el aumento de la relación de CEC con respecto a células no raras que se
desea es de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 200 veces o aproximadamente 10 veces a
aproximadamente 150, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces o de aproximadamente 25
35 veces a aproximadamente 100 veces o de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo.

Las CEC concentradas o aisladas se examinan a continuación para la presencia de uno o más factores de
coagulación. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, tal
examinación implica un ensayo que usa un elemento de enlace para un factor de coagulación específico.

40 Cualquier ensayo adecuado puede emplearse para la determinación de una presencia y/o cantidad de factor de
coagulación presente sobre las CEC. Los ensayos se llevan a cabo combinando células mejoradas o aisladas con
reactivos para identificar uno o más factores de coagulación, que incluyen el elemento de enlace para el factor de
coagulación. El elemento de enlace es un agente que reconoce específicamente y/o se une a un factor de
coagulación sobre las CEC. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo a realizar. En
general, el ensayo es un método para la determinación de un factor de coagulación sobre una CEC. El ensayo
45 puede ser un inmunoensayo o un no inmunoensayo. El ensayo puede llevarse a cabo simultáneamente con la
filtración o puede llevarse a cabo después de la filtración. Diversos métodos de ensayo se discuten más adelante a
modo de ilustración y no de limitación.

En algunos ejemplos los reactivos comprenden, como que incluyen el elemento de enlace para un factor de
coagulación específico, al menos un anticuerpo específico para un factor de coagulación que puede estar presente
50 sobre la CEC. Este ensayo se le hace referencia generalmente como un inmunoensayo como se distingue de
ensayos que no utilizan un anticuerpo, a los que se hace referencia como no inmunoensayo. Por la oración
"anticuerpo para un factor de coagulación" "anticuerpo para un factor de coagulación" significa un anticuerpo que se
une específicamente al factor de coagulación y no se une a ningún grado significativo a otras sustancias que
distorsionarían el análisis para el factor de coagulación particular.

55 Los anticuerpos específicos para un factor de coagulación para su uso en inmunoensayos para identificar un factor
de coagulación particular puede ser monoclonal o policlonal. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante
técnicas que son bien conocidas en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de suero
(policlonal) o mediante la preparación de líneas de células híbridas continuas y la recogida de la proteína segregada

(monoclonal) o mediante la clonación y la expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para el enlace específico de anticuerpos naturales.

5 Los anticuerpos incluyen una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, y IgM, por ejemplo. Los fragmentos de los mismos incluyen Fab, Fv y F(ab')₂, y Fab', por ejemplo. Además, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos pueden usarse cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga la afinidad de enlace para una molécula particular.

10 Otros reactivos están incluidos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo a realizar. Tales ensayos normalmente implican reacciones entre elementos de enlace tales como un factor de coagulación sobre una CEC y un anticuerpo correspondiente o el enlace entre un anticuerpo y un elemento de enlace correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. El anticuerpo y el factor de coagulación son miembros de un par de enlace específico, que comprende dos moléculas distintas, cada una de las cuales tiene un área en la superficie o en una cavidad que se enlaza específicamente con y se define, de este modo, como complementario
15 con una organización polar y espacial particular de la otra molécula. Los miembros del par de enlace específico serán normalmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo y hapteno-anticuerpo, aunque otros pares específicos incluyen, por ejemplo, biotina-avidina, hormona-receptores de hormona, enzima-sustrato, dupletes de ácido nucleico, IgG-proteína A y pares de nucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN.

20 Como se ha comentado anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una o dos moléculas distintas para la otra en comparación con un reconocimiento sustancialmente inferior de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente dependiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores entre los que se incluye interacciones hidrófobas entre moléculas. En muchas realizaciones en ensayos para un factor de coagulación particular, los elementos de enlace preferidos son anticuerpos y los ensayos se les hace referencia
25 como inmunoensayos.

Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden normalmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión lumínica correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos de enzimas, inmunoensayos
30 marcados por fluorescencia, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida y ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Los ensayos se pueden realizar sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos incluyen, pero sin limitación, técnicas de
35 inmunocitoquímica, ensayo de anticuerpo fluorescente directo o el ensayo de inmunofluorescencia directo, inmunoensayos de enzima homogéneos incluyendo el ensayo EMIT® que se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 3.817.837; métodos de inmunofluorescencia tales como los que se describen en la patente de Estados Unidos n.º 3.996.345; inmunoensayos de canalización de enzimas tales como los que se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.233.402; y el inmunoensayos de polarización de fluorescencia tal como se desvela, por
40 ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.354.693; por ejemplo.

Otros inmunoensayos de enzimas incluyen el inmunoensayo mediado por modulado de enzima; el inmunoensayo de fluorescencia marcado de sustrato; los inmunoensayos de donante de enzima combinado; inmunoensayos marcados de partícula homogénea tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrico realizado por partícula y el
45 inmunoensayo turbidimétrico realizado por partícula; por ejemplo. Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partícula sol; el inmunoensayo de tinte disperso; el metalinmunoensayo; los inmunoensayos de membrana de enzima; luminoensayo; inmunoensayos de marcador de éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como una fase sólida; por ejemplo. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican el seguimiento de los cambios en una o más de las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada por anticuerpo cuando se une un fármaco hidrófobo. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de
50 inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico y similares.

