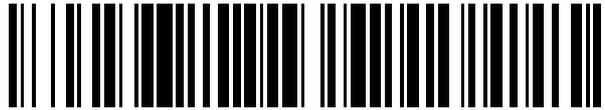


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 673**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07870350 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2089536**

54 Título: **Método de medición de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática**

30 Prioridad:

29.11.2006 FR 0610444

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

02.04.2013

73 Titular/es:

**DIAGNOSTICA STAGO (100.0%)
9, RUE DES FRERES CHAUSSON
92600 ASNIÈRES, FR**

72 Inventor/es:

**VAN DREDEN, PATRICK y
ROUSSEAU, AURÉLIE**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 399 673 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 de medición de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática

- 5 **[0001]** La invención se refiere al campo de la hemostasia y, en particular, a los trastornos de la coagulación.
- [0002]** La presente solicitud tiene por objeto un método para medir, en una muestra biológica, la actividad funcional de la trombomodulina plasmática.
- 10 **[0003]** De acuerdo con la invención, el método se realiza in vitro a partir de una muestra biológica, en particular, a partir de una muestra de sangre extraída de un paciente.
- [0004]** De acuerdo con la invención, el método permite medir la actividad funcional de la trombomodulina en un medio plasmático.
- 15 **[0005]** La presente solicitud se refiere en particular a un método para determinar la actividad funcional de la trombomodulina en un medio plasmático, realizándose dicha determinación, por ejemplo, mediante un método cromogénico o fluorométrico.
- 20 **[0006]** La trombomodulina (TM) es un proteoglicano receptor de la trombina integrado en la membrana de las células endoteliales. Es, en parte, responsable de las propiedades anticoagulantes del endotelio, es una proteína de 557 aminoácidos reagrupados en tres partes; una parte C-terminal intra-citoplasmática implicada en los mecanismos de endocitosis; una parte intra-membranosa hidrófoba; y una parte N-terminal constituida por una larga cadena peptídica. Esta última comprende cuatro regiones; una región rica en Ser/Thr, seguida de una región de seis dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), una región hidrófoba y, por último, un dominio similar a lectina, (Figura 1).
- 25 **[0007]** En 1981, Owen W.G. y Esmon C.T. caracterizaron la actividad funcional de la trombomodulina (Proceedings of the National Academy of Science USA, 1981, vol. 78, páginas 2249-52 y Journal of Biological Chemistry 1981 vol. 256, páginas 6632-5) poniendo de manifiesto una activación de la proteína C plasmática en proteína C activada anticoagulante, por la trombina, catalizada por la trombomodulina.
- 30 **[0008]** La secuencia codificante de la trombomodulina humana se ha caracterizado e identificado en Wen D.Z. et al. en 1987 (Biochemistry, 1987, vol. 26, páginas 4350-7) descrito en EMBL con la referencia BC 035602 y Weiler H. et al. (J. Thromb. Haemost. 2003 Jul, 1(7): 151-24).
- 35 **[0009]** La TM está presente en la superficie de todos los vasos sanguíneos (arterias, venas, capilares) y linfáticos del organismo, siendo en particular abundante en órganos muy vascularizados, como la placenta y el pulmón. Los queratinocitos, osteoblastos, células mesangiales, plaquetas y neutrófilos también la expresan.
- 40 **[0010]** La regulación de la síntesis de la TM depende principalmente del AMPcíclico, del TNF α , de la IL-1, y del ácido retinoico.
- 45 **[0011]** Las células endoteliales no secretan TM y no se degrada por la trombina. Únicamente bajo el efecto de diferentes tipos de agresiones de la célula endotelial (elastasa de polinucleares; citoquinas, macrófagos, lipopolisacáridos...) la TM endotelial se escinde en fragmentos que se liberan a la circulación en forma soluble y después se eliminan por vía renal. Una vez escindida, la TM celular es una forma soluble, es decir, plasmática, de TM, delecionada de las regiones citoplasmáticas y membranosas (Ishiih et al., 1985. J.Clin.Invest. 76, 2178). La evaluación de la TM plasmática soluble (TMp) constituye un buen marcador de lesión endotelial.
- 50 **[0012]** La función principal de la TM es la de oponerse a la acción procoagulante de la trombina, mediante diferentes mecanismos. Cuando la trombina (Th) se une a la TM sufre una modificación conformacional. Pierde sus propiedades coagulantes y su afinidad por las plaquetas y por el fibrinógeno. Sin embargo, siempre puede inactivarse por la antitrombina III (ATIII). La formación del complejo TM-Th aumenta en presencia de sulfato de condroitina. Estas interacciones permiten a la TM eliminar del plasma la Th circulante. Este complejo TM-Th es capaz de activar la proteína C que, en presencia de la proteína S, inhibe los factores Va y VIIIa; esta sucesión de interacciones y de reacciones constituye el sistema de la proteína C. El complejo TM-Th también desempeña un papel en la activación de la proteína C ligada al receptor endotelial de la proteína C (EPCR) así como en la activación de una procarboxipeptidasa plasmática implicada en la fibrinólisis: el TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina). Por tanto, la TM posee una actividad antitrombótica en presencia de ATIII. Igualmente se atribuye a la TM un papel en la inflamación y en la proliferación/diferenciación celular (Figura 2)
- 55 **[0013]** La trombomodulina actúa por tanto como un inhibidor de la coagulación, en particular, acelerando la activación de la proteína C en proteína C activada (PCa) que por sí misma, en presencia del cofactor proteína S, inactiva los factores de la coagulación Va y VIIIa.
- 60
- 65

- 5 **[0014]** La síntesis in vivo de la trombomodulina está aumentada por diferentes factores, tales como el AMPc, los retinoides, las hormonas tiroideas, y la hipertermia (Conway E.M. et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 22804). Otros agentes tales como las citoquinas, IL1, TNF, LPS, y la homocisteína, así como microorganismos intracelulares (citomegalovirus, Herpes, rickettsias) influyen negativamente sobre su expresión y su actividad, lo que conduce a un aumento transitorio de la actividad procoagulante de las células endoteliales.
- 10 **[0015]** Aunque las tasas de TM soluble (TMs) sean elevadas en los recién nacidos, la edad no influye en los sujetos sanos en una franja de edad considerada entre 20 y 60 años, no obstante el sexo del individuo sí que influye, puesto que se observan valores significativamente más elevados en el hombre que en la mujer.
- 15 **[0016]** En numerosas patologías, tales como CIVD, diabetes, leucemia mieloide crónica, insuficiencia hepática y renal, e igualmente en preeclampsias, púrpura trombótica trombocitopénica, rickettsiosis, enfermedad de Behcet, homocistinuria, se ha descrito una elevación de la tasa de TMs asociada a una agresión del endotelio. Se han observado tasas disminuidas en estudios de enfermedades con hipertensión arterial pulmonar y durante melanomas. Por último, se han descrito mutaciones del gen de la TM y se han asociado a una disminución de la tasa de TMs.
- 20 **[0017]** En el plano terapéutico, la perfusión del animal con TM recombinante ha demostrado su eficacia para prevenir la aparición de trombosis.
- 25 **[0018]** Teniendo en cuenta su influencia directa sobre las etapas de la coagulación, en particular en la activación del sistema de la proteína C, parece interesante poder determinar la actividad funcional de la trombomodulina.
- 30 **[0019]** En el estado de la técnica anterior ya se han propuesto ensayos de determinación de la actividad de la trombomodulina, sin embargo no conducen a la determinación de la actividad de la trombomodulina en los sistemas plasmáticos sino únicamente en los celulares. Recientemente, Öhlin A. K. et al. (Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005, 3: 976-982) han descrito un método de evaluación en un medio plasmático. Sin embargo, esta publicación no propone un ensayo directo de la TMs sino que requiere una primera etapa de aislamiento y de separación por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la trombomodulina plasmática. De hecho, en una primera etapa del ensayo descrito por Öhlin A. K. et al., el plasma ensayado, eventualmente diluido, se incuba en una microplaca cuyos pocillos contienen un anticuerpo monoclonal contra la trombomodulina humana. Tras haber retirado el plasma, los pocillos de las microplacas se lavan para conservar solo los fragmentos de trombomodulina que se han unido al anticuerpo. En una segunda etapa, los pocillos de la microplaca preparados de este modo se ponen en presencia de reactivos necesarios para obtener la proteína C activada. Tras la incubación, un sustrato cromogénico o fluorométrico permite revelar la proteína C activada.
- 35 **[0020]** Los autores de la publicación llegan a la conclusión de que sería importante en el futuro, diseñar un ensayo que permita medir directamente en el plasma la actividad de la trombomodulina sin pasar por una etapa de aislamiento y separación de la trombomodulina.
- 40 **[0021]** Por tanto, actualmente, la evaluación de la trombomodulina plasmática se basa únicamente en una evaluación antigénica de la proteína soluble que corresponde a la proteína de la membrana escindida que ha perdido la región citoplasmática carboxiterminal y la región transmembrana hidrófoba. La TMs es capaz de unirse a la trombina y de activar la proteína C, funciones localizadas en los motivos repetitivos del EGF.
- 45 **[0022]** Actualmente se dispone de diversos ensayos que aplican reacciones inmunológicas entre anticuerpos anti-trombomodulina y la trombomodulina soluble. La sociedad Diagnostica Stago propone, por ejemplo, un ensayo ELISA para evaluar la trombomodulina (Asserachrom® Thrombomodulin).
- 50 **[0023]** El problema de la evaluación in vitro de la actividad funcional de la trombomodulina es lo que resuelve la presente invención al proponer un método de medición de la actividad funcional de la trombomodulina, en un medio biológico y, en particular, en un medio plasmático, es decir, un método que permita evaluar in vitro la trombomodulina soluble contenida en el medio biológico que la conserva, en particular en el plasma, sin separar la trombomodulina del resto de los constituyentes del medio biológico ensayado, principalmente del plasma.
- 55 **[0024]** En otros términos, la invención propone un ensayo de medición de la trombomodulina, en un medio biológico y, en particular, en el medio plasmático, en presencia de los reactivos necesarios para la activación del sistema de la proteína C. Por otro lado, la invención propone un ensayo que permite, en un medio biológico y, en particular, en el medio plasmático, superar la dificultad ligada a la coagulación de la muestra bajo el efecto de los reactivos necesarios para la activación de la proteína C.
- 60 **[0025]** El método de la invención y los medios para aplicarla se definen por poder utilizarse en el ámbito de los exámenes biomédicos efectuados in vitro.
- 65 **[0026]** Como recordatorio, la activación de la proteína C en PCa se produce in vivo bajo la acción del complejo formado en la superficie del endotelio vascular por la trombomodulina y la trombina (Factor IIa). La PCa forma, a continuación, un complejo con la proteína S para fijarse sobre los fosfolípidos a la superficie de las plaquetas o del

endotelio. Estos complejos PCa-PS-Fosfolípidos catalizan la inactivación de los factores Va y VIIIa, ralentizando así los fenómenos de coagulación.,

5 **[0027]** La invención se refiere por tanto a un método de medición in vitro de la actividad funcional de la trombomodulina, realizándose dicha medición un medio biológico a partir de una muestra previamente extraída de un paciente. Según un modo de realización particular de la invención, una muestra que permita la medición de la actividad de la trombomodulina en un medio biológico, es una muestra de plasma. Según otro modo de realización particular de la invención, la muestra que permite la medición de la actividad de la trombomodulina es una muestra de sangre total o de líquido cefalorraquídeo (LCR) o de líquido amniótico.

