

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 764**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08805655 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2150623**

54 Título: **Método para medir la actividad de la plasmina de micropartículas presentes en una muestra de un fluido biológico y uso del mismo**

30 Prioridad:

07.06.2007 FR 0704060

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cedex 13, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE MARSEILLE (25.0%);
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (25.0%) y
UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ANGLES CANO, EDUARDO;
LACROIX, ROMARIC;
MALATERRE, FLORENCE y
DIGNAT-GEORGE, FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 764 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para medir la actividad de la plasmina de micropartículas presentes en una muestra de un fluido biológico y uso del mismo

5 La invención tiene por objeto un método para medir la actividad de la plasmina de micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes presentes en una muestra de sangre, tal como se define en la reivindicación 1, pudiendo servir dicho método como método de diagnóstico o como método de seguimiento de un tratamiento.

Las micropartículas resultantes de las gemaciones de la membrana celular fueron descritas en diversos modelos celulares y en numerosas condiciones patológicas como marcadores fiables de la activación y/o apoptosis celular.

10 Particularmente, los inventores describieron inicialmente la liberación de estas micropartículas por las células endoteliales en respuesta a una estimulación inflamatoria y al aumento de la cantidad de micropartículas endoteliales circulantes en pacientes que presentan el riesgo de trombosis. Puesto que, los niveles elevados de micropartículas endoteliales circulantes fueron descritas en diferentes condiciones patológicas tales como los síndromes coronarios, insuficiencia renal, diabetes, síndrome de los antifosfolípidos (SALP), púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) o también drepanocitosis, los trastornos en los cuales la presencia de micropartículas
15 refleja disfuncionalidades endoteliales es indicativo de un mal pronóstico.

Las micropartículas que expresan diversos componentes bioactivos procedentes de las células de las cuales se derivan, pueden presentar una amplia gama de actividades biológicas capaces de modular las funciones de las células endoteliales o sanguíneas, de influir sobre la homeostasis vascular y participar en las respuestas inflamatorias o en la angiogénesis.

20 Por ejemplo, las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, presentan superficies fosfolípídicas procoagulantes implicadas en el ensamblaje y la activación de los factores de la coagulación.

Además, la participación de micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes, en la generación de trombina resulta de su capacidad de expresar, transferir o inducir el factor tisular en el compartimento vascular.

25 Entre los principales reguladores del equilibrio hemostático, el sistema de activación del plasminógeno es la principal vía fisiológica para la disolución del coágulo de fibrina. Esta vía facilita igualmente la angiogénesis ayudando a la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular.

30 La conversión del plasminógeno en plasmina activa depende de dos serin-proteasas: el activador tisular del plasminógeno (t-PA: tejido de tipo plasminógeno activador) que en los vasos está principalmente implicado en la fibrinólisis, y la uroquinasa (u-PA; uroquinasa de tipo plasminógeno activador) que, unida a su receptor específico, uPAR, está implicada en la proteólisis pericelular.

La generación de plasmina inducida por la uPA y la activación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que de ello resulta, favorece la migración de células a través de la matriz intersticial y participa en los procesos tales como el remodelado tisular, la invasión metastásica y la angiogénesis.

35 Una activación no controlada y/o excesiva del plasminógeno puede tener consecuencias deletéreas induciendo el desprendimiento celular y/o la apoptosis celular. Se entiende, por lo tanto, que la regulación de la expresión de la plasmina en la superficie de las células, particularmente de las células endoteliales, es de importancia crítica en la regulación de la homeostasis vascular.

40 El documento Graves Laura E et al, (Cancer Research 64, 7045-7049, 1 octubre 2004) describe un método para la medición de la actividad de la plasmina de las vesículas unidas a las membranas aisladas de muestras de ascitis. El documento de JY W. et al. ("Measuring circulating cell-derived microparticles", Journal of thrombosis and haemostasis, vol. 2, nº 10, 1 octubre 2004, páginas 1842-1843) describe, en referencia a él, diferentes métodos para aislar las micropartículas.

45 En la lectura de lo precedente se entiende, por lo tanto, el interés que existe, por una parte en poder evaluar la generación de la "actividad de la plasmina" de las micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes, en un fluido biológico, particularmente en un fluido biológico en situación de flujo, muy particularmente sangre, o en extractos tisulares y, por otra parte, en poder modular esta actividad.

Por "fluido biológico" se entiende cualquier líquido corporal extraíble como, por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido bronco-alveolar (LBA), orina, líquido sinovial, leche materna, saliva, lágrimas, líquido seminal, líquidos de ascitis, derrame pleural, líquido amniótico.

50 Por "fluido biológico en situación de flujo" se entiende cualquier líquido corporal que fluye dentro o fuera del cuerpo de forma natural como, por ejemplo la sangre en circulación, leche materna, orina, saliva, lágrimas, líquido seminal, flujo menstrual y cualquier otro flujo seroso y/o mucoso.

Entre las fuentes de extractos tisulares se pueden citar las placas de ateroma o cualquier otro tejido obtenido por cirugía.