En muchos de los ensayos que se discuten en el presente documento para la determinación de un factor de coagulación, se emplea un marcador; el marcado es parte normalmente de un sistema productor de señal. La
55 naturaleza del marcador depende del formato de ensayo particular. Un sistema productor de señal incluye normalmente uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador detectable, que genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de marcador enlazado y/o no enlazado, es decir, la cantidad de marcador enlazado o no enlazado al analito que se detecta o a un agente que refleja la cantidad del analito a

detectar. El marcador es cualquier molécula que produce o puede ser inducido para producir una señal y puede ser, por ejemplo, un agente fluorescente, un radiomarcador, una enzima, un quimiluminiscente o un fotosensibilizador. De este modo, la señal se detecta y/o mide detectando la actividad de la enzima, la luminiscencia, la absorbancia lumínica o radioactividad, dependiendo de la naturaleza del marcador.

- 5 Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, tintes; agentes fluorescentes, tal como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina; enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como replicasa QB; promotores; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presente en nanocristales de semiconductor conocidos como puntos cuánticos; quimiluminiscentes tales como ésteres de isoluminol y acridinio, por ejemplo; sensibilizadores; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcadores tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como las partículas de látex, partículas de carbono, partículas de metal incluyendo partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO₂) y similares; metal sol; cristalita; liposomas; células, etc., que puede marcarse adicionalmente con un tinte, catalizador u otro grupo detectable.
- 10
- 15 El marcador puede producir directamente una señal y, por lo tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo agentes fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, en la que la absorción lumínica transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa a continuación mediante emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que pueden producir una señal incluyen isótopos radioactivos y tintes.
- 20 Como alternativa, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema productor de señal incluiría a continuación todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Tales otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, accionadores, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones de metal y una sustancia de unión específica requerida para la unión de las sustancias que general señal. Se puede encontrar una discusión detallada de sistemas productores de señal en la patente de Estados Unidos n.º 5.185.243, columnas 11-13.
- 25

El marcador u otros miembros del sistema producir de señal puede unirse a un soporte o volverse unido a una molécula tal como una célula que se dispone sobre un soporte. Las células pueden unirse a un soporte sólido de cualquier modo conocido en la técnica, siempre y cuando la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de un factor de coagulación sobre la célula de unirse con un anticuerpo. En algunas realizaciones, las células pueden estar recubiertas o unidas covalentemente directamente al soporte sólido. Los grupos de unión también pueden usarse para emparejar covalentemente el soporte sólidos y las células. Otros métodos de unión de células también son posibles. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un enlazador para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse a las células o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede conseguirse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura.

30

35

El soporte puede estar comprendido de un material insoluble en agua orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una cantidad de formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, caña, superficies planas (tales como, por ejemplo, lámina, placa y platina), y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no puede suspenderse en el medio en el cual se emplea. Ejemplos de soportes que se pueden suspender son materiales poliméricos tales como látex; bicapas lipídicas y liposomas; gotas de aceite y soportes metálicos tales como, por ejemplo, partículas metálicas; por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon y poli(butirato de vinilo), bien usados por sí mismos o en conjunto con otros materiales.

40

45

El marcador y/u otro miembro del sistema productor de señal puede unirse a un miembro de un par de unión específica u otra molécula. Por ejemplo, el marcador se puede encontrar covalentemente a un miembro de un par de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor para un anticuerpo o un receptor que es capaz de unirse a una molécula pequeña conjugada a un anticuerpo. Un receptor es una molécula capaz de unirse específicamente a otra molécula. La unión del marcador al miembro de par de unión específico puede lograrse mediante reacciones químicas que resultan en el reemplazo de un átomo de hidrógeno del marcador con un enlace al miembro par de unión específico o puede incluir un grupo de enlace entre el marcador y el miembro de par de unión específico. Otros miembros de sistema productor se señal también pueden encontrarse unidos covalentemente a miembros de par de unión específicos. Por ejemplo, dos miembros de sistema productor de señal tal como un agente fluorescente y un desactivador de fluorescencia puede cada uno estar enlazado a un anticuerpo distinto que forma un complejo específico con el factor de coagulación. La formación del complejo lleva al agente fluorescente y al desactivador de fluorescencia en cercana proximidad, permitiendo de este modo que el

50

55

desactivador de fluorescencia interactúe para producir una señal.

Los ensayos descritos anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que, en general, proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El pH del medio de ensayo normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH normalmente será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de enlace de cualquier par de unión específico y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como miembros de un sistema producir de señal, por ejemplo. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el periodo de incubación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de tampones y conservantes, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones, tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de unión, por ejemplo. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente como para lograr el efecto o función deseados.

Pueden aplicarse uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio normalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca el enlace de diversos componentes de los reactivos. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo el método y normalmente la temperatura constante, preferentemente, la temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente varían de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de enlace de diversos. Las temperaturas durante las mediciones, en general, variarán de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 50 °C o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo, en general, se determinarán mediante el intervalo de concentración de interés del factor de coagulación, la naturaleza del ensayo, la afinidad y avidéz del anticuerpo y la fragmentación del anticuerpo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo durante el intervalo. Las consideraciones, tales como la naturaleza de un sistema de producción de señales y la naturaleza del factor de coagulación, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Mientras que el orden de agregación puede variarse en amplia manera, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden más sencillo de agregación es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, los reactivos pueden combinarse secuencialmente. Opcionalmente, puede estar implicada una etapa de incubación después de cada adición, tal como se ha tratado anteriormente. La longitud del periodo de incubación es aquel que es suficiente para conseguir la función deseada.