10 **[0028]** El método de evaluación in vitro, según la invención, comprende la medición, en el medio biológico de la muestra, de la activación de la proteína C en proteína C activada (PCa), realizando dicha activación por efecto de la trombina, en presencia de su cofactor, la trombomodulina de la muestra. La medición se realiza tras la adición de proteína C purificada en exceso. También se añaden a la muestra otros agentes necesarios para la activación del sistema de la proteína C, así como un inhibidor de la polimerización de la fibrina.

15 **[0029]** La invención tiene, en particular, por objeto un método de medición in vitro de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática, comprendiendo dicho método la evaluación, en el medio plasmático, de la activación de la proteína C en proteína C activada (PCa) por la trombina en presencia de su cofactor, de dicha trombomodulina plasmática. Para la realización de esta medición, en el plasma ensayado, se añade en exceso proteína C purificada, denominada proteína C exógena purificada, así como agentes necesarios para la activación del sistema de la proteína C y un inhibidor de la polimerización de la fibrina.

20 **[0030]** Como alternativa a la adición de proteína C purificada, se puede añadir TAFI (Carboxipeptidasa U plasmática cuya activación catalizada por la trombina, está incrementada por la trombomodulina) para medir su activación en TAFI activado (TAFIa).

25 **[0031]** La medición de la actividad quiere decir una medición de la actividad funcional de la trombomodulina, puesto que permite medir la actividad de la trombomodulina en un medio biológico, en particular en un medio plasmático, particularmente en un plasma, al que se ha añadido proteína C en exceso y los agentes necesarios para la activación del sistema de la proteína C. Se observará que el exceso de proteína C utilizada es suficiente para liberar, cuando se mide, cualquier déficit cuantitativo o cualitativo relativo a la presencia de proteína C endógena en el medio de ensayo. En otros términos por "exceso de proteína C exógena" se entiende por tanto la realización de la invención, en la que la proteína C exógena se añade en tal cantidad que la medición de su activación en PCa es independiente de la cantidad de proteína C de la muestra.

30 **[0032]** Según un modo de realización particular de la invención, la evaluación efectuada en el medio plasmático se realiza en una muestra de plasma obtenida a partir de una muestra biológica extraída de un paciente.

35 **[0033]** La trombomodulina plasmática que se mide según la invención es la proteína soluble (trombomodulina soluble o TMs también denominada trombomodulina plasmática TMp) que corresponde a la trombomodulina de la membrana escindida y por tanto separada de sus regiones citoplasmática carboxiterminal y la hidrófoba transmembranosa. En efecto, la trombomodulina soluble permanece capaz de unirse a la trombina y de activar la proteína C en PCa puesto que esta función de activación se localiza sobre los motivos repetidos de la proteína EGF.

40 **[0034]** Por el contrario, cuando la actividad de la trombomodulina se mide en una muestra de LCR o de líquido amniótico, la trombomodulina está bajo su forma completa (no truncada).

45 **[0035]** Los agentes necesarios para la activación del sistema de la proteína C que se suministran a la muestra de plasma ensayado son principalmente, la trombina (en particular la a-trombina humana purificada) y los iones de calcio, para los diferentes modos de realización de la invención.

50 **[0036]** Los iones de calcio son suministrados, por ejemplo, en forma de CaCl₂.

55 **[0037]** Por otro lado, el método de medición de la actividad de la trombomodulina plasmática según la invención comprende suministrar, a la muestra de ensayo, un inhibidor que compite con la trombina y que bloquea así la transformación del fibrinógeno en fibrina.

60 **[0038]** Un método de medición in vitro de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática según la invención comprende:

- La puesta en contacto de una muestra de plasma para el ensayo de la actividad de la trombomodulina, con proteína C exógena purificada, trombina, iones de calcio y un inhibidor de la polimerización de la fibrina.
- la incubación del medio obtenido para permitir la producción de la proteína C activada;
- 65 - la evaluación funcional de la proteína C activada.

[0039] En un modo de realización particular del método de medición según la invención, la cantidad de proteína C activada formada se evalúa por su actividad sobre un sustrato. Este sustrato es, en particular, un sustrato enzimático, natural o sintético; por ejemplo, se trata de un sustrato cromogénico o fluorométrico.

5 **[0040]** Un sustrato apropiado para evaluar la actividad de la PCa puede ser un sustrato proteico, por ejemplo un péptido.

10 **[0041]** En un modo de realización particular de la invención, el sustrato enzimático de la proteína C activada medida es un sustrato que permite evaluar la actividad amidolítica de la PCa. En particular, se trata de un sustrato cromogénico o fluorométrico.

15 **[0042]** Como sustratos sintéticos que pueden utilizarse en el ámbito de la invención, se citan los sustratos oligopeptídicos sintéticos. Como ejemplo, se menciona el sustrato sintético CBS 42.46 de la sociedad Diagnostica Stago (oligopéptido: THC-Pro-Arg-pNA). Otro ejemplo de sustrato cromogénico es el sustrato S-2366 (oligopéptido piroGlu-Pro-Arg-pNa) o S-2238 (oligopéptido H-D-Phe-Pip-Arg-pNA).

20 **[0043]** En el ámbito de la invención, pueden seleccionarse diferentes inhibidores de polimerización de la fibrina. Como ejemplo, se citan los inhibidores peptídicos sintéticos, por ejemplo, el inhibidor oligopeptídico H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH.AcOH(GPRP.AcOH) (Pefabloc® FG de la sociedad Pentapharm).

[0044] En un modo de realización particular de la invención, el método de medición de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática comprende las siguientes etapas:

25 a) la puesta en contacto de una muestra de plasma con un reactivo 1 que comprende la trombina, contenida en un medio que permite la activación del sistema de la proteína C, comprendiendo en particular iones de calcio, comprendiendo además el reactivo 1 un inhibidor de la polimerización de la fibrina;

b) la incubación del medio constituido en la etapa a) con un reactivo 2 que comprende la proteína C purificada, durante un tiempo suficiente para permitir su activación en PCa por la trombina formando un complejo con su cofactor, la trombomodulina contenida en la muestra de plasma;

30 c) la puesta en contacto del medio constituido en la etapa b) que comprende la proteína C activada, con un sustrato enzimático de la PCa;

d) la cuantificación de la transformación del sustrato de la PCa.

35 **[0045]** Para la realización de la invención, la proteína C utilizada es una proteína C purificada, por ejemplo la proteína C aislada según el método descrito por Öhlin et al, J. Biol. Chem., 1988, 263: 19240-8. Según un modo de realización particular de la invención, la proteína C utilizada es la proteína C humana purificada. La proteína C utilizada se añade para a una concentración comprendida en el intervalo 0,5 µM/l y 2,5 µM/lm, incluso de 0,1 a 10 µM/l.

40 **[0046]** Se dice que la proteína C está purificada para expresar que carece sustancialmente de otros componentes proteicos y contaminantes, independientemente de cualquier referencia a su modo de preparación.

[0047] La proteína C añadida puede ser una proteína recombinante.

45 **[0048]** La proteína C está disponible también en forma purificada y activa para la realización de la medición según la invención, en las sociedades Diagnostica Stago, Enzyme Research Laboratories, American Diagnostica.

50 **[0049]** En el ámbito del método de la invención, la puesta en contacto de la trombina suministrada con la trombomodulina presente en el plasma de ensayo, conduce a la formación del complejo trombina/trombomodulina.

55 **[0050]** El reactivo que aporta la trombina y los iones de calcio puede estar constituido por la trombina diluida en un tampón que comprende los iones de calcio. Igualmente, al tampón puede añadirse el inhibidor de la polimerización de la fibrina. Adicionalmente, pueden añadirse otros constituyentes contenidos habitualmente en este tipo de tampón.

[0051] Ventajosamente, la trombina utilizada es de origen humano. En particular, se trata de trombina cuya actividad, expresada en unidades NIH, está en un intervalo de 5 a 20 NIH, ventajosamente 10 NIH en el reactivo que se utiliza para preparar el medio de reacción.

60 **[0052]** El reactivo así constituido permite la interacción de la trombina suministrada con la trombomodulina de la muestra de plasma y la activación de la proteína C.

65 **[0053]** Entre los otros componentes del reactivo constituido, se cita, por ejemplo, un inhibidor de la heparina o de cualquier otro anticoagulante, utilizado en la medición en la que la muestra con la que se ensaya se ha extraído anteriormente de un paciente tratado con heparina o con cualquier otro anticoagulante y es por tanto característico de un paciente tratado con heparina o con cualquier otro anticoagulante.

[0054] Sin embargo, si la muestra proviene de un paciente tratado con un anticoagulante de la familia de las antivitaminas K, no se añade inhibidor de este anticoagulante, puesto que, actualmente, no hay ningún inhibidor disponible.

5
[0055] Como alternativa a la dilución de la muestra en el tampón de Owren Koller, se propone realizar la dilución en un plasma normal según los criterios de selección habituales conocidos por el experto en la materia, de forma que dicho plasma sea deficiente en trombomodulina. Por tanto, a este plasma se le añade la trombina exógena así como la proteína C purificada y el inhibidor de la polimerización de la fibrina y, como se indicó anteriormente, y el inhibidor de la heparina cuando la muestra biológica proviene de un paciente tratado con heparina, o con cualquier otro inhibidor si se trata de un anticoagulante diferente. El suministro de trombina lo realiza el plasma.

10
[0056] Por plasma deficiente en trombomodulina se entiende un plasma que comprende menos del 1% de esta proteína.

15
[0057] Un plasma deficiente en trombomodulina puede prepararse por cualquier método en sí conocido.

[0058] Se puede utilizar, por ejemplo, la técnica de inmunoadsorción con anticuerpos dirigidos contra esta proteína, por ejemplo anticuerpos inmovilizados en un soporte.

20
[0059] El plasma a tratar está citrado.

25
[0060] La proteína C purificada, se suministra en condiciones que permitan su reacción con el complejo trombina/trombomodulina, que conduce a la activación de esta última a la forma de una proteína C activada (PCa). Es en esta forma de PCa, en la que la proteína C, interacciona con los iones de calcio así como con los fosfolípidos y su cofactor, la proteína S, y así es capaz de interactuar con sus sustratos y particularmente en el proceso de coagulación, los factores Va y VIIIa (FVa, FVIIIa). Se puede así evaluar la inhibición del factor Va para medir la actividad de la trombomodulina.

