

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 203**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011** **E 11175510 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2413144**

54 Título: **Reactivo y kit para ensayar dímero D**

30 Prioridad:

**27.07.2010 JP 2010168521**

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

**09.09.2013**

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)**  
**5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome, Chuo-ku**  
**Kobe-shi Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**NAGAI, KEISUKE;**  
**YAMASHITA, KAZUAKI;**  
**HOSHIKO, SUSUMU y**  
**SUZUKI, TAKESHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 422 203 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**

Reactivo y kit para ensayar dímero D

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un reactivo para ensayar dímero D para usar para medir dímero D que es un producto de degradación de fibrina y un kit del reactivo para ensayar dímero D.

**10 Antecedentes**

Se sabe que en el campo de los ensayos de laboratorio clínico, en particular, ensayos fibrinolíticos de coagulación de la sangre, se mide el dímero D. El dímero D es un tipo de marcador molecular de coagulación de la sangre, y es importante medirlo cuando se diagnostiquen diversos tipos de trombosis que potencia el sistema de coagulación/fibrinolítico y DIC (síndrome de coagulación intravascular diseminada), y cuando se obtenga un barómetro para determinar la patología de éstos y valorar los efectos de la curación.

Hay diversos métodos conocidos para medir dímero D y también se comercializan reactivos para ensayar el dímero D. Los reactivos para ensayar el dímero D en los que se sensibiliza un tipo de anticuerpo monoclonal para partículas de vehículo se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa (JP-B) N° 7-46104, Solicitud de Patente Japonesa Abierta (JP-A) N° 2000-1939663, JP-A N° 2006-105633, JP-A N° 2006-234676 y Patente Japonesa N° 3857468.

En el diagnóstico por exclusión de trombosis venosa profunda, se sabe que la medición de la concentración de dímero D es útil (documentos US2004029286 y US2009305301). Específicamente, Sukhu et al. (Lab. Hem. 2008, 30, 200-204) han comparado un ensayo fluorescente ligado a enzima establecido (Vidas®) con la cuantificación de dímero D usando un método inmuno-turbidométrico que incorpora una suspensión de micropartículas de látex recubiertas con dos anticuerpos monoclonales diferentes específicamente dirigidos contra fragmentos de dímero D humanos (STalia® D-DI).

En el caso en el que se establece un valor de punto de corte para la concentración de dímero D y la concentración de dímero D de un sujeto está por debajo del valor del punto de corte, puede determinarse que el sujeto no tiene trombosis venosa profunda. Por lo tanto, existe la necesidad de alta sensibilidad de medición de dímero D en una región de baja densidad para determinar si el sujeto tiene trombosis venosa profunda.

En el pasado, la concentración de un anticuerpo para dímero D en un reactivo de ensayo se ha mejorado o se ha añadido un sensibilizador al reactivo para mejorar la sensibilidad de medición de dímero D. Sin embargo, estos procedimientos han provocado problemas en los que el fondo aumenta y se espesa una solución de reacción y se forma espuma.

**40 Sumario de la invención**

El alcance de la presente invención se define solamente por las reivindicaciones adjuntas, y no está afectada en ningún grado por las declaraciones dentro de este sumario.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un reactivo capaz de ensayar dímero D en una región de baja densidad con alta sensibilidad sin aumentar la concentración de un anticuerpo para dímero D en un reactivo de ensayo o añadir un sensibilizador al reactivo y un kit de reactivo.

Los presentes inventores se han dedicado al estudio y han descubierto que cuando se usa un reactivo que contiene vehículos sensibilizados para los primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D, la detectabilidad del dímero D mejora en comparación con la de un reactivo convencional sensibilizado para un tipo de anticuerpo y por lo tanto puede medirse dímero D incluso en una región de baja densidad, y han completado la presente invención.

(1) Un primer aspecto de la presente invención es un reactivo para ensayar dímero D, que comprende: partículas de vehículo con las que se conjugan o adsorben el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D; donde el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004 y el segundo anticuerpo monoclonal se selecciona de: un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-968 y un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-969.

(2) El reactivo para ensayar dímero D según (1), donde las partículas de vehículo se sensibilizan individualmente para el primer y segundo anticuerpos monoclonales.