Realizaciones específicas de ensayos que pueden emplearse para identificar uno o más factores de coagulación sobre las CEC de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se describen a continuación a modo de ilustración y no de limitación.

En un ejemplo, se emplea una técnica de inmunocitoquímica para determinar si un factor de coagulación particular está o no está presente sobre las CEC. La preparación de CEC se coloca sobre un soporte sólido, que puede ser, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio. La preparación de CEC aislada puede retirarse de una membrana de filtro, por ejemplo, y colocarse sobre un soporte sólido para su examinación o la membrana de filtro misma puede colocarse sobre el soporte sólido. La preparación de CEC puede tratarse para fijar las células y/o permeabilizar las células, si se desea.

La fijación de las CEC inmoviliza las células y conserva la estructura celular y mantiene las células en una condición que se parece cercanamente a las células en una condición similar a *in vivo* y una en la que los factores de coagulación de interés son capaces de ser reconocidos mediante un anticuerpo específico. La cantidad de fijador empleada es aquella que conserva las células pero que no conduce a resultados erróneas en un ensayo posterior. La cantidad de fijadores depende de uno o más de la naturaleza del fijador y las CEC, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad de fijador es de aproximadamente el 0,05 % al aproximadamente 0,15%, o aproximadamente del 0,05% a aproximadamente el 0,10 %, o de aproximadamente el 0,10 % al aproximadamente 0,15%, por ejemplo, en volumen de la muestra de sangre. Los agentes para llevar la fijación de las células raras incluyen, pero sin limitación, agentes de reticulación tales como, por ejemplo, un reactivo de aldehído (tal como, por ejemplo,

formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído); un alcohol (tal como, por ejemplo, alcoholes C1-C5, tales como metanol, etanol e isopropanol); una cetona (tal como una cetona C3-C5, tal como acetona); por ejemplo. Las designaciones C1-C5 o C3-C5 se refieren al número de átomos de carbono en el alcohol o la cetona. Una o más etapas de lavado pueden llevarse a cabo sobre las células fijadas usando un medio acuoso tamponado.

5 Si es necesario después de la fijación, la preparación de CEC puede someterse a permeabilización. En algunos casos, un agente de fijación tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol= o una cetona (por ejemplo, acetona) también resulta en la permeabilización y no es necesaria ninguna etapa de permeabilización adicional. La permeabilización proporciona acceso a través de la membrana celular a los factores de coagulación de interés. La cantidad de agente de permeabilización empleada el aquel que altera la membrana celular y permite el
10 acceso a los factores de coagulación. La cantidad de agente de permeabilización depende de uno o más de la naturaleza del agente de permeabilización y la cantidad de CEC, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad de agente de permeabilización es de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,5 %, o de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,4 %, o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,3 %, o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,2 % o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,5%, o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,4% o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,3 %, por ejemplo. Los agentes para llevar la permeabilización de las células raras incluyen, pero sin limitación, un alcohol (tal como, por ejemplo, alcoholes C1-C5, tales como metanol y etanol); una cetona (tal como una cetona C3-C5, tal como acetona); un detergente (tal como, por ejemplo, saponina, TRITON® X-100 y TWEEN®-20); por ejemplo. Una o más etapas de lavado pueden llevarse a cabo sobre las células permeabilizadas
20 usando un medio acuoso tamponado.

En la técnica de inmunocitoquímica, un anticuerpo marcado específico para un factor de coagulación sobre una CEC se emplea para cada factor de coagulación distinto sospechado en la preparación de CEC. Los marcadores empleados son marcadores fluorescentes y un marcador fluorescente distinto se emplea para cada factor de coagulación distinto de modo que los múltiples anticuerpos marcados con fluorescente pueden emplearse en
25 cualquier un ensayo sobre una preparación de CEC aislada.

Una vez fijada y permeabilizada, la preparación de CEC se pone en contacto con un medio acuoso que contiene uno o más anticuerpos marcados tal como se ha descrito anteriormente. El medio acuoso puede ser un medio de ensayo tal como se ha descrito anteriormente y la cantidad de cada anticuerpo marcado es aquella que es suficiente para identificar cada uno de los factores de coagulación que pueden ser de interés. En algunos ejemplos, la cantidad de
30 cada anticuerpo marcado es en exceso de la cantidad sospechosa de los factores de coagulación. Las CEC se incuban con los anticuerpos marcados en condiciones que permiten la unión de los anticuerpos marcados con sus factores de coagulación respectivos. Tales condiciones se describen anteriormente respecto a los ensayos en general. Después de la incubación, la preparación de CEC se somete a una o más etapas de lavado usando un medio acuoso tamponado para retirar los anticuerpos marcados no unidos.

35 Un colorante de ADN tal como, por ejemplo, 4', 6-diamidino-2-fenilindol, yoduro de propidio, bromuro de etidio, SYBR® Green I, VISTRA™ GREEN, SYTO® GREEN, SYBR® Gold, YO-PRO-1™, TOTO-3™, TO-PRO-3™, NUCLEAR-ID™ Red o colorante Hoechst, se emplea para potenciar el contraste en la imagen de preparación de CEC durante el examen microscópico. Después de la coloración, pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado sobre las células usando un medio acuoso tamponado. Las células se examinan a continuación usando un
40 microscopio fluorescente y cada uno de los marcadores fluorescentes distintos se usa en la detección directa de un factor de coagulación respectivo en la preparación de CEC.