30
[0061] La medida de la actividad funcional de la proteína C activada comprende la reacción del reactivo obtenido, con un sustrato enzimático de la proteína C activada.

35
[0062] Este sustrato ha sido descrito anteriormente y se recuerda que puede ser un sustrato natural o sintético. Cuando se trata de un sustrato natural, puede tratarse de una proteína de la coagulación plasmática, tal como el FVa o el FVIIIa. Como alternativa, el sustrato medido, revelador de la actividad funcional de la trombomodulina puede ser el TAFI activado (TAFIa) o un sustrato del TAFI activado. Cuando el sustrato enzimático de la PCa es de naturaleza sintética, puede tratarse, por ejemplo, de un sustrato peptídico. Ventajosamente, el sustrato en cuestión es un sustrato cromogénico o fluorométrico.

40
[0063] En particular, puede tratarse de un sustrato que permita evaluar la actividad amidolítica de la PCa. Tal sustrato es, por ejemplo, el sustrato oligopeptídico sintético CBS42.46 de la sociedad Diagnostica Stago. Otros sustratos se han citado anteriormente como ejemplos.

45
[0064] La etapa de cuantificación de la actividad funcional de la trombomodulina se basa en la cuantificación de la transformación del sustrato de la PCa.

[0065] Esta cuantificación puede realizarse midiendo la densidad óptica de la mezcla de reacción en una ventana de lectura determinada en función del sustrato seleccionado.

50
[0066] En un modo de realización particular de la invención, el plasma obtenido a partir de la muestra biológica extraída del paciente está diluido. Por ejemplo, el plasma está diluido menos de veinte veces, por ejemplo menos de diez veces y particularmente está diluido a 1/3 o a 1/4.

55
[0067] La dilución realizada puede decidirse en función de la sensibilidad del sustrato: cuanto más sensible es el sustrato más fuerte puede ser la dilución..

60
[0068] En un modo de realización particular de la invención, el inhibidor de la polimerización de la fibrina es un inhibidor polipeptídico. En particular, puede tratarse del oligopéptido H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH.AcOH GPRP.AcOH (Pefabloc® FG de la sociedad Pentapharm). Este inhibidor puede utilizarse en la reacción de evaluación, a una concentración que varía de 1 a 15 g/l, seleccionada según la dilución de la muestra de plasma. Por ejemplo, cuando el plasma está diluido a 1/3, se utilizarán ventajosamente 10 g/l de ese inhibidor.

65
[0069] En otro modo de realización de la invención, el inhibidor de la polimerización de la fibrina es un anticuerpo antifibrinógeno tal como el descrito anteriormente.

[0070] En un modo de realización particular de la invención, la medición de la actividad funcional de la

trombomodulina comprende la utilización del tampón de trombina que tiene la siguiente constitución:

NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y, cuando la muestra de plasma proviene de un paciente tratado con heparina, un inhibidor de la heparina, por ejemplo, polibreno (10 g/l).

[0071] Puede utilizarse cualquier tampón adaptado para la dilución de la trombina.

[0072] Cuando el sustrato enzimático de la proteína C activada es el CBS42.46, u otro sustrato enzimático, particularmente un sustrato sintético, la lectura de la densidad óptica puede realizarse en una ventana de lectura que varíe de 6 a 500 s, a una longitud de onda de 405 nm.

[0073] Como alternativa, la densidad óptica puede leerse en una ventana que varíe de 6 a 200 s, a una longitud de onda de 405 nm.

[0074] La concentración de sustrato, particularmente de CBS42.46 es, por ejemplo, de 2,5 µM/ml en el reactivo a suministrar en el medio de reacción.

[0075] La etapa de incubación del plasma puesto en contacto con la trombina en presencia de iones de calcio, con la proteína C puede realizarse durante aproximadamente de 1 a 120 min., por ejemplo, durante aproximadamente 600 s.

[0076] De esta forma, en un modo de realización particular de la invención, el método de medición de la actividad funcional de la PCa se realiza en las siguientes condiciones:

- para la etapa a), se ponen en contacto 70 µl de muestra de plasma diluido a 1/3, con 40 µl de trombina 10 NIH diluida en un tampón que contiene NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y en presencia de inhibidor de la polimerización de la fibrina, por ejemplo GPRP.AcOH (10 g/l) y, cuando la muestra de plasma proviene de un paciente tratado con heparina, un inhibidor de heparina, por ejemplo, polibreno (10 g/l);
- para la etapa b) se incuban 30 µl de proteína C purificada durante 600 s en el medio constituido en la etapa a);
- para la etapa c) 110 µl de sustrato enzimático de la proteína C activada, por ejemplo CBS 42.46 a 2,5 µM/ml (en el reactivo), y la cantidad de sustrato enzimático transformado se determina por lectura óptica dentro de un periodo de 6 a 500 s a una longitud de onda de 405 nm.

[0077] En un modo de realización particular de la invención, la medición de la actividad funcional de la trombomodulina plasmática se realiza midiendo paralelamente la misma actividad de un control interno. Este control puede obtenerse utilizando un plasma convencional tratado como la muestra.

[0078] Las cantidades y/o concentraciones de los reactivos a suministrar en el medio de reacción para la realización del método, tales como las cantidades y/o concentraciones de plasma, de trombina, de proteína C purificada, de inhibidor de polimerización de la fibrina, y de sustrato pueden variar en relación a los datos descritos en la presente solicitud, especialmente en función de la concentración de cada reactivo o de su actividad. Preferentemente las concentraciones finales respectivas de los diferentes reactivos de la reacción se conservan sensiblemente en el medio de reacción.

[0079] Por concentración final se entiende la concentración de los reactivos en el medio donde actúan cuando se les introduce.

[0080] El experto en la materia está en condiciones de adaptar las concentraciones y actividades, en función de los reactivos seleccionados. A modo ilustrativo, se observa que las concentraciones o las actividades de los reactivos, pueden variar a niveles superiores de aproximadamente el 50%, por ejemplo un nivel superior de aproximadamente 20%, o de aproximadamente el 10%, con respecto a los indicadores contenidos en la presente solicitud. Esta variación puede afectar a cada reactivo, independientemente del resto de reactivos.

[0081] Para cuantificar la actividad funcional de la trombomodulina, según un modo de realización particular, la invención propone comparar el resultado obtenido de la reacción, por ejemplo, el valor obtenido de la densidad óptica, con valores establecidos sobre una curva de calibración. Esta curva de calibración se obtiene, por ejemplo, midiendo la actividad funcional de la trombomodulina mediante

- una muestra de plasma convencional diluida en tampón de Owren Koller, por ejemplo, un plasma que comprenda cantidades estadísticamente habituales, es decir, normales, de factores de coagulación conocidos en las vías endógena y exógena de la coagulación. Puede obtenerse, a partir de muestras normales de plasma, ya sea de muestras normales ensayadas en grupo o de muestras ensayadas individualmente para, a continuación, determinar un valor medio de los valores individuales obtenidos de la

5 actividad de la trombomodulina. Los valores estadísticamente habituales de los factores de coagulación se sitúan en unos intervalos que se encuentran en los manuales conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se considerará como plasma normal, un plasma que ofrece resultados calificados como normales en ensayos de fibrinógeno, de tiempos de cefalina con activador (TCA), de tiempos de trombina (TB), de la PC y del factor V. A este respecto, también pueden tomarse como referencia las normas definidas en la obra: "How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guidelines-Segunda Edición. Documento NCCLS C28-A2 (ISBN 1-56238-406-6) NCCLS-USA 2000." o,

10 - un plasma deficiente en trombomodulina al que se añade una cantidad creciente de TM purificada. Puede obtenerse por cualquier método en sí conocido, por ejemplo por inmunoadsorción mediante anticuerpos antitrombomodulina, para realizar el consumo de TM antes de la adición de la TM purificada.

[0082] Se puede así formar una gama de diluciones, de plasmas normales, de un grupo de plasmas normales o de plasmas que se muestran deficientes en TM a los que se les añade cantidades crecientes de TM.

15 **[0083]** La trombomodulina añadida a las muestras de plasma para establecer la curva de calibración puede ser completa o soluble.

[0084] Se puede tratar también de una molécula recombinante truncada y soluble de trombomodulina, como la solulina® comercializada por la sociedad BerlexBiosciences, San Francisco USA. Esta molécula puede utilizarse como patrón para la realización de un control interno o para la realización de una curva de calibración.

20

[0085] Siguiendo las características de los pacientes susceptibles de someterse a un ensayo de medición de la actividad de la TM, la elección de las muestras de los plasmas utilizados podrá ajustarse para obtener valores de los controles.

25

[0086] De este modo, las muestras de plasma seleccionadas como controles, se extraerán preferentemente de individuos que presenten características parecidas a las de los pacientes del ensayo, en cuanto a la edad, el sexo, el índice de masa corporal y, si fuese apropiado, la frecuencia del consumo de tabaco o alcohol.

30 **[0087]** La invención también tiene por objeto un kit para medir la actividad de la trombomodulina plasmática en el medio plasmático, que comprende;

- un reactivo 1, que comprende la trombina diluida en un tampón que comprende un inhibidor de la polimerización de la fibrina y que comprende iones de calcio y, si fuera el caso, un inhibidor de heparina;

35 - un reactivo 2, que comprende la proteína C purificada; o como alternativa TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina)

- un reactivo 3, que comprende un sustrato enzimático de la proteína C activada, o un sustrato específico del TAFIa.

40 **[0088]** La evaluación de la actividad del TAFI que consiste en medir el TAFIa (TAFI activado) se ha descrito, por ejemplo, en la patente WO 03/004516, mediante sustratos cromógenos del TAFIa derivados de compuestos de arazofornilo.

45 **[0089]** Según un modo de realización particular de la invención, el kit se caracteriza por que el reactivo 1 comprende esencialmente los siguientes compuestos: NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y por las muestras de plasma de los enfermos tratados con heparina o con cualquier otro anticoagulante, un inhibidor de la heparina o de dicho anticoagulante, por ejemplo, polibreno (10 g/l) y un inhibidor de la polimerización de la fibrina.

50 **[0090]** Según un modo de realización particular de la invención, el inhibidor de la polimerización de la fibrina es el GPRP.AcOH utilizado a una concentración de 1 a 15 g/l. La concentración se determina en función del grado de dilución del plasma de ensayo. Por ejemplo, cuando el plasma está diluido a un tercio, se utilizan 10 g/l de GPRP.AcOH. Las propiedades y condiciones de utilización de este inhibidor se describieron anteriormente.

55 **[0091]** La invención tiene también por objeto un kit, como el definido anteriormente, en el que el inhibidor de la polimerización de la fibrina es un anticuerpo antifibrinógeno.

[0092] En un modo de realización particular, el kit comprende adicionalmente un control interno definido como se indica en la presente solicitud.