5 Por "actividad de la plasmina" se debe entender en el presente texto la capacidad de una muestra de fluido biológico, particularmente un fluido biológico en situación de flujo que contiene micropartículas, particularmente micropartículas circulantes, de generar plasmina, cualquiera que sea el mecanismo empleado.

10 Como método de diagnóstico, el valor de la "actividad de la plasmina de la muestra testada", medida en la muestra de fluido biológico que contiene micropartículas, particularmente micropartículas circulantes, y comparada con la medida de esta misma capacidad en una muestra testigo obtenida de individuos denominados normales, es decir que no presentan ninguna patología, si es significativamente superior a la del testigo, reflejará, por ejemplo, y sin limitación, para un individuo, un riesgo más o menos elevado de sufrir por ejemplo accidentes vasculares causado por una inestabilidad acusada de las placas de ateroma, un riesgo más o menos elevado para un individuo afectado por un cáncer de sufrir una invasión metastásica o, también para un individuo un riesgo más o menos elevado de sufrir un accidente cerebrovascular y sus consecuencias deletéreas sobre el funcionamiento cerebral. Si este valor de la "actividad de la plasmina de la muestra testada" es inferior a la del testigo, entonces ésta reflejará, por ejemplo para el individuo cuya sangre ha sido testada, un riesgo acrecentado de trombosis.

15 Como seguimiento de un tratamiento, el valor de la "actividad de la plasmina de la muestra testada", medida en las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, de una muestra de fluido biológico, particularmente un fluido biológico en situación de flujo de un individuo en curso de tratamiento, y comparada con la medición de esta misma capacidad en una muestra testigo obtenida del mismo individuo antes del tratamiento o anteriormente en el tratamiento, permite seguir la evolución de la respuesta de dicho individuo en función del tratamiento que le ha sido administrado.

20 No obstante, existe siempre la necesidad de un ensayo simple, eficaz y fiable, de los riesgos a los que se expone un paciente, ligados a una actividad de la plasmina demasiado fuerte o demasiado débil de su sangre o, también, un ensayo sencillo para seguir la evolución de un tratamiento que pretende modular la actividad de la plasmina de las micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes, de un fluido biológico, particularmente un fluido biológico en situación de flujo de un individuo.

Uno de los objetivos de la presente invención es suministrar un ensayo de este tipo.

25 En efecto, después de amplios trabajos y de manera sorprendente, los inventores han puesto de manifiesto y en su buen saber por primera vez, que las micropartículas circulantes presentes en un fluido biológico, particularmente en un fluido biológico en situación de flujo, particularmente en la sangre de un individuo, son portadoras de una actividad biológica que las confiere la capacidad de generar plasmina.

30 En base de este descubrimiento, la presente descripción tiene por objeto un método para la medición de la actividad de la plasmina de micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, de una muestra de fluido biológico, particularmente un fluido biológico en situación de flujo, particularmente de sangre, previamente extraída, en la cual

- en una primera etapa se aíslan las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, presentes en dicha muestra,
- en una segunda etapa se mide, por cualquier método apropiado, la capacidad de dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 para generar plasmina, y
- 40 - en una tercera etapa se compara el resultado de la medida obtenida en la etapa 2 con el resultado de una medida idéntica realizada en las mismas condiciones en una muestra testigo de fluido biológico idéntico.

Así, con más precisión, el objeto de la invención es tal como se define en la reivindicación 1.

45 Según una variante de la invención, el fluido biológico idéntico, testigo, puede ser un fluido biológico idéntico al testado, pero que procede de al menos un individuo considerado como sano, es decir que no presenta patologías, por lo menos la patología de la cual padece el individuo cuyo fluido biológico se ha testado y que permite evaluar entonces los riesgos de dicho individuo frente a un valor considerado como normal.

50 Según otra variante de la invención, el fluido biológico idéntico, testigo, puede ser el mismo fluido biológico que el testado, procedente del mismo individuo, pero obtenido en una extracción anterior a la que haya dado lugar a la muestra testada, por ejemplo antes del comienzo de un tratamiento, con el fin de poder establecer un seguimiento de la evolución de la capacidad de las micropartículas de generar plasmina, por ejemplo en el transcurso de un tratamiento.

Según la invención, la primera etapa del método (aislamiento de las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes presentes en la muestra) se puede realizar según cualquier procedimiento compatible

con el aislamiento de tales micropartículas. Como ejemplo, se citará la centrifugación a elevadas velocidades o también técnicas de biocaptura cualquiera que sea el soporte captador (por ejemplo anticuerpos, por ejemplo anexina V).