(3) Un segundo aspecto de la presente invención es un kit para ensayar dímero D, que comprende: un primer reactivo que contiene un tampón; y un segundo reactivo que contiene partículas de vehículo conjugadas o adsorbidas en el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D; donde el primer anticuerpo monoclonal reacciona con la fracción X de fibrinógeno, fracción Y de fibrinógeno y dímero D, pero no reacciona con las fracciones D de fibrinógeno y E de fibrinógeno y el segundo anticuerpo monoclonal reacciona con dímero D, pero no reacciona con fracciones X de fibrinógeno, Y de fibrinógeno y E de fibrinógeno; y donde el primer reactivo contiene además el primer anticuerpo monoclonal.

(4) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con (3), donde el primer reactivo contiene un anticuerpo que reacciona con fracción X, fracción Y de fibrinógeno y dímero D, pero no reacciona con fracciones D y E de fibrinógeno.

(5) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con (3) o (4), donde las partículas de vehículo se conjugan individualmente o se adsorben con el primero y segundo anticuerpos monoclonales.

(6) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con uno cualquiera de (3) a (5), donde el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004.

(7) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con uno cualquiera de (3) a (6), donde el segundo anticuerpo monoclonal no reacciona con fracción D de fibrinógeno.

(8) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con uno cualquiera de (3) a (6), donde el segundo anticuerpo monoclonal reacciona con fracción D de fibrinógeno.

(9) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con uno cualquiera de (3) a (7), donde el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-968.

(10) El kit para ensayar dímero D de acuerdo con uno cualquiera de (3) a (6) u (8), donde el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por el hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-969.

De acuerdo con el reactivo y el kit de la presente invención, es posible medir dímero D en una muestra incluso en una región de baja densidad que ha sido difícil medir con un reactivo convencional para ensayar dímero D con alta sensibilidad.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra diferencias de reactividad entre anticuerpo DD-M1653, anticuerpo DD-M1039 y anticuerpo DD-M46 con los productos de degradación de fibrina/fibrinógeno;

la Figura 2 es un gráfico que muestra la variación de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 800 nm cuando se mide un patrón de referencia de dímero D usando cada uno de los segundos reactivos de los Ejemplos 1 a 3 y los ejemplos Comparativos 1 y 2; y

la Figura 3 es un gráfico que muestra la variación de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 800 nm cuando se mide un patrón de referencia de dímero D usando cada uno de los segundos reactivos de los Ejemplos 4 a 6 y los ejemplos Comparativos 3 y 4.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos.

La presente solicitud proporciona un reactivo y un kit para ensayar dímero D.

La expresión "dímero D" es un producto de degradación de fibrina que se obtiene cuando una fibrina estabilizada, que es un polímero que se forma cuando el fibrinógeno en sangre coagula debido a los efectos de una enzima tal como trombina, se degrada por una enzima tal como plasmina.

El dímero D también se conoce como un nombre genérico para fracciones DD/E o multímeros de las fracciones DD/E en la técnica. Los ejemplos conocidos de los multímeros de las fracciones DD/E incluyen fracciones DXD/YY (trímeros de fracciones DD/E), fracciones YXY/DXXD (pentámeros de fracciones DD/E) y fracciones DXXD/YXXY (heptámeros de fracciones DD/E). En la técnica, el dímero D y los multímeros de las fracciones DD/E se denominan de forma colectiva "fracción XDP".

En la técnica, se sabe que una enzima, tal como plasmina degrada fibrinógeno presente en la sangre. Cuando el fibrinógeno se degrada por una enzima (por ejemplo plasmina), se producen productos de degradación de fibrinógeno tales como fracciones D, E, X y Y (es decir, elementos constituyentes de las fracciones DD/E). Por lo tanto, el dímero D producido por degradación de la fibrina estabilizada y un producto de degradación de fibrinógeno producido por degradación de fibrinógeno se mezclan en la sangre de un paciente con trombosis.

La expresión "fracción molecular alta de dímero D" en el presente documento significa un producto de degradación

de fibrina obtenido degradando la fibrina estabilizada por una enzima, tal como plasmina durante un tiempo corto. Los ejemplos de la fracción molecular alta de dímero D incluyen productos de degradación de fibrina obtenidos degradando la fibrina estabilizada por plasmina durante 0,25 horas a 4 horas, preferentemente durante 0,25 horas a 2 horas.