60

[0093] Según un modo de realización particular, el kit puede comprender también una curva de calibración de la actividad funcional de la trombomodulina, o los medios apropiados para la realización de dicha curva.

65 **[0094]** La invención también tiene por objeto un método de detección in vitro de una anomalía de la coagulación, que comprende la medición de la actividad funcional de la trombomodulina en un medio plasmático, como el que se describe en la presente solicitud. Se puede tratar de detectar un aumento de la tasa de actividad funcional de la

trombomodulina o una disminución de esa tasa.

[0095] En un sujeto adulto, se considera que una variación (elevación o disminución) anómala de la tasa de trombomodulina es un marcador de riesgo trombotico o de lesión (o lesiones) endotelial (endoteliales).

[0096] Según un modo de realización particular de este método, en un medio plasmático se compara la actividad funcional medida de la trombomodulina con un valor de esta actividad, medida sobre un plasma convencional.

[0097] En un modo de realización particular de la invención, el valor así obtenido, denominado valor convencional o normal, se obtiene después de evaluar la actividad funcional de la trombomodulina en un grupo de muestras de plasma convencionales.

[0098] Según otro modo de realización particular de la invención, dicho valor convencional se establece a partir de valores de la actividad funcional de la trombomodulina medidos sobre muestras de plasma normales (convencionales) evaluadas individualmente.

[0099] Los medios, métodos y kits descritos en la presente solicitud pueden utilizarse para la detección de un aumento de la tasa de trombomodulina, eventualmente asociada a síntomas clínicos. De este modo, un aumento de la tasa de trombomodulina puede asociarse a síntomas de coagulación intravascular diseminada (CIVD), diabetes, leucemia mieloide crónica, insuficiencia hepática y renal, preeclampsia, púrpura trombótica trombocitopénica, rickettsiosis, enfermedad de Behçet, homocistinuria, aborto espontáneo.

[00100] Según otro modo de realización de la invención, los medios, métodos y kits, se utilizan para la detección de una disminución de la tasa de trombomodulina eventualmente asociada a síntomas clínicos. Estos síntomas pueden ser síntomas de hipertensión pulmonar arterial o de melanomas u otros.

[00101] En otro modo de realización de la invención, los medios, métodos y kits descritos, se utilizan para la detección de una disminución de la tasa de trombomodulina asociada a una mutación en el gen de la trombomodulina.

[00102] Otras características y ventajas de la invención aparecen en los siguiente ejemplos, en particular, para ilustrar las variaciones de tasas de trombomodulina ligadas a estados patológicos y en las figuras.

Figura 1: Esquema de la organización estructural de la trombomodulina: EGF=Factor de crecimiento epidérmico (EGF-like). La secuencia de la trombomodulina se describe en el artículo de Weiler H. e Isermann B.H. de 2003 (Journal of Thrombosis y Haemostasis, vol1, páginas 1515-1524).

Figura 2: Esquema de la actividad de la trombomodulina; PC: proteína C; PCa: proteína C activada; Th: trombina; ATIII-Th: complejo antitrombina III-Trombina; EPCR-PC: Receptor endotelial de la proteína C-proteína C; TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina; TAFIa: TAFI activado; TM: Trombomodulina; V: Factor V; Va Factor V activado.

Figura 3: Curva que ilustra la especificidad de la evaluación. (Def TM: Deficiente en TM).

Figura 4: Detección de plasmas patológicos y de plasmas normales.

Figura 5: Curva de calibración de la medición (DDO) de la actividad de la trombomodulina en función de su concentración.

Figura 6: Media de la sensibilidad de la actividad de la trombomodulina, en función de la tasa de la proteína C de la muestra.

Figura 7: Sensibilidad de la muestra a la tasa del factor II.

Figura 8: Sensibilidad de la muestra a la tasa de TAFI.

Figura 9: Estimación de la estabilidad.

Figura 10: Medida de la concentración en fosfolípidos y de la actividad TMa en muestras de plasma de mujeres con gestación normal o sujeta a complicaciones.

Figura 11: actividad de la trombomodulina en relación al infarto de miocardio (IDM)

Figura 12: evolución de la trombomodulina en pacientes que han sufrido un aloinjerto. La actividad TMa se ha ensayado sobre muestras de pacientes cuyo estado evolucionaba con complicaciones, y sobre muestras de pacientes cuyo estado evolucionaba favorablemente.

[00103] Las condiciones de la obtención de estos resultados se describen en los ejemplos

EJEMPLOS

I Método de evaluación

[00104] La evaluación de la actividad funcional de la trombomodulina se realizó, en una muestra de plasma de 70 µl diluida a 1/3, de la siguiente manera:

A) Reactivos suministrados al medio de reacción

[00105]

- 40 µl de trombina 10 NIH(o bien 1,6 NIH finales en el medio) en un tampón de trombina constituido por:

5 NaCl 0,15 mol/l
 Tris 20 mmol/l
 CaCl₂ 2,5 mmol/l
 BSA 5 mg/ml
 10 GPRP.AcOH (Inhibidor de polimerización de la fibrina) 10 g/l, polibreno 10 ml/l

- 30 µl de proteína C purificada a 100 µg/ml recogida en 1 ml de agua destilada
- 110 µl de sustrato sintético de PCa (CBS42.46 de la sociedad Diagnostica Stago a 2,5 µM/ml) recogido en 6 ml de agua destilada / Hirudina a 20 ATU (o bien a una concentración final en el medio de 1,10 µM/ml)

15 B) Activación de la proteína C y evaluación de la PCa

[00106] La muestra de plasma se puso en contacto con la trombina en el tampón de trombina y se incubó a 37 °C con la proteína C, durante aproximadamente 600 s, para activar la proteína C.

20 **[00107]** El medio obtenido se puso en contacto con el sustrato sintético.

[00108] Después, la actividad amidolítica de la PCa se determinó a 37 °C por lectura de la densidad óptica dentro de un periodo de 6 a 500 s, a 405 nm.

25 C) Control de la especificidad de la medición

[00109] La especificidad de la medición de la densidad óptica con respecto a la actividad de la PCa se verificó comparando la actividad obtenida con un grupo de plasmas normales y con un plasma deficiente en TM al que se le añadió TM purificada (disponible, por ejemplo, en American Diagnostica o Haematologic Technologies INC). Los resultados se muestran en la figura 3 y confirman la especificidad de la evaluación.

D) Control de la repetibilidad

35 **[00110]** Las mediciones de repetibilidad se calcularon y los resultados se relacionan en las tablas 1-3.

E) Valores de actividad de la PCa

40 **[00111]** Siguiendo el método de la invención, se evaluaron 43 plasmas normales con respecto a la actividad de la trombomodulina. Las mediciones de densidad óptica y los porcentajes de actividad de la TM correspondientes se relacionan en la tabla 4. Estas mediciones pueden considerarse como indicadoras de los valores normales de la actividad funcional de la trombomodulina.

Tabla 4

Plasmas normales	Normales (n=43)	
	DDO	%
Media	1,281	106
Mediana	1,291	109
Min	1,122	65
Max	1,451	151

45 **[00112]** Se consideró que el 100% de actividad funcional de la TM se define arbitrariamente como la tasa de TM que resulta de la formación de 0,03 µmol/l de PCa cuando las concentraciones de trombina y de PC son de 10 NIH y 100 µg/ml respectivamente, en presencia de 2,5 mmol/l de iones Ca²⁺.

50 **[00113]** Por otra parte, los plasmas obtenidos a partir de las muestras biológicas extraídas de pacientes afectados por las patologías identificadas, se evaluaron también con respecto a la actividad funcional de la TM, según el método de la invención. Las mediciones se realizaron en un analizador STA-R (Diagnostica Stago, Francia) utilizando el ensayo cromogénico con el sustrato sintético indicado anteriormente. Los valores de las Cts intra e inter ensayo son <4% y <5% respectivamente.

[00114] La respuesta al ensayo es lineal entre 0 y 200%. Los resultados en porcentaje de actividad de la TM son los siguientes; diabetes (n=15): 130% ± 28; cánceres (n=10): 155% ±60; septicemia (n=12): 173% ± 56; traumatismo múltiple (n=20): 185% ±62.

5 **[00115]** Estos resultados se ilustran en la figura 4.

II Ejemplo de preparación de una curva de calibración

10 **[00116]** Para establecer la curva de calibración, proporcionando la actividad funcional de la trombomodulina, se utilizó

- bien la dilución de un grupo de plasmas normales en tampón de Owren Koller o uno deficiente en trombomodulina.
- bien la sobrecarga de un plasma deficiente en trombomodulina con trombomodulina purificada.
- 15 - bien definiendo arbitrariamente la tasa del 100% de actividad de trombomodulina como la tasa de trombomodulina que resulta en la formación de 0,03 µl/l de PCa cuando la concentración de trombina es de 10 NIH y la concentración de PC es de 100 µg/ml, en presencia de 2,5 mmol/l de Ca²⁺.

20 **[00117]** Cada dilución de plasmas se ensayó a 1/3 en la configuración

[00118] Se determinó la concentración de TM añadida al grupo de plasmas correspondiente a una actividad del 200%, 150%, 100%, 50%, 25%, 12,5% y 0% de la trombomodulina siguiendo la regla definida anteriormente.

25 **[00119]** La actividad de la trombomodulina se determinó sobre un sustrato sintético de la PCa, el CBS42.46. Se midió la actividad amidolítica de la PCa por la liberación de paranitroanilina (de color amarillo) a una longitud de onda de 405 nm.

30 **[00120]** Se determinó la densidad óptica, que corresponde a cada valor (en porcentaje) de la actividad de la trombomodulina, en una ventana de lectura que varía de 6 a 500 s a una longitud de onda de 405 nm.

[00121] En la figura 5 se representa una curva de calibración.

III Evaluación de la sensibilidad de la dosificación a diferentes proteínas plasmáticas de la coagulación, o a agentes que interfieren con la coagulación.

35 A) Sensibilidad a la heparina

40 **[00122]** La sensibilidad se evaluó añadiendo al plasma evaluado en las condiciones de evaluación descritas anteriormente, concentraciones en aumento de calciparina®.

[00123] La influencia de la calciparina se describe en la siguiente tabla 6 y parece poco determinante sobre la actividad funcional de la TM.

Tabla 6

Sensibilidad a la heparina			
	DDO	%	Recuperación %
Calciparina 0	1,183	119	100
Calciparina 0,4	1,135	107	90
Calciparina 0,8	1,159	113	95
Calciparina 1,0	1,199	123	103
Calciparina 1,4	1,239	133	111
Calciparina 1,8	1,271	141	118
Calciparina 2,0	1,214	127	106

45 B) Sensibilidad a la tasa de proteína C contenida en la muestra de plasma

[00124] Los plasmas que comprenden una concentración variable determinada de proteína C se evaluaron según el método descrito anteriormente.