Como alternativa, en el procedimiento anterior pueden emplearse anticuerpos no marcados y los anticuerpos respectivos se detectan indirectamente empleando un miembro de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo antiespecie con un marcador. Los marcadores respectivos de los miembros de unión específicos se
45 detectan mediante medios apropiados.

Como alternativa, en los procedimientos anteriores pueden emplearse anticuerpos en los que los anticuerpos respectivos se detectan indirectamente con un segundo anticuerpo marcado con una enzima o directamente marcados con una encima en un método de amplificación de enzima. Una enzima respectiva tal como, por ejemplo, se detecta peroxidasa de rábano silvestre (HRP) mediante medios apropiados. Por ejemplo, mediante generación
50 enzimática de una señal fluorescente, óptica o quimiluminiscente respectiva, se genera un marcador de enzima respectivo a un colorante covalentemente unido a grupos de tirosina de proteína en presencia de HRP (tal como, por ejemplo, Amplificación de la Señal de Tiramida (TSA™), Perkin Elmer), por ejemplo. Los miembros de unión específicos pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para cada uno de los anticuerpos no marcados respectivos usados para la unión a un factor de coagulación respectivo.

55 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, uno de los métodos de inmunoensayo, tal como, por ejemplo, un método de inmunocitoquímica, se lleva a cabo en conjunto con el uso de un conjunto de filtración de matriz porosa descrito anteriormente. En un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, se emplea el conjunto de filtración de matriz porosa descrito en la publicación de solicitud de patente '664.

Las CEC retenidas en el filtro del conjunto se examinan usando un método de inmunoensayo tal como, por ejemplo, el método de inmunocitoquímica descrito más completamente anteriormente. En un ejemplo particular, una muestra a someter a ensayo para células CEC se somete a filtración empleando el conjunto de filtración de matriz porosa de la publicación de solicitud de patentes '664. Las CEC concentrada sobre una superficie de la matriz porosa se examinan exponiendo las CEC a uno o más anticuerpos marcados, cada uno de las cuales es específico para un factor de coagulación sobre una CEC. Los marcadores empleados son marcadores fluorescentes y un marcador fluorescente distinto se emplea para cada factor de coagulación distinto de modo que los múltiples anticuerpos marcados con fluorescente pueden emplearse en cualquier un ensayo sobre una preparación de CEC aislada. Una vez fijada y permeabilizada, la preparación de CEC se pone en contacto con un medio acuoso que contiene uno o más anticuerpos marcados tal como se ha descrito anteriormente. Las CEC se incuban con los anticuerpos marcados en condiciones que permiten la unión de los anticuerpos marcados con sus factores de coagulación respectivos. Después de la incubación, la preparación de CEC se somete a una o más etapas de lavado usando un medio acuoso tamponado para retirar los anticuerpos marcados no unidos. Un colorante de ADN, tal como se ha tratado anteriormente, se emplea para potenciar el contraste en la imagen de preparación de CEC durante el examen microscópico. Después de la coloración, pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado sobre las células usando un medio acuoso tamponado.

Las células se examinan a continuación usando un microscopio fluorescente y cada uno de los marcadores fluorescentes distintos se usa en la detección directa de un factor de coagulación respectivo en la preparación de CEC. En ejemplos de acuerdo con la discusión anterior, se observan sorprendentemente niveles de fondo inferiores de modo que la señal de factor de coagulación más débil (inmunoensayo de afinidad inferior) puede observarse como una señal separada de ruido de fondo en la señal de marcador de identificación celular endotelial. Esto resulta una ventaja inesperada realizada en ejemplos de métodos para análisis de CEC empleando técnicas de filtración de matriz porosa y técnicas de inmunocitoquímica.

La medición de una cantidad de señal obtenida en cualquiera de los anteriores métodos de ensayo para CEC que comprenden uno más factores de coagulación está correlacionada con el nivel de enfermedad endotelial en el sujeto. Esta medición se explica en más detalle en lo que sigue: Para determinar en primer lugar si la célula de interés es una célula endotelial usando un marcador de célula endotelial con señal distinta separada y mediante comparación con un marcador de célula inmune en una segunda señal distinta separada. Las células CEC se recuentan cuando las CEC están por encima de un umbral y la señal de GB se encuentra por debajo de un umbral. El umbral se define como el punto en el cual la señal es detectable por encima del ruido. El ruido en este caso es la señal de fondo sobre la matriz de filtración. Una tercera señal distinta separada para el marcador del factor de coagulación se mide para cada CEC. Las células CEC con una señal de factor de coagulación medido por encima del umbral se cuentan como CEC activadas. El proceso de filtración permite que todas las tres señales se midan simultáneamente. Un umbral de señal separado se seleccionada para cada determinación de si una célula es CEC, GB o si una CEC tiene un factor de coagulación. El umbral de señal de GB se establece usando un control negativo con GB. Las CEC y los umbrales de señal de factor de coagulación se determinan usando un control positivo con GB y células endoteliales cultivadas que se fijan con un factor de coagulación. Las señales por debajo del umbral se establecen a cero. La muestra desconocida se ejecuta y solo las señales de factor de coagulación por encima del umbral medido sobre células que son células de CEC positivas y de GB negativos.

