



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 032**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05822796 .8**

96 Fecha de presentación : **27.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1832654**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54

Título: **Anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble humana y procedimiento de ensayo inmunológico usando el anticuerpo.**

30

Prioridad: **28.12.2004 JP 2004-378598**

73

Titular/es: **SEKISUI MEDICAL Co., Ltd.**
13-5, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027, JP

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

72

Inventor/es: **Matsuo, Masanao;**
Ebinuma, Hiroyuki;
Miyazaki, Osamu;
Tanaka, Kyoko y
Suzuki, Akiko

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 032 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

Anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble humana y procedimiento de ensayo inmunológico usando el anticuerpo

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal contra una fibrina soluble que no reacciona con fibrinógeno, pero que reconoce específicamente un sitio con cambio conformacional recién producido en una región C terminal de una cadena $A\alpha$ de la fibrina soluble formada mediante la digestión con trombina del fibrinógeno. El anticuerpo monoclonal detecta específicamente la fibrina soluble sin detectar una fibrina soluble digerida con plasmina o productos de la degradación de fibrina reticulada porque el sitio con cambio conformacional reconocido por el anticuerpo monoclonal es escindido de la fibrina soluble mediante digestión con plasmina y, por tanto, el anticuerpo monoclonal pierde su reactividad con la fibrina soluble digerida con plasmina. La presente invención también se refiere a un ensayo inmunológico empleando el anticuerpo monoclonal. La presente invención se refiere además a un procedimiento para evaluar la hipercoagulabilidad en una muestra de ensayo midiendo los niveles de la fibrina soluble en la muestra con el procedimiento de ensayo inmunológico.

Técnica anterior

20 La detección de un marcador molecular formado en la sangre en respuesta a la activación del sistema coagulación-fibrinolítico es un factor importante para el diagnóstico precoz del síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID), así como para comprobar el estado de la misma. Particularmente, el complejo de monómeros de fibrina soluble (CMFS) se ha empleado clínicamente como marcador para detectar hipercoagulabilidad inicial.

25 La trombina, que se ha formado mediante activación en un vaso sanguíneo, corta el extremo N de una cadena $A\alpha$ de fibrinógeno para formar, de este modo, un monómero de desAA fibrina y, además, corta el extremo N de la cadena $B\beta$ del mismo para formar, de este modo, un monómero de desAABB fibrina. El monómero de fibrina formado de este modo forma un complejo con fibrinógeno u otros en la sangre u el complejo (es decir, CMFS) circula en sangre. Como se conoce, la trombogénesis se puede detectar en un estadio precoz mediante la detección del CMFS.

30 Hasta la fecha se han notificado varios anticuerpos específicos y procedimientos de ensayo inmunológico para detectar el CMFS. Por ejemplo, G. Soe y col. han dado a conocer un anticuerpo IF-43 como anticuerpo monoclonal que reconoce un cambio de conformación que se produce en el dominio E durante la formación de un complejo fibrina-fibrinógeno a partir de un monómero de fibrina y fibrinógeno. El epítipo reconocido por el anticuerpo IF-43 está presente en una secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 17 a 78 en la región N-terminal de la cadena $A\alpha$. El anticuerpo IF-43 se caracteriza porque no actúa sobre el fibrinógeno, el monómero de fibrina o los productos de la degradación con plasmina del fibrinógeno o los productos de la degradación con plasmina de la fibrina, por lo que refleja el sistema de coagulación sanguínea (documento de patente 1 y documento que no es patente 1).

40 No obstante, se sabe que un reactivo de ensayo de fibrina soluble que emplea el anticuerpo IF-43 (latro FS, Patrón) actúa sobre un complejo formado a través de la reacción entre monómero de fibrina-productos de la degradación con plasmina (fragmento de fibrina X, Y o E) y fibrinógeno, así como sobre el complejo formado a través de la reacción entre monómero de fibrina-productos de la degradación con plasmina y fibrinógeno-productos de degradación con plasmina (fragmento X, Y o D) (documento de patente 2). Por tanto, ya que el anticuerpo IF-43 también actúa sobre la fibrina soluble digerida con plasmina, el anticuerpo no se puede considerar un anticuerpo que refleje exclusivamente el sistema de coagulación.

50 Asimismo, se ha dado a conocer un anticuerpo que reconoce una secuencia de aminoácidos en la región N-terminal de la cadena $A\alpha$ de fibrinógeno que se forma cortando la cadena $A\alpha$ con trombina. Específicamente, U. SCHEEFERS-BORCHEL y col. produjeron anteriormente un anticuerpo específico de la fibrina soluble mediante inmunización con un hexapéptido sintético (GPRVVE) que es idéntico a la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la fibrina (documento no patente 2). A. Hamano y col. produjeron anteriormente un anticuerpo (F405) específico de la fibrina soluble usando un monómero de fibrina preparado tratando fibrinógeno con batroxobina, como inmunógeno (documento de patente 3 y documento no patente 3).

60 No obstante, dado que el epítipo reconocido por estos anticuerpos es un sitio en la secuencia de aminoácidos en N-TERMINAL que se forma mediante una acción de la trombina sobre la cadena $A\alpha$, se considera que estos anticuerpos actúan sobre los productos de la degradación con plasmina del monómero de fibrina, complejos de los mismos y fracciones XDP (DY, DXD etc., productos de la degradación con plasmina de fibrina reticulada). Por tanto, se considera que estos anticuerpos no reflejan exclusivamente el sistema de coagulación, sino que reflejan los sistemas tanto de coagulación como fibrinolítico.

65 Además, se ha dado a conocer un anticuerpo monoclonal que reacciona con un péptido formado de la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 148 a 161 de una cadena $A\alpha$ de fibrinógeno (documento patente 4).

Dado que el sitio de reconocimiento del anticuerpo no está en el lado C-terminal de la cadena A α que se digiere con plasmina, se considera que el anticuerpo reacciona con fibrina soluble digerida con plasmina o los productos de la degradación con plasmina de la fibrina reticulada. Por tanto, el anticuerpo no se puede considerar como un anticuerpo que refleja exclusivamente el sistema de coagulación.

Mitkevich y col., BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, ENE 1996, vol. 7, n° 1, páginas 85-92, describieron anticuerpos anti-fibrina, B10 y A11 de unión a epítomos lineales en la cadena Aalfa y no se unen al fibrinógeno, y 1 H10 y 5F3 no se unen a ninguna de las 3 cadenas del fibrinógeno sino al fragmento purificado E (tabla 1). B10 y A11 sufren reacciones cruzadas con el oligómero similar a X de fibrina. B10 y A11 están dirigidos al C terminal de la cadena Aalfa, un péptido de 6900 de peso molecular (D8, página 412, § 2). Se ha sugerido que el epítopo de B10 está entre los aminoácidos 78-103 de Aalfa.