50 **[00125]** Se trata de:

- Plasma deficiente en proteína C (columna 0);
- Plasmas de un grupo que es más o menos deficiente en proteína C (columnas 12,5-50);
- Plasma de un grupo normal (grupo GK (Georges King)) (columna 100);

5 **[00126]** Los resultados (Tabla 7 y figura 6) muestran que la tasa de PC de la muestra influye poco en el valor de la actividad funcional de la TM.

Tabla 7

Sensibilidad de la muestra a la tasa de proteína C (1)							
Tasa de PC %	0	12,5	25	50	100	150	300
Tasa teórica (%)	110	103	104	106	102	102	102
Tasa medida (%)	110	110	101	107	102	96	96
Recuperación	100	107	97	101	100	94	94
0=Def. PC Clinisys 12,5-50= Grupo/Def PC 100 = Grupo GK 150-300=Grupo/PC purificada							

10 **C) Sensibilidad a la tasa del Factor II contenido en la muestra de plasma**

[00127] Según el método descrito anteriormente, se evaluaron plasmas que comprendían una determinada concentración variable de Factor II.

15 **[00128]** Se trata de :

- Plasma deficiente en Factor II (columna 0)
- Plasmas de un grupo que resultan más o menos deficientes en Factor II (columnas 25-87,5)
- Plasma de un grupo normal (grupo GK) (columna 100)

20 **[00129]** Los resultados (Tabla 8 y figura 7) muestran que la tasa de FII de la muestra tiene poca influencia sobre el valor de la actividad funcional de la TM.

Tabla 8

Tasa de FII (%)	100	87,5	75	50	25	0
Tasa teórica(%)	100	95	90	79	69	58
Tasa medida (%)	100	95	88	76	74	58
Recuperación (%)	100	100	98	96	107	100
0=Def. II GK 25-87,5= Grupo/Def. II 100=Grupo GK						

25 **D) Sensibilidad a la tasa de TAFI contenido en la muestra de plasma**

[00130] Según el método descrito anteriormente, se evaluaron plasmas que comprendían una concentración variable determinada de TAFI.

30 **[00131]** Se trata de:

- Plasma deficiente en TAFI;
- Plasmas de un grupo que resultan más o menos deficientes en TAFI;
- Plasma de un grupo normal (grupo GK);

35 **[00132]** Los resultados (Tabla 9 y figura 8) muestran que la tasa de TAFI de la muestra tiene poca influencia sobre el valor de la actividad funcional de la TM.

Tabla 9

Sensibilidad de la muestra a la tasa de TAFI (1)							
Muestras		Grupo+ TAFI10	Grupo+ TAFI20	Grupo+ TAFI 30	Grupo	Grupo ½ def. en TAFI	Def.en TAFI
Con CPI	DDO	1,102	1,097	1,079	1,144	1,077	0,980
	%	95	94	89	103	85	59
Sin CPI	DDO	1,112	1,094	1,097	1,124	1,062	0,964
	%	98	93	94	97	81	55
Δ		-3	1	-5	5	4	4

E) Estimación de la estabilidad

- 5 **[00133]** La evaluación de la actividad funcional de la TM se reprodujo en el tiempo para estimar la estabilidad de la reacción. La evaluación realizada a intervalos de 4 h sobre una misma muestra mostró valores adecuadamente estables (Tabla 10 y figura 9).

Tabla 10

	T=0		T=4h		Desviación Relativa %
	DDO	%	DDO	%	
Grupo Stago	1,195	101	1,216	106	5
PIN 725-17	1,220	107	1,274	121	13

- 10 **[00134]** PIN 725-17 es un plasma normal suministrado por la sociedad Manchester y correspondiente al lote 725-17

F) Zonas de lectura

- 15 **[00135]** La zona de lectura de las densidades ópticas se modificó para leer en una ventana de 6-500 s y, después, en una ventana de 6-200 s.

[00136] Los resultados obtenidos de los diferentes plasmas eran sensiblemente equivalentes (Tabla 11)

IV Correlación entre un aumento de la actividad de la trombomodulina y la pérdida prematura de fetos en gestantes.

- 20 **[00137]** La pérdida prematura de fetos es un grave problema clínico que no siempre puede explicarse o detectarse adecuadamente. Además de las causas anatómicas, cromosómicas o problemas hormonales, hasta ahora, el síndrome antifosfolípido (APS en inglés) es la única causa común que puede diagnosticarse. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el aborto espontáneo es la hipoxia debida a trombosis utero-placentaria. La actividad de la trombomodulina puede ser un marcador importante para esta trombosis. Un ensayo, según la invención, de la actividad de la trombomodulina, basado en su capacidad para promover la activación de la proteína C por la trombina, se aplicó en un estudio de control en pacientes que habían sufrido un aborto espontáneo. Se compararon los resultados obtenidos de muestras de sangre recogidas durante el primer trimestre de gestación en pacientes (N=35) sin historial de trombosis y que habían sufrido un aborto espontáneo precoz (no ligado al APS) con los resultados obtenidos de muestras obtenidas durante el primer trimestre de gestación en mujeres de un grupo de edad similar con una gestación normal (N=37) y con pacientes normales no gestantes (N=32). Las muestras de sangre se recogieron en el grupo de pacientes inmediatamente después del aborto espontáneo. Todas las muestras de sangre (1:10 en 109 MN de citrato) se agitaron dos veces y el plasma de congeló a -80 °C hasta el ensayo para ensayar el aPTT y para determinar la actividad de la trombomodulina (Diagnostica Stago, Francia). No se observó ninguna modificación en los tiempos de la aPTT. Los valores medios del ensayo de la actividad de trombomodulina fueron $106 \pm 12\%$ para el control frente a $120 \pm 10\%$ para las gestantes normales y $158 \pm 14\%$ para los abortos naturales (p inferior a 0,001). Aunque sean necesarios estudios complementarios para determinar la capacidad y la especificidad de este ensayo, la determinación de este parámetro puede ser una herramienta útil para ayudar a detectar mujeres con riesgo de aborto espontáneo. La actividad de la trombomodulina aparece como un marcador predictivo precoz interesante de la complicación hipertensiva de la gestación que, en una mujer de riesgo, puede permitir la intervención farmacéutica destinada a prevenir las manifestaciones clínicas más graves.
- 25
- 30
- 35
- 40

Tabla 11

	Muestra normal n=32	Gestación normal n= 37	Aborto espontáneo n=35
TM (Actividad)	106 65-139	120 69-152	158 77-279
aPTT	34,7 29,4-39,6	33,9 29,5-40,4	32,7 28,6-37,3

V Correlación entre la actividad de la trombomodulina y las complicaciones de la gestación

- 5 **[00138]** Las situaciones de complicación durante la gestación implican la actividad de linfocitos citolíticos (NK, natural killer) y la trombosis utero-placentaria.
- [00139]** Los fosfolípidos procoagulantes (PPL) pueden modular el papel de la actividad de los linfocitos citolíticos, NK, y, en el caso de daños vasculares, la TMa aumenta.
- 10 **[00140]** Las mediciones de la concentración de los PPL utilizando un ensayo de coagulación basado en el factor Xa (XaCT-Xa Tiempo de coagulación) y la medición de la actividad de la TMa pueden presentar un interés ya que estos ensayos son marcadores predictivos para la detección de mujeres susceptibles de tener una complicación durante la gestación.
- 15 **[00141]** Se ensayaron muestras de sangre obtenidas de mujeres (35), sin historial de trombosis, que habían tenido complicaciones durante la gestación (no ligadas al síndrome antifosfolipídico), de mujeres (37) de un mismo grupo de edad con una gestación normal y de mujeres (32) sin patología identificada y no gestantes. Las muestras se trataron para recoger el plasma que se conservó a -80 °C antes de realizar el ensayo.
- 20 **[00142]** Los PPL se midieron en un ensayo XaCT. Un tiempo de coagulación corto refleja una elevación de la concentración de PPL. La actividad de la TMa se midió en un ensayo cromogénico basado en la capacidad de promover la activación de la proteína C (como se ha descrito anteriormente).
- 25 **[00143]** La comparación de los resultados obtenidos (Figura 10) sobre los 3 tipos de muestras muestra: 1) para los ensayos XaCT: medias de $35,2 \pm 11,8$ s; $50,6 \pm 8,6$ s y $55,5 \pm 9,2$ s respectivamente para las pacientes con complicaciones durante la gestación, gestación normal, y controles ($p < 0,001$); 2) para los ensayos de actividad de la TMa: medias de $169 \% \pm 24$, $119 \% \pm 16$ y $106 \% \pm 16$ respectivamente para gestantes con complicaciones, gestación normal y controles ($p < 0,05$).
- 30 **[00144]** Parece entonces que tanto los ensayos de XaCT como los de TMa tienen interés como marcadores predictivos para la detección de mujeres con riesgo de complicación durante su gestación.

VI - Correlación entre un aumento de la actividad de la trombomodulina y el infarto de miocardio

- 35 **[00145]** La medición de la actividad de la trombomodulina se realizó en un grupo de plasmas normales y en una muestra de plasma extraída de un paciente vivo que sufrió un infarto de miocardio (IDM) y en una muestra de plasma extraída de un paciente que murió después de un IDM.
- [00146]** La medición se efectuó en las condiciones descritas anteriormente en el punto I.
- 40 **[00147]** Los resultados mostraron un aumento sensible de la actividad de la trombomodulina en el caso de IDM.

	TM %
Normal	95
Paciente vivo tras IDM	155
Paciente muerto tras IDM	209

VII- Correlación entre la actividad de la trombomodulina y el alotrasplante de médula

5 **[00148]** La actividad de la trombomodulina se midió en muestras de plasma extraídas de pacientes (niños) que se habían sometido a un alotrasplante de médula.

