



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 043**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06745768 .9**
96 Fecha de presentación : **27.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1887358**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **Procedimiento para analizar inmunológicamente el producto de la degradación con plasmina de la fibrina estabilizada.**

30 Prioridad: **28.04.2005 JP 2005-132444**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

73 Titular/es: **mitsubishi chemical medience
CORPORATION
2-8, Shibaura 4-chome
Minato-ku, Tokyo 108-8559, JP**

72 Inventor/es: **Matsuya, Takeshi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 043 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

Procedimiento para analizar inmunológicamente el producto de la degradación con plasmina de la fibrina estabilizada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar inmunológicamente los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, en particular un ensayo muy sensible para los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada mediante quimioluminiscencia.

10 El término "análisis", tal como se emplea en la presente, incluye la detección para determinar la presencia o la ausencia de una sustancia que se va a analizar, y la medición para determinar cuantitativa o semicuantitativamente una cantidad o una actividad de una sustancia que se va a analizar.

Antecedentes de la técnica

15 Los productos digeridos de la fibrina estabilizada humana con diversas proteasas son útiles como marcadores de diagnóstico en la diagnosis clínica. Por ejemplo, los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada humana, que incluyen p-DD/E como unidad básica, y sus polímeros u oligómeros (denominados en lo sucesivo a veces en la presente dímero D-D o complejo DD/E), tienen un uso extendido como marcadores de diagnóstico de la coagulación intravascular diseminada (DIC). En la determinación de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada en una muestra biológica, en general se emplea una aglutinación de látex sensibilizado con un anticuerpo monoclonal específico para los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada.

20 Es necesario en la actualidad prestar atención a la trombosis de venas profundas (DVT). En Japón, la DVT no tiene una fuerte incidencia pero el número de pacientes que la sufren está aumentando a medida que el estilo de vida japonés se va occidentalizando. Un diagnóstico o una predicción de la trombosis, o la presencia de trombos, es muy difícil, pero los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada son el marcador más fiable para un diagnóstico de DVT (referencias que no son patentes 1 y 2). La fibrina estabilizada, que se genera mediante la reticulación de la fibrina durante el proceso de la coagulación, se digiere con plasmina para producir polímeros u oligómeros p-DD/E compuestos de una unidad básica de p-DD/E, o p-DD/E. Por tanto, la formación de trombos y la fibrinólisis secundaria puede controlarse detectando p-DD/E o sus polímeros u oligómeros. La medición de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada es muy útil para confirmar la presencia de trombos.

25 La embolia pulmonar (PE), conocida como el síndrome de la clase turista, he empezado a destacar. Se considera que la PE se desarrolla debido al bloqueo del flujo sanguíneo con trombos de venas profundas que viajan a través de la vena cava inferior y corazón hasta alcanzar una arteria pulmonar. Existe un informe que indica que la medición de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada es útil para evaluar pacientes que padecen PE, así como los que padecen DVT (referencias que no son patentes 3 y 4).

30 Se conoce el anticuerpo monoclonal JIF-23 por ser un anticuerpo monoclonal capaz de detectar de modo específico los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada (referencia que no es una patente 5). Se sabe que este anticuerpo reconoce la estructura N-terminal recién expuesta en el dominio D₁ después de liberar la secuencia N-terminal, que consiste en los aminoácidos 63-85 de la cadena γ del dominio D_{1A} en los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. La formación de trombos y la fibrinólisis secundaria pueden controlarse con facilidad mediante un procedimiento de medición capaz de analizar de modo específico los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada contenidos en una muestra biológica, utilizando el anticuerpo JIF-23. Este procedimiento de medición no está particularmente limitado pero puede ser, por ejemplo, un procedimiento de aglutinación de látex o un procedimiento ELISA.

35 El procedimiento de aglutinación de látex es conocido en el campo clínico por ser un procedimiento convencional de uso habitual para medir los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando el anticuerpo JIF-23. La cantidad de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada es de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ FEU en personas sanas, según la referencia que no es una patente 6, y de $15,2 \pm 18,5 \mu\text{g/ml}$ en pacientes que padecen DIC, según la referencia que no es una patente 7. Los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada pueden detectarse con la reacción de aglutinación de látex utilizando el anticuerpo JIF-23 (sensibilidad de la detección = aproximadamente 45 ng/ml) y, de hecho, este procedimiento se emplea habitualmente en el campo clínico. El valor de corte clínico para la DVT es de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ FEU, según la referencia que no es una patente 8. El diagnóstico de la DVT requiere controlar los pequeños cambios entre los valores para personas normales y para pacientes en comparación con el diagnóstico de DIC y, por tanto, se desea un procedimiento de medición más sensible capaz de ensayar de modo preciso los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada en el intervalo normal.

Como procedimiento ELISA que emplea un anticuerpo que reconoce un neoantígeno en el dominio D de los

5 productos digeridos de la fibrina estabilizada se conoce, por ejemplo, MiniVidas (Biomerieux) (referencias que no son patentes 8 y 11). En la referencia que no es una patente 9 se indica que la sensibilidad en un procedimiento ELISA es mayor que en una aglutinación de látex y, por tanto, el procedimiento ELISA es útil para el diagnóstico de la DVT. Este procedimiento ELISA con una alta sensibilidad se está extendiendo al campo clínico como un procedimiento para medir los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. Por ejemplo, la sensibilidad de detección del MiniVidas es de aproximadamente 45 ng/ml FEU. Los valores y las unidades descritas anteriormente se basan en las descripciones de las referencias que no son patentes, y las unidades "µg/ml FEU" y "µg/ml" pueden interconvertirse según la siguiente ecuación:

$$1 \mu\text{g/ml} = 2 \mu\text{g/ml FEU}$$

10 en la que el valor "2" es un valor aproximado (referencia que no es una patente 10).

Referencia que no es una patente 1: Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 1994, vol. 71, pp. 1-6.

Referencia que no es una patente 2: Quality Journal of Medicine, Reino Unido, 1997, vol. 90, pp. 437-442.

Referencia que no es una patente 3: Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 1999, vol. 81, pp. 493-497.

Referencia que no es una patente 4: Thrombosis and Haemostasis, Alemania, 2000, vol. 83, pp. 191-198.

15 Referencia que no es una patente 5: Excepta Medica, Amsterdam, Países Bajos, 1990, pp. 43-48.

Referencia que no es una patente 6: U.K. National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation, informe sobre el estudio 142, Reino Unido, mayo de 2004.

Referencia que no es una patente 7: ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, Francia, 1988, vol. 46, pp. 730-733.

20 Referencia que no es una patente 8: Biomerieux Vidas D-Dimer Package Insert, EEUU, septiembre de 2003, 008120-4.

Referencia que no es una patente 9: Annals of Internal Medicine, EEUU, 2004, pp. 589-602.

Referencia que no es una patente 10: Journal of Thrombosis and Haemostasis, Reino Unido, 2005, pp. 377-384.

Referencia que no es una patente 11: British Journal of Haematology, Reino Unido, 2004, pp. 15-25.

25 En Pfitzner et al. (1997), Thrombosis and Haemostasis, vol. 78, pp. 1069-1078, se describen combinaciones de anticuerpos monoclonales para la investigación de los productos de la degradación de la fibrina. Por ejemplo, el anticuerpo JIF-23 se emplea en combinación con otros anticuerpos pero ninguno de los cuales se une a un neoantígeno en el dominio E de la fibrina estabilizada digerida con plasmina.

Descripción de la invención

Problemas que resuelve la invención

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un ensayo más sensible para los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. Este ensayo, con una sensibilidad mayor que los ensayos muy sensibles convencionales, permite una reducción en el tiempo de medición.

Medios para resolver los problemas

35 El objeto puede resolverse mediante la presente invención, es decir, un procedimiento para analizar inmunológicamente los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, que se caracteriza por utilizar una combinación de:

(a) un anticuerpo monoclonal que no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y

40 (b) un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio diferente al reconocido por el anticuerpo monoclonal (a), y que reacciona de modo específico con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada,

en el que uno de los anticuerpos monoclonales (a) y (b) es portado por una partícula magnética, y el otro está marcado con una enzima, y se emplea un sustrato quimioluminiscente como sustrato para la enzima, y

el anticuerpo monoclonal (b) no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende:

- 5 (1) poner en contacto una muestra sospechosa de contener los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada con los anticuerpos monoclonales (a) y (b);
- (2) separar un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que forma un inmunocomplejo, a través de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, siendo portado el anticuerpo monoclonal por una partícula magnética, de un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que no forma el inmunocomplejo;
- 10 (3) añadir un sustrato quimioluminiscente al inmunocomplejo separado del anticuerpo monoclonal portado por una partícula magnética/productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada/anticuerpo monoclonal marcado con una enzima, para provocar la emisión de luz quimioluminiscente; y
- (4) analizar la señal quimioluminiscente generada.

Según otra realización preferida, el sustrato quimioluminiscente es 1,2-dioxetano.

- 15 Según otra realización preferida, la enzima marcador es la fosfatasa alcalina.

La presente invención se refiere a un kit para analizar inmunológicamente los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, que se caracteriza porque comprende:

- 20 (a) un anticuerpo monoclonal que no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y
- (b) un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio diferente al reconocido por el anticuerpo monoclonal (a), y que reacciona de modo específico con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, en el que el anticuerpo monoclonal (b) no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la
- 25 digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y

(c) un sustrato quimioluminiscente,

en el que uno de los anticuerpos monoclonales (a) y (b) es portado por una partícula magnética, y el otro está marcado con una enzima cuyo sustrato es el sustrato quimioluminiscente.

- 30 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar (o diagnosticar) la trombosis de venas profundas y/o la embolia pulmonar, que se caracteriza por analizar los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada contenidos en una muestra, mediante el procedimiento de análisis inmunológico o mediante el kit de análisis inmunológico.

Efectos de la invención

- 35 Según el ensayo inmunológico de la presente invención, puede realizarse un análisis sensible y específico de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. La presente invención puede aplicarse al diagnóstico de la DVT y/o de la embolia pulmonar, así como a DIC.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de medir una serie diluida de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando dos sistemas de medición, es decir, una realización del procedimiento de la presente invención que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 36-1 marcado con fosfatasa alcalina (círculos negros), y un procedimiento para la comparación que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo JIF-23 marcado con fosfatasa alcalina (círculos blancos).
- 40

- La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de medir una serie diluida de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando tres realizaciones del procedimiento de la presente invención, es decir, una realización que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 36-1 marcado con fosfatasa alcalina (círculos negros), una realización que emplea una
- 45

combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo n° 1-1 marcado con fosfatasa alcalina (cuadrados blancos), y una realización que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo n° 5-4 marcado con fosfatasa alcalina (triángulos blancos).

Mejor modo de realizar la invención

5 La expresión “productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada”, tal como se emplea en la presente, significa los productos digeridos que se generan digiriendo la fibrina estabilizada con plasmina, y están sustancialmente compuestos por una o una pluralidad de unidades básicas de p-DD/E. Los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada incluyen p-DD/E como la anterior unidad básica, y polímeros u oligómeros de p-DD/E que consisten en una pluralidad de unidades básicas. Los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada a veces se denominan, por ejemplo, dímero D-D o complejo DD/E.

En la presente memoria descriptiva, un producto de la digestión generado por la digestión con plasmina a veces se indica colocando el símbolo “p-“ delante del producto. De modo similar, un producto de la digestión generado por la digestión con la elastasa de granulocitos a veces se indica colocando el símbolo “e-“ delante del producto.

15 En la presente invención, que incluye el procedimiento de análisis inmunológico (es decir, el ensayo inmunológico) de la presente invención y el kit de análisis inmunológico de la presente invención, se emplean dos anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen epitopos diferentes como anticuerpos monoclonales. El término “anticuerpo”, tal como se emplea en la presente, significa no sólo la longitud completa del anticuerpo, sino también un fragmento del anticuerpo. Como fragmento del anticuerpo pueden mencionarse, por ejemplo, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv. Un anticuerpo para detectar de modo específico los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada humana en un inmunoensayo de “sandwich” no debería formar un inmunocomplejo de “sandwich” con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí debe reaccionar, como epitopo, con un sitio (es decir, un neoantígeno) recién expuesto en los productos digeridos por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, para formar un inmunocomplejo de “sandwich”.

25 En la presente memoria descriptiva, se emplea un anticuerpo monoclonal que no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, como el primer anticuerpo monoclonal (denominado en lo sucesivo a veces en la presente anticuerpo anti-neoantígeno del dominio D), y se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio diferente al reconocido por el primer anticuerpo monoclonal y que reacciona de modo específico con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, como el segundo anticuerpo monoclonal.

30 El primer anticuerpo (es decir, el anticuerpo anti-neoantígeno del dominio D) utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, con la condición de que sea un anticuerpo monoclonal que reconozca un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada. Como primer anticuerpo, por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo monoclonal que reconoce un neoantígeno recién expuesto en el dominio D cuando un fragmento que consiste en los aminoácidos 63-85 de la cadena γ se libera de la cadena γ por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, tal como el anticuerpo monoclonal JIF-23.

35 El anticuerpo JIF-23 es un anticuerpo monoclonal muy conocido que puede utilizarse para detectar de modo específico los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada (por ejemplo, Matsuda, M., Terukina, S., Yamazumi, K., Maekawa, H., Soe, G., A monoclonal antibody that recognizes the NH₂-terminal conformation of fragment D, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1990, 43-38). El anticuerpo JIF-23 reacciona no sólo con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, sino también con los productos digeridos con elastasa de granulocitos de la fibrina estabilizada (es decir, e-DD/E como unidad básica, y sus polímeros u oligómeros). Debido a que p-DD/E, como unidad básica de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, contiene dos epitopos del anticuerpo JIF-23, los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada pueden ser detectados de modo específico utilizando sólo el anticuerpo JIF-23, y en el campo clínico tiene un uso extendido un reactivo de látex para medir los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando el anticuerpo JIF-23.

40 En la presente memoria descriptiva, el segundo anticuerpo que reconoce un sitio diferente al reconocido por el primer anticuerpo, tal como el anticuerpo JIF-23, se utiliza junto con el primer anticuerpo para construir un sistema para detectar los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. El segundo anticuerpo no está particularmente limitado, con la condición de que reconozca de modo específico una secuencia de aminoácidos o su estructura terciaria, recién expuesta por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada. Como anticuerpo secundario puede mencionarse, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que reconoce de modo específico un neoantígeno en el dominio E (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales n° 36-1, n° 1-1, y n° 5-4), el anticuerpo

monoclonal DD3B6/22 (American Diagnostica; Thrombosis Research, 1983, vol. 31, pp. 87-96, o Drug Coagulation & Fibrinolysis, 1997, vol. 31, pp. 87-96), el anticuerpo monoclonal MA8D3 (IL etc.; Thrombosis and Haemostasis, 1989, vol. 58, pp. 1024-1029), el anticuerpo monoclonal P10B5E12C9 (Biomerieux; Clinical Chemistry, 1996, vol. 42, pp. 410-415), o el anticuerpo monoclonal P2C5A10 (Biomerieux; Clinical Chemistry, 1996, vol. 42, pp. 410-415).

5 En la invención reivindicada, el anticuerpo monoclonal que reconoce de modo específico un neoantígeno en el dominio E (denominado en lo sucesivo en la presente anticuerpo anti-neoantígeno del dominio E), que puede utilizarse como segundo anticuerpo, no está particularmente limitado, con la condición de que sea un anticuerpo monoclonal que no reaccione con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero que sí reaccione con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la
10 digestión con plasmina de la fibrina estabilizada. Como anticuerpo anti-neoantígeno del dominio E, por ejemplo, pueden utilizarse los anticuerpos que tienen las especificidades de reacción listadas en la tabla 1 del ejemplo de referencia 1, tales como los anticuerpos monoclonales nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4. El anticuerpo nº 36-1 reacciona con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, pero no reacciona con los productos digeridos con elastasa de granulocitos de la fibrina estabilizada.

15 En la presente invención, uno de los dos anticuerpos monoclonales es portado por partículas magnéticas, y el otro está marcado con una enzima. La partícula magnética utilizada en la presente invención no está particularmente limitada, con la condición de que tenga propiedades magnéticas y que pueda utilizarse como portador sólido para la inmunorreacción. La partícula magnética puede prepararse a partir de un polímero que esté impregnado con una sustancia magnetizable. La superficie de la partícula no está particularmente limitada, con la condición de que el
20 anticuerpo pueda inmovilizarse sobre la superficie. Cuando un anticuerpo se inmoviliza mediante adsorción física, la superficie de la partícula es preferiblemente hidrófoba. Cuando un anticuerpo se inmoviliza mediante enlaces químicos, resulta preferible introducir un enlace funcional, tal como un grupo carboxilo, succinimida, isotiocianato, clorosulfonilo, maleimida, hidrazida, amino, o SH, en la superficie de la partícula. El diámetro de partícula de la partícula magnética puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 10 µm, preferiblemente de 1 a 5 µm.

25 Un anticuerpo puede inmovilizarse sobre las partículas magnéticas mediante un procedimiento convencional, tal como un procedimiento de adsorción física basado en una interacción hidrófoba, o un procedimiento de enlace químico. Cuando se emplea el procedimiento de enlace químico, por ejemplo, puede utilizarse un grupo carboxilo, succinimida, isotiocianato, clorosulfonilo, maleimida, hidrazida, o amino. En el caso del grupo carboxilo, se emplea la carbodiimida para activar el grupo carboxilo, que puede unirse a un grupo amino de un anticuerpo. El grupo
30 succinimida, isotiocianato, o clorosulfonilo puede reaccionar directamente con un grupo amino de un anticuerpo. El grupo maleimida puede reaccionar, por ejemplo, con un grupo SH. El grupo SH puede introducirse en un anticuerpo utilizando un reactivo de introducción de SH. Como alternativa, puede utilizarse el grupo SH en el sitio de bisagra de un anticuerpo, reduciendo el anticuerpo. El grupo hidrazida puede reaccionar con cadenas de azúcares de un anticuerpo. En el caso del grupo amino, el gluraldehído puede utilizarse para convertir un grupo amino sobre la
35 partícula en un grupo aldehído, que puede reaccionar con un grupo amino de un anticuerpo.

La enzima utilizada para marcar el anticuerpo monoclonal en la presente invención no está particularmente limitada, con la condición que la quimioluminiscencia sea pertinente. Puede realizarse un análisis muy sensible utilizando dicha enzima. Cuando el sustrato es luminol puede utilizarse la peroxidasa como enzima marcadora. Cuando el sustrato es Lumigen PPD puede utilizarse la fosfatasa alcalina como enzima marcadora. Una combinación de
40 fosfatasa alcalina como enzima y 1,2-dioxetano (en particular, CDP-Star (Tropics)) como sustrato es útil y preferible, desde el punto de vista de proporción S/N. Como en el caso de AMPPD o CSPD, CDP-Star es hidrolizado por la fosfatasa alcalina para provocar una emisión de luz a través de un intermedio. Se ha indicado que la intensidad de luz de CDP-Star es extremadamente alta en comparación con la de AMPPD y CSPD (Bronstein, I., Edwards, B., Voyta, J.C., 1,2-Dioxetanes: Novel Chemiluminescent Enzyme Substrates. Application to Immunoassays, Journal of
45 Bioluminescence and Chemiluminescence, 43, 99-111 (1989); Beck, S., Koster, H., Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology, Analytical Chemistry, 62, 2258-2270 (1990); Tizard, R., Cate, R.L., Ramachandran, K.L., Wusk, M., Voyta, J.C., Murphy, O.J., Bronstein, I., Imaging of DNA Sequences with Chemiluminescence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4514-4518 (1990); o Bronstein, I., Voyta, J.C., Lazzari, K.G., Murphy, Q., Edwards, B., Kricka, L.J., Rapid and Sensitive Detection of DNA in Southern Blots with Chemiluminescence, BioTechniques, 8, 310-314 (1990)). Además, CDP-Star resulta ventajoso como sustrato para
50 un ensayo muy sensible que emplee fosfatasa alcalina, porque el tiempo de aparición de la quimioluminiscencia con CDP-Star es más rápido que con AMPPD y CSPD, y la quimioluminiscencia se mantiene durante más de 24 horas.

Un anticuerpo puede marcarse con una enzima mediante un procedimiento convencional. Como dicho procedimiento convencional puede mencionarse, por ejemplo, un procedimiento para reticular un grupo amino de la
55 enzima con un grupo amino del anticuerpo utilizando glutaraldehído; un procedimiento en que un grupo funcional (tal como un grupo succinimida o isotiocianato) capaz de unirse a un grupo amino se introduce en la enzima a través de un aminoácido de la enzima, y se hace reaccionar con un grupo amino del anticuerpo; o un procedimiento

en el que un grupo maleimida se introduce en la enzima a través de un aminoácido de la enzima, y se hace reaccionar con un grupo SH o similar en la región de bisagra del anticuerpo. Cuando la enzima es una glicoproteína, tal como peroxidasa de rábano, las cadenas de azúcares de la enzima pueden ser convertidas por el ácido peryódico en un grupo aldehído, que puede reaccionar con un grupo amino del anticuerpo.

5 El procedimiento de análisis inmunológico de la presente invención puede realizarse según los inmunoensayos convencionales, por ejemplo, de forma manual o utilizando un sistema automático, excepto que se emplea una combinación de anticuerpos monoclonales específicos. Más en concreto, se ponen en contacto en un tubo de reacción la muestra que se va a ensayar o una muestra patrón, un anticuerpo monoclonal portado por partículas magnéticas, y otro anticuerpo monoclonal marcado con una enzima, y la mezcla se incuba a una temperatura predeterminada (por ejemplo, de 30 °C a 40 °C). Se coloca un imán sobre la pared exterior del tubo de reacción para capturar las partículas magnéticas que portan el anticuerpo sobre la pared interior del tubo de reacción. El interior del tubo de reacción se lava mientras las partículas están siendo capturadas. Se añade un sustrato quimioluminiscente al tubo de reacción para provocar una emisión de luz. La señal de luz resultante se mide para determinar la cantidad de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada contenidos en la muestra de ensayo o en la muestra patrón. Debido a la separación de las partículas del líquido de la muestra después de la incubación, y de que la posterior separación del líquido de lavado puede hacerse de modo preciso utilizando las partículas magnéticas y el imán, el procedimiento resulta ventajoso desde el punto de vista de una reducción o similares en un blanco. Como muestra que puede analizarse según la presente invención puede mencionarse una muestra biológica sospechosa de contener los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, tal como sangre, plasma, suero u orina.

El presente inventor utiliza una combinación del anticuerpo JIF-23 como primer anticuerpo, y el anticuerpo nº 36-1 (un anticuerpo que reconoce una estructura recién expuesta en el dominio E por la digestión con plasmina) como segundo anticuerpo, para evaluar la correlación entre la presente invención y los reactivos de látex convencionales, midiendo los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada contenidos en plasma humano. En (1) una comparación de “un procedimiento de aglutinación de látex que emplea sólo el anticuerpo JIF-23” con “un sistema de medición de partículas magnéticas con anticuerpos inmovilizados y un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina que emplea sólo el anticuerpo JIF-23”, y (2) una comparación del “procedimiento de aglutinación de látex que emplea sólo el anticuerpo JIF-23” con “un sistema de medición de partículas magnéticas con anticuerpos jif-23 inmovilizados y un anticuerpo monoclonal marcado con fosfatasa alcalina que reconoce el dominio E después de la digestión con plasmina”, no se observaron diferencias significativas en los gradientes y las intercepciones de las línea de regresión y los coeficientes de correlación, obtenidos a partir de los resultados de los ensayos de correlación que emplean muestras de plasma humano (n = 50) que contienen los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada. Se considera a partir de este resultado que la especificidad del sistema de medición que emplea la combinación del anticuerpo JIF-23 y el anticuerpo que reconoce la estructura recién expuesta en el dominio E después de la digestión con plasmina no es sustancialmente diferente de la del sistema de medición que emplea el anticuerpo JIF-23 sólo, para medir los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada contenidos en el plasma.

Según el informe de Francis et al. (Francis, C.W., Marder, V.J., Barlow, G.H., Plasmic degradation of crosslinked fibrin, Journal of Clinical Investigation, 66, 1033-1043, 1980), se especula que los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada pueden no alcanzar la fase 4 (es decir, el estado en que la fibrina estabilizada se digiere hasta la unidad básica de DD/E, o el fragmento del dímero D (DD) y el fragmento E) *in vivo* mediante la acción del flujo sanguíneo y un inhibidor de plasmina α_2 , y puede permanecer en fase 3 (es decir, el estado en que la fibrina estabilizada se digiere hasta los polímeros o los oligómeros de las unidades básicas de DD/E). En Soe et al. se indican datos que apoyan su especulación (Soe, G., Kohno, I., Sakurai, J. y Matsuda, M., Analysis of plasmin-digested products of fibrin using monoclonal antibody JIF-23 that recognizes the amino terminal structure of fragment D, Japanese Journal of Thrombosis and Haemostasis, 5, 105-113, 1994). Estos informes sugieren con fuerza el anterior resultado de que no se observa una diferencia significativa en las correlaciones de los anteriores ensayos de correlación (1) y (2).

Ejemplos

50 La presente invención se ilustrará más a fondo mediante los siguientes ejemplos, pero de ninguna manera está limitada a ellos.

Ejemplo 1: Ensayo de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada mediante un sistema automático

55 (1) Preparación de las partículas magnéticas sobre las cuales se inmoviliza el anticuerpo monoclonal JIF-23 anti-neoantígeno del dominio D

Una fracción $F(ab')_2$ obtenida digiriendo el anticuerpo JIF-23 con pepsina se preparó según el informe de Matsuya et al. (Matsuya, T., Tashiro, S., Hoshino, N., Shibata, N., Nagasaki, Y., Kataoka, K., A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive PEG tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorimetric immunoassay, *Anal. Chem.*, 75, 6124-6132, 2003).

5 A una suspensión al 1% (10 ml) de partículas magnéticas con grupos carboxilo introducidos (diámetro de partícula = 2,5 μm , fabricadas por JSR) en tampón MES 50 mmol/l (pH 6,5) se le añadió una disolución acuosa (1 ml) que contenía carbodiimida 100 mg/ml, y el conjunto se mezcló invirtiendo el tubo de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos para recoger las partículas magnéticas, que se lavaron dos veces con tampón MES 50 mmol/l (pH 6,5). Se añadió una disolución de $F(ab')_2$ del anticuerpo
10 JIF-23 (200 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$) en tampón MES 50 mmol/l (pH 6,5) a las partículas magnéticas resultantes, y el conjunto se mezcló invirtiendo el tubo a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos para eliminar la disolución de anticuerpo sin reaccionar. Se añadió una disolución al 0,3% (10 ml) de albúmina de suero bovina en Tris-HCl 0,1 mol/l (pH 8,0), y el conjunto se mezcló invirtiendo el tubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos para eliminar la disolución
15 de albúmina de suero bovina. Las partículas magnéticas con anticuerpos inmovilizados resultantes se lavaron con tampón Tris-HCl 10 mmol/l (pH 8,0) que contenía Tween-20 al 0,01% y se utilizaron en el siguiente experimento.

(2) Preparación de los anticuerpos monoclonales anti-neoantígeno del dominio E nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 marcados con fosfatasa alcalina

20 Se realizaron fracciones Fab' de los anticuerpos nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 que reconocen el dominio E después de realizar una digestión con plasmina según el informe de Matsuya et al. (Matsuya, T., Tashiro, S., Hoshino, N., Shibata, N., Nagasaki, Y., Kataoka, K., A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive PEG tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorimetric immunoassay, *Anal. Chem.*, 75, 6124-6132, 2003). Las especificidades de reacción de los anticuerpos monoclonales nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 se muestran en el ejemplo de referencia 1 descrito a continuación.

25 Las fracciones Fab' resultantes de los anticuerpos monoclonales nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 se marcaron con fosfatasa alcalina según el informe de Ishikawa et al. (Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., y Ueno, T., Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining, *J. Immunoassay*, 4, 209-327, 1983; e Ishikawa, E., Hashida, S., Kohno, T. y Tanaka, K., Methods for enzyme-labeling of antigens, antibodies and their fragments, en: *Nonisotopic Immunoassay*, T.T. Ngo (ed.), pp. 27-
30 55, Plenum Publishing Company, Nueva York, 1988).

Como comparación se repitieron los anteriores procedimientos, excepto por el uso del anticuerpo JIF-23, para preparar una fracción Fab' del anticuerpo monoclonal JIF-23 marcada con fosfatasa alcalina.

(3) Preparación de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada

35 Los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada se prepararon según el informe de Olexa et al. (Olexa, S.A., Budzynski, A.Z., Primary soluble plasmic degradation products of human cross-linked fibrin, Isolation and stoichiometry of the (DD)E complex, *Biochemistry*, 18, 991-995, 1979). El fragmento D y el fragmento E, que son los productos de la degradación de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, se prepararon según el informe de Masci et al. (Masci, P.P., Whitaker, A.N., Winzor, D.J., A simple chromatographic procedure for the purification of the D dimer fragment from crosslinked fibrin, *Analytical Biochemistry*, 147, 128-135,
40 1985).

(4) Medición de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando partículas magnéticas con anticuerpos inmovilizados y un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina

Una serie diluida preparada diluyendo los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada con tampón Tris-HCl 20 mmol/l (pH 7,0) que contenía albúmina de suero bovina al 3% se empleó como muestras. Cada muestra
45 (50 μl), cada fracción Fab' marcada con fosfatasa alcalina (50 μl) del anticuerpo nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4, y las partículas magnéticas (partículas magnéticas al 1%, 50 μl) sobre las cuales se inmovilizó la fracción $F(ab')_2$ del anticuerpo JIF-23 se mezclaron y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 5 minutos. Se utilizó una disolución de lavado que contenía Triton X-100 como componente principal para retirar los componentes de la muestra sin reaccionar y el exceso de anticuerpos marcados. Las partículas magnéticas a las cuales se une el inmunocomplejo
50 se mezclan con 100 μl de sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Tropics), y se midió la señal de luz después de 1 minuto desde el mezclado utilizando un fotomultiplicador.

Como comparación, el anterior procedimiento se repitió, excepto que se empleó la fracción Fab' del anticuerpo JIF-23 marcada con fosfatasa alcalina en lugar de la fracción Fab' del anticuerpo nº 36-1 marcada con fosfatasa

alcalina.

(5) Resultados de la medición de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada

La figura 1 muestra los resultados de la medición de una serie diluida de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando dos sistemas de medición, es decir, una realización del procedimiento de la presente invención que utiliza una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 36-1 marcado con fosfatasa alcalina (círculos negros en la figura 1) y un procedimiento para la comparación que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo JIF-23 marcado con fosfatasa alcalina (círculos blancos en la figura 1).

Cuando se utilizan dos anticuerpos monoclonales diferentes (es decir, anticuerpos JIF-23 y nº 36-1) que reconocen diferentes epitopos, la reactividad de este sistema de medición de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada se potenció en aproximadamente 6 veces, en comparación con el sistema de medición que emplea sólo el anticuerpo JIF-23. La sensibilidad de detección de este sistema de medición era de 0,005 µg/ml FEU (tiempo de ensayo = aproximadamente 17 minutos), y fue potenciado en aproximadamente 9 veces en comparación con la sensibilidad de detección (45 ng/ml FEU, tiempo de ensayo = aproximadamente 35 minutos) de un procedimiento ELISA convencional (MiniVidas; Biomerieux, referencias que no son patentes 8 y 11) que emplea un anticuerpo que reconoce un neoantígeno en el dominio D de los productos digeridos de la fibrina estabilizada. La alta sensibilidad en el procedimiento de la presente invención también contribuye a acortar el tiempo de ensayo.

La figura 2 muestra los resultados de medir una serie diluida de productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada utilizando tres realizaciones del procedimiento de la presente invención, es decir, una realización que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 36-1 marcado con fosfatasa alcalina (círculos negros en la figura 2), una realización que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 1-1 marcado con fosfatasa alcalina (cuadrados blancos en la figura 2), y una realización que emplea una combinación de las partículas magnéticas con el anticuerpo JIF-23 inmovilizado y el anticuerpo nº 5-4 marcado con fosfatasa alcalina (triángulos blancos en la figura 2). Como resulta evidente a partir de los resultados de estas combinaciones, se obtuvo la misma reactividad que en la combinación que emplea el anticuerpo nº 36-1, cuando se emplean anticuerpos que reconocen un neoantígeno en el dominio E de la fibrina estabilizada como anticuerpo que va a ser marcado con fosfatasa alcalina. Este resultado indica que cualquier anticuerpo que reconozca un neoantígeno en el dominio E de los productos digeridos de la fibrina estabilizada puede utilizarse como anticuerpo que va a ser marcado con fosfatasa alcalina.

Ejemplo de referencia 1: Confirmación de los sitios de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4

Las especificidades de reacción de los anticuerpos monoclonales nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 se determinaron mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 5 de la publicación de patente examinada japonesa (Kokoku) nº 5-48119, es decir, mediante un análisis de la transferencia Western según el manual de instrucciones Zeta-Probe Blotting Mewbraues (BioRad).

Más en concreto, el fibrinógeno se trató con plasmina en presencia de Ca²⁺ o EGTA, y los productos digeridos del fibrinógeno obtenido después de las reacciones durante 30 minutos, 60 minutos y 24 horas se aplicaron a una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en presencia o en ausencia de ditioneitol (DTT), seguido de un análisis de la transferencia Western utilizando el anticuerpo nº 36-1. Este procedimiento se repitió, excepto que se utilizaron los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, el fragmento D o el fragmento E, en lugar de los productos digeridos del fibrinógeno.

Los resultados se muestran en la tabla 1. En la tabla 1, el símbolo (-) significa que los anticuerpos no tienen la reactividad de unión, y el símbolo (+) significa que los anticuerpos tienen la reactividad de unión. Tal como se muestra en la tabla 1, se confirmó que los anticuerpos nº 36-1, nº 1-1, y nº 5-4 reaccionan con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada.

Tabla 1

Antígenos	Reactividad
Fibrinógeno	(-)
X	(-)
Y	(+)

Fragmento del dímero D	(-)
(DD)E	(+)
D temprano	(-)
Dcato	(-)
Degta	(-)
A α	(-)
B β	(-)
γ	(-)
γ - γ	(-)
1 γ 5	(-)
E1, E2	(+)
E3	(+)

Aplicabilidad industrial

El procedimiento de análisis inmunológico de la presente invención puede aplicarse a diversos diagnósticos, tal como el diagnóstico de DIC, DVT o embolia pulmonar.

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para analizar inmunológicamente los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, **que se caracteriza porque** emplea una combinación de:

5 (a) un anticuerpo monoclonal (a) que no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y

10 (b) un anticuerpo monoclonal (b) que reconoce un sitio diferente al reconocido por el anticuerpo monoclonal (a), y que reacciona de modo específico con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, en el que el anticuerpo monoclonal (b) no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada,

en el que uno de los anticuerpos monoclonales (a) y (b) es portado por una partícula magnética, y el otro está marcado con una enzima, y se emplea un sustrato quimioluminiscente como sustrato para la enzima.

2.- El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:

15 (1) poner en contacto una muestra sospechosa de contener los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada con los anticuerpos monoclonales (a) y (b);

(2) separar un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que forma un inmunocomplejo, a través de los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, siendo portado el anticuerpo monoclonal por una partícula magnética, de un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que no forma el inmunocomplejo;

20 (3) añadir un sustrato quimioluminiscente al inmunocomplejo separado del anticuerpo monoclonal portado por una partícula magnética/productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada/anticuerpo monoclonal marcado con una enzima, para provocar la emisión de luz quimioluminiscente; y

(4) analizar la señal quimioluminiscente generada.

3.- El procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sustrato quimioluminiscente es 1,2-dioxetano.

25 4.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima marcadora es la fosfatasa alcalina.

5.- Un kit para analizar inmunológicamente los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, **que se caracteriza porque** comprende:

30 (a) un anticuerpo monoclonal (a) que no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio D por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y

35 (b) un anticuerpo monoclonal (b) que reconoce un sitio diferente al reconocido por el anticuerpo monoclonal (a), y que reacciona de modo específico con los productos digeridos con plasmina de la fibrina estabilizada, en el que el anticuerpo monoclonal (b) no reacciona con la fibrina estabilizada, con el fibrinógeno ni con los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno, pero sí reacciona con un neoantígeno recién expuesto en el dominio E por la digestión con plasmina de la fibrina estabilizada, y

(c) un sustrato quimioluminiscente,

en el que uno de los anticuerpos monoclonales (a) y (b) es portado por una partícula magnética, y el otro está marcado con una enzima, cuyo sustrato es el sustrato quimioluminiscente.

40 6.- Un procedimiento para detectar la trombosis de venas profundas y/o la embolia pulmonar, **que se caracteriza porque** analiza los productos digeridos con plasmina del fibrinógeno contenidos en una muestra mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el kit según la reivindicación 5.

Figura 1

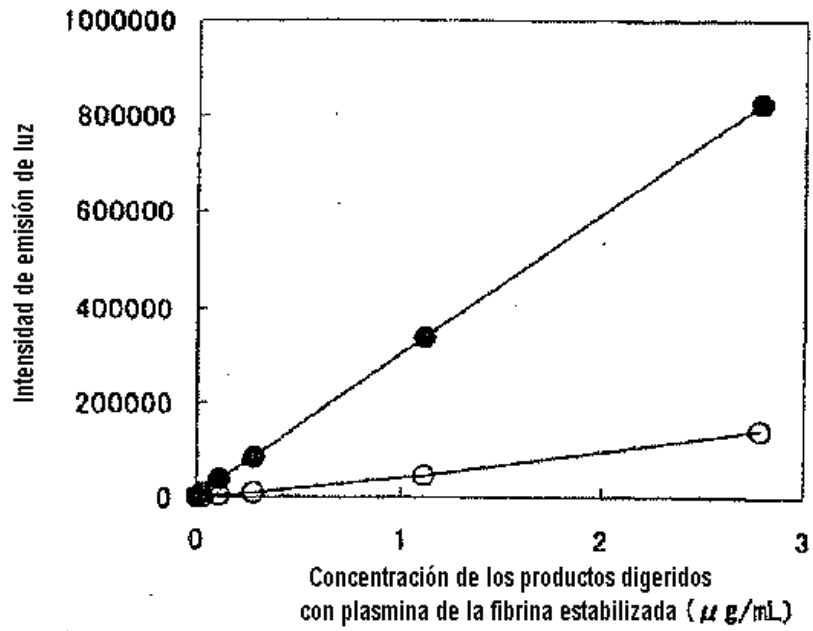


Figura 2