5 Según la primera etapa del método según la invención, las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, se pueden aislar por una sucesión de centrifugaciones y ultracentrifugaciones en un procedimiento según el cual

- 10 - en una etapa 1A se centrifuga un volumen comprendido entre 500 µl y 5 ml, preferentemente entre 1 ml y 2 ml, de una muestra de fluido biológico, preferentemente un fluido biológico en situación de flujo, por ejemplo de sangre previamente extraída, a una velocidad comprendida entre 1000 g y 2000 g, preferentemente entre 1200 g y 1800 g, durante un tiempo comprendido entre 5 minutos y 20 minutos, preferentemente entre 10 y 15 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C;
- 15 - en una etapa 1B se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1A a una velocidad comprendida entre 10000 g y 20000 g, preferentemente entre 12000 g y 15000 g, durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 5 minutos, preferentemente entre 2 y 3 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C;
- 20 - en una etapa 1C se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1B a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C;
- 25 - en una etapa 1D se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1C en un volumen comprendido entre 250 µl y 4 ml, preferentemente entre 1 y 2 ml, de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C;
- 30 - en una etapa 1E se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1D en un volumen comprendido entre 250 µl y 4 ml, preferentemente entre 1 y 2 ml, de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C;
- en una etapa 1F se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1E en un volumen comprendido entre 20 µl y 500 µl, preferentemente entre 50 y 100 µl, de tampón fosfato salino (PBS).

La suspensión de micropartículas, particularmente de micropartículas circulantes, obtenida en la etapa 1F se puede utilizar inmediatamente para análisis o se puede conservar preferentemente a -80°C.

35 Según la invención, la segunda etapa del método (medición de la capacidad de las micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes, para generar plasmina) se puede realizar directamente sobre la cantidad de micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa. Preferentemente, según la invención, la segunda etapa del método se puede realizar en una determinada cantidad de las micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa, pudiendo estar comprendida dicha cantidad entre 10000 y 100000 micropartículas, preferentemente entre 40 100000 y 300000 micropartículas. En este caso, el método según la invención puede comprender una etapa suplementaria (etapa 1bis) de recuento de las micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa, intercalándose dicha etapa de recuento entre la primera y la segunda etapa del método según la invención.

45 Dicha etapa de recuento se puede realizar según la invención según cualquier procedimiento conocido para el recuento de micropartículas. Ventajosamente, el recuento de las micropartículas se puede realizar por citometría de flujo según los protocolos clásicamente utilizados en la técnica anterior, los descritos por ejemplo en la solicitud de patente francesa FR-A-2795820 o, también, mediante un ensayo de detección basado en la actividad pro-coagulante de las micropartículas (Zymufen MP-activity, Hyphen BioMed) o, también, por dosificación proteica. Preferentemente según la invención, las micropartículas se recuentan por citometría de flujo.

50 Según la invención, la segunda etapa del método, es decir la medición de la capacidad de dichas micropartículas, particularmente de las micropartículas circulantes aisladas en la etapa 1, para generar plasmina se puede determinar bien sea por medición de la cantidad de plasmina espontáneamente presente sobre las micropartículas, o bien por medición de la cantidad de plasmina susceptible de ser producida por estas micropartículas.

Dichas mediciones de plasmina se pueden realizar por cualquier método conocido.

55 Según una variante de la etapa 2 del método según la invención, la medición de la cantidad de plasmina espontáneamente presente sobre las micropartículas, particularmente sobre las micropartículas circulantes, se

puede realizar por cualquier método conocido, como por ejemplo por una medición inmunológica (FASEB J 2003, 17: 1301-3) (ELISA o Western Blot) con ayuda de anticuerpos antiplasmin(ógenos) (por ejemplo TC12040, Technoclone, Austria o producto 3641, American Diagnostica) o, también, por espectrofotometría, por lectura de la absorción de la muestra a 405 nm con ayuda de sustratos cromogénicos selectivos de la plasmina (por ejemplo CBS0065, Stago).

Según otra variante de la etapa 2 del método según la invención, la medición de la cantidad de plasmina susceptible de ser producida por las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, se puede realizar según el procedimiento descrito en Thromb Haemost 2004; 92: 1066-75, en el cual

- en una etapa 2-1 se añade a las micropartículas obtenidas en la etapa 1 o en la etapa 1bis del método según la invención, plasminógeno, ventajosamente purificado, en una cantidad final comprendida entre 0,1 μ M y 2,0 μ M, preferentemente entre 0,5 μ M y 1 μ M, y un sustrato cromogénico selectivo de la plasmina como, por ejemplo, (metil-malonil)-hidroxipropilarginina-p-nitroanilida (CBS0065) comercializada por la sociedad STAGO (Francia), en una cantidad final comprendida entre 0,50 mM y 1,0 mM, preferentemente entre 0,65 mM y 0,85 mM;
- en una etapa 2-2 se incuba la mezcla obtenida en la etapa 2-1, por ejemplo en una estufa de secado, a una temperatura comprendida entre 25°C y 45°C, preferentemente 30°C y 40°C, durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 90 minutos, preferentemente entre 50 y 70 minutos, y
- en una etapa 2-3 se mide la cantidad de plasmina susceptible de ser producida, y se detecta por fotometría por lectura de la absorción de la muestra a 450 nm (por ejemplo en un lector de placas de 96 pocillos como el lector de microplacas MR 700 Dynex).

Según una variante de la etapa 2-1, el sustrato selectivo de la plasmina puede ser un sustrato fluorescente como, por ejemplo, la H-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-metilcumarina (Bachem, Bubendorf, Suiza) o el D-AFK-ANSNH-C4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont EE.UU).