[00149] Después del trasplante, el nivel de actividad de la TM varía según el estado de extracción de la muestra tras el trasplante. Se observa una diferencia en la evolución de la actividad de la TM, según que el trasplante evolucione con complicaciones o, por el contrario, tenga una evolución favorable.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método de medición *in vitro* de la actividad funcional de la trombomodulina, comprendiendo dicho método evaluar, en un medio biológico, a partir de una muestra biológica, la activación de la proteína C en proteína C activada (PCa) por la trombina en presencia de su cofactor, dicha trombomodulina, comprendiendo dicho método la adición, al plasma de la muestra, de agentes necesarios para la activación del sistema de la proteína C, la adición de proteína C purificada y también la adición de un inhibidor de la polimerización de la fibrina.
- 10 2.- El método de medición *in vitro* de la actividad funcional de la trombomodulina según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la trombomodulina evaluada es la trombomodulina plasmática, siendo la muestra biológica una muestra de plasma, realizándose la evaluación en un medio plasmático.
- 15 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que**, para activar el sistema de la proteína C, se añade trombina e iones de calcio.
- 20 4.- El método según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la actividad de la proteína C activada se determina usando un sustrato enzimático.
- 25 5.- El método según la reivindicación 4, **caracterizado por que** se evalúa:
 - la actividad amidolítica de la proteína C activada, usando un sustrato cromogénico o fluorométrico de la PCa, o
 - una proteína plasmática de la coagulación cuya inhibición depende de la PCa, por ejemplo el factor Va, el factor VIIa, o
 - el TAFIa o un sustrato del TAFIa.
- 30 6.- El método según la reivindicación 5, **caracterizado por que**, cuando se mide la actividad amidolítica de la proteína C activada, se evalúa la liberación de la paranitroanilina mediante el sustrato sintético CBS 42.46.
- 35 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende las etapas de:
 a) poner en contacto una muestra de plasma con un reactivo 1 que comprende trombina, contenida en un medio que permite la activación del sistema de la proteína C, que comprende, en particular, iones de calcio, comprendiendo adicionalmente el reactivo 1 un inhibidor de la polimerización de la fibrina;
 b) incubar el medio constituido en la etapa a) con un reactivo 2, que comprende la proteína C purificada, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su activación en PCa por la trombina que forma un complejo con su cofactor, la trombomodulina contenida en la muestra de plasma;
 c) poner en contacto el medio constituido en la etapa b) que comprende la proteína C activada, con un sustrato enzimático de la PCa;
 d) detectar la transformación del sustrato de la PCa y;
 e) opcionalmente, evaluar adicionalmente un control interno.
- 40 8.- El método según una de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizado por que** la muestra de plasma está diluida, por ejemplo, diluida a 1/3.
- 45 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** el inhibidor de la polimerización de la fibrina es un inhibidor polipeptídico, por ejemplo el H-GlyProArgPro-OH.AcOH (GPRP.AcOH) o es un anticuerpo antifibrinógeno.
- 50 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** el tampón de trombina comprende esencialmente los siguientes compuestos:
 NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y,
 cuando la muestra de plasma es característica de un paciente tratado con heparina, un inhibidor de heparina, por ejemplo polibreno (10 g/l).
- 55 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado por que** el sustrato enzimático de la proteína C activada es el oligopéptido THC-Pro-Arg-pNA.
- 60 12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 **caracterizado por que** la reacción se efectúa en las siguientes condiciones:
 - para la etapa a), se ponen en contacto 70 µl de la muestra de plasma diluida a 1/3, con 40 µl de trombina 10 NIH diluida en un tampón que contiene NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y en presencia del inhibidor de la polimerización de la fibrina, por ejemplo GPRP.AcOH (10 g/l) y, cuando la muestra de plasma procede de un paciente tratado con heparina, un inhibidor de heparina, por ejemplo
- 65

polibreno (10 g/l);

- para la etapa b) se incubaron 30 µl de proteína C durante 600 s con el medio constituido en la etapa a);
- para la etapa c) 110 µl de sustrato enzimático de la proteína C activada, determinándose la cantidad de sustrato enzimático transformado leyendo la densidad óptica dentro de un periodo de 6 a 500 s, a una longitud de onda de 405 nm.

13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado por que** la medición cuantitativa de la transformación del sustrato enzimático de la PCa se realiza leyendo la densidad óptica y los valores de densidad óptica obtenidos se comparan con una curva de calibración.

14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, **caracterizado por que** el reactivo 1 es la trombina contenida en un plasma deficiente en trombomodulina, al cual se añade un inhibidor de polimerización de fibrina y, cuando el plasma ensayado es característico de un paciente tratado con un anticoagulante, un inhibidor de dicho anticoagulante.

15.- Un kit para medir la actividad funcional de la trombomodulina en un medio biológico, especialmente un medio plasmático, que comprende:

- un reactivo 1 que comprende trombina diluida en un tampón que comprende un inhibidor de la polimerización de la fibrina y calcio;
- un reactivo 2 que comprende la proteína C purificada;
- y si fuera apropiado, un reactivo 3 que comprende un sustrato enzimático de la proteína C activada y, opcionalmente
- un control interno y, opcionalmente
- una curva de calibración de la actividad funcional de la trombomodulina

16.- Un kit según la reivindicación 15, **caracterizado por que** el reactivo 1 comprende esencialmente los siguientes compuestos:

NaCl (0,15 mmol/l), Tris (20 mmol/l), CaCl₂ (2,5 mmol/l), BSA (5 mg/ml) y, cuando la muestra de plasma procede de un paciente tratado con heparina, un inhibidor de heparina, por ejemplo, polibreno (10 g/l) y un inhibidor de la polimerización de la fibrina, por ejemplo GPRP.AcOH utilizado a una concentración de 1 a 15 g/l.

17.- Un kit para medir la actividad funcional de la trombomodulina, en un medio biológico, especialmente un medio plasmático, que comprende:

- un reactivo 1 que comprende la trombina diluida en un tampón que comprende un inhibidor de la polimerización de la fibrina y calcio;
- un reactivo 2 que comprende TAFI y, si fuera apropiado
- un reactivo 3 que comprende un sustrato de TAFIa y, opcionalmente
- un control interno, y opcionalmente
- una curva de calibración de la actividad funcional de la trombomodulina.

18.- Un método para la detección *in vitro* de una anomalía de coagulación, que comprende medir la actividad funcional de la trombomodulina plasmática según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14.

19.- El método según la reivindicación 18, que comprende comparar el nivel de actividad funcional medido de la trombomodulina, con un valor normal de dicha actividad obtenido después de evaluar la actividad funcional de la trombomodulina de un grupo de muestras de plasma normales, o establecido a partir de valores de la actividad funcional de la trombomodulina medidos en muestras de plasma normales evaluadas individualmente.

20.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 18-19, o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para la detección de:

- un aumento de la tasa de trombomodulina asociado a síntomas de coagulación intravascular diseminada (CIVD), diabetes, leucemia mieloide crónica, insuficiencia hepática y renal, preeclampsia, púrpura trombótica trombocitopénica, rickettsiosis, enfermedad de Behcet, homocistinuria, aborto espontáneo, o
- una disminución de la tasa de trombomodulina asociada a síntomas de hipertensión arterial pulmonar o de melanomas, o
- una disminución de la tasa de trombomodulina asociada a una mutación en el gen de la trombomodulina.