5 La expresión "fracción molecular baja de dímero D" en el presente documento significa un producto de degradación de fibrina obtenido degradando la fibrina estabilizada por una enzima, tal como plasmina durante un tiempo largo. Los ejemplos de la fracción molecular baja de dímero D incluyen productos de degradación de fibrina obtenidos degradando la fibrina estabilizada por plasmina durante 10 a 30 horas, preferentemente durante 15 a 25 horas.

10 Los anticuerpos para usar para el kit de la presente invención son dos tipos de anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D como se detalla posteriormente. En lo sucesivo en el presente documento, uno de los anticuerpos monoclonales se denomina "primer anticuerpo monoclonal" y el otro se denomina "segundo anticuerpo monoclonal". Los anticuerpos proporcionados en el kit son un primer anticuerpo monoclonal que reacciona con fracciones moleculares altas y bajas de dímero D y un segundo anticuerpo monoclonal que reacciona con la fracción molecular alta, pero tiene reactividad con la fracción molecular baja que es diferente de la del primer anticuerpo monoclonal; además el primer anticuerpo monoclonal para usar para el kit de la presente invención es un anticuerpo que reacciona con fracción X, fracción Y y dímero D, pero no reacciona con fracción D y fracción E y el segundo anticuerpo monoclonal para usar para el kit de la presente invención es un anticuerpo que reacciona con dímero D, pero no reacciona con fracción X, fracción Y y fracción D. El segundo anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo que reacciona con fracción D o un anticuerpo que no reacciona con fracción D.

25 El primer y segundo anticuerpos monoclonales pueden derivar de cualquier mamífero, tal como ratones, ratas, hámsteres, conejos, cabras y caballos. Entre ellos, se prefieren los ratones. El isotipo de los anticuerpos puede ser cualquiera de IgG, IgM, IgE e IgA. Los anticuerpos contienen fragmentos de anticuerpo y los derivados de los mismos. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen fragmentos Fab y fragmentos F(ab')<sub>2</sub>.

30 El primer y segundo anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por cualquier procedimiento inmunológico en la técnica. Es decir, un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal puede obtenerse mezclando de forma arbitraria dímero D como un antígeno con un adyuvante, inmunizando un animal con la mezcla y permitiendo que los linfocitos B derivados del animal se fusionen con diversos tipos de células de mieloma.

35 Específicamente, el primer y segundo anticuerpos monoclonales que se usan para el reactivo de la presente invención pueden obtenerse de la siguiente manera.

(Obtención del antígeno)

40 El dímero D para usar como un antígeno puede obtenerse haciendo reaccionar una enzima capaz de degradar fibrina, como plasmina, con fibrina. Preferentemente, el dímero D contiene una fracción que tiene un peso molecular mayor que el de las fracciones DD/E. Los ejemplos de los mismos incluyen de dímeros a pentámeros de fracciones DD/E. Puede usarse como un antígeno dímero D recombinante obtenido por cualquier procedimiento de ingeniería genética conocido en la técnica basándose en una secuencia de aminoácidos de dímero D.

45 Como para la fibrina que se usa como el material de dímero D, puede usarse fibrina disponible en el mercado o puede usarse fibrina haciendo reaccionar fibrinógeno con trombina, factor XIII y sal cálcica.

(Método de inmunización)

50 Es posible inmunizar a un animal con una solución de antígeno obtenida mezclando arbitrariamente el antígeno obtenido de la manera anterior con un adyuvante y disolviendo o suspendiendo en un tampón adecuado. La concentración del antígeno en la solución de antígeno es preferentemente de aproximadamente 50 a 500 µg/ml. Cuando la inmunogenicidad del antígeno es baja, el antígeno puede unirse de forma arbitraria con proteínas vehículo tales como albúmina y hemocianina de lapa californiana.

55 Con respecto al adyuvante, puede usarse cualquier adyuvante conocido en la técnica. Los ejemplos del adyuvante incluyen adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA), Ribi (MPL), Ribi (TDM), Ribi (MPL y TDM), vacuna de *Pertussis* (vacuna de *Bordetella pertussis*), Muramildipéptido (MPD), adyuvante de Aluminio (ALUMBRE) y combinaciones de los mismos. Una combinación particularmente preferible es que el FCA se use en la inmunización primaria y el FIA y el adyuvante Ribi se usen en refuerzo.

60 El animal para inmunizar puede ser cualquiera de ratones, ratas, hámsteres, caballos, cabras y conejos. Se prefieren ratones y se prefiere más un ratón BALB/c.