Según una variante de la etapa 2-2, la mezcla obtenida en la etapa 2-1 se deposita en un lector de placas termostatazadas a 37°C, el cual mide la cinética de formación de plasmina por medición de la absorción a 405 nm en función del tiempo.

Según la invención, la segunda etapa del método se puede realizar sobre cualquier soporte compatible con las incubaciones y las mediciones a realizar. A este efecto, se pueden citar los cuencos con fondo redondo o los cuencos con fondo plano, por ejemplo los cuencos de las placas con 48 o 96 pocillos de poliestireno o de cloruro de polivinilo. Preferentemente, la etapa 2 del método según el invento se realiza en cuencos con fondo redondo o en cuencos con fondo plano de placas con 96 pocillos.

Según la invención, la medición de la cantidad de plasmina susceptible de ser producida por las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, o de la cantidad de plasmina espontáneamente presente sobre las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, se puede realizar en un volumen final comprendido entre 25 μ l y 150 μ l, preferentemente entre 50 μ l y 100 μ l, ajustado por ejemplo con ayuda de tampón fosfato salino (PBS), suplementado con albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin: BSA) con una concentración comprendida entre 1,0 y 3,0 mg/ml, preferentemente entre 1,5 y 2,5 mg/ml. El número de micropartículas a testar por pocillo puede estar comprendido entre 50 000 y 400 000 partículas, preferentemente 100 000 a 200 000 partículas por pocillo. Ventajosamente, cuando la medición se realiza en cuencos con fondo redondo, el volumen final es preferentemente de 50 μ l y cuando la medición se realiza en cuencos con fondo plano el volumen final es preferentemente de 100 μ l. Según la invención, los resultados se expresan en cantidad de plasmina producida por número de micropartículas.

En una muestra de fluido biológico, particularmente de fluido biológico en situación de flujo, muy particularmente de sangre, las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, representan una población global de micropartículas, que como se ha visto anteriormente, tienen por origen una gemación celular y pueden proceder de numerosos tipos celulares diferentes. A este respecto, se pueden citar micropartículas procedentes de células endoteliales, de células hematopoyéticas.

Así, según el tipo celular del cual proceden, las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, serán portadoras de características propias del tipo celular del que proceden. Sobre esta base, es posible aislar las micropartículas en función de su origen y generar, así, distintas poblaciones de micropartículas de un solo tipo. Por tanto, puede ser interesante no realizar la medición de la actividad de la plasmina más que en un tipo particular de micropartículas.

Así, según un modo particular de realización de la invención, el método puede comprender, además, una etapa 1ter de aislamiento de las micropartículas en función de su origen. Esta etapa se puede realizar después de la primera etapa del método según la invención, es decir después de la etapa 1 o la etapa 1bis de dicho método, preferentemente después de la etapa 1 y antes de la etapa 1bis.

El aislamiento de las micropartículas interesantes se puede realizar por cualquier método conocido de la técnica anterior. A este respecto, se citará un procedimiento de cribado celular por citometría o también por inmuno separación magnética. Preferentemente según la invención, se utiliza el método de la inmunoseparación magnética.

5 Todavía, según otra variante del método según la invención, es posible inmovilizar las micropartículas aisladas en la etapa 1 en el soporte sobre la cual se va a realizar la etapa 2. La inmovilización de las micropartículas se puede realizar según cualquier procedimiento conocido de la técnica anterior, particularmente el descrito en la solicitud de patente internacional WO-A-96/03655. Por ejemplo, es posible preparar el soporte utilizado en la etapa 2 del método según la invención cubriendo su superficie con ayuda de un compuesto apto para inmovilizar las
10 micropartículas por reconocimiento de un elemento de la superficie de dichas micropartículas. A este respecto, se pueden citar la anexina V que reconoce los fosfolípidos procoagulantes, o también los anticuerpos específicos de los complejos glicoprotéicos conformacionales activos y/o funcionales de las membranas GPIIb/GPIIIa, o también los receptores adhesivos de los monocitos o de los linfocitos LFA-1, o también la trombomodulina endotelial o también la CD146. Según otra variante del método según la invención, es posible inmovilizar las micropartículas
15 con ayuda de un polícatión como la poli-L-lisina.

La invención tiene igualmente por objeto la utilización de micropartículas circulantes, presentes en una muestra de sangre, en un método de medición de la actividad de la plasmina de dicha muestra de sangre según una de las reivindicaciones 1 a 18.

20 La invención tiene también por objeto la utilización de un método según una de las reivindicaciones 1 a 18 en un método de diagnóstico, en un individuo cuya sangre procede,

- del riesgo más o menos elevado de sufrir accidentes vasculares causados, por ejemplo, por una inestabilidad acrecentada de las placas de ateroma, o también
- del riesgo más o menos elevado de dicho individuo, afectado de un cáncer, de sufrir una invasión metastásica, o también
- 25 - del riesgo más o menos elevado de dicho individuo de sufrir un accidente vascular cerebral, sus complicaciones hemorrágicas,
- del riesgo de dicho individuo de sufrir una trombosis.