FIGURA 1

Figura 1: Estructura de la Trombomodulina

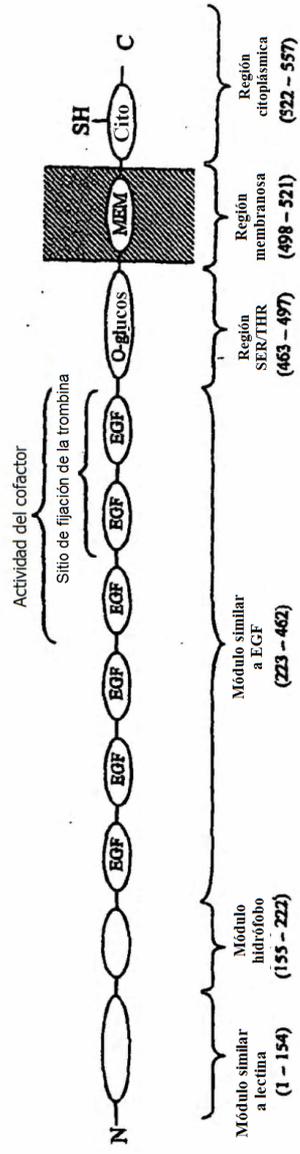


FIGURA 2

Figura 2: Actividad de la trombomodulina

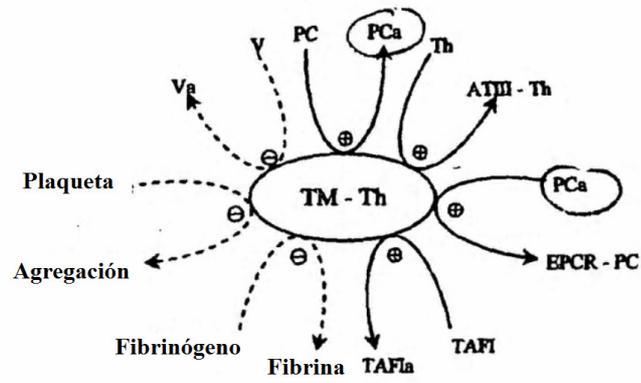


FIGURA 3

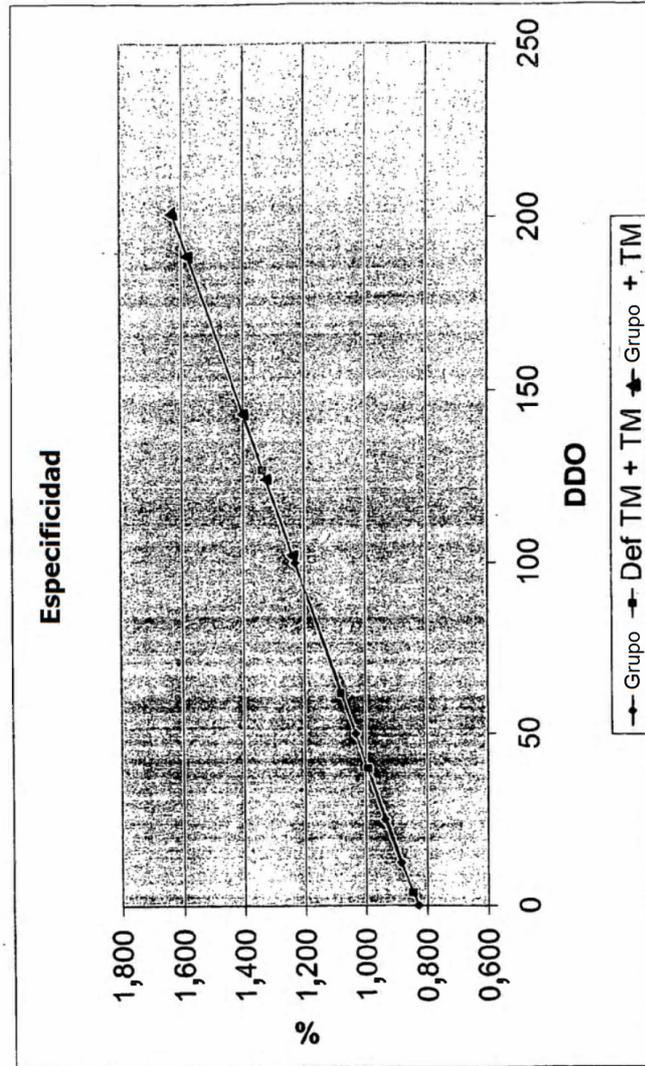


FIGURA 4
Enfermedades del plasma

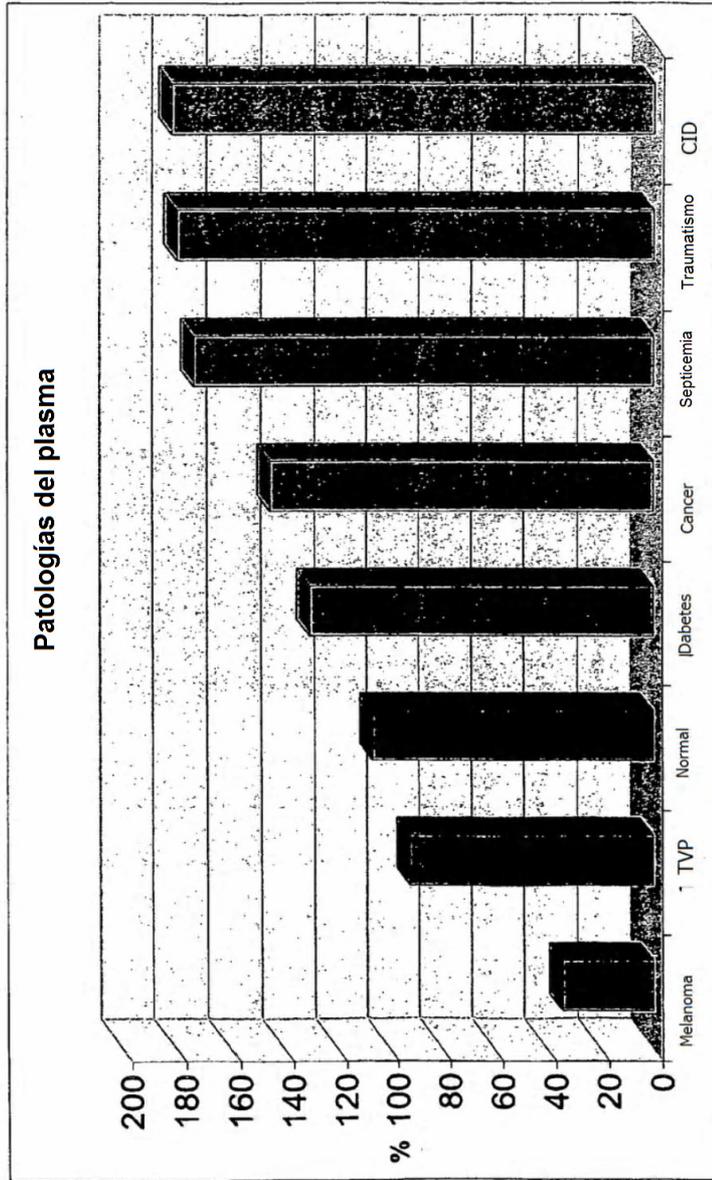
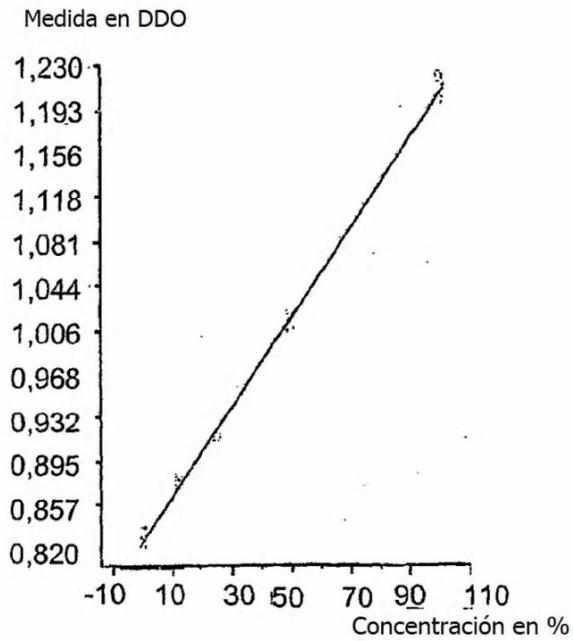


FIGURA 5

Calibración nº1



$$C = (280,0886 \cdot d) - 214,4718$$

$$r = + 0,999$$

ID	Nombre de producto	Lote
Ra Trombina	Tampón / Trombina	15/03/2006
Rb PC	Proteína C	15/03/2006
Rc		
Rd Sus	Sustrato	15/03/2006

