

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 964**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 18158772 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3361254**

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:

19.06.2020

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:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 767 964 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

5 ANTECEDENTES

La invención se refiere a procedimientos para determinar el nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. Más en particular, la invención se refiere a procedimientos para determinar la posibilidad de que un sujeto mamífero presente coagulación prematura.

10 El análisis celular es importante en aplicaciones médicas, tales como el diagnóstico de muchas enfermedades. Sin embargo, muchas aplicaciones médicas de análisis celular requieren el aislamiento de determinadas células de interés, que típicamente representan solo una pequeña fracción de la muestra analizada. Por ejemplo, las células endoteliales circulantes ("CEC") son de particular interés en el diagnóstico de cáncer metastásico y de trastornos cardiovasculares. Si bien las CEC se pueden medir, el valor clínico de dichas mediciones no está claro. Se ha demostrado que las CEC están presentes en pacientes con y sin cardiovascularopatía o cáncer. El incremento de las CEC o el cambio en su morfología no es suficiente para predecir el infarto de miocardio; por tanto, el uso de dichos enfoques no tiene suficiente valor clínico.

20 Es necesario medir y mantener la hemostasia para la prevención de la trombosis, incluyendo, por ejemplo, coágulos sanguíneos tales como trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada (CID), embolia pulmonar, trombosis miocárdica y apoplejía. Debido a que la hemostasia es una función que detiene el sangrado y protege la integridad de la circulación sanguínea, la hemostasia es importante en pacientes propensos a la coagulación debida a vasos sanguíneos lesionados o a una variedad de afecciones que activan la coagulación tales como, por ejemplo, aterosclerosis, sepsis, cirugía, fibrilación auricular, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión no controlada, trombocitopenia, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, lupus) y otras afecciones que conducen a la coagulación. La hemostasia es causada y/o resulta afectada por una variedad de afecciones clínicas y no se considera que esté relacionada únicamente con cardiovascularopatías, enfermedades infecciosas, cáncer u otras enfermedades primarias. La trombosis es la formación de un coágulo sanguíneo dentro de un vaso sanguíneo que obstruye el flujo de sangre a través del aparato circulatorio. Cuando se lesiona un vaso sanguíneo, el cuerpo usa las plaquetas y la fibrina para formar un coágulo sanguíneo para evitar la pérdida de sangre. La trombosis es una extensión patológica de la hemostasia normal. La hemostasia es la detención de la hemorragia en respuesta a una lesión vascular. La trombosis es una formación de un coágulo sanguíneo en la circulación. Por tanto, es importante mantener la hemostasia en pacientes cuya posibilidad de trombosis es mayor de lo normal.

35 La hemostasia se mide típicamente detectando la coagulación a través de la formación de un coágulo de fibrina mediante pruebas de coagulación (por ejemplo, tiempo de protrombina), agregación plaquetaria o por la presencia de proteasas activadas en el plasma en ausencia o presencia de cofactores e inhibidores. Sin embargo, dichos procedimientos no proporcionan una imagen completa, ya que la hemostasia depende de las proteínas plasmáticas, las plaquetas y el tejido vascular (endotelio) que se encuentra en el sitio de la lesión y de la formación de coágulos. Por lo tanto, la información sobre la hemostasia es la principal información necesaria para una acción terapéutica. En muchos pacientes no se dispone fácilmente de tejido vascular. La salud cardiovascular de los pacientes se ha evaluado sometiendo a CEC aisladas a análisis morfológicos.

45 Un problema importante con las CEC es que el marcador para tipado celular de CEC no es específico de las células endoteliales. En los linfocitos, monocitos y macrófagos también están presentes CD105, CD51/61, CD73, S-ENDO/MUC18, CD31/PECAM-1, CD36, AAMP, selectina E y P y CD54. Por lo tanto, los resultados se pueden ver alterados por la inflamación y la infección. Adicionalmente, HEMCAM, Sca-1 y CD34 se expresan en células precursoras hematopoyéticas. Por lo tanto, la medición de cardiovascularopatías mediante recuentos de CEC no es específica. En general los pacientes normales se contabilizan como positivos debido a CEC no específicas, que no tienen ningún impacto sobre la enfermedad.

50 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento no morfológico, mínimamente invasivo para analizar las CEC para evaluar la posibilidad de hemostasia de un paciente o la posibilidad de enfermedad endotelial, así como para identificar y tratar a un paciente por coagulación prematura.

SUMARIO

60 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a procedimientos para determinar el nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. El procedimiento comprende potenciar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mediante uno o más procedimientos de filtración. El procedimiento comprende además examinar las células endoteliales circulantes del sujeto para detectar la presencia de uno o más factores de coagulación y correlacionar una cantidad de células endoteliales circulantes que presentan uno o más factores de coagulación con el nivel de enfermedad endotelial del sujeto.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a procedimientos para determinar la posibilidad de que un sujeto mamífero presente coagulación prematura. En los procedimientos se potencia una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mamífero y se examina la presencia de un factor de coagulación en las células endoteliales circulantes. La presencia de la coagulación se correlaciona con la posibilidad de que el sujeto mamífero presente coagulación prematura.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a procedimientos para identificar y tratar la coagulación prematura en un sujeto mamífero. El procedimiento comprende potenciar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mamífero mediante uno o más procedimientos de filtración, examinar las células endoteliales circulantes para detectar la presencia de un factor de coagulación, correlacionar la presencia de la coagulación con la posibilidad de que el sujeto mamífero presente coagulación prematura, y administrar al sujeto mamífero un tratamiento anti-factor de coagulación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN ESPECÍFICOS

Análisis general

Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento implican una determinación de si las CEC aisladas presentan o no uno o más factores de coagulación en una superficie de las mismas. La presencia y/o la cantidad de CEC que tienen uno o más factores de coagulación se pueden usar para medir el alcance de la disfunción o daño del endotelio y se puede usar también como una indicación de coagulación prematura (falta de hemostasia). La hemostasia de un paciente se mantiene dirigiendo el tratamiento al factor o factores de coagulación detectados. Los factores de coagulación incluyen, pero no se limitan a, factores I, II, factor tisular III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, trombina, protombina, antitrombina, trombosmodulina, plasmina, plasminógeno, urocinasa, fibronectina, proteína C de células endoteliales, factor de von Willebrand (vWF), enzima convertidora de angiotensina, fibrina, dímero D, activador de plasminógeno tisular, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, inhibidores de la ruta del factor tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, bikunina, heparina cofactor II, procoagulante del 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 procedimientos para determinar el nivel de enfermedad endotelial en un sujeto. La enfermedad endotelial incluye cardiovasculopatías, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad cardíaca, enfermedad vascular del cerebro y riñón y enfermedad arterial periférica, por ejemplo. La enfermedad cardíaca incluye, pero no se limita a, trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada (CID), embolia pulmonar, trombosis miocárdica, aterosclerosis, sepsis, cirugía, fibrilación auricular (FA), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), hipertensión no controlada (HTN), hipertensión pulmonar, trombocitopenia (TTP) y apoplejía, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el procedimiento comprende potenciar una concentración de CEC en una muestra obtenida del sujeto. La muestra que se va a analizar normalmente es biológica. La frase "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser sólida, semisólida o fluida (líquida o gaseosa) procedente de cualquier fuente biológica. En algunos ejemplos, la muestra puede proceder del cuerpo de un sujeto, incluyendo una eliminación corporal, una aspiración corporal, una extirpación corporal o una extracción corporal. El sujeto puede ser, por ejemplo, mamífero, reptil, pez, planta, hongo o bacteria. En algunos ejemplos, la muestra es de un mamífero y en algunos ejemplos el sujeto es un humano. En algunos ejemplos, la muestra que se va a analizar es una muestra de sangre de un mamífero tal como, pero sin limitarse a, un sujeto humano, por ejemplo. La muestra de sangre es una que contiene células tales como, por ejemplo, células no raras y células raras. En algunos ejemplos, la muestra de sangre es sangre completa o plasma.