Los inventores pudieron poner de manifiesto, además, que las micropartículas circulantes, particularmente las micropartículas procedentes de células endoteliales, contenidas en un fluido biológico, particularmente un fluido
30 biológico en situación de flujo, por ejemplo de sangre, portadoras de una actividad de plasmina en el sentido de la invención, presentan una gran resistencia a la inactivación, particularmente a la neutralización o inhibición por los inhibidores de enzimas proteolíticas presentes en el fluido biológico. Esta propiedad confiere a dichas micropartículas circulantes la capacidad de transmitir la actividad de la plasmina a través del organismo por el fluido biológico hasta el lugar en el que la presencia de la plasmina desarrolla su actividad, sin riesgo de inhibición
35 o al menos con un riesgo de inhibición extremadamente reducido. A este respecto, se sabe que la plasmina nativa circulante es inhibida rápidamente en los fluidos biológicos. Dichas micropartículas pueden ser comparadas entonces como un vector de la actividad de la plasmina, lo que permite considerar su utilización como tal, una vez purificadas o semipurificadas. De la misma manera que las micropartículas portan el factor tisular, son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades hemorrágicas congénitas como la hemofilia (Nature
40 Medicine 2003, 9: 1020-1025).

Por purificadas o semipurificadas se entiende que las micropartículas se utilizan después de haber sufrido al menos una etapa de purificación.

Así, la descripción tiene por objeto la utilización de micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes procedentes de células endoteliales, purificadas o semipurificadas, como vector de la actividad de plasmina.

45 La descripción tiene también por objeto la utilización de micropartículas, particularmente micropartículas circulantes, particularmente las micropartículas procedentes de células endoteliales, purificadas o semipurificadas, como medicamento, particularmente como medicamento con actividad proteolítica o antitrombótica.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán en la lectura de los ejemplos siguientes, que no se dan más que a título ilustrativo y no limitan en nada la presente invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Demostración de la actividad de la plasmina portada por las micropartículas de células endoteliales en cultivo:

1-A: Preparación de micropartículas de células endoteliales:

5 Células de la línea endotelial microvascular humana HMEC-1 (J. Invest. dermatol. 1992; 99: 683-90) fueron cultivadas hasta la confluencia en medio MCDB 131 (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia) suplementado con 10% de suero de ternera fetal exento de micropartículas (FCS), 10 ng/ml de EGF humano recombinante (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY, EE.UU.) y 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, St Quintin Fallavier, Francia).

Las micropartículas endoteliales (EMP) fueron purificadas a partir del medio de cultivo de células HMEC-1 estimuladas durante 48 horas con 100 ng/ml de TNF-α (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ, EE.UU) según las condiciones descritas en J. Clin. Invest. 1999 julio; 104(1): 93-102.

10 Los sobrenadantes del cultivo fueron centrifugados a 4300 g durante 5 minutos con el fin de desembarazarlos de las células y los residuos celulares flotantes.

Los sobrenadantes se centrifugaron entonces a 20000 g durante 120 minutos a 4°C.

15 El coágulo de EMP se lavó entonces 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) y se volvió a suspender en PBS. Partes alícuotas de 10 µl de suspensión de EMP, diluida 1/100, se marcaron con anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Abcys. Paris, Francia). Las EMP se contaron por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente en J. Thromb. Haemost. 2004 oct.: 2(10): 1842-3 y en la solicitud de patente francesa FR-A-2795820.

1-B: Inmovilización de las EMP

Las EMP se inmovilizaron sobre una superficie de poliacrilato según el principio de la adsorción físico-química.

20 Para ello, las paredes y el fondo de los pocillos con fondo redondo de placas con 96 pocillos de PVC se activaron con 25 µg/ml de poli-L-lisina (Aldrich-Sigma). Diferentes concentraciones de EMP en PBS se incubaron entonces durante una noche a 4°C en los pocillos previamente activados. Los pocillos se lavan después y las EMP inmovilizadas se utilizaron en el ensayo de generación de plasmina.

1-C: Ensayo de generación de plasmina

1-C-1: protocolo

25 En los pocillos de las placas de 96 pocillos con fondo redondo, de PVC, se incubaron diferentes concentraciones de EMP en suspensión en PBS, suplementado con 0,8% de seroalbúmina bovina (PBSA), con 50 µl de una mezcla de plasminógeno 1 µM y (metil-malonil)-hidroxipropilarginina-p-nitroanilida (CBS0065, Stago, Asnières, Francia), sustrato cromogénico selectivo de la plasmina 0,75 mM.

Como control se utilizó un volumen idéntico del sobrenadante del último lavado de las EMP.

30 La microplaca se depositó en el lector de microplacas, y la cinética de la aparición de la plasmina fue seguida durante 9 horas con ayuda de un espectrofotómetro adaptado a la lectura de placas multipocillos (MX5000, Dynex), a 37°C, por medición de las modificaciones de la absorción a 405 nm producidas por la liberación de p-nitroanilina en función del tiempo.