FIGURA 6
Sensibilidad de la muestra
a la tasa de proteína C

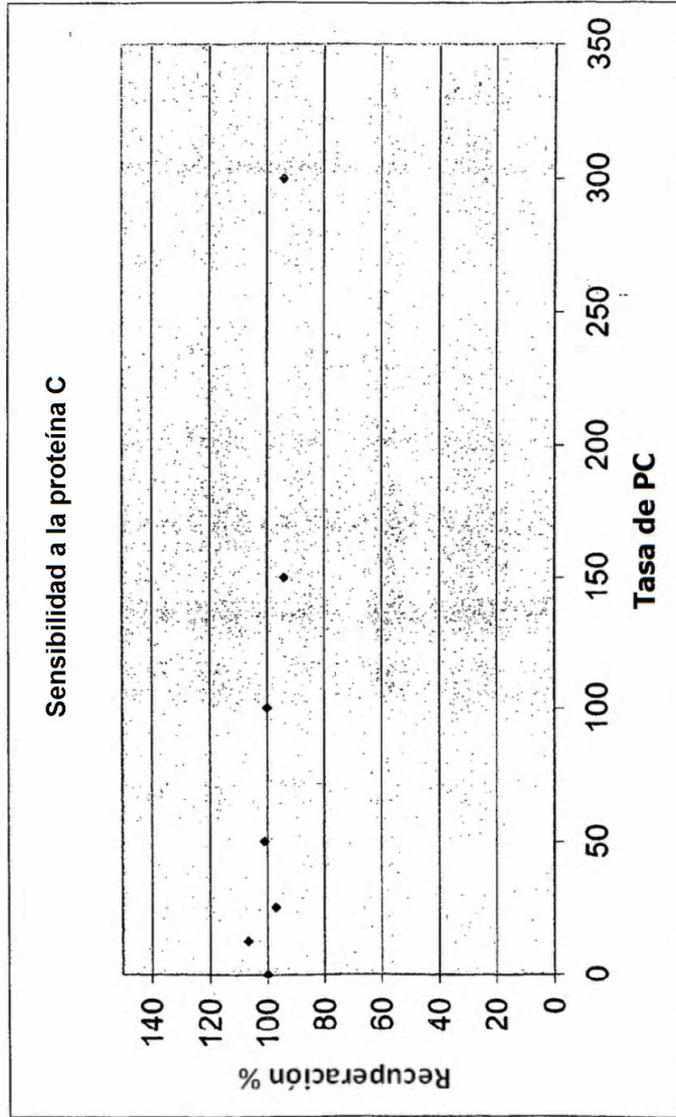


FIGURA 7
Sensibilidad de la muestra a la
tasa de factor II

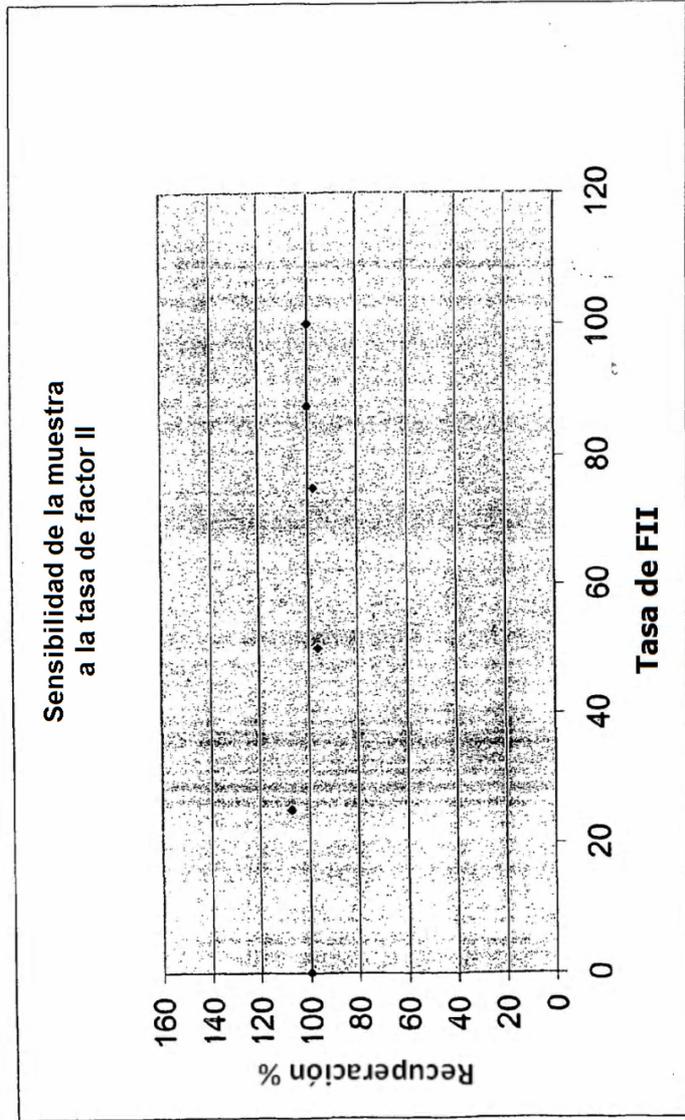


FIGURA 8
Sensibilidad de la muestra
a la tasa del TAFI

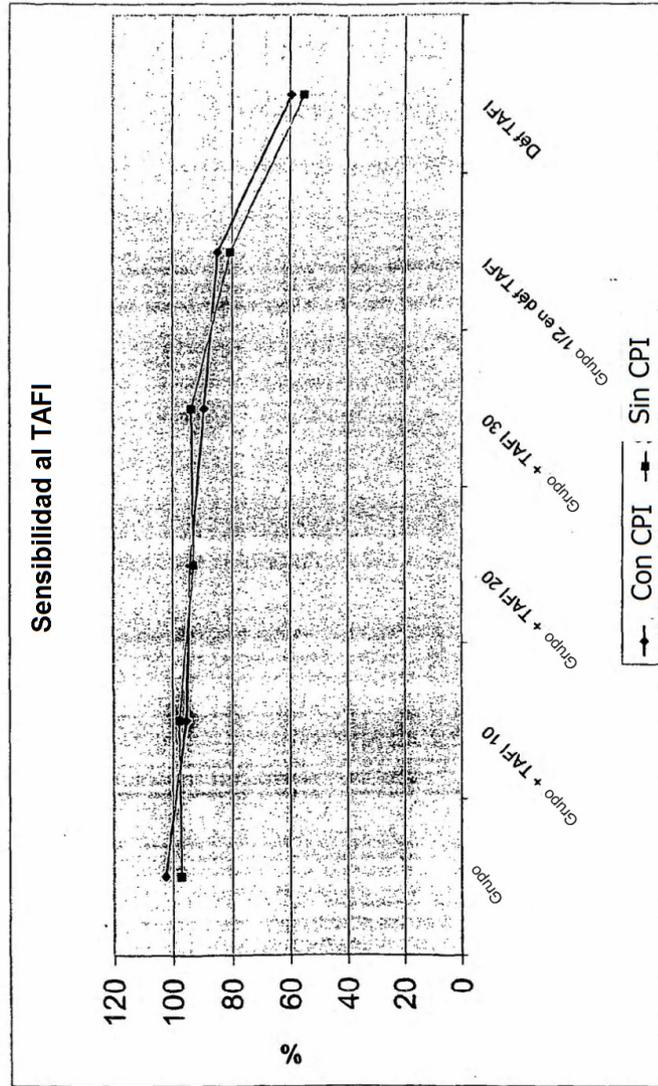


FIGURA 9
Estimación de la estabilidad

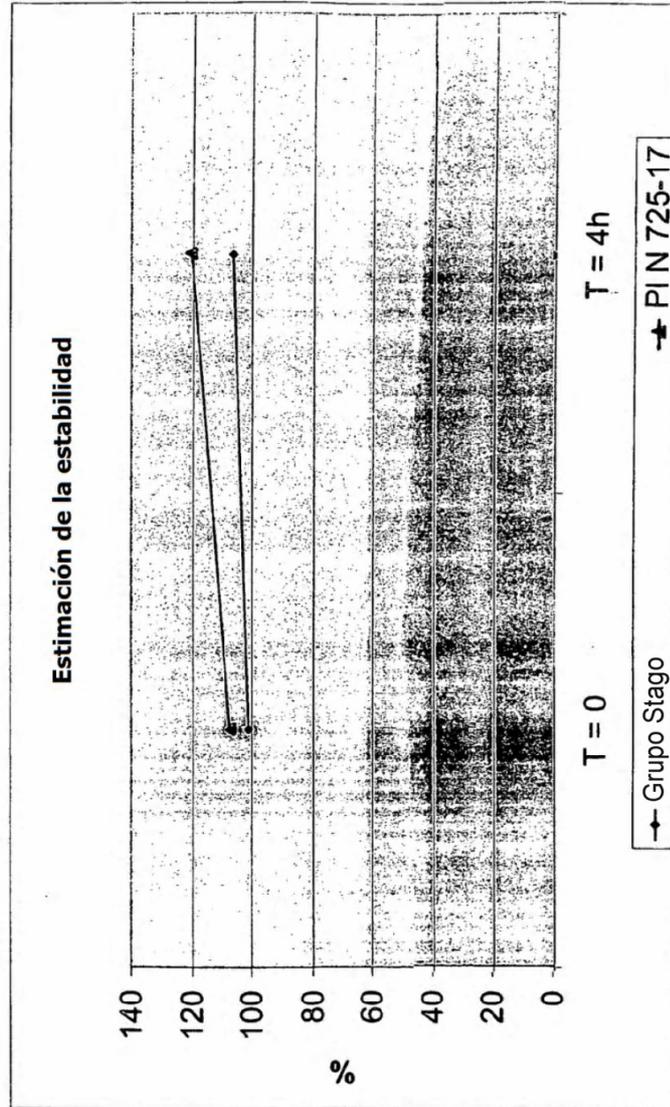
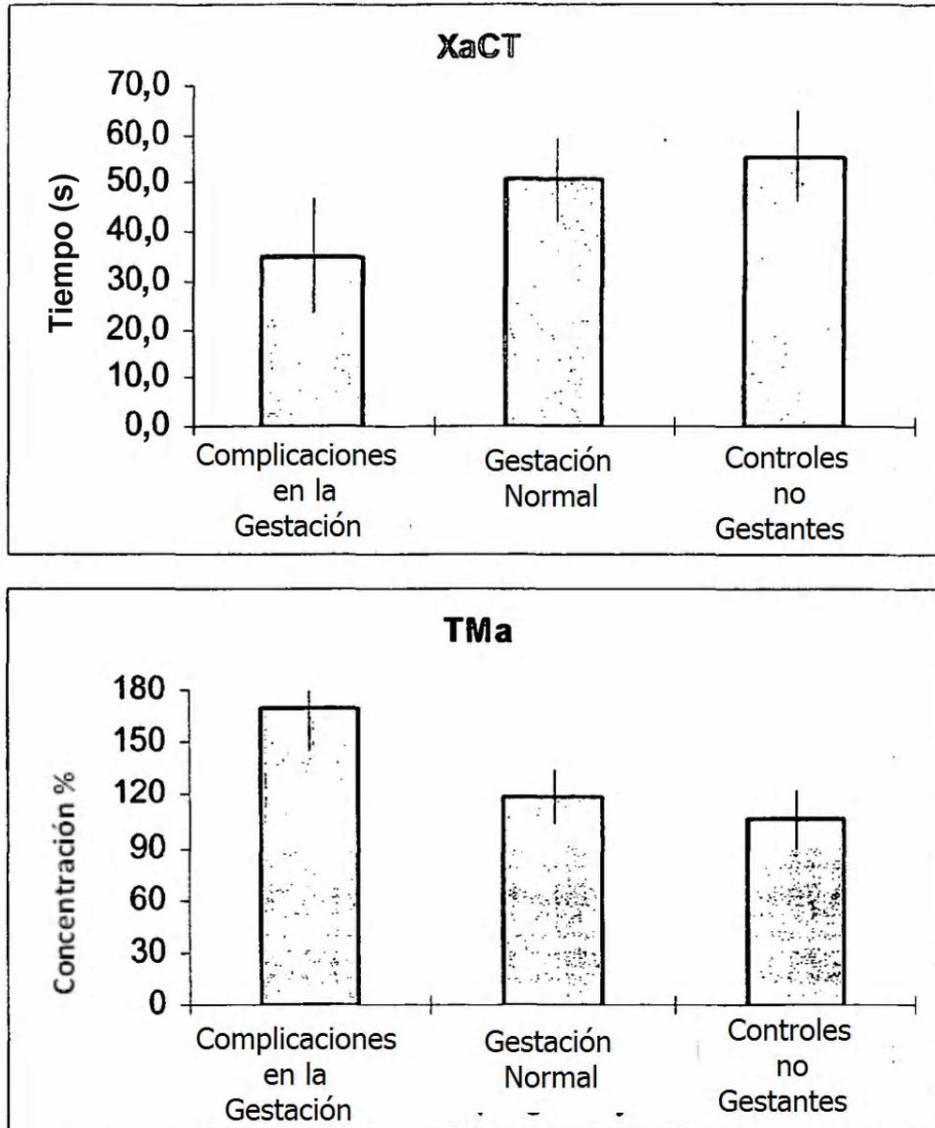


FIGURA 10

Resultados



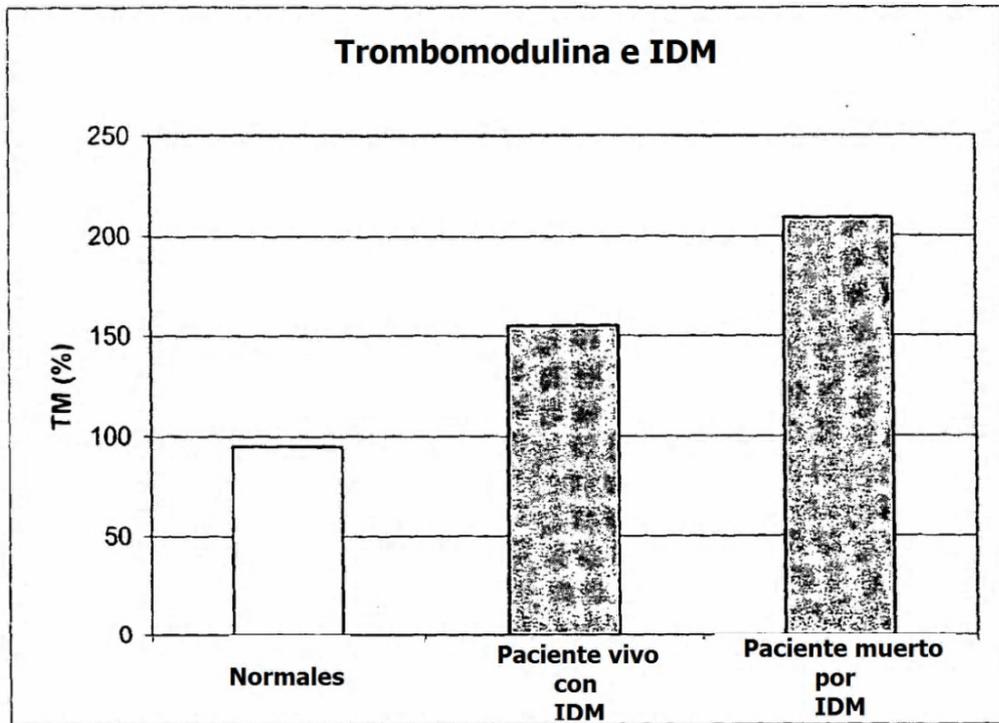


FIGURA 11

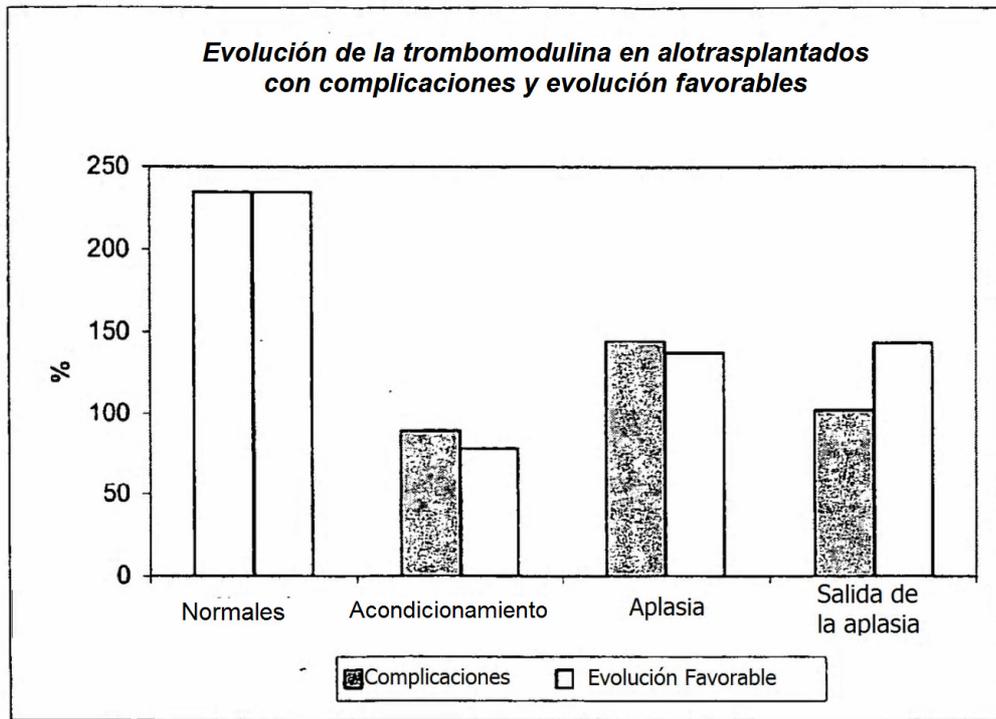


FIGURA 12