65 El método de inmunización puede seleccionarse de forma adecuada dependiendo del tipo de antígeno para usar y la presencia o ausencia del adyuvante. Por ejemplo, cuando se usa un ratón, se inyectan de 0,05 a 1 ml de (antígeno:

10 a 200 µg) una solución de mezcla de adyuvante-antígeno en la cavidad abdominal, bajo la piel, músculo o vena de la cola. El refuerzo se realiza de una a cuatro veces aproximadamente cada 4 a 21 días después de la inmunización primaria. Después de 1 a 4 semanas, se realiza la inmunización final.

5 La inmunización puede realizarse sin usar el adyuvante para la solución de antígeno aumentando la cantidad de antígeno para inyección intraperitoneal. Se recoge sangre y se mide el título de anticuerpo aproximadamente 5 a 10 días después del refuerzo. El título del anticuerpo puede medirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, tal como el ensayo de título de anticuerpo que se describirá posteriormente. De aproximadamente 3 a días  
10 después de la inmunización final, se extrae el bazo del animal inmunizado y las células del bazo se separan para obtener células productoras de anticuerpo.

(Preparación de anticuerpo monoclonal)

15 Puede prepararse un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, tal como un método descrito en Kohler y Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975).

20 Las células de mieloma para usar pueden derivar de cualquiera de ratones, ratas y seres humanos. Los ejemplos de las mismas incluyen células de mieloma establecidas tales como mieloma de ratón P3X63-Ag8, P3X63-Ag8-U1, P3NS1-Ag4, SP2/o-Ag14 y P3X63-Ag8/653. Algunas células de mieloma producen una cadena ligera de inmunoglobulina, y cuando dicha célula de mieloma se usa como un sujeto de fusión, esta cadena ligera puede unirse aleatoriamente con una cadena pesada de inmunoglobulina producida por la célula productora de anticuerpo. En consecuencia, es preferible usar, particularmente, una célula de mieloma que no produce una cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, P3X63-Ag8/653 o SP2/o-Ag14. Las células productoras de anticuerpo y células de mieloma derivan preferentemente de los mismos animales, particularmente animales endogámicos.

25 El método para producir una hibridoma fusionando la célula productora de anticuerpos con la célula de mieloma no está particularmente limitado. Los ejemplos de los mismos incluyen un método de uso de polietilenglicol (PEG), un método de uso de virus Sendai, y un método de uso de un aparato de fusión eléctrica. En el método de PEG, las células del bazo y células de mieloma pueden suspenderse en una relación de mezcla de 1:1 a 10:1, preferentemente 5:1 a 10:1 en un medio adecuado o tampón que contiene PEG de aproximadamente 30 a 60%  
30 (peso molecular medio: 1000 a 6000) y después incubarse durante aproximadamente 30 segundos a 3 minutos en las condiciones de una temperatura de aproximadamente 25 a 37 °C y pH de 6 a 8. Después de finalizarse la incubación, las células se lavan para retirar la solución de PEG, se suspenden de nuevo en el medio, después se siembran en una placa de microtitulación y se continúan cultivando.

35 Puede seleccionarse un hibridoma cultivando las células fusionadas de la manera anterior en un medio selectivo. El medio selectivo puede ser un medio de cultivo en el que solamente pueden aumentar las células fusionadas. Por ejemplo, se usa un medio de cultivo de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). Se inicia la selección del hibridoma cambiando una parte del medio, preferentemente aproximadamente la mitad del medio, con el medio selectivo, habitualmente de 1 a 7 días después del procedimiento de fusión, cultivando mientras se intercambia el medio cada  
40 2 a 3 días de la misma manera que se ha descrito anteriormente, seleccionando después pocillos en los que crecen colonias de hibridoma por observaciones microscópicas.

45 La presencia de anticuerpo deseado en el hibridoma obtenido de este modo puede confirmarse recogiendo un sobrenadante de cultivo del hibridoma y realizando ensayo de título de anticuerpo. El ensayo de título de anticuerpo puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede detectarse por un proceso de adición de un sobrenadante de cultivo diluido en serie a una proteína de antígeno inmovilizada en una fase sólida y haciendo reaccionar el producto resultante con un segundo anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo antiglobulina, anticuerpo anti-IgG y anticuerpo anti-IgM) marcado con una sustancia fluorescente, una enzima o un radioisótopo (RI).  
50

El hibridoma en el que se ha confirmado producción de anticuerpo deseado por el ensayo de título de