1-C-2: Resultados

35 Los resultados de estas mediciones se muestran en la tabla siguiente:

EMP/50 µL	A 405 nm/min
10 ⁶	48,7
10 ⁵	12,9
5.10 ⁴	4,7
10 ⁴	1,6
10 ³	1,1
0	0,5
5.10 ⁴ + EACA	0,6

EACA: ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -aminocaproic acid), inhibidor de la unión del plasminógeno a las MP.

1-D: medición de la constante de Michaelis

1-D-1: medición sobre las EMP en suspensión

1-D-1a: protocolo

- 5 En los pocillos de las placas de 96 pocillos con fondo redondo, de PVC, $2 \cdot 10^5$ EMP en suspensión en PBS, suplementado con 0,8% de suero de suero de albúmina bovina (PBSA), se incuban con diferentes concentraciones de plasminógeno (0 a 5 μM) en un volumen final de 50 μl , en presencia de (metil-malonil)-hidroxipropilarginina-p-nitroanilida (CBS0065, Stago, Asnières, Francia), sustrato cromogénico selectivo de la plasmina 0,75 mM.

Como control se utilizó un volumen idéntico de sobrenadante del último lavado de las EMP.

10 **1-D-1b: Resultados**

Los resultados de estas mediciones se muestran en la tabla siguiente:

Pg (μM)	A 405 nm/min
5	35,8
2,5	31,8
1,25	25,9
0,62	21,8
0,31	18,2
0,18	16,4
0	0,4

Por aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten, estos resultados permiten determinar la constante de Michaelis de la generación específica de plasmina : $K_m = 0,122 \mu\text{M}$.

1-D-2: medición sobre las EMP inmovilizadas

15 **1-D-2A: protocolo**

Las micropartículas fueron inmovilizadas en los pocillos tal como se indicó anteriormente (1-B inmovilización de las micropartículas).

El plasminógeno y el sustrato cromogénico se añadieron a las micropartículas inmovilizadas según el mismo protocolo que para las EMP en suspensión.

- 20 La cinética de formación de la plasmina se detecta en un lector de microplacas por medición de la absorción a 405 nm.

Esta variante, después de la detección de la cinética de activación, permite medir la plasmina ligada a las micropartículas inmovilizadas. A este efecto, las placas se lavan con PBSA y la plasmina fijada a las micropartículas inmovilizadas se detectó por adición de 50 μl /pocillo de CBS0065 0,325 mM y medición de las modificaciones de la absorción a 405 nm.

25

1-D-2b: Resultados

EMP/50 μL	A 405 nm/min
$2 \cdot 10^5$	4,6
10^5	2,3
$7.5 \cdot 10^4$	1,5
$5 \cdot 10^4$	0,8
$2,5 \cdot 10^4$	0,6

1-E: Conclusiones

Estos resultados muestran que la formación de plasmina por las micropartículas es función del número de micropartículas añadidas a los pocillos o de la concentración fija de micropartículas o de la concentración de plasminógeno añadida. Estos resultados muestran igualmente que el efecto de las micropartículas se debe a la presencia de un activador del plasminógeno presente sobre las micropartículas.

Ejemplo 2: Demostración de la actividad de la plasmina portada por las micropartículas in vivo:

2-A: Protocolo

A partir de una muestra de sangre entera previamente obtenida de un individuo que presenta una patología autoinmune con riesgo trombótico, se aislaron las micropartículas según el método siguiente:

- 10 + (etapa 1A) se centrifugan 2 ml de dicha muestra de sangre a la velocidad de 1500 g, durante 10 minutos a la temperatura de 4°C;
- + (etapa 1-B) se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1A a la velocidad de 17500 g, durante 2 minutos, a la temperatura de 4°C;
- 15 + (etapa 1-C) se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1Ba la velocidad de 17500 g, durante 90 minutos, a la temperatura de 4°C;
- + (etapa 1D) se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1C en 1000 µl de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a la velocidad de 17500 g durante 90 minutos, a la temperatura de 4°C.
- + (etapa 1E) se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1D en 1000 µl de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a la velocidad de 17500 g durante 90 minutos, a la temperatura de 4°C.
- 20 + (etapa 1F) se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1E en 50 µl de tampón fosfato salino (PBS) para la conservación y utilización ulterior.

Las micropartículas así obtenidas en la etapa 1F se recuentan por citometría de flujo.

25 En un cuenco con fondo redondo de una placa de 96 pocillos (Vinyl alphanumeric U bottom plates, ref. 2101, Thermo), en un volumen final de 50 µl, ajustado en caso necesario con tampón fosfato salino (PBS), suplementado con seroalbúmina bovina a la concentración final de 2 mg/ml, con 200000 micropartículas obtenidas anteriormente y conservadas en PBS suplementado con seroalbúmina bovina a la concentración final de 2 mg/ml, se añade plasminógeno purificado (Américan Diagnostica, Hyphen) a una concentración final de 0,5 µM (o 1 µM) y CBS0065 (STAGO) a la concentración final de 0,75 mM.