Tymkewycz y col., BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, ABR 1993, vol. 4, n° 2, páginas 211-221, divulgan un anticuerpo monoclonal (5A2) que se une a la región C terminal de la cadena Aalfa de la fibrina (529-539) que se une al fibrinógeno pero no a los fragmentos X, Y, D, E. El epítopo se destruye mediante la digestión con plasmina del fibrinógeno. Como se ha descrito anteriormente, en muchos casos, los anticuerpos convencionales contra una fibrina soluble formada mediante hipercoagulabilidad también reconocen una fibrina soluble digerida con plasmina o productos de degradación con plasmina de fibrina reticulada formada mediante el sistema fibrinolítico. Hasta la fecha no se conoce ningún anticuerpo que reconozca específicamente la fibrina soluble sobre la que no ha actuado la plasmina y no se ha dado a conocer ningún procedimiento que refleje exclusivamente el sistema de coagulación.

[Documento de patente 1] Publicación de patente internacional n° 95/012317 Folleto

[Documento de patente 2] Solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público (kokai) N° 2004-53359

[Documento de patente 3] Publicación de patente internacional n° 98/59047 Folleto

[Documento de patente 4] Solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público (kokai) N° 2-028197

[Documento que no es Patente 1] G. Soe., y col., Blood 88, 2109-2117, 1996.

[Documento que no es Patente 2] U. SCHEEFERS-BORCHEL y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7091-7095, 1985.

[Documento que no es Patente 3] Hamano y col., Clinica Chimica Acta 318, 25-32, 2002.

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que refleje la hipercoagulabilidad inicial y que pueda medir específicamente la fibrina sobre la que no ha actuado la plasmina; un hibridoma que pueda producir el anticuerpo monoclonal; un procedimiento de ensayo inmunológico para medir la fibrina soluble empleando el anticuerpo monoclonal; y un procedimiento para evaluar la hipercoagulabilidad en una muestra de ensayo midiendo el nivel de fibrina soluble en la muestra con el procedimiento de ensayo inmunológico.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios extensos con el fin de resolver los problemas anteriores y han descubierto un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un sitio con cambio conformacional recién producido en una región C terminal de una cadena A α de la fibrina soluble formada mediante la digestión con trombina del fibrinógeno. El anticuerpo monoclonal pierde su reactividad con la fibrina soluble digerida con plasmina cuando el sitio reconocido por el anticuerpo se escinde de la fibrina soluble mediante digestión con plasmina. Los inventores también han descubierto que la fibrina soluble en plasma sobre la que no ha actuado la plasmina puede medirse específicamente mediante el uso del anticuerpo. La presente invención se ha conseguido sobre la base de estos hallazgos.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal contra un monómero de fibrina, en el que el anticuerpo reconoce específicamente un sitio con cambio conformacional recién producido en una región C terminal de una cadena A α de la fibrina soluble formada mediante la digestión de un fibrinógeno, en el que el sitio se escinde de la fibrina soluble mediante digestión con plasmina, tal como se define en la reivindicación 1.

La presente invención también proporciona un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente.

La presente invención también proporciona un procedimiento de ensayo inmunológico para medir una fibrina soluble en una muestra de ensayo, en el que el procedimiento comprende hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal con la muestra.

La presente invención también proporciona un reactivo para medir una fibrina soluble que contiene el anticuerpo monoclonal.

La presente invención también proporciona un procedimiento para evaluar la hipercoagulabilidad en una muestra de ensayo, que comprende medir los niveles de la fibrina soluble en la muestra con el procedimiento de ensayo inmunológico.

5 Efectos de la invención

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede reconocer específicamente la fibrina soluble sobre la que no ha actuado la plasmina sin reconocer la fibrina soluble digerida con plasmina o los productos de la degradación con plasmina de la fibrina reticulada. Por tanto, mediante el empleo del anticuerpo monoclonal de la presente invención, la hipercoagulabilidad inicial se puede detectar rápidamente con una sensibilidad elevada.

Breve descripción de las figuras

15 [Fig. 1] Resultados analíticos de la reactividad del anticuerpo J2-23 con fibrinógeno tratado en condiciones reductoras, que se obtuvo en el Ejemplo 3 (A: tinción CBB, B: transferencia de tipo western).

[Fig. 2] Imagen de electroforesis que muestra fragmentos de digestión reactivos (teñida la proteína con CBB), que se obtuvo mediante análisis de transferencia de tipo western llevado a cabo en el ejemplo 4 para la reactividad del anticuerpo J2-23 con fragmentos de fibrinógeno digerido con plasmina.

20 [Fig. 3] Gráfico que muestra la inhibición competitiva entre seis péptidos sintéticos y el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

[Fig. 4] Gráfico que muestra la reactividad de la fibrina soluble con el reactivo LTIA investigado en el Ejemplo 6.

Mejores modos para llevar a cabo la invención

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "fibrina soluble" se refiere, en conjunto, a un monómero de fibrina (un monómero de desAA fibrina o un monómero de desAABB fibrina) y un complejo de monómero de fibrina (un polímero de fibrina, un complejo monómero de fibrina-fibrinógeno, un complejo monómero de fibrina-FDP o un complejo monómero de fibrina y otras proteínas del cuerpo).

30 Un rasgo característico del anticuerpo monoclonal de la presente invención reside en que el anticuerpo actúa sobre la fibrina soluble mencionada anteriormente, pero no actúa sobre el fibrinógeno o los productos de la degradación con plasmina del monómero de fibrina o productos de la degradación con plasmina del monómero de fibrina reticulada.

35 Un epítipo para el anticuerpo monoclonal de la presente invención está presente en un sitio con cambio conformacional recién producido en la región C terminal de la cadena $A\alpha$ de la fibrina soluble formado mediante digestión con trombina del fibrinógeno y escindido a partir de la fibrina soluble mediante digestión con plasmina. Cuando la fibrina soluble es digerida con plasmina se pierde la función de reconocimiento del anticuerpo monoclonal por la fibrina soluble digerida con plasmina. Específicamente, el epítipo está presente en, entre fragmentos formados mediante digestión con plasmina del fibrinógeno, un fragmento C-terminal de una $A\alpha$ de fibrinógeno. El epítipo está presente en un fragmento peptídico digerido que tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, en el que su extremo N-terminal corresponde al residuo del aminoácido 425 de la cadena $A\alpha$. Más específicamente, el epítipo está presente en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 502 a 521 en la cadena $A\alpha$ de fibrinógeno. No se impone ninguna limitación concreta sobre el tipo de anticuerpo monoclonal de la presente invención, siempre que el anticuerpo reconozca un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 502 a 521 en la cadena $A\alpha$ de fibrinógeno.