Los métodos anteriores también pueden emplearse para determinar un potencial de un sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura o trombosis. La señal obtenida en cualquiera de los métodos de ensayo anteriores para CEC que comprenden uno o más factores de coagulación se correlaciona con el potencial de un sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura o trombosis midiendo las señales de CEC y GB identificando las células por encima del umbral de CEC y por debajo del umbral de GB. La señal de factor de coagulación sobre las CEC se mide a continuación si está por encima del umbral positivo. Los números de CEC se recuentan para cada paciente. Si la señal para el factor de coagulación se encuentra por encima del umbral de las CEC, la célula se considera activada. Cuando mayor sea el aumento en el aumento de la señal de factor de coagulación por encima del umbral, mejor será la activación para las CEC. Cuanto mayor sea el número de CEC, el número de CEC activadas y el alcance de activación, mejor será la correlación del sujeto que muestra coagulación prematura.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documentos están dirigidos a métodos de identificación y tratamiento de un sujeto mamífero para la coagulación prematura. El método comprende mejorar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida a partir del sujeto mamífero, examinar las células endoteliales circulantes para la presencia de un factor de coagulación, correlacionar la presencia de la coagulación con respecto el potencial del sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura y administrar al sujeto mamífero una terapia de factor de anticoagulación.

Ejemplos de métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento ofrecen ventajas significantes con respecto a la terapia de sujetos identificados como que tienen un potencial para la coagulación prematura. Como se ha mencionado anteriormente, la terapia de factor de coagulación puede emplearse, la cual evita el uso de fármacos administrador para combatir la trombosis, tal como, por ejemplo, anticoagulantes, (por ejemplo, heparina), inhibidores de trombina, agentes profibrinolíticos, warfarina, acenocoumarol, fenprocoumon,

atromentina, brodifacum, fenindona, fondaprinux, idraparinux, argatrobán, dabigatrán, rivaroxabán, apixabán, que también pueden ir dirigidos a la hemostasis. Agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, ticagrelor y prasugrel. Es deseable tratar la trombosis sin afectar la hemostasis en ningún grado significativo. La frase "grado significativo" significa que la hemostasis está afectada por causar un tiempo de coagulación anormal (tiempo de protrombina) y función o recuento plaquetario anormal.

En algunos ejemplos la terapia de factor de anticoagulación implica tratar a un paciente identificado por estar en riesgo de coagulación prematura con un inhibidor para el factor de coagulación o factores de coagulación detectados. Los inhibidores para un factor de coagulación se incluyen, pero sin limitación, inhibidores de molécula pequeña para un factor de coagulación específico, anticuerpos para un factor de coagulación específico (por ejemplos factores de I a XI), antitrombina, anticuerpos para factores de coagulación específicos, inhibidores de plasmína, inhibidores de urocinasa, inhibidores de la vía del factor tisular, inhibidores del activador de plasminógeno y bikuninas, por ejemplo. La terapia de inhibidor de molécula pequeña implica la administración a un sujeto identificado mediante métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento en una cantidad eficaz de un inhibidor de molécula pequeña de un factor de coagulación específico presente sobre las CEC. La terapia de anticuerpo implica la administración a un sujeto identificado mediante métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para un factor de coagulación identificado presente sobre las CEC.

La frase "inhibidor de molécula pequeña" se refiere a un inhibido para un factor de coagulación específico que es una molécula orgánica que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2.000 o inferior a aproximadamente 1.500 o inferior a aproximadamente 1.000 o inferior a aproximadamente 500 o inferior a aproximadamente 400 o inferior a aproximadamente 300, por ejemplo. En algunos ejemplos, el inhibidor de molécula pequeña tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 300, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, por ejemplo. Inhibidores de molécula pequeña para un factor de coagulación específico incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, inhibidores directos del factor Xa (rivaroxabano, apixabano) e inhibidores directos de trombina hirudina, lepirudina, bivalirudina, argatrobán, dabigatrán, ximelagatrán), por ejemplo.

Anticuerpos contra un factor de coagulación específico puede prepararse usando técnicas descritos en detalle anteriormente para la preparación de anticuerpos. Anticuerpos específicos para un factor de anticoagulación incluyen, pero sin limitación, anticuerpos específicos para el factor X, anticuerpos específicos para el factor IX, anticuerpos específicos para el factor VIII, anticuerpos específicos para el factor VII, anticuerpos específicos para el factor V, anticuerpos específicos para el factor IV, anticuerpos específicos para el factor tisular, anticuerpos específicos para el factor II, anticuerpos específicos para el factor I, anticuerpos específicos para la trombina, anticuerpos específicos para la plasmína, anticuerpos específicos para la protrombina, anticuerpos específicos para la antitrombina, anticuerpos específicos para la trombomodulina, anticuerpos específicos para la plasmína, anticuerpos específicos para el plasminógeno, anticuerpos específicos para la urocinasa, anticuerpos específicos para la fibronectina, anticuerpos específicos para la enzima convertidora de la angiotensina, específicos para factor von Willebrand (vWF), anticuerpos específicos para la fibrina; anticuerpos específicos para el dímero D, anticuerpos específicos para el activador del plasminógeno tisular, anticuerpos específicos para la proteína Z relacionada con inhibidores de la proteasa, anticuerpos específicos para los inhibidores de la vía del factor tisular, anticuerpos específicos para los inhibidores del activador del plasminógeno, anticuerpos específicos para la bikunina, anticuerpos específicos para el cofactor II de la heparina, anticuerpos específicos para el procoagulante de cáncer, anticuerpos específicos para la proteína C, anticuerpos específicos para la proteína Z y anticuerpos específicos para la proteína S, por ejemplo.