30 Al final de la adición del plasminógeno y del sustrato cromogénico a las micropartículas en un volumen final de 50 µl en una placa de 96 pocillos, dicha placa se dispone directamente en el fotómetro termostatzado a 37°C (MX5000; Dynex) con el fin de detectar la variación de la absorción a 405 nm en función del tiempo durante 4 a 6 horas.

35 La actividad de la plasmina de una muestra testigo procedente de un sujeto exento de riesgo trombótico, se mide en paralelo en las mismas condiciones. La cantidad de plasmina producida por las micropartículas se calcula en relación con una curva de referencia hecha con concentraciones variables de plasmina (0 a 20 nM).

2-B: Resultados

P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A
1	1,35	5	3,5	9	0,4	13	1,5	17	3,75	21	1,5
2	1,8	6	1,0	10	0,7	14	1,05	18	7,5	22	0,9
3	0,7	7	0,6	11	1,2	15	1,8	19	6,5		
4	0,5	8	2,8	12	9,05	16	2,15	20	0,85		

A: absorción (405 nm/min); P = paciente

2-C: Conclusión

40 Estos resultados muestran que las micropartículas circulantes aisladas a partir del plasma de un sujeto que presenta una enfermedad autoinmune generan plasmina como las partículas del protocolo testado in vitro. Estos

resultados muestran igualmente que el efecto de las micropartículas producidas in vivo depende de la presencia del plasminógeno añadido.

REIVINDICACIONES

1. Método para la medición de la actividad de la plasmina de las micropartículas aisladas, particularmente de las micropartículas circulantes de una muestra de sangre, previamente extraída, en el cual
 - en una primera etapa se aíslan dichas micropartículas presentes en dicha muestra, según un procedimiento en el cual
 - o en una etapa 1A se centrifuga un volumen comprendido entre 500 μ l y 5 ml de una muestra de sangre previamente extraída, a una velocidad comprendida entre 1000 g y 2000 g, durante un tiempo comprendido entre 5 minutos y 20 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C;
 - o en una etapa 1B se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1A a una velocidad comprendida entre 10000 g y 20000 g, durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 5 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C;
 - o en una etapa 1C se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1B a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C;
 - o en una etapa 1D se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1C en un volumen comprendido entre 250 μ l y 4 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C;
 - o en una etapa 1E se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1D en un volumen comprendido entre 250 μ l y 4 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad comprendida entre 15000 g y 25000 g, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 120 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C;
 - o en una etapa 1F se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1E en un volumen comprendido entre 20 μ l y 500 μ l de tampón fosfato salino (PBS).
 - en una segunda etapa se mide, por cualquier método apropiado, la capacidad de dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 para generar plasmina, y
 - en una tercera etapa se compara el resultado de la medida obtenida en la etapa 2 con el resultado de una medida idéntica realizada en las mismas condiciones en una muestra de sangre idéntica, testigo.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha muestra de sangre idéntica, testigo, es una muestra de sangre procedente de al menos un individuo considerado como sano, o es sangre procedente del mismo individuo pero obtenida en una extracción anterior a la que ha dado la muestra testada, por ejemplo antes del comienzo de un tratamiento.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la primera etapa de dicho método (aislamiento de las micropartículas, particularmente las micropartículas circulantes, presentes en la muestra), se realiza según un procedimiento en el cual,
 - + en la etapa 1A el volumen de la muestra de sangre está comprendido preferentemente entre 1 ml y 2 ml, se centrifuga a una velocidad comprendida preferentemente entre 1200 g y 1800 g, durante un tiempo comprendido preferentemente entre 10 y 15 minutos, a una temperatura comprendida preferentemente entre 3 y 5°C;
 - + en la etapa 1B se centrifuga el plasma o sobrenadante obtenido en la etapa 1A a una velocidad comprendida preferentemente entre 12000 g y 15000 g, durante un tiempo comprendido preferentemente entre 2 y 3 minutos, a una temperatura comprendida preferentemente entre 3 y 5°C;
 - + en la etapa 1C se centrifuga el sobrenadante obtenido en la etapa 1B a una velocidad comprendida preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida preferentemente entre 3 y 5°C;
 - + en la etapa 1D se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1C en un volumen comprendido preferentemente entre 1 y 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad comprendida preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida preferentemente entre 3 y 5°C;
 - + en una etapa 1E se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1D en un volumen comprendido preferentemente entre 1 y 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifuga la mezcla a una velocidad

comprendida preferentemente entre 18000 g y 22000 g, durante un tiempo comprendido preferentemente entre 60 y 100 minutos, a una temperatura comprendida preferentemente entre 2 y 6°C, preferentemente entre 3 y 5°C:

- 5 + en una etapa 1F se recoge el coágulo obtenido en la etapa 1E en un volumen comprendido preferentemente entre 50 y 100 µl de tampón fosfato salino (PBS).
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la segunda etapa de dicho método (medición de la capacidad de dichas micropartículas para generar plasmina) se realiza directamente sobre la cantidad de micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa.
- 10 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la segunda etapa de dicho método (medición de la capacidad de dichas micropartículas para generar plasmina) se realiza sobre una determinada cantidad de micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque dicha cantidad está comprendida entre 10000 y 100000 micropartículas, preferentemente entre 100000 y 300000 micropartículas.
- 15 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5 ó 6, caracterizado porque comprende una etapa suplementaria (etapa 1bis) de recuento de dichas micropartículas obtenidas a partir de la primera etapa, intercalándose dicha etapa de recuento entre la primera y la segunda etapa del método.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque el recuento de dichas micropartículas se realiza por citometría de flujo.
- 20 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la segunda etapa de dicho método, es decir la medición de la capacidad de dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 para generar plasmina, se determina o bien por la medición de la cantidad de plasmina espontáneamente presente sobre dichas micropartículas, o bien por medición de la cantidad de plasmina susceptible de ser producida por estas micropartículas.
- 25 10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la medición de la cantidad de plasmina espontáneamente presente sobre dichas micropartículas se realiza por cualquier método conocido como, por ejemplo, por una medición inmunológica con ayuda de anticuerpos antiplasmin(ógenos) o también por espectrometría por lectura de la absorción de la muestra a 405 nm con ayuda de sustratos cromogénicos selectivos de la plasmina.
- 30 11. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la medición de la cantidad de plasmina susceptible de ser producida por dichas micropartículas se realiza según un procedimiento en el cual
- en una etapa 2-1 se añade a las micropartículas obtenidas en la etapa 1 o en la etapa 1bis de dicho método, plasminógeno, ventajosamente purificado, en una cantidad final comprendida entre 0,1 µM y 2,0 µM, preferentemente entre 0,5 µM y 1 µM, y un sustrato cromogénico selectivo de la plasmina, en una cantidad final comprendida entre 0,50 mM y 1,0 mM, preferentemente entre 0,65 mM y 0,85 mM;
 - 35 - en una etapa 2-2 se incuba la mezcla obtenida en la etapa 2-1, por ejemplo en una estufa de secado, a una temperatura comprendida entre 25°C y 45°C, preferentemente 30°C y 40°C, durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 90 minutos, preferentemente entre 50 y 70 minutos, y
 - en una etapa 2-3 se detecta por fotometría la cantidad de plasmina susceptible de ser producida, por lectura de la absorción de la muestra a 450 nm
- 40 12. Método según la reivindicación 11, caracterizado porque de la etapa 2-1, el sustrato selectivo de la plasmina es un sustrato fluorescente como, por ejemplo, el H-U-Val-Leu-Lys-7-amido-4-metilcumarina (Bachem, Bubendorf, Suiza) o D-AFK-ANSNH-iC4H9.2HB (Haematologic Technologies Inc, Vermont EE.UU).
- 45 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la segunda etapa de dicho método, es decir la medición de la capacidad de dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 para generar plasmina, se realiza en un volumen final comprendido entre 25 µl y 150 µl, preferentemente entre 50 µl y 100 µl.
- 50 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la segunda etapa de dicho método, es decir la medición de la capacidad de dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 para generar plasmina, se realiza en un tampón fosfato salino (PBS) suplementado con seroalbúmina bovina (Bovine Serum Albumin: BSA) a una concentración comprendida entre 1,0 y 3,0 mg/ml, preferentemente entre 1,5 y 2,5 mg/ml.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque comprende, además, una etapa 1ter de aislamiento de dichas micropartículas en función de su origen.
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque dichas micropartículas aisladas en la etapa 1 están inmovilizadas sobre el soporte en el cual se realiza la etapa 2.
- 5 17. Método según la reivindicación 16, caracterizado porque dichas micropartículas aisladas de la etapa 1 están inmovilizadas sobre el soporte con ayuda de un compuesto apto para inmovilizar dichas micropartículas, habiéndose fijado previamente dicho compuesto a la superficie de dicho soporte.
- 10 18. Método según la reivindicación 17, caracterizado porque dicho soporte apto para inmovilizar dichas micropartículas se selecciona entre la anexina V, los anticuerpos específicos de los complejos glicoprotéicos conformacionales activos y/o funcionales de las membranas GPIIb/GPIIIa, los receptores adhesivos de los monocitos o los linfocitos LFA-1, la trombomodulina endotelial o también el CD 146 o, también, un policatión como la poli-L-lisina.
- 15 19. Utilización de micropartículas circulantes presentes en una muestra de sangre, en un método de medición de la actividad de la plasmina de dicha muestra de sangre según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20. Utilización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en un método de diagnóstico en un individuo cuya sangre procede
- del riesgo más o menos elevado de sufrir accidentes vasculares causados por ejemplo por una inestabilidad acrecentada de las placas de ateroma o, también,

20

 - del riesgo más o menos elevado de dicho individuo afectado por un cáncer de sufrir una invasión metastásica o, también,
 - del riesgo más o menos elevado de dicho individuo de sufrir un accidente vascular cerebral y sus consecuencias hemorrágicas o, también,
 - del riesgo de este individuo de sufrir una trombosis.

25