50 Por tanto, nunca se ha conocido un anticuerpo monoclonal que no reaccione con el propio fibrinógeno pero que reconozca un sitio con cambio conformacional recién producido en la región C terminal de la cadena $A\alpha$ de la fibrina soluble formado mediante digestión con trombina del fibrinógeno y escindido a partir de la fibrina soluble mediante digestión con plasmina. Por tanto, el anticuerpo antiidiotípico de la presente invención es un anticuerpo monoclonal nuevo. Hasta la fecha, no se han deducido claramente ningún cambio conformacional en la región C terminal de la cadena $A\alpha$ de la fibrina soluble. No obstante, de acuerdo con un informe de Y. I. Veklich y col. (J. Bio. Chem., 1993; 268,13577-13585), un fragmento escindido de la cadena $A\alpha$ con plasmina es un fragmento de digestión que tiene un peso molecular de 40 kDa en el que su extremo N-terminal corresponde al residuo de aminoácidos 220 de la cadena $A\alpha$, lo que indica que el sitio de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal de la presente invención está incluido en el fragmento escindido mediante plasmina. En el informe anterior, la morfología del fibrinógeno se observó con microscopio electrónico. La región C terminal de cada una de las dos cadenas $A\alpha$ del fibrinógeno está unida al dominio E central en condiciones neutras. Cuando un fibrinopéptido se escinden de la cadena $A\alpha$ mediante digestión con trombina, la región C terminal de la cadena $A\alpha$ unida al dominio E se disocia. La disociación tiene como resultado un cambio conformacional en la región C terminal de la cadena $A\alpha$. El anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce específicamente este sitio con cambio conformacional.

65 El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir mediante el procedimiento siguiente. Un

monómero de fibrina o una fibrina soluble que se ha formado a partir de fibrinógeno se emplean, preferentemente, como inmunógeno. Como alternativa, sólo se pueden emplear también fibrinógeno tratado con trombina o fibrinógeno tratado con batroxobina, que no están tratados con plasmina. Los monómeros de fibrina se pueden preparar mediante, por ejemplo, el procedimiento divulgado por U. SCHEEFERS-BORCHEL y col. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7091 a 7095, 1985]. Específicamente, se puede preparar un monómero de desAA fibrina mediante tratamiento de una solución de fibrinógeno con batroxobina y solubilizando el coágulo de fibrina formado mediante el uso de urea o ácido, mientras que un monómero de desAABB fibrina se puede preparar mediante tratamiento de una solución de fibrinógeno con trombina y solubilizando el coágulo de fibrina formado mediante el uso de urea o ácido. Como alternativa, el fibrinógeno se trata con una cantidad muy pequeña de batroxobina o trombina y la solución formada de este modo, que no es un coágulo formado, se puede emplear sin realizar tratamientos adicionales. Como otra alternativa, se puede emplear un fragmento en C-terminal de una cadena A α escindido de fibrinógeno mediante tratamiento con plasmina o un polipéptido sintetizado que tiene la misma secuencia como secuencia parcial del fragmento en C-terminal de la cadena A α . Preferentemente, se sintetiza el polipéptido 502-521 mencionado con anterioridad y se emplea el péptido sintético.

No se impone ninguna limitación en un animal usado para inmunización. Ejemplos del animal incluyen ratones y ratas. La inmunización se puede realizar mediante un procedimiento convencional. En un procedimiento de ejemplo se administra a un animal una suspensión de un inmunógeno en un tampón empleado habitualmente o solución salina fisiológica o una mezcla del inmunógeno y un relleno tal como adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea, intracutánea o intraperitoneal para realizar una inmunización primaria y, si es necesario, la inmunización se repite. La dosis de administración del inmunógeno se determina de forma adecuada en función de la vía de administración o la especie del animal y, en general, la dosis es, preferentemente, de aproximadamente 10 μ g a 1 mg por administración.

Preferentemente, los inmunocitos usados para la fusión celular son células de bazo recogidas de 3 a 4 días después de la inmunización final. Las células de mieloma que se van a fusionar con los inmunocitos son, preferentemente, cualquier línea celular conocida que ya se ha establecido. Ejemplos de las líneas celulares incluyen líneas celulares de ratón, tal como NS1 (P3/NSI/I-Ag4-1) [Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976)]; SP2/0-Ag14 [Nature 276: 269 (1978)]; P3-X63-Ag8.653 [J. Immunol. 123: 1548 (1979)]; y P3-X63-Ag8U.1 [Curro Top. Microbiol. Immunol. 81:1 (1978)], y líneas celulares de rata tales como Y3-Ag1.2.3 [Nature 277: 131-133 (1979)]; y YB2/0(YB2/3HUP2.G11.16Ag.20) [Methods Enzymol. 73B:1 (1981)].

En la fusión celular se puede usar poli(etilenglicol) (PEG), virus Sendai (HVJ) o similares que se emplean de forma convencional. La fusión celular puede realizarse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, a un sedimento mixto de células de mieloma e inmunocitos en una cantidad de aproximadamente 1 a 10 veces la de las células de mieloma se añade, gota a gota, poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular medio de 1.000 a 6.000 y una concentración de 30 a 60 %, seguido de mezclado. El hibridoma diana se selecciona usando medio de cultivo convencional, tal como medio HAT (es decir, un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Después de cultivar en el medio HAT, la cepa de hibridoma diana que produce un anticuerpo de interés se puede seleccionar y monoclonal usando un procedimiento de dilución límite convencional.

La cepa de hibridoma diana que produce un anticuerpo de interés se puede obtener con ELISA, RIA o un ensayo similar. En el ensayo, la cepa de hibridoma se puede obtener seleccionando una cepa que produce un anticuerpo que reacciona de forma específica con fibrina soluble sobre la que no ha actuado la plasmina pero no reacciona con fibrinógeno o producto de degradación con plasmina del monómero de fibrina o producto de degradación con plasmina de fibrina reticulada. Específicamente, los anticuerpos monoclonales contenidas en el sobrenadante del medio de cultivo se inmovilizan mediante un anticuerpo IgG anti-ratón o similar y se hace reaccionar con una muestra que contiene fibrina soluble y fibrinógeno. A continuación se añade al reactante un anticuerpo anti-fibrinógeno marcado con un agente de marcaje tal como una enzima para seleccionar de este modo un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con fibrina soluble pero no reacciona con fibrinógeno. Posteriormente, se selecciona un anticuerpo monoclonal que no reacciona con fragmentos de fibrina X, Y o E que son productos de degradación de fibrina y productos de degradación de fibrina reticulada (XDP). Mediante el modo descrito anteriormente se selecciona un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo que se presenta en un fragmento que se escinde con plasmina.