La frase "al menos", tal como se usa en el presente documento, significa que el número de elementos especificados puede ser igual a o mayor que el número citado. La frase "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, significa que el número citado puede diferir en más o menos el 10 %; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y están previstas para describir y no limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes que se desvelan en el presente documento son en volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Todos los productos químicos pueden adquirirse en Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO) a menos que se indique lo contrario.

Abreviaturas:

K₃EDTA = sal de potasio de etilendiaminotetraacetato

GB = glóbulos blancos

GR = glóbulos rojos

5 DAPI = 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

HBSS = Solución salina tamponada de Hank

min = minuto(s)

seg = segundo(s)

10 μm = micrómetro(s)

ml = mililitro(s)

mg = miligramo(s)

μg = microgramo(s)

15 PBS = tampón fosfato salino (3,2 mM de Na₂HPO₄, 0,5 mM de KH₂PO₄, 1,3 mM de KCl, NaCl 135 mM, pH 7,4) mBar = milibare(s)

TA = temperatura ambiente

20 Todos los especímenes de sangre para su ensayo se prepararon mediante la colección de sangre a partir de 10 sujetos que contenían células endoteliales circulantes (CEC). Las muestras de sangre (7-10 ml) se recogieron en tubos de VACUTAINER® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ) que contenían K₃EDTA. Se añadió paraformaldehído adicional a 0,05 % en volumen de la muestra de sangre. La concentración de GB fue de aproximadamente 10⁷ por 10 ml de sangre y de GR fue de aproximadamente 5x10¹⁰ por 10 ml de sangre.

25 Se realizaron muestras negativas y positivas a partir de las muestras de sangre completas mediante la adición de células endoteliales cultivadas con factor de coagulación a un nivel de 200 células por 10 ml de muestra de sangre. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH) (ATCC PCS-100-010) se cultivaron en medio basal ENDOGRO® (Millipore Corporation, Billerica MA). Las células se fijaron añadiendo 1,0 ml de 2 % de formaldehído HBSS para suspender la célula e incubando de 2 °C a 8 °C durante la noche durante aproximadamente 20 h. Los factores de coagulación, a saber Factor X humano, o Factor tisular o factor von Willebrand y otros se fijaron a las células por medios de formaldehído. El factor X humano, que se adquirió a partir del Enzyme Research Laboratory, South Bend IN. Todos los otros factores se adquirieron de Sigma Aldrich. El factor de coagulación, Factor X, juega un papel importante en la iniciación de la coagulación sobre células portadores de TF en el endotelio mediante la amplificación de la señal procoagulantes mediante la trombocina generada sobre la célula portadora de TF y la propagación de la generación de trombina sobre la superficie plaquetaria. Ambas vías extrínsecas e intrínsecas convergen en el factor Xa. El factor Xa es importante según la coagulación se activa cuando el factor Xa se forma sobre el endotelio y las CEC en un complejo Xa/Va/Ca/fosfolípido.

35 Después de un día de almacenamiento a 25 °C, las muestras de sangre se filtraron a través de una membrana que tenía un tamaño de poro de 8 μm según un método que se desvela en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2012/0315. Durante la filtración, la muestra sobre la membrana se sometió a un mBar negativo, es decir, una disminución superior a aproximadamente -30 de presión atmosférica. El vacío aplicado varía de 1 a -30 mBar según el volumen de la muestra se reduce durante la filtración. Las caídas de alta presión fueron permisibles dependiendo del volumen del depósito y de la muestra y velocidad de filtración. Justo antes de la filtración, una muestra (7-10 ml) se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, que se llenó hasta 20 ml con PBS frío. Los tubos Falcon se volcaron manualmente dos veces y se sometieron a centrifugación durante 10 min a 400 x f a 20 °C. La muestra diluida se colocó en la estación de filtración sin mezclar y la muestra se filtró a través de la membrana. Después de la filtración, la membrana se lavó con PBS, y la muestra se fijó con formaldehído, se lavó con PBS, se sometió a permeabilización usando 0,2 % de TRITON® X100 en PBS y se volvió a lavar con PBS.