La presencia y/o la cantidad de CEC se pueden detectar a partir de otras células raras usando marcadores característicos de las células endoteliales para tipado celular. Los marcadores de tipado de células endoteliales incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, CD136, CD105/endoglin, CD144/VE-cadherina, CD145, CD34, Cd41, CD136, CD34, CD90, CD31/PECAM-1, ESAM, VEGFR2/Flk-1, Tie-2, CD202b/TEK, CD56/NCAM, CD73/VAP-2, claudina 5, ZO-1 y vimentina, por ejemplo. Además, los marcadores de tipado de células endoteliales que también proporcionan el origen de la célula endotelial se pueden usar como una medida adicional o principal de las CEC. Los marcadores de origen endotelial incluyen, pero no se limitan a, CD36, HEMCAM para origen microvascular; SCA-1 o D34 para origen de 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; VEGFR-3, NRP-2, LYVE-1, podoplanina, prox1, efrina-B2, CCL21 para origen linfático; y LuECAM para origen venular pulmonar, por ejemplo.

Los leucocitos (WBC) se pueden excluir del ensayo excluyendo los WBC positivos para uno o más marcadores de grupo de diferenciación (CD) que son específicos para las células inmunitarias (también denominado "grupo de designación", a menudo abreviado como CD). Los ejemplos incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, marcadores tales como CD45, CTLA-4, CD4, CD68 y/o CD8 presentes en los leucocitos se pueden usar para indicar

- que una célula no es una célula cancerosa. En un ejemplo particular no limitante, el antígeno CD45 (también conocido como PTPRC, receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C, y originalmente llamado antígeno común de leucocitos (todos los términos se pueden usar en el presente documento de manera intercambiable)) es útil para detectar todos los leucocitos. Adicionalmente, el CD45 se puede usar para diferenciar los diferentes tipos de leucocitos cuando se combina con otros marcadores de CD. Por ejemplo, los granulocitos están indicados 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-. Adicionalmente, dos moléculas CD comúnmente usadas son CD4 y CD8, que, en general, se usan como marcadores para los linfocitos T citotóxicos y auxiliares, respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3+, ya que algunos otros leucocitos también expresan estas moléculas CD (algunos macrófagos expresan bajos niveles de CD4; las células dendríticas expresan altos niveles de CD8).
- Las células raras son aquellas células que están presentes en una muestra en cantidades relativamente pequeñas en comparación con la cantidad de células no raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células raras están presentes en una cantidad de aproximadamente un 10⁻⁸ % a aproximadamente un 10⁻² % en peso de una población celular total en una muestra sospechosa de contener las células raras. Las CEC se incluyen en la categoría de células raras.
- Las células no raras son aquellas células que están presentes en cantidades relativamente grandes en comparación con la cantidad de células raras, tales como las CEC, en una muestra. En algunos ejemplos, las células no raras están presentes en una cantidad al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 10² veces, o al menos aproximadamente 10³ veces, o al menos aproximadamente 10⁴ veces, o al menos aproximadamente 10⁵ veces, o al menos al menos aproximadamente 10⁶ veces, o al menos aproximadamente 10⁷ veces, o al menos aproximadamente 10⁸ veces mayor que la cantidad de células raras en la población celular total en una muestra sospechosa de contener células no raras y células raras. Las células no raras pueden ser, pero no se limitan a, leucocitos (WBC), plaquetas y glóbulos rojos (RBC), por ejemplo.
- La potenciación de la concentración de CEC (o aislamiento de CEC) en una muestra de un sujeto se puede lograr mediante filtración usando una o más de las siguientes fuerzas: centrifugación, presión, vacío, fuerzas hidrostáticas capilares, ultracentrifugación, gradiente térmico diferencial y fuerzas electroforéticas, por ejemplo. La filtración implica poner en contacto la muestra con una matriz porosa, normalmente a presión de vacío. Las técnicas de filtración incluyen, pero no se limitan a, microfiltración, ultrafiltración o filtración de flujo cruzado, por ejemplo. En algunos ejemplos, la matriz porosa puede ser parte de un módulo de filtración donde la matriz porosa es parte de un conjunto para un uso conveniente durante la filtración ("conjunto de filtración de matriz porosa"). La matriz porosa puede ser una membrana, película o estructura microfluidica que tiene poros u obstáculos a través de los cuales el líquido de las células fluye o pasa a través.
- Friedrich, *et al.*, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0315664 ("publicación de solicitud de patente '664") describe un ejemplo de un conjunto de filtración de matriz porosa, a modo de ilustración y sin limitación. La publicación de solicitud de patente '664 divulga un conjunto y un procedimiento para la filtración de un líquido. Se diseña un cuerpo de soporte en un rebajo de un portador y hay una membrana de filtro que descansa plana sobre el cuerpo de soporte. La membrana del filtro y el cuerpo de soporte están diseñados para ser permeables a los líquidos y, por tanto, sirven como filtros, en particular para filtrar células raras de la sangre. Como resultado de que la membrana del filtro descansa nivelada sobre el cuerpo de soporte, el residuo de filtración se puede examinar particularmente bien de forma microscópica.
- En algunos ejemplos, las muestras se recogen del cuerpo de un sujeto en un recipiente adecuado tal como, pero sin limitarse a, una bolsa, un frasco, una aguja o un recipiente VACUTAINER®, por ejemplo. El recipiente puede contener un medio de recogida en el cual se entrega la muestra. El medio de recogida es normalmente un medio seco y puede comprender una cantidad de agente de desactivación de plaquetas eficaz para lograr la desactivación de las plaquetas en la muestra de sangre cuando se mezcla con la muestra de sangre. El medio de recogida también puede comprender otros agentes tales como, por ejemplo, un anticoagulante, un agente de fijación o un agente de detención de la 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, una muestra se puede tratar para aglutinar preferentemente las CEC con respecto a células no raras para facilitar la separación de las CEC de células no raras durante la filtración.
- La matriz porosa es un material sólido o semisólido y puede estar compuesto de un material orgánico o inorgánico, insoluble en agua. La matriz porosa puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como, por ejemplo, tubular (por ejemplo, fibra hueca, enrollada en espiral y fibra fina hueca), superficie grabada o plana (por ejemplo, tira, disco, película, membrana y placa). La matriz se puede fabricar a partir de una amplia variedad de materiales, que pueden ser naturales o sintéticos, poliméricos o no poliméricos, fibrosos o no fibrosos. Ejemplos, a modo de ilustración y sin limitación, de dichos materiales para fabricar una matriz porosa incluyen celulosa (incluyendo papel), nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno,

polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon y poli(butirato de vinilo), material cerámico, material metálico, por ejemplo, ya sea usado por sí mismos o junto con otro y/o con otros materiales.

5 El tamaño de los poros de la matriz porosa es tal que sea suficiente para retener preferentemente las CEC al tiempo que permite el paso de otras células, incluyendo células no raras, a través de los poros. El tamaño de los poros de la matriz porosa depende del tamaño de las CEC y de las células no raras y de 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 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.

20 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, se aplica presión a la muestra en la matriz porosa para facilitar el paso de células no raras a través de la membrana. El término "presión" se refiere a diferencias de presión con respecto a la presión atmosférica normal y puede ser tanto presión positiva (aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica normal) como presión negativa (vacío) (disminución de la presión con respecto a la presión atmosférica normal). El nivel de presión aplicado depende de uno o más de la naturaleza y el 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 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 400 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 300 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 200 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 100 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 50 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 25 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 20 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 15 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibar, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 30 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 25 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 20 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 15 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 10 milibares, por ejemplo. El nivel de presión negativa (vacío) aplicado es el negativo de los intervalos anteriores.

40 En algunos ejemplos, la presión aplicada a la muestra en la matriz porosa es una presión oscilante, lo que significa que la presión se aplica de manera 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 oscila entre aproximadamente 0 milibares y aproximadamente 10 milibares, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 10 milibares, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 7,5 milibares, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 5,0 milibares, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 2,5 milibares, por ejemplo, durante parte o la totalidad de la aplicación de presión a la muestra de sangre. La presión oscilante se logra usando un interruptor de encendido-apagado, por ejemplo, y se puede llevar a cabo de forma automática o manual. Se permiten altas caídas de presión dependiendo de uno o más del volumen del depósito, el volumen de la muestra y la tasa de filtración.

60 Como se menciona anteriormente, la muestra se pone en contacto con una matriz porosa de modo que las CEC se retienen preferentemente en 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 con un medio de dilución antes de ponerla 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 tamponado acuoso es normalmente 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. Se pueden usar diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante cualquier periodo de incubación. Tampones ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, borato, fosfato (por ejemplo, solución salina tamponada con

fosfato), carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINA, por ejemplo.

5 La cantidad de medio de dilución combinada con la muestra depende de uno o más de una serie 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 aproximadamente 30 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 20 ml, o de 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 aproximadamente 20 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 30 ml, por ejemplo, en base a 10 ml de la muestra.

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

20 En algunos ejemplos, un incremento deseado de la proporción de CEC con respecto a células no raras en una muestra sospechosa de contener CEC y células no raras es de al menos aproximadamente 10 veces, o de al menos aproximadamente 20 veces, o de al menos aproximadamente 50 veces, o de al menos aproximadamente 75 veces, o de al menos aproximadamente 100 veces con respecto a la proporción entre las CEC y las células no raras en la muestra original. En algunos ejemplos, el incremento de la proporción de CEC con respecto a células no raras que se desea es de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 200 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 25 veces a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo.

30 Las CEC concentradas o aisladas se examinan a continuación para detectar la presencia de uno o más factores de coagulación. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, dicho examen implica un ensayo que utiliza un compañero de unión para un factor de coagulación específico.

35 Se puede emplear cualquier ensayo adecuado para determinar la presencia y/o cantidad de un factor de coagulación presente en las CEC. Los ensayos se llevan a cabo combinando células potenciadas o aisladas con reactivos para identificar uno o más factores de coagulación, que incluyen un compañero de unión para el factor de coagulación. El compañero de unión es un agente que reconoce y/o se une específicamente a un factor de coagulación en las CEC. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo que se vaya a realizar. En general, el ensayo es un procedimiento para la determinación de un factor de coagulación en una CEC. El ensayo puede ser un inmunoanálisis o no-inmunoanálisis. El ensayo se puede llevar a cabo de manera concomitante a la filtración o se puede llevar a cabo después de la filtración. A continuación se analizan diversos procedimientos de ensayo a modo de ilustración y sin limitación.

40 En algunos ejemplos, los reactivos comprenden, como un compañero de unión para un factor de coagulación específico, al menos un anticuerpo específico para un factor de coagulación que puede estar presente en las CEC. En general, este ensayo se denomina inmunoanálisis, a diferencia de los ensayos que no utilizan un anticuerpo, que se denominan no-inmunoanálisis. Por la frase "anticuerpo para un factor de coagulación" se entiende un anticuerpo que se une específicamente al factor de coagulación y no se une de manera significativa a otras sustancias que distorsionarían el análisis para el factor de coagulación particular.

45 Los anticuerpos específicos para un factor de coagulación para su uso en inmunoanálisis para identificar un factor de coagulación particular pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como la inmunización de un huésped y la recogida de sueros (policlonales) o mediante la preparación de líneas celulares híbridas continuas y la recogida de la proteína secretada (monoclonal) o mediante la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de los mismos que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos

naturales.

Los anticuerpos incluyen una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, incluyendo dichas inmunoglobulinas las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, e IgM, por ejemplo. Los fragmentos de las mismas incluyen Fab, Fv y F(ab')₂, y Fab', por ejemplo. Además, se pueden usar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

En el medio de ensayo se incluyen otros reactivos dependiendo de la naturaleza del ensayo que se vaya a llevar a cabo. Dichos ensayos normalmente implican reacciones entre compañeros de unión tales como un factor de coagulación en una CEC y un anticuerpo correspondiente, o la unión entre un anticuerpo y un compañero de unión 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 unión específico, que comprende dos moléculas diferentes, cada una de las cuales tiene un área en la superficie o en una cavidad que se une específicamente y, por lo tanto, se define como complementaria de una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico normalmente serán miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo y hapteno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos incluyen, por ejemplo, biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A y pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN.

Como se analiza anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otra parte, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. La unión no específica puede ser el resultado de varios factores, incluyendo las interacciones hidrófobas entre las moléculas. En muchos modos de realización de ensayos para determinar un factor de coagulación particular, los compañeros de unión preferentes son anticuerpos y los ensayos se denominan inmunoanálisis.

Los inmunoanálisis pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoanálisis que implican reactivos no marcados normalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, procedimientos de inmunoprecipitina y aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoanálisis marcados incluyen enzimoimmunoanálisis, fluoroinmunoanálisis, fluoroinmunoanálisis de polarización, radioimmunoanálisis, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida y ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Los ensayos se pueden realizar sin separación (homogéneos) o con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoanálisis homogéneos incluyen, pero no se limitan a, técnicas de inmunocitoquímica, la prueba directa de anticuerpos fluorescentes o la prueba directa de inmunofluorescencia, enzimoimmunoanálisis homogéneos que incluyen el ensayo EMIT® divulgado en la patente de EE. UU. n.º 3.817.837; procedimientos de inmunofluorescencia tales como los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 3.996.345; inmunoanálisis de canalización de enzimas tales como los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 4.233.402; y el fluoroinmunoanálisis de polarización como se divulga, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.354.693; por ejemplo.

Otros enzimoimmunoanálisis incluyen el inmunoanálisis mediado por modulación enzimática; el fluoroinmunoanálisis con sustrato marcado; los inmunoanálisis combinados de donantes enzimáticos; inmunoanálisis homogéneos marcados con partículas tales como inmunoturbidimetría de inhibición potenciada con partículas e inmunoturbidimetría potenciada con partículas; por ejemplo. Otros ensayos incluyen el inmunoanálisis de partículas en solución; el inmunoanálisis de tinte disperso; el metaloinmunoanálisis; los enzimoimmunoanálisis de membrana; luminoimmunoanálisis; inmunoanálisis de marcaje con éster de acridinio que usan partículas paramagnéticas como una fase sólida; por ejemplo. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que implican la monitorización de los cambios en una o más de las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie con anticuerpos inmovilizados tras la unión de un fármaco hidrófobo. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores de semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodos amperométricos y similares.

En muchos de los ensayos analizados en el presente documento para la determinación de un factor de coagulación se emplea un marcador; el marcador normalmente forma parte de un sistema productor de señales. La naturaleza del marcador depende del formato de ensayo particular. Un sistema productor de señales normalmente incluye uno o más componentes, al menos un componente es un marcador detectable que genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de marcador unido y/o no unido, es decir, la cantidad de marcador unido o no unido al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad de analito que se va a detectar. El marcador es cualquier molécula que produce o puede ser inducido a producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un fluorescente, un radiomarcador, una enzima, un quimioluminiscente o un fotosensibilizador. Por tanto, la señal se

detecta y/o mide detectando la actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radioactividad, dependiendo de la naturaleza del marcador.

Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, tintes; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluoescamina; 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 QB replicasa; promotores; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimioluminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridinio, por ejemplo; sensibilizadores coenzimas sustratos enzimáticos; radiomarcadores tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co y ^{75}Se ; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO_2) y similares; soluciones metálicas; cristalita; liposomas; células, etc., que se pueden marcar adicionalmente con un tinte, catalizador u otro grupo detectable.

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 fluorescentes, pueden absorber la luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las coloca en un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa a continuación por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y tintes.

De forma alternativa, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema productor de señales incluiría entonces todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Dichos otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, depuradores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señales. En la patente de EE. UU. n.º 5.185.243, columnas 11-13 se puede encontrar un análisis detallado de sistemas productores de señales adecuados.

El marcador u otros miembros del sistema productor de señales se pueden unir a un soporte o unirse a una molécula tal como una célula que está dispuesta sobre un soporte. Las células se pueden unir a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de un factor de coagulación en la célula de unirse a un anticuerpo. En algunos modos de realización, las células pueden recubrir o unirse covalentemente directamente al soporte sólido. También se pueden usar grupos de enlace para acoplar covalentemente el soporte sólido y las células. También son posibles otros procedimientos para unir las células. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., se puede unir 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 se puede lograr mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura.

El soporte puede estar compuesto de un material orgánico o inorgánico, sólido o fluido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo microesferas, películas, membranas, tubos, pocillos, tiras, varillas, superficies planas (tales como, por ejemplo, láminas, placas y portaobjetos) y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no ser suspendible en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex; bicapas lipídicas o liposomas; gotitas de aceite y soportes metálicos tales como, por ejemplo, partículas magnéticas; por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon y poli(butirato de vinilo), ya sean utilizados solos o en combinación con otros materiales.

El marcador y/u otro miembro del sistema productor de señales se pueden unir a un miembro de un par de unión específico u otra molécula. Por ejemplo, el marcador se puede unir 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 con un anticuerpo. Un receptor es una molécula capaz de unirse específicamente a otra molécula. La unión del marcador al miembro del par de unión específico se puede lograr mediante reacciones químicas que dan como resultado la sustitución de un átomo de hidrógeno del marcador por un enlace al miembro del par de unión específico o puede incluir un grupo de enlace entre el marcador y el miembro del par de unión específico. Otros miembros del sistema productor de señales también se pueden unir covalentemente a miembros de pares de unión específicos. Por ejemplo, dos miembros del sistema productor de señales, tales como un fluorescente y un desactivador, se pueden unir a un anticuerpo diferente para formar un complejo específico con el factor de coagulación. La formación del complejo coloca al fluorescente y al desactivador en estrecha proximidad, permitiendo por tanto que el desactivador interactúe con el fluorescente para producir una señal.

Los ensayos analizados anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio acuoso tamponado a un pH moderado, que en general proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El pH para el medio de ensayo estará normalmente 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. Normalmente, el pH será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como los miembros de un sistema productor de señales, por ejemplo. Se pueden usar diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el periodo de incubación. Tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los procedimientos de ensayo. Por ejemplo, además de tampones y conservantes, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunos modos de realización, además de estos aditivos, se pueden incluir 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 para lograr el efecto o la función deseados.

Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluyendo los intervalos entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio se incuba normalmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el procedimiento y normalmente se emplea una temperatura constante, preferentemente temperatura ambiente, durante el periodo de 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 unión de los diversos reactivos. Las temperaturas durante las mediciones variarán en general 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 estarán determinadas en general por 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 en todo el intervalo. Consideraciones tales como la naturaleza de un sistema productor de señales y la naturaleza del factor de coagulación normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más simple es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. De forma alternativa, los reactivos se pueden combinar secuencialmente. Opcionalmente, puede estar involucrada una etapa de incubación posterior a cada adición como se analiza anteriormente. La duración del periodo de incubación es la suficiente para lograr la función deseada.

Modos de realización específicos de los ensayos que se puede emplear para identificar uno o más factores de coagulación en las CEC de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se analizan a continuación a modo de ilustración y sin limitación.

En un ejemplo se emplea una técnica de inmunocitoquímica para determinar si un factor de coagulación particular está presente o no en las CEC. La preparación de CEC aisladas se coloca sobre un soporte sólido, que puede ser, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio. La preparación de CEC aisladas se puede retirar de una membrana de filtro, por ejemplo, y colocar sobre un soporte sólido para su examen o la membrana de filtro en sí misma se puede colocar sobre el soporte sólido. La preparación de CEC se puede tratar 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 mucho a la de las células en una condición similar a la *in vivo* y en una en la que los factores de coagulación de interés pueden ser reconocidos por un anticuerpo específico. La cantidad de fijador empleada es la que conserva las células pero no da lugar a resultados erróneos en un ensayo posterior. La cantidad de fijador 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 un 0,05 % a aproximadamente un 0,15 % o de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,10 %, o de aproximadamente un 0,10 % a aproximadamente un 0,15 %, por ejemplo, en volumen de la muestra de sangre. Los agentes para llevar a cabo la fijación de las células raras incluyen, pero no se limitan a, agentes de reticulación tales como, por ejemplo, un reactivo 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. Se pueden

llevar a cabo una o más etapas de lavado en las células fijadas usando un medio acuoso tamponado.

Si es necesario después de la fijación, la preparación de CEC se puede someter 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 da como resultado la permeabilización y no es necesaria una etapa de permeabilización adicional. La permeabilización proporciona acceso a través de la membrana celular a factores de coagulación de interés. La cantidad de agente de permeabilización empleada es la que altera la membrana celular y permite el 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 un aproximadamente 0,5 %, o de aproximadamente un 0,1 % a un aproximadamente 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 a cabo la permeabilización de las células raras incluyen, pero no se limitan a, 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. Se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado en las células permeabilizadas usando un medio acuoso tamponado.

En la técnica de inmunocitoquímica se emplea un anticuerpo marcado específico para un factor de coagulación en una CEC para cada factor de coagulación diferente sospechoso en la preparación de CEC. Los marcadores empleados son marcadores fluorescentes y se emplea un marcador fluorescente diferente para cada factor de coagulación diferente, de modo que se pueden emplear múltiples anticuerpos marcados con fluorescentes en cualquier ensayo llevado a cabo en una preparación de CEC aisladas.

Después de la fijación y permeabilización, la preparación de CEC se pone en contacto con un medio acuoso que contiene uno o más anticuerpos marcados como se describe anteriormente. El medio acuoso puede ser un medio de ensayo como se describe anteriormente y la cantidad de cada anticuerpo marcado es la suficiente para identificar cada uno de los factores de coagulación que pueden ser de interés. En algunos ejemplos, la cantidad de cada anticuerpo marcado supera la cantidad sospechada de los factores de coagulación. Las CEC se incuban con los anticuerpos marcados en condiciones que permiten la unión de los anticuerpos marcados a sus respectivos factores de coagulación. Dichas condiciones se analizan anteriormente con 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 eliminar los anticuerpos marcados no unidos.

Una tinción de ADN fluorescente 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 tinte Hoechst, se emplea para potenciar el contraste en la imagen de la preparación de CEC durante el examen microscópico. Después de la tinción, se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado en las células usando un medio acuoso tamponado. A continuación, las células se examinan usando un microscopio fluorescente y cada uno de los diferentes marcadores fluorescentes se usa en la detección directa de un factor de coagulación respectivo en la preparación de CEC.

De forma alternativa, en el procedimiento anterior se pueden emplear anticuerpos no marcados y los anticuerpos respectivos se detectan indirectamente empleando un miembro de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-especie con un marcador. Los marcadores respectivos de los miembros de unión específicos se detectan por medios apropiados.

De forma alternativa, en los procedimientos anteriores se pueden emplear anticuerpos donde los anticuerpos respectivos se detectan indirectamente con un segundo anticuerpo marcado con una enzima o directamente marcado con una enzima en un procedimiento de amplificación enzimática. Una enzima respectiva tal como, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante (HRP) se detecta por medios apropiados. Por ejemplo, mediante generación enzimática de una señal fluorescente, óptica o quimioluminiscente respectiva, se genera un marcador enzimático respectivo para unir covalentemente el tinte a grupos de proteína tirosina en presencia de HRP (tal como, por ejemplo, Amplificación de 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 unirse a un factor de coagulación respectivo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, uno de los procedimientos de inmunoanálisis, tal como, por ejemplo, un procedimiento de inmunocitoquímica, se lleva a cabo junto con el uso de un conjunto de filtración por matriz porosa descrito anteriormente. En un ejemplo, a modo de ilustración y sin limitación, se emplea el conjunto de filtración por matriz porosa descrito en la publicación de solicitud de patente '664. Las CEC retenidas en el filtro del conjunto se examinan usando un procedimiento de inmunoanálisis tal como, por ejemplo, el procedimiento de inmunocitoquímica analizado más en detalle anteriormente. En un ejemplo particular, una muestra que se va a someter a prueba para detectar células CEC se somete a filtración empleando el conjunto de filtración por matriz porosa de la publicación de solicitud de patente '664. Las CEC concentradas sobre

una superficie de la matriz porosa se examinan exponiendo las CEC a uno o más anticuerpos marcados, cada uno de los cuales es específico para un factor de coagulación en una CEC. Los marcadores empleados son marcadores fluorescentes y se emplea un marcador fluorescente diferente para cada factor de coagulación diferente, de modo que se pueden emplear múltiples anticuerpos marcados con fluorescentes en cualquier ensayo llevado a cabo en una preparación de CEC aisladas. Después de la fijación y permeabilización, la preparación de CEC se pone en contacto con un medio acuoso que contiene uno o más anticuerpos marcados como se describe anteriormente. Las CEC se incuban con los anticuerpos marcados en condiciones que permiten la unión de los anticuerpos marcados a sus respectivos factores de coagulación. Después de la incubación, la preparación de CEC se somete a una o más etapas de lavado usando un medio acuoso tamponado para eliminar los anticuerpos marcados no unidos. Una tinción de ADN fluorescente, como se analiza anteriormente, se emplea para potenciar el contraste en la imagen de la preparación de CEC durante el examen microscópico. Después de la tinción, se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado en las células usando un medio acuoso tamponado.

A continuación, las células se examinan usando un microscopio fluorescente y cada uno de los diferentes marcadores fluorescentes se usa en la detección directa de un factor de coagulación respectivo en la preparación de CEC. En los ejemplos de acuerdo con el análisis anterior se observaron niveles de ruido de fondo sorprendentemente menores, de modo que la señal del factor de coagulación más débil (inmunoanálisis de menor afinidad) se pudo ver como una señal separada del ruido de fondo en la señal del marcador de identificación de células endoteliales. Esta es una ventaja inesperada obtenida en ejemplos de procedimientos para el análisis de CEC que emplean técnicas de filtración por matriz porosa y técnicas de inmunocitoquímica.

La medición de una cantidad de señal obtenida en cualquiera de los procedimientos de ensayo anteriores para CEC que comprenden uno o más factores de coagulación está correlacionada con el nivel de enfermedad endotelial en el sujeto. Esta medición se explica más en detalle como sigue: Determinar primero si la célula de interés es una célula endotelial usando un marcador de células endoteliales con una señal distinta separada y por comparación con un marcador de células inmunitarias en una segunda señal distinta separada. El recuento de células CEC se realiza cuando las CEC están por encima de un umbral y la señal de WBC está por debajo de un umbral. El umbral se define como el punto en el que la señal es detectable sobre el ruido. El ruido en este caso es la señal de fondo en la matriz de filtración. Se mide una tercera señal distinta separada adicional para el marcador del factor de coagulación para cada CEC. Las células CEC con una señal de factor de coagulación medida que esté por encima del umbral se contabilizaron como CEC activadas. El proceso de filtración permite medir simultáneamente las tres señales. Se selecciona un umbral de señal separado para cada determinación de si una célula es CEC, WBC o si una CEC tiene un factor de coagulación. El umbral de señal de WBC se establece utilizando un control negativo con WBC. Los umbrales de señal de CEC y factor de coagulación se determinan usando un control positivo con WBC y células endoteliales cultivadas que se fijan con un factor de coagulación. Las señales por debajo del umbral se establecen como cero. La muestra desconocida se procesa y solo se consideran las señales de factor de coagulación que están por encima del umbral medido en células que son células CEC positivas y células WBC negativas.

Los procedimientos anteriores también se pueden emplear para determinar la posibilidad de que un sujeto mamífero presente coagulación prematura o trombosis. La señal obtenida en cualquiera de los procedimientos de ensayo anteriores para CEC que comprenden uno o más factores de coagulación se correlaciona con la posibilidad de que un sujeto mamífero presente coagulación prematura o trombosis midiendo las señales de CEC y WBC que identifican las células que están por encima del umbral de CEC y por debajo del umbral de WBC. La señal del factor de coagulación en las CEC se mide a continuación si está por encima del umbral positivo. Se realiza un recuento del número de CEC para cada paciente. Si la señal para el factor de coagulación está por encima del umbral para la CEC, la célula se considera activada. Cuanto mayor sea el incremento de la señal del factor de coagulación por encima del umbral, mayor será la activación de la CEC. Cuanto mayor es el número de CEC, el número de CEC activadas y el grado de activación, mayor es la correlación con el sujeto que presenta una coagulación prematura.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a procedimientos para identificar y tratar la coagulación prematura en un sujeto mamífero. El procedimiento comprende potenciar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mamífero, examinar las células endoteliales circulantes para detectar la presencia de un factor de coagulación, correlacionar la presencia de la coagulación con la posibilidad de que el sujeto mamífero presente coagulación prematura, y administrar al sujeto mamífero un tratamiento anti-factor de coagulación.

Los ejemplos de procedimientos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento ofrecen ventajas significativas con respecto al tratamiento para sujetos en los que se ha identificado la posibilidad de coagulación prematura. Como se menciona anteriormente, se puede emplear un tratamiento anti-factor de coagulación que evita el uso de medicamentos administrados para combatir la trombosis, tales como, por ejemplo, anticoagulantes (por ejemplo, heparina), inhibidores de trombina, agentes profibrinolíticos, warfarina, acenocumarol, fenprocumón, atromentina, brodifacoum, fenindona, fondaprinax, idraparinax, argatrobán, dabigatrán, rivaroxabán, apixabán, que también se pueden dirigir a la hemostasia. Los agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, ticagrelor y prasugrel. Es deseable tratar la trombosis sin afectar a la hemostasia en ningún grado significativo. La frase "grado significativo" significa que la hemostasia se ve afectada para provocar un tiempo de coagulación anómalo (tiempo de protrombina) y un recuento o función plaquetaria anómalo.

En algunos ejemplos, el tratamiento anti-factor de coagulación implica tratar a un paciente identificado por presentar riesgo de coagulación prematura con un inhibidor para el factor o factores de coagulación detectados. Los inhibidores para un factor de coagulación incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de molécula pequeña para un factor de coagulación específico, anticuerpos para un factor de coagulación específico (por ejemplo, factores I a XI), antitrombina, anticuerpos para factores de coagulación específicos, inhibidores de plasmina, inhibidores de urocinasa, inhibidores de la ruta del factor tisular, inhibidores del activador del plasminógeno y bikuninas, por ejemplo. El tratamiento con inhibidores de molécula pequeña implica administrar a un sujeto, identificado mediante procedimientos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de un inhibidor de molécula pequeña de un factor de coagulación específico presente en la CEC. El tratamiento con anticuerpos implica administrar a un sujeto, identificado mediante procedimientos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para un factor de coagulación identificado presente en la CEC.

La frase "inhibidor de molécula pequeña" se refiere a un inhibidor de un factor de coagulación específico que es una molécula orgánica que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2000, o inferior a aproximadamente 1500, o inferior a aproximadamente 1000, 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 2000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, 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 1500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, por ejemplo. Los inhibidores de molécula pequeña para un factor de coagulación específico incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, inhibidores directos del factor Xa (rivaroxabán, apixabán) e inhibidores directos de la trombina (hirudina, lepirudina, bivalirudina, argatrobán, dabigatrán, ximelagatrán), por ejemplo.

Los anticuerpos contra un factor de coagulación específico se pueden preparar usando técnicas descritas en detalle anteriormente para la preparación de anticuerpos. Los anticuerpos específicos para un factor de anticoagulación incluyen, pero no se limitan a, 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 trombina, anticuerpos específicos para plasmina, anticuerpos específicos para protombina, anticuerpos específicos para antitromina, anticuerpos específicos para trombomodulina, anticuerpos específicos para plasmina, anticuerpos específicos para plasminógeno, anticuerpos específicos para urocinasa, anticuerpos específicos para fibronectina, anticuerpos específicos para enzima convertidora de angiotensina, anticuerpos específicos para el factor de Von Willebrand (vWF), anticuerpos específicos para fibrina, anticuerpos específicos para dímero D, anticuerpos específicos para activador de plasminógeno tisular, anticuerpos específicos para inhibidores de proteasa relacionados con la proteína Z, anticuerpos específicos para inhibidores de la ruta del factor tisular, anticuerpos específicos para inhibidores del activador del plasminógeno, anticuerpos específicos para bikunina, anticuerpos específicos para heparina cofactor II, anticuerpos específicos para procoagulante del cáncer, anticuerpos específicos para la proteína C, anticuerpos específicos para la proteína Z y anticuerpos específicos para proteína S, por ejemplo.

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

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente los modos de realización específicos de la invención a modo de ilustración y sin limitación y pretenden describir y no limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes divulgados en el presente documento son en volumen a menos que se indique de otro modo.

EJEMPLOS

Todos los productos químicos se pueden adquirir a Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO) a menos que se indique de otro modo.

Abreviaturas:

K₃EDTA = sal de potasio de etilendiaminotetraacetato

WBC = leucocitos

RBC = glóbulos rojos

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

5 DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

HBSS = solución salina tamponada de Hank

min = minuto(s)

10 seg = segundo(s)

μm = micrómetro(s)

15 ml = mililitro(s)

mg = miligramo(s)

20 μg = microgramo(s)

PBS = solución salina tamponada con fosfato (Na_2HPO_4 3,2 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, pH 7,4)

25 mbar = milibar(es)

TA = temperatura ambiente

30 Las muestras de sangre completa para las pruebas se prepararon mediante la obtención de sangre de 10 sujetos que contenían células endoteliales circulantes (CEC). Las muestras de sangre (7-10 ml) se recogieron en tubos VACUTAINER® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ) que contenían K_3EDTA . Se añadió paraformaldehído adicional al 0,05 % en volumen de la muestra de sangre. La concentración de WBC fue de aproximadamente 10^7 en 10 ml de sangre y la de RBC fue de aproximadamente 5×10^{10} en 10 ml de sangre.

35 Se obtuvieron muestras de control negativo y positivo a partir de muestras de sangre completa mediante la adición de células endoteliales cultivadas con factor de coagulación a un nivel de 200 células en 10 ml de muestra de sangre. La línea celular principal de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) (ATCC PCS-100-010) se cultivaron en medios basales ENDOGRO® (Millipore Corporation, Billerica MA). Las células se fijaron añadiendo 1,0 ml de formaldehído HBSS al 2 % 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 el factor X humano, el factor tisular o el factor de von Willebrand u otros, se fijaron a las células por medio de formaldehído. El factor X humano se adquirió a Enzyme Research Laboratory, South Bend IN. Todos los demás factores se adquirieron a Sigma Aldrich. El factor de coagulación, el factor X, desempeña un papel crítico en el inicio de la coagulación en las células portadoras de TF en el endotelio mediante la amplificación de la señal procoagulante por la trombina generada en la célula portadora de TF y la propagación de la generación de trombina en la superficie de las plaquetas. Tanto la ruta extrínseca como la intrínseca convergen en el factor Xa. El factor Xa es importante, ya que la coagulación se activa cuando el factor Xa se forma en el endotelio y la CEC en un complejo Xa/Va/Ca/fosfolípido.

50 Un día después del almacenamiento a 25 °C, las muestras de sangre se filtraron a través de una membrana que tenía un tamaño de poro promedio de 8 μm de acuerdo con un procedimiento divulgado en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0315664. Durante la filtración, la muestra en la membrana se sometió a un mbar negativo, es decir, una disminución mayor de aproximadamente -30 mbar con respecto a la presión atmosférica. El vacío aplicado varía de 1 a -30 mbar a medida que el volumen de la muestra se reduce durante la filtración. Se permitieron altas caídas de presión dependiendo del depósito y del volumen de muestra y velocidad de filtración. Justo antes de la filtración, se transfirió una muestra (7-10 ml) a un tubo Falcon de 50 ml, que se llenó a 20 ml con PBS frío. Los tubos Falcon se voltearon manualmente dos veces y se sometieron a centrifugación durante 10 min a 400 x g a 20 °C. La muestra diluida se colocó en la estación de filtración sin mezclar y la muestra diluida 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 TRITON® X100 al 0,2 % en PBS y se lavó nuevamente con PBS.

60 Las células capturadas en la membrana se detectaron con un procedimiento de inmunocitoquímica (ICC) basado en la unión de anticuerpos específicos a proteínas o antígenos específicos en las células. Se dispensó un tampón de bloqueo de caseína al 10 % en PBS sobre la membrana. Después de un periodo de incubación de 5 min, la membrana se lavó con PBS para bloquear la unión no específica a la membrana. A continuación, se dispensó una mezcla de conjugados de anticuerpos a la membrana, seguido de un periodo de incubación de 20 min a TA. La mezcla de conjugados de anticuerpos (en caseína al 10 % en PBS) incluía anticuerpo anti-factor de coagulación

(reactivos al factor X humano o al factor tisular o al factor de von Willebrand) conjugado a Dy488 a 10 µg/ml, anticuerpo anti-CEC (reactivo a cualquiera de los marcadores de la Tabla 1) conjugado a Dy550 a 10 µg/ml y anticuerpo anti-CD45 (usado para WBC) conjugado a Dy650 a 20 µg/ml. La mezcla de conjugados de anticuerpos incluía anticuerpo contra células endoteliales (reactivo a los marcadores de la Tabla 1) conjugado a Dy550. El anticuerpo no unido se lavó (PBS + TWEEN® 20 al 0,05 %) y se añadió DAPI (0,8 µg/ml en PBS), una tinción de ADN fluorescente, para teñir los núcleos de las células. Se realizó una última etapa de lavado con PBS, seguida de medios de cobertura para ayudar a conservar la intensidad de fluorescencia de las sondas. Los portaobjetos se prepararon con DABCO como medio de cobertura (0,25 g de DABCO en 9 ml de glicerol y 1 ml de PBS 10x).

A continuación, se colocaron portaobjetos para pacientes y control en un portaobjetos de un microscopio fluorescente (Leica DM5000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania)) donde se capturaron imágenes durante el escaneado automático de la membrana para cada una de las sondas fluorescentes usadas para la detección de las células diana. Los conjugados de anticuerpos se unieron a la proteína o al antígeno de una célula, y los marcadores fluorescentes se detectaron usando un microscopio fluorescente con filtros de excitación, emisión y corte específicos para cada marcador. Se usaron múltiples marcadores fluorescentes, cada uno con un anticuerpo específico diferente, para detectar múltiples antígenos o proteínas en las células aisladas.

A continuación, las células se caracterizaron escaneando la membrana mediante microscopía de fluorescencia llevada a cabo con el Leica DM5000 usando los conjuntos de filtros para los respectivas marcadores fluoróforos usados en los conjugados de anticuerpos anteriores, a saber, DyLight 488 (Dy488), DyLight 550 (Dy550), DyLight 650 (Dy650) (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham MA) o DAPI. Los controles se sometieron a prueba primero para asignar umbrales para la detección de señales positivas para CEC, WBC y factor de coagulación. El enriquecimiento de las células raras logrado se midió mediante el recuento de las células raras (CEC positivas) y excluyendo las células inmunitarias (WBC) que quedan en la membrana. Los glóbulos rojos se lisaron o pasaron a través de la membrana.

Los resultados de cinco anticuerpos diferentes para marcadores de CEC, dos anticuerpos diferentes para marcadores de factores de coagulación y un anticuerpo para marcadores de WBC se resumen a continuación en la Tabla 1. Los anticuerpos se sometieron a prueba contra una muestra natural conocida que contenía CEC, CEC activadas con factores de coagulación y WBC. Los anticuerpos también se sometieron a prueba contra un control positivo con células HUVEC cultivadas fijadas con factores de coagulación. La relación señal/ruido se evaluó como cero a 5+ en función de la unión a las células en la sangre de control positivo.

Tabla 1

Relación señal-ruido para la unión de anticuerpos por filtración

Marcador	CEC natural	WBC natural	HUVEC de control
Vimentina	++++	0	+
Z0-1	++	0	+
CD105	++	0	++++
CD144	+	0	+
CD146	+++	0	++
Anti-factor X	++	0	++++
Anti-vWF	++	0	++++
CD45	0	+++	0

Todos los anticuerpos capaces de medir CEC, incluyendo vimentina, Z0-1, CD105, CD144 y CD146, respondieron a las muestras de CEC natural y HUVEC de control con factores de coagulación. Todos los anticuerpos capaces de medir factores de coagulación, incluyendo el factor X y vWF, respondieron a la muestra de CEC activada con factores de coagulación y a la muestra de HUVEC de control con factores de coagulación. El anticuerpo CD45 capaz de medir WBC no respondió a la muestra de CEC activada con factores de coagulación ni a la muestra de HUVEC de control con factores de coagulación, y solo respondió a WBC.

De acuerdo con los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, en todos los casos los anticuerpos de CEC y factores de coagulación tenían niveles de ruido de fondo sorprendentemente más bajos en las muestras de sangre que contenían solo WBC medidas como cero (0). Incluso los anticuerpos con señales de anticuerpo débiles (+ a ++) para células de control (inmunoanálisis de menor afinidad) pudieron separar una señal del ruido de fondo para la identificación de células endoteliales nativas. Esta fue una ventaja inesperada obtenida en análisis de CEC que emplean técnicas de filtración por matriz porosa y técnicas de inmunocitoquímica. Si bien no se desea limitarse a ningún mecanismo en particular, se cree que las ventajas anteriores son el resultado de una filtración que impulsa la reacción de afinidad y elimina los marcadores no unidos más eficazmente. El recuento de

células CEC se realizó cuando la señal de CEC estaba por encima de un umbral y la señal de WBC estaba por debajo de un umbral. El umbral era el punto en el que la señal era detectable sobre el ruido, que en este caso era la señal de fondo en la matriz de filtración. (Véase la Tabla 2).

5 Los resultados para diez pacientes sanos y diez no sanos se resumen a continuación en la Tabla 2. Los pacientes no sanos fueron aquellos con plaquetas hiperactivadas (desequilibrio de hemostasia). Estos pacientes con plaquetas hiperactivadas tienen más probabilidades de experimentar liberación de CEC. Los pacientes con plaquetas hiperactivas fueron aquellos con tiempos de cierre inferiores a 75 seg cuando se midieron con el producto Colágeno/ADP o inferiores a 150 seg cuando se midieron con el producto Colágeno/ADP (PFA-100 Siemens Healthcare Diagnostics, Newark DE). Los pacientes no se sometieron a tratamiento para coagulación durante 12 h antes de la obtención de la muestra.

15 Estos pacientes se sometieron a prueba por dos procedimientos diferentes. El primer procedimiento se empleó solo para determinar la cantidad de señal de unión para CEC por el anticuerpo Vimentina marcado con Dy550 y para WBC por el anticuerpo CD45 marcado con Dy650, y para el factor de coagulación por el anticuerpo de factor X marcado con Dy448. La intensidad relativa de la señal se estableció en gráficos bidimensionales. En un gráfico, las células de las áreas con una señal Dy550 más fuerte y una señal Dy650 débil se consideraron CEC positivas. En otro gráfico, las células de las áreas con una señal Dy550 más fuerte y una señal Dy448 más fuerte se consideraron CEC activadas. Este procedimiento produjo una señal de Dy488, Dy550 y Dy650 para cada célula y no había células sin señal. Este procedimiento representa un enfoque que típicamente se realizaría en un procedimiento de enriquecimiento celular sin filtración como la citometría de flujo con fluorescencia y, por lo tanto, representa un procedimiento que no está de acuerdo con los principios descritos en el presente documento y se proporciona con propósitos de comparación. Este procedimiento no separó muy bien a los pacientes sanos de los no sanos, con una superposición significativa, y produjo un porcentaje de CEC activadas en la población sana.

25 El segundo procedimiento se usó para el enriquecimiento celular con filtración para determinar la cantidad de umbral de unión detectable para CEC y WBC. Este procedimiento es un procedimiento de filtración con un lavado altamente eficaz que permitió eliminar el ruido de fondo de Dy488, Dy550 y Dy650 debido a la unión no específica. El procedimiento midió primero la señal para CEC por el anticuerpo Vimentina marcado con Dy550 y para WBC por el anticuerpo CD45 marcado con Dy650. Solo las células con señales de Dy550 por encima del umbral de CEC y con señales de Dy650 por debajo del umbral de WBC se contabilizan como CEC. La señal del factor de coagulación en la CEC se midió a continuación si estaba por encima del umbral positivo para Dy480 y si la CEC se consideraba activada.

35 Este segundo procedimiento estuvo de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. El segundo procedimiento separó muy bien a los pacientes sanos de los no sanos, sin una superposición significativa, y no produjo un porcentaje de CEC activadas en la población sana. En este segundo procedimiento se detectó un mayor porcentaje de CEC activadas en la población no sana. Cuanto mayor es el número de CEC, el número de CEC activadas y el grado de activación, mayor es la correlación con el paciente que presenta una coagulación prematura. A medida que la señal del factor de coagulación se incrementó para la CEC, las células se consideraron más activadas.

Tabla 2

Donantes	Número promedio de CEC (desviación estándar)		Porcentaje de CEC con factor de coagulación activo	
	Procedimiento 1	Procedimiento 2	Procedimiento 1	Procedimiento 2
Sanos	8 (10)	4 (4)	12 %	0 %
No sanos	20 (19)	23 (8)	25 %	63 %

45 Procedimiento 1 Medido por señales de CEC con factor de coagulación sin uso de umbral predeterminado

Procedimiento 2 Medido por señales de CEC con factor de coagulación con uso de umbral predeterminado

50 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de la presente invención que se pueden hacer determinados cambios y modificaciones a la misma. Además, la descripción anterior, para propósitos de explicación, usó una nomenclatura específica para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que no se requieren los detalles específicos para practicar la invención. Por tanto, las descripciones anteriores de modos de realización específicos de la presente invención se presentan con propósitos ilustrativos y descriptivos; no pretenden ser exhaustivos ni limitar la invención a las formas precisas divulgadas. Muchas modificaciones y variaciones son posibles en vista de las enseñanzas anteriores. Los modos de realización se eligieron y describieron para explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y para permitir de este modo que otros expertos en la técnica utilicen la invención.

60

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un procedimiento para determinar un nivel de enfermedad endotelial en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- (a) examinar las células endoteliales circulantes del sujeto para detectar la presencia de uno o más factores de coagulación, y
- 10 (b) correlacionar una cantidad de células endoteliales circulantes que presentan uno o más factores de coagulación con el nivel de enfermedad endotelial en el sujeto,
- caracterizado por que** el procedimiento comprende además potenciar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mediante uno o más procedimientos de filtración.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad endotelial es un trastorno cardiovascular.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de sangre.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en factores I, II, factor tisular III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, trombina, protombina, antitrombina, trombomodulina, plasmina, plasminógeno, urocinasa, fibronectina, proteína C de células endoteliales, factor de von Willebrand, enzima convertidora de angiotensina, fibrina, dímero D, activador de plasminógeno tisular, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, inhibidores de la ruta del factor tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, bikunina, heparina cofactor II, procoagulante del cáncer, proteína C, proteína Z y proteína S.
- 25
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células se examinan para detectar la presencia de uno o más factores de coagulación exponiendo las células a un compañero de unión marcado para cada uno de los uno o más factores de coagulación.
- 30
6. Un procedimiento para identificar un sujeto mamífero con coagulación prematura, comprendiendo el procedimiento:
- 35 (a) potenciar una concentración de células endoteliales circulantes en una muestra obtenida del sujeto mamífero mediante uno o más procedimientos de filtración.
- (b) examinar las células endoteliales circulantes para detectar la presencia de un factor de coagulación,
- 40 (c) correlacionar la presencia de la coagulación con la posibilidad de que el sujeto mamífero presente coagulación prematura.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el factor de coagulación se selecciona del grupo que consiste en factores I, II, factor tisular III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, trombina, protombina, antitrombina, trombomodulina, plasmina, plasminógeno, urocinasa, fibronectina, proteína C de células endoteliales, factor de von Willebrand, enzima convertidora de angiotensina, fibrina, dímero D, activador de plasminógeno tisular, inhibidor de proteasa relacionada con la proteína Z, inhibidores de la ruta del factor tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, bikunina, heparina cofactor II, procoagulante del cáncer, proteína C, proteína Z y proteína S.
- 45
- 50 8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que las células se examinan para detectar la presencia de uno o más factores de coagulación exponiendo las células a un compañero de unión marcado para cada uno de los uno o más factores de coagulación.