El anticuerpo monoclonal se puede producir de acuerdo con un procedimiento convencional. Por ejemplo, el hibridoma se puede cultivar para separar el anticuerpo del sobrenadante del cultivo. Como alternativa, el hibridoma se puede administrar a un mamífero compatible con el hibridoma para obtener el anticuerpo de ascitis.

Cuando el anticuerpo monoclonal de la presente invención se aplica a cualquiera de los procedimientos de ensayo inmunológico convencionales, una fibrina soluble en fluido corporal humano sobre la cual no ha actuado la plasmina se puede medir específicamente mediante el procedimiento. Cuando el ensayo se realiza mediante el procedimiento de ELSA, la fibrina soluble se puede medir mediante el procedimiento siguiente empleando fibrina soluble purificada como patrón. Específicamente, a una placa de ELISA sobre la que el anticuerpo monoclonal de la presente invención se ha inmovilizado se añade una muestra de ensayo diluida, para permitir de este modo que la muestra reaccione con el anticuerpo. Posteriormente, se hace reaccionar además con un anticuerpo policlonal anti-

fibrinógeno marcado con una enzima, Tras la coloración, la fibrina soluble en la muestra sobre la que no ha actuado la plasmina se puede medir específicamente sobre la base del cambio de la absorbancia. Cuando el ensayo se realiza mediante el procedimiento de LTIA, la fibrina soluble se puede medir mediante el procedimiento siguiente empleando fibrina soluble purificada como patrón. Específicamente, partículas de látex que sirven como vehículo insoluble se sensibilizan con al menos un anticuerpo monoclonal de la invención y una muestra se pone en contacto con el vehículo sensibilizado, de modo que las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo están reticuladas juntas mediante fibrina soluble contenida en la muestra y se agrega. La fibrina soluble puede medirse específicamente sobre la base del cambio en el grado de agregación. No se impone una limitación concreta sobre la muestra de ensayo, siempre que sea un fluido corporal humano que contenga fibrina soluble. Ejemplos de la muestra incluyen sangre y orina.

No se impone una limitación concreta sobre las partículas de látex usadas para las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo en los procedimientos de ensayo, tales como LTIA, siempre que las partículas sean micropartículas empleadas en general como vehículo en la aglutinación inmunológica o la inhibición de la aglutinación usando agregación con látex. No obstante se prefieren micropartículas orgánicas que se pueden producir en masa a escala industrial. Ejemplos del material de dichas partículas orgánicas incluyen un homopolímero y un copolímero de monómeros de vinilo, tales como estireno, cloruro de vinilo, acrilonitrilo, acetato de vinilo, éster acrilato o éster metacrilato; y un copolímero de butadieno tal como un copolímero de estireno-butadieno y copolímero de metacrilato de metilo-butadieno. Como alternativa, preferentemente se emplean micropartículas orgánicas reactivas formadas mediante unión de dichas micropartículas orgánicas a un grupo funcional, tal como un grupo carboxilo, un grupo amino primario, un grupo carbamilo, un grupo hidroxilo o un grupo aldehído. Entre las partículas de látex mencionadas anteriormente, se prefieren las partículas de látex hechas de poliestireno, tal como poliestireno y copolímero de estireno-butadieno, ya que exhiben una excelente adsorbabilidad del antígeno o anticuerpo y garantiza la actividad biológica durante un periodo de tiempo prolongado.

No se impone ninguna limitación concreta en la forma de las partículas de látex. No obstante, las partículas tienen, preferentemente, un tamaño de partícula medio tal que un aglutinado formado mediante la aglutinación entre una proteína presente sobre las superficies de las partículas de látex y un ensayo objeto se puedan detectar visualmente u ópticamente. Preferentemente, el tamaño de partícula medio es de 0,02 a 1,6 μm , particularmente preferentemente de 0,03 a 0,5 μm .

No se impone ninguna limitación concreta sobre el procedimiento de sensibilizar las partículas de látex con el anticuerpo monoclonal de la presente invención y se puede emplear cualquier procedimiento conocido. Ejemplos del procedimiento de sensibilización incluyen adsorción física del anticuerpo sobre las superficies de las partículas de látex y sensibilización de las superficies de las partículas de látex que tienen un grupo funcional mediante un enlace covalente o mediante unión inmunológica.

Además de las partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, se puede usar un estabilizante, tal como BSA o sacarosa, o un conservante, tal como azida sódica, con un reactivo para someter a ensayo la fibrina soluble de la presente invención. El reactivo para el ensayo de la fibrina soluble de la presente invención puede además combinarse con un diluyente para proporcionar de este modo un kit de ensayo de agregación de látex. El diluyente puede además contener, opcionalmente, el estabilizante o conservante mencionado con anterioridad.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalla a modo de ejemplos, que no deberán interpretarse como limitantes de la invención en relación a esto.

Ejemplo 1. Preparación del anticuerpo monoclonal

(1) Preparación de hibridomas

Fibrinógeno humano purificado disuelto en PBS se trató con batroxobina para formar, de este modo, fibrina soluble que sirva como inmunógeno. Este inmunógeno y un adyuvante completo de Freund (GIBCO) se mezclaron en una proporción de 1:1 para preparar de este modo una emulsión de 0,1 mg/0,1 ml. La emulsión se administró por vía subcutánea a ratones BALB/C hembra de 6 semanas de edad seis veces a intervalos de una semana. Tres días después de la inmunización final se extirpó el bazo de cada ratón. Los esplenocitos recolectados de los bazos extirpados y las células de mieloma SP2/0-Ag14 se mezclaron en una proporción de 6:1 y se fusionaron en presencia de polietilenglicol 1540 al 50 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las células fusionadas de este modo se suspendieron en medio HAT de modo que la concentración de esplenocitos se ajustó a $2,5 \times 10^6/\text{ml}$. La suspensión se dispuso en una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning Incorporated) a 0,2 ml/pocillo, seguido de cultivo a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 %. Tras aproximadamente dos semanas, las cepas deseadas para la producción de un anticuerpo contra fibrina soluble se seleccionaron examinando el sobrenadante del cultivo de cada pocillo en el que se había cultivado el hibridoma usando el procedimiento de ELISA descrito más adelante en el presente documento.

En primer lugar, las IgG contenidas en cada sobrenadante del cultivo se inmovilizaron en una microplaca (Nunc) usando un anticuerpo IgG anti-ratón (Fc) (The Jackson Laboratory). A la placa se añadieron fibrina soluble, fibrinógeno, fibrinas X, Y y E y productos degradados de fibrina reticulada (XDP) para inducir la reacción con las IgG. Tras la adición de un anticuerpo policlonal de conejo anti-fibrinógeno marcado con peroxidasa (DAKO), el producto resultante dejó que desarrollara color con una solución de sustrato de peroxidasa que contiene o-fenilendiamina (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.). La coloración se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1,5N. El grado de coloración se midió por medio de un lector de microplacas (Abs. 492 nm), para seleccionar de este modo las cepas que habían exhibido reactividad alta a la fibrina soluble pero ninguna reactividad a fibrinógeno, fibrinas X, Y y E, y a los productos de degradación de fibrina reticulada (XDP). El hibridoma obtenido de este modo se clonó mediante dilución límite para establecer así un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (J2-23). Este hibridoma se depositó como FERM BP-1 0172 en el Instituto Nacional de ciencia Industrial Avanzada y Tecnología, Reserva de Organismos de Patente Internacional (Central 6th, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki, 305-8566, Japón) el 3 de diciembre de 2004. En lo sucesivo en el presente documento, el anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble secretado del hibridoma (J2-23) se denomina "anticuerpo J2-23".

(2) Preparación del anticuerpo monoclonal

A cada uno de los ratones BALB/C hembra de 12 semanas de edad a los que se inyectó pristano (0,5 ml) por vía intraperitoneal hace dos semanas, el hibridoma preparado anteriormente ($0,5 \times 10^6$ células) se inyectó por vía intraperitoneal en los ratones. Aproximadamente 14 días después de la administración del hibridoma se recogió la ascitis y se centrifugó, para dar de este modo un sobrenadante. El sobrenadante se mezcló con una cantidad equivalente de un tampón de adsorción (3 mol/l de NaCl-1,5 mol/l de Glicina-NaOH, pH 8,5), y se filtró la mezcla. El filtrado resultante se pasó a través de una columna de proteína A (Pharmacia Corporation), que se había equilibrado con el tampón de adsorción, para adsorber así el anticuerpo en la columna. El anticuerpo adsorbido se eluyó de la columna mediante el uso de un tampón de ácido cítrico a 0,1 mol/l (pH 3,0), para purificar de este modo el anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (anticuerpo J2-23).

Ejemplo 2 Identificación de la clase de inmunoglobulina y especificidad del anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (anticuerpo J2-23) (1)

La clase de inmunoglobulina del anticuerpo J2—23 se determinó mediante ELISA (ZYMED). Se descubrió que el anticuerpo tenía clase de inmunoglobulina de IgG1, cadena ligera κ . El anticuerpo J2-23 se diluyó con PBS hasta la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. El anticuerpo diluido se añadió a una placa de ELISA de 96 pocillos (Nunc) a 50 $\mu\text{l/pocillo}$ y se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó tres veces con PBS y, después, se añadió una solución de bloqueo (PBS que contiene BSA al 1%) a 100 $\mu\text{l/pocillo}$, para llevar a cabo de este modo el bloqueo durante una hora. Tras la retirada de la solución de bloqueo, se añadió cada uno de los antígenos indicados en la Tabla 1 diluidos mediante el líquido de bloqueo a 50 $\mu\text{l/pocillo}$ y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con la solución de bloqueo y, después, se añadió un anticuerpo policlonal de conejo anti-fibrinógeno marcado con peroxidasa y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con la solución de bloqueo y, posteriormente, se añadió la solución de sustrato de peroxidasa en el Ejemplo 1 a 50 $\mu\text{l/pocillo}$. Después de diez minutos, se añadió ácido sulfúrico 1,5N a 50 $\mu\text{l/pocillo}$ y se midió la absorbancia a 492 nm.

Los antígenos de la Tabla 1 se prepararon del siguiente modo. El fibrinógeno (en lo sucesivo en el presente documento denominado Fbg) empleado se preparó mediante purificación adicional del fibrinógeno purificado (Sigma) mediante filtración en gel. Cada monómero de desAA fibrina (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar desAAFbn) y el monómero de desAABB fibrina (en lo sucesivo en el presente documento se puede denominar desAABBFbn) se preparó tratando el Fbg purificado con batroxobina o trombina para formar coágulos, seguido de solubilización de los coágulos formados con ácido. Cada complejo de desAAFbn-Fbg y un complejo de desAABB-Fbn-Fbg se prepararon añadiendo desAAFbn o desAABBFbn solubilizada con ácido a una solución de Fbg para inducir la formación de complejos y separando la fracción polimérica de la mezcla con filtración en gel. Se emplearon fragmentos X e Y de Fbg comercialmente disponibles (estos productos proceden de International Bio). Cada uno de los fragmentos X e Y de fibrina se preparó mediante tratamiento del fragmento X o Y de Fbg con trombina. Se emplearon fragmento E de Fbg y fragmento E de fibrina, dímero D (DD) y monómero D (D) comercialmente disponibles (estos productos proceden de International Bio). Los XDP que contienen DD/E se prepararon mediante digestión de un coágulo de fibrina con plasmina y separando los productos digeridos con filtración en gel, para dar la fracción de peso molecular alto.

Los resultados del experimento descritos con anterioridad se muestran en la Tabla 1, "+" indica realización de la reacción e "-" indica la no realización de la reacción en un ensayo ELISA de tipo sándwich.

[Tabla 1]

Antígenos	Anticuerpo J2-23
Fibrinógeno	-
Monómero de desAA fibrina	+
Complejo desAA fibrina-fibrinógeno	+
Monómero de desAABB fibrina	+
Complejo desAABB fibrina-fibrinógeno	+
Fragmento X del fibrinógeno	-
Fragmento X de fibrina	-
Fragmento Y del fibrinógeno	-
Fragmento Y de fibrina	-
Fragmento E del fibrinógeno	-
Fragmento E de fibrina	-
Fracción XDP que contiene DD/E	-
DD	-
D	-

5 Como queda claro a partir de la Tabla 1, el anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) exhibe reactividad con, entre varios antígenos en la solución, desAAFbn, complejo desAAFbn-Fbg, complejo de desAABBFbn y desAABBFbn-Fbg y ausencia de reactividad con Fbg no tratado, productos de la degradación con plasmina del fibrinógeno (FbgDP; es decir, fragmento X del fibrinógeno, fragmento Y del fibrinógeno, fragmentos E y D del fibrinógeno) y productos de la degradación con plasmina de fibrina (FbnDP; es decir fragmento X de fibrina, fragmento Y de fibrina, fragmento E de fibrina, fracción de XDP que contiene DD/E y DD).

10 **Ejemplo 3 Identificación de especificidad del anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (anticuerpo J2-23) (2)**

15 Los antígenos evaluados en el Ejemplo 2 se separaron con SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con PBST (PBS suplementado con Tween 20 al 0,05 %) que contiene 3% de leche desnatada durante una hora, después se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal (anticuerpo J2-23; anticuerpo primario) y con en anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa (anticuerpo secundario; Biosource International). Después de lavar la membrana de PVDF con PBST, se añadió diaminobencidina como sustrato para permitir de este modo el desarrollo de color. Como resultado, se descubrió que el anticuerpo J2-23 reaccionaba no sólo con desAAFbn y desAABBFbn, sino también con Fbg y que no exhibía ninguna reactividad con FbgDP. Un procedimiento similar al descrito con anterioridad se realizó usando Fbg tratado adicionalmente en condiciones reductoras, lo que muestra que el anticuerpo reaccionaba intensamente con la cadena A α de Fbg (Fig. 1).

25 Mediante el análisis, se encontró que el epítipo para el anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) no aparecía en un Fbg no desnaturalizado en la solución de ensayo pero sí aparecía en la cadena A α de Fbg desnaturalizado. Dado que el anticuerpo J2-23 no reacciona con los FbgDP, se ha probado que el sitio de reacción estaba presente en un fragmento escindido de la fibrina soluble con plasmina.

30 **Ejemplo 4 Análisis del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (anticuerpo J2-23) (1)**

35 En base al hallazgo obtenido en el Ejemplo 3, la posición del epítipo de la cadena A α se identificó mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, el Fbg purificado se disolvió en 10 mmol/l de tampón Tris (Ph 8,0) para formar una solución que tenga una concentración final de 10 mg/ml y a la solución se añadió plasmina (Chromogenics) para conseguir una concentración final de 0,2 unidades/ml. El Fbg se digirió a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió aprotinina (Mitsubishi Pharma Corporation) al digestante para conseguir una concentración final de 500 unidades/ml, mediante lo cual se inactivó la plasmina. El digestante se redujo y el producto de reducción se sometió a separación con de 15 a 25 % de SDS-PAGE y la materia resultante se transfirió a PVDF. Después de la transferencia se realizó tinción con CBB. Y se efectuó inmunotransferencia de forma independiente tras la transferencia mediante el uso del anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) de un modo similar al del Ejemplo 3.

45 Como resultado se observó un fragmento digerido (aproximadamente 16 kDa) que tenía reactividad con el anticuerpo J2-23 (una banda indicada por la flecha en la Fig. 2). El fragmento digerido teñido con CMM se retiró y se analizó la secuencia de aminoácidos del extremo N. Se encontró que la secuencia era TGKEKVTSS, con el extremo en N-terminal correspondiente al residuo de aminoácidos 425 de la cadena A α de Fbg. Dado que la secuencia está incluida en un fragmento que se escinde de Fbg cuando el Fbg se transforma en Fbg-X mediante digestión con plasmina, se ha demostrado que el epítipo para el anticuerpo monoclonal de la presente invención estaba presente en la cadena A α de Fbg y en la región C-terminal de la cadena A α escindida mediante digestión con plasmina. Además, el epítipo se ha demostrado que el epítipo para el anticuerpo monoclonal de la presente invención está

presente en la región posterior al aminoácido 425 de la cadena A α en el fragmento digerido con plasmina. Hasta la fecha nunca se ha conocido un anticuerpo contra una fibrina soluble que exhiba reactividad con un fragmento en c terminal de la cadena A α formada mediante digestión con plasmina. Por tanto, se ha descubierto que el anticuerpo de la invención es nuevo.

5 **Ejemplo 5 Análisis del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-fibrina soluble (anticuerpo J2-23) (2)**

En base al hallazgo obtenido en el Ejemplo 4, la posición del epítipo de la cadena A α se analizó adicionalmente mediante el procedimiento siguiente.

10 Mediante el procedimiento de Doolittle y col. (Biochemistry 1977, 16: 1703), se aisló una cadena A α de Fbg y se purificó. La cadena A α purificada se digirió con endoproteinasa Asp-N (Sigma) y se realizó inmunotransferencia de un modo similar a la del Ejemplo 4.

15 Como resultado se observó un fragmento digerido (de 7 a 8 kDa) y se analizó la secuencia de aminoácidos en N-terminal del fragmento digerido. Mediante el análisis, se encontró que la secuencia era DTAST, con el extremo en N-terminal correspondiente al aminoácido 502 de la cadena A α de Fbg. Considerando el peso molecular del fragmento digerido y el hecho de que en el lado del grupo amino de ácido aspártico hay un sitio de escisión al lado de Asp-N, se considera el fragmento el péptido de los residuos de aminoácidos 502 a 573 de la cadena A α .

20 Posteriormente se sintetizaron 6 péptidos (comenzando desde el aminoácido 502: AA502-521, AA512-531, AA522-541, AA532-551, AA542-561, y AA552-571) incluidos en la secuencia de aminoácidos del fragmento digerido anterior y el epítipo para el anticuerpo monoclonal de la presente invención anticuerpo J2-23) se identificó con más precisión de acuerdo con el procedimiento siguiente.

25 En primer lugar, un anticuerpo IgG (Fc) anti-ratón de cabra se diluyó con PBS hasta la concentración de 5 μ g/ml. La solución del anticuerpo se añadió a una microplaca a 50 μ l/pocillo y se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó tres veces con PBST (PBS suplementado con Tween 20 al 0,05 %), a la que se añadió una solución de bloqueo (BSA-PBST) a 100 μ l/pocillo y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBST, el anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) se diluyó con BSA-PBST hasta una concentración de 0,2 μ g/ml y se añadió a la microplaca a 50 μ g/pocillo. La mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBST, cada uno de los péptidos sintetizados anteriormente diluidos con BSA-PBST hasta de 0 a 100 μ g/ml se añadió a la microplaca a 25 μ l/pocillo y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, la fibrina soluble (preparada en el Ejemplo 6 mencionada a continuación en el presente documento) se diluyó con BSA-PBST hasta 1 μ g/ml y se añadió a la microplaca a 25 μ l/pocillo, seguido de incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces con PBST, un anticuerpo anti-fibrinógeno humano de conejo marcado con HRP (DAKO) diluido 5.000 veces con BSA-PBST se añadió a la microplaca a 50 μ l/pocillo, seguido de incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces con PBST, la solución de sustrato de peroxidasa preparada en el Ejemplo 1 se añadió a la microplaca a 50 μ l/pocillo. Diez minutos después de la adición de la solución de sustrato se añadió ácido sulfúrico 1,5N a 50 μ l/pocillo y se midió la absorbancia a 492 nm.

35 Los resultados se muestran en la Figura 3. Entre los seis péptidos sintetizados, sólo AA502-521 exhibió inhibición competitiva. Por tanto, se ha demostrado que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) era una secuencia de aminoácidos de 502 a 521 de la cadena A α de Abg. Este resultado indica que se genera un cambio conformacional en la región C-terminal de la cadena A α , al menos en las proximidades de los residuos de aminoácidos 502 a 521, de la fibrina soluble formada a partir de Fbg mediante trombina. Por tanto, el anticuerpo monoclonal de la presente invención (anticuerpo J2-23) es un anticuerpo específico de la fibrina soluble que reconoce específicamente un sitio con el cambio de conformación.

50 **Ejemplo 6 Ensayo para medir fibrina soluble empleando inmunoensayo turbidométrico con látex (LTIA)**

(1) Preparación de látex sensibilizado con el anticuerpo

55 Un anticuerpo monoclonal (anticuerpo J2-23) se diluyó con 20 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 7,5) a 0,7 mg/ml. La solución de anticuerpo se mezcló con una cantidad equivalente de una solución de látex al 1 % (tamaño de partícula: 0,2 μ m, Sekisui Chem. Co., Ltd.) y la mezcla se agitó a 4 °C durante aproximadamente dos horas. Posteriormente, a la mezcla se añadió una cantidad equivalente de BSA al 1 %, seguido de agitación durante una hora. El producto se centrifugó (100.000 x g, 5 minutos). El látex precipitado se suspendió en 5 mmol/l de MOPS (pH 7,0) que contiene BSA al 0,5 %, para preparar, de este modo, un látex sensibilizado con el anticuerpo.

(2) Preparación de fibrina soluble

De un modo similar al del ejemplo 2 se prepararon desAAFbn y desAABBFbc soluble en ácido. Cada monómero de

fibrina se añadió a plasma citrado humano hasta una concentración final de 0 a 50 µg/ml para preparar de este modo fibrina soluble.

(3) Ensayo para medir fibrina soluble

5 Se preparó un tampón de 30 mmol/ml de Tris-HCl (pH 8,5) que contiene BSAL al 0,4 % y 0,5 mol/l de cloruro sódico (Reactante 1). El ensayo se realizó usando Reactivo 1 y el látex sensibilizado con el anticuerpo preparado anteriormente (Reactivo 2) por medio de un autoanalizador bioquímico (Hitachi, Modelo 7170). Específicamente, a
10 cada celda de reacción en el autoanalizador mantenido a 37 °C, se añadieron cada una de las fibrinas solubles preparadas anteriormente (3 µl) y el reactivo 1 (100 µl). Cinco minutos después de la adición del reactivo 1, se añadió el reactivo 2 (100 µl) para producir la reacción antígeno-anticuerpo durante 5 minutos. Un cambio en la absorbancia a una longitud de onda principal de 570 nm y a una sublongitud de onda de 800 m, se midió antes y después de la reacción (entre el punto 18 y el punto 34) (Fig. 4). La absorbancia se cambió con la concentración de
15 cada uno de desAAFbc y desAABBFbn que se había añadido, lo que indicó que los niveles de fibrina soluble en sangre se podían medir usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal contra un monómero de fibrina, en el que el anticuerpo reconoce específicamente un sitio con cambio conformacional recién producido en una región en C-terminal de una cadena A α del monómero de fibrina formado mediante digestión con trombina de un fibrinógeno, pero que no reacciona con fibrinógeno, productos de degradación con plasmina del monómero de fibrina o productos de degradación con plasmina de la fibrina reticulada,
10 en el que el sitio reconocido por el anticuerpo es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos de 502 a 521 de la cadena A α del fibrinógeno.
- 15 2. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sitio reconocido por el anticuerpo está presente en un fragmento en C terminal de una cadena A α del fibrinógeno, en el que el fragmento se escinde del fibrinógeno cuando el fibrinógeno se transforma en fibrinógeno X mediante digestión con plasmina.
- 20 3. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Un procedimiento de ensayo inmunológico para medir un monómero de fibrina en una muestra de ensayo, que comprende hacer reaccionar el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 con la muestra.
- 25 5. El procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se usa el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 inmovilizado sobre un vehículo insoluble.
6. Un reactivo para un ensayo de medición de un monómero de fibrina, que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
7. Un procedimiento para evaluar la hipercoagulabilidad en una muestra de ensayo, que comprende medir el nivel del monómero de fibrina en la muestra con el procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.

Fig. 1

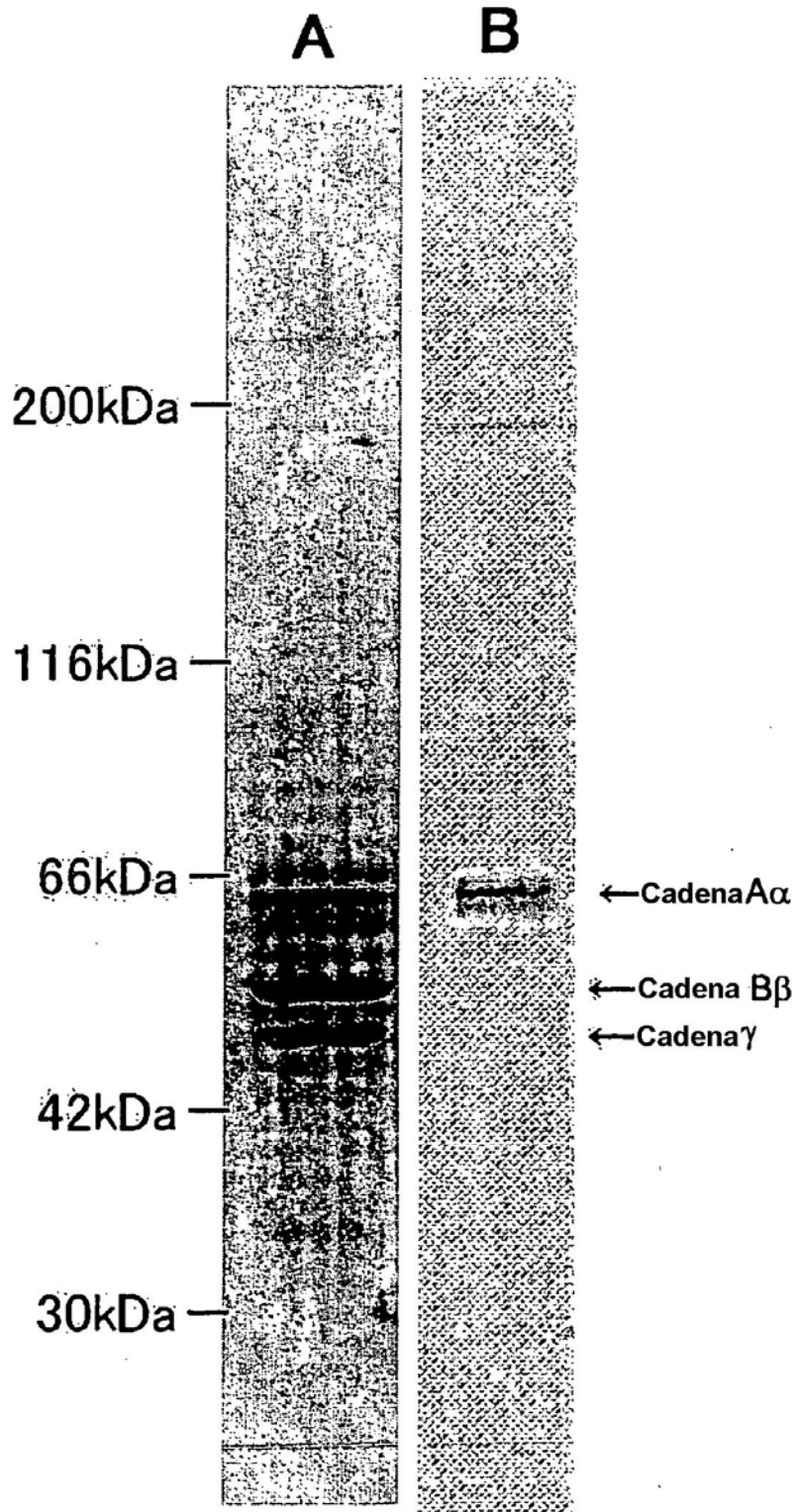


Fig. 2

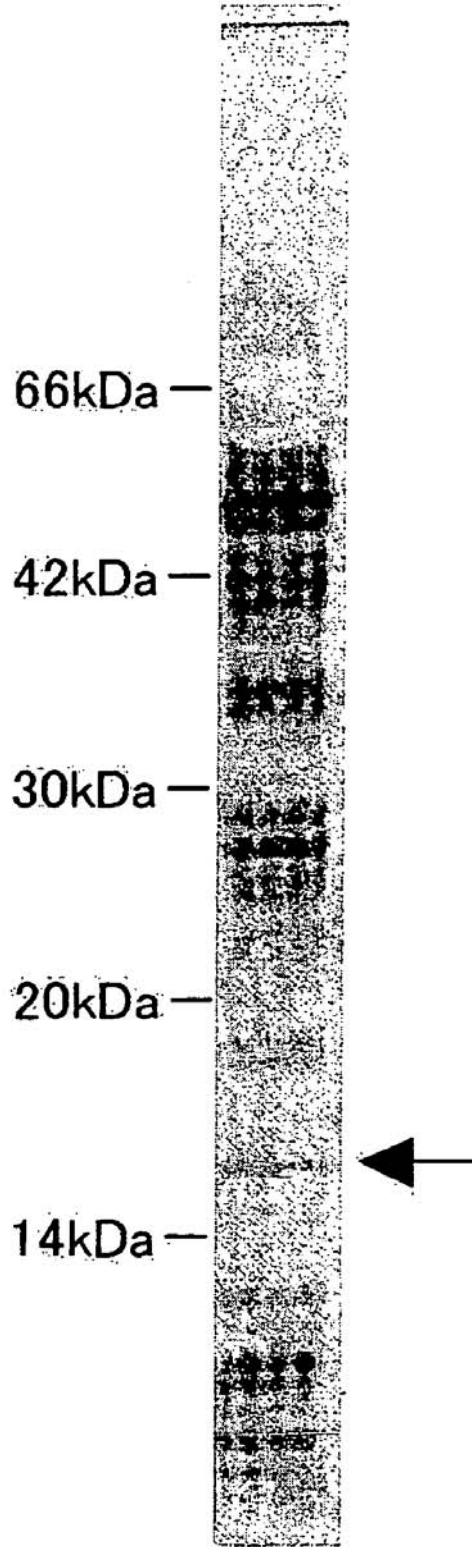


Fig. 3

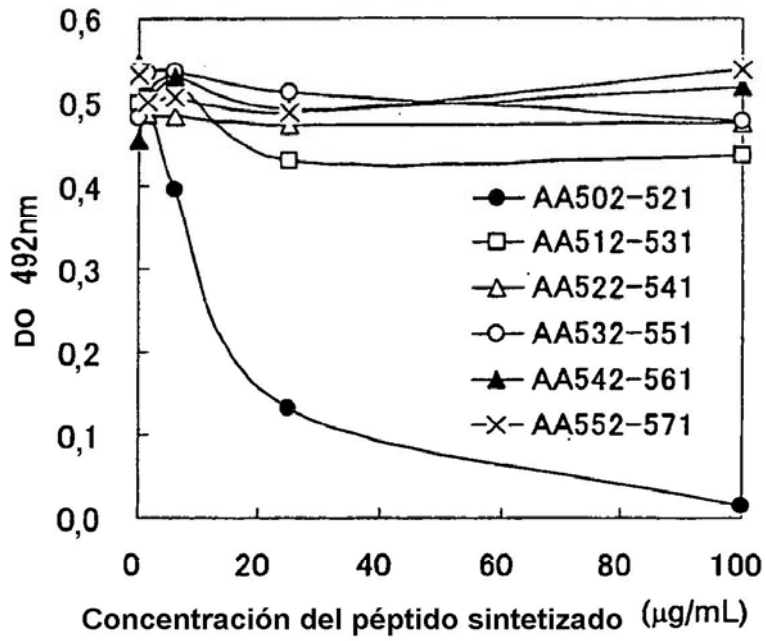


Fig. 4