- Las células capturadas sobre la membrana fueron detectadas con un procedimiento de inmunocitoquímica (ICQ) que se basa en la unión de anticuerpos específicos a proteínas específicas o antígenos en las células. Un tampón bloqueante de 10 % de caseína en PBS se administró sobre la membrana. Después de un período de incubación de 5 min, la membrana se lavó con PBS para bloquear la unión no específica a la membrana. A continuación, una
- 5 mezcla de anticuerpo-conjugado se administró a la membrana seguido por un período de incubación de 20 min a TA. La mezcla de conjugados de anticuerpos (en 10 % de caseína en PBS) incluían anticuerpo de factor de anticoagulación (reactivo o a Factor X humano, o factor tisular o factor von Willebrand) conjugados a Dy488 a 10 µg/ml, anticuerpo anti-CEC (reactivo a cualquier marcador en la Tabla 1) conjugado con Dy550 a 10 µg/ml, y anticuerpo anti-CD45 (usado para GB) conjugado con Dy650 a 20 µg/ml. La mezcla de conjugados de anticuerpo
- 10 incluía anticuerpo de célula antiendotelial (reactivo a marcadores en la Tabla 1) conjugado a Dy550. El anticuerpo no unido se retiró mediante lavado (PBS + 0,05 % de TWEEN® 20) y DAPI (0,8 µg/ml en PBS), se añadió un colorante de ADN fluorescente para teñir el núcleo de las células. Se llevó a cabo una última etapa de lavado con PBS, seguido por medio de cobertura para ayudar a conservar la intensidad fluorescente de las sondas. Se realizaron platinas con DABCO como un medio cubreobjetos (0,25 g de DABCO a 9 ml de glicerol y 1 ml 10 x PBS).
- 15 Las platinas para paciente y control se colocaron a continuación en un soporte de platina de un microscopio fluorescente Leica DM5000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) donde se capturaron imágenes durante el escaneo automático de la membrana para cada una de las sondas fluorescentes usadas para la detección de células diana. Los conjugados de anticuerpo se unieron a la proteína o antígeno de una célula, u los marcadores fluorescentes se detectaron usando un microscopio fluorescente con excitación, emisión y filtros de corte específicos
- 20 para cada marcador. Se usaron múltiples marcadores fluorescentes, cada uno con un anticuerpo específico distinto, para detectar múltiples antígenos o proteínas en las células aisladas.
- Las células a continuación se caracterizaron escaneando la membrana mediante microscopía de fluorescencia llevada a cabo con Leica DM5000 usando los conjuntos de filtro para los marcadores de fluoróforo respectivos usados en las conjugados de anticuerpo anteriores, concretamente, DyLight 488 (Dy488), DyLight 550 (Dy550),
- 25 DyLight 650 (Dy650) (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham MA) o DAPI. Los controles se sometieron a ensayo en primer lugar para asignar umbrales para la detección de señales positivas de CEC, GB y factor de coagulación. El enriquecimiento de células raras logrado se midió contando las células raras (CEC positivas) y excluyendo las células inmunes (GB) que permanecían sobre la membrana. Los GR se sometieron a lisis o pasaron a través de la membrana.
- 30 Los resultados de cinco anticuerpos distintos con respecto a marcadores para CEC, dos anticuerpos distintos con respecto a marcadores para factores de coagulación y un anticuerpo con respecto a marcadores para GB se resumen en la Tabla 1. Los anticuerpos se sometieron a ensayo frente a una muestra nativa conocida que contenía CEC., CEC activadas con factores de coagulación y GB. Los anticuerpos también se sometieron a ensayo frente a un control positivo con células CEVUH cultivadas fijadas con factores de coagulación. La señal con respecto a la
- 35 relación de ruido se evaluó como de cero a 5+ basándose en la unión a células en la sangre de control positivo.

Tabla 1

Marcador	Señal con respecto a ruido de CEC nativas	para la unión de anticuerpos de GB nativos	mediante filtración de CEVUH de control
Vimentina	++++	0	+
Z0-1	++	0	+
CD105	++	0	++++
CD144	+	0	+
CD146	+++	0	++
Anti-factor X	++	0	++++
Anti VWF	++	0	++++
CD45	0	+++	0

- 40 Todos los anticuerpos capaces de medir CEC incluyendo la vimentina, Z0-1, CD105, CD144 y CD146, fueron receptivos a CEC nativas y muestras de CEVUH de control con factores de coagulación. Todos los anticuerpos capaces de medio factores de coagulación que incluyen factor X y vWF, fueron receptivos a CEC activadas con factores de coagulación y muestra de CEVUH de control con factores de coagulación. El anticuerpo CD45 capaz de medir los GB no respondió a las CEC activadas con factores de coagulación o muestra de CEVUH de control con factores de coagulación y solo a GB.
- 45 De acuerdo con los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, en todos los casos las CEC y los anticuerpos de factores de coagulación tenían niveles de fondo sorprendentemente inferiores en muestras de sangre que solo contenían GB medidos como cero (0). Incluso anticuerpos con señales de anticuerpo débiles (+ a ++) con respecto a células de control (inmunoensayo de afinidad inferior) fueron capaces de separar una

señal del ruido de fondo para la identificación celular endotelial nativa. Esto resultó una ventaja inesperada realizada en análisis empleando técnicas de filtración de matriz porosa y técnicas de inmunocitoquímica. Sin desear quedar ligado por mecanismo particular alguno, se cree que las ventajas anteriores resultan de la filtración que conduce la reacción de afinidad y que lava los marcadores no unidos de forma más eficaz. Las células CEC se recontaron cuando la señal de las CEC estaba por encima de un umbral y la señal de GB se encontraba por debajo de un umbral. El umbral era el punto en el cual la señal era detectable por encima del ruido, el cual en este caso era la señal de fondo sobre la matriz de filtración. (Véase la Tabla 2).

Los resultados para diez pacientes sanos y diez pacientes no sanos se resumen en la tabla 2 a continuación. Los pacientes no sanos eran aquellos con plaquetas hiperactivadas (desequilibrio de hemostasia). Estos pacientes con plaquetas hiperactivadas son más propensos a tener un desprendimiento de CEC. Los pacientes con plaquetas hiperactivadas fueron aquellos con tiempos de cierre por debajo de 75 seg cuando se midieron con el producto de colágeno/ADP o por debajo de 150 seg cuando se midieron con el producto de colágeno/ADP (PFA-100 Siemens Healthcare Diagnostics, Newark DE). Los pacientes no se encontraban con terapia para la coagulación 12 h antes de la recogida de muestra.

Estos pacientes fueron sometidos a ensayo mediante dos métodos distintos. El primer método se empleó justo para determinar la cantidad de señal de unión para CEC mediante anticuerpo de vimentina marcado con Dy550 y para GB mediante anticuerpo CD45 marcado con Dy650 y para el factor de coagulación mediante anticuerpo de factor C marcado con Dy448. La intensidad relativa de señal se determinó en dos gráficos de dimensión. En un gráfico, las células en las áreas con señal de Dy550 más fuerte y señal de Dy650 débil se determinaron como CEC positivas. En otro gráfico, las células en las áreas con señal Dy550 más fuerte y señal Dy448 más fuerte se determinaron como CEC activadas. Este método produjo una señal Dy488, Dy550 y Dy650 para cada célula y no tuvo células sin una señal. Este método representa un enfoque que se realizaría típicamente sobre un método de enriquecimiento celular de no filtración como citometría de flujo de fluorescencia y por lo tanto, representa un método no de acuerdo con los principios descritos en el presente documento y se proporciona para fines comparativos. Este método no separó pacientes sanos de pacientes no sanos muy bien con solapamiento significativo y produjo un porcentaje de CEC activadas en la población sana.

El segundo método se usó para el enriquecimiento celular de filtración para determinar la cantidad de umbral de unión detectable para CEC y GB. Este método es un método de filtración con un lavado altamente eficaz que permitió retirar por lavado Dy488, Dy550 y Dy650 de fondo debido a la unión no específica. El método midió en primer lugar la señal para CEC mediante anticuerpos de vimentina marcado con Dy550 y para GB mediante anticuerpo CD45 marcado con Dy650. Solo las células con señales de Dy550 por encima del umbral de CEC y con señales Dy650 por debajo del umbral de GB se cuentan como CEC. La señal del factor de coagulación sobre las CEC se midió a continuación si estaba por encima del umbral positivo para Dy480 y las CEC se consideraron activadas.

Este segundo método estuvo de acuerdo con los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. El segundo método separó pacientes sanos de pacientes no sanos muy bien sin solapamiento significativo y no produjo un porcentaje de CEC activadas en la población sana. En este segundo método, se detectó un porcentaje superior de CEC activadas en la población no sana. Cuanto mayor sea el número de CEC, el número de CEC activadas y el alcance de activación, superior será la correlación del paciente que muestra coagulación prematura. Según la señal del factor de coagulación aumentó para las CEC, las células se consideraron más activadas.

Tabla 2

Donadores	Número promedio de CEC (desviación estándar)		Porcentaje de CEC con factor de coagulación activo	
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
Sano	8 (10)	4(4)	12 %	0 %
No sano	20 (19)	23 (8)	25%	63%

Método 1 medido mediante CEC con señales de factor de coagulación sin el uso de umbral predeterminado
 Método 2 medido mediante CEC con señales de factor de coagulación con el uso de umbral predeterminado

Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplos a efectos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para aquellos expertos habituales en la materia ante las enseñanzas de la presente invención que puedan realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma. Además, la descripción anterior, con fines explicativos, usó nomenclatura específica para proporcionar una comprensión más profunda de la invención. Sin embargo, resultará aparente al experto en la técnica que los detalles específicos no se requieren para practicar la invención. De este modo, las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se presentan con fines ilustrativos y descriptivos; no tienen la intención de ser

exhaustivos o limitar la invención a las formas precisas que se desvelan. Son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se escogieron y describieron para explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y, de este modo, permitir a otros expertos en la técnica utilizar la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación un potencial de un sujeto mamífero de mostrar coagulación prematura, comprendiendo el método:
 - 5 (a) mejorar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida a partir del sujeto mamífero, en la que la concentración de células endoteliales circulantes en una muestra se lleva a cabo disponiendo la muestra sobre
un lado de una matriz porosa y aplicando presión a la muestra dispuesta,
 - (b) examinar las células endoteliales circulantes para la presencia de un factor de coagulación y
 - 10 (c) correlacionar la presencia de la coagulación con el potencial del sujeto mamífero en mostrar coagulación prematura.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la muestra es una muestra de sangre.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el factor de coagulación se selecciona entre el grupo que consiste en factores I, II, III de factor tisular, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII trombina, protombina, antitrombina, trombomodulina, plasmina, plasminógeno, urocinasa, fibronectina, proteína C de célula endotelial, factor von
15 Willebrand, enzima convertidora de la angiotensina, fibrina, dímero D, activador del plasminógeno tisular, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, inhibidores de la vía del factor tisular, inhibidor activador del plasminógeno, bikunina, cofactor II de la heparina, procoagulante de cáncer, proteína C, proteína Z y proteína S.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la aplicación aplicada es de 1 milibar a aproximadamente 30 milibares y un tamaño de poro de la matriz poroso de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm .
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las células endoteliales circulantes concentradas sobre la matriz porosa se examinan mediante técnicas de inmunocitoquímica.
6. El método de la reivindicación 1 en el que las células se examinan para la presencia de uno o más factores de coagulación exponiendo las células a un elemento de enlace marcado para cada uno de los uno o más factores de coagulación.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la concentración de células endoteliales circulantes en una muestra se mejora mediante uno o más métodos de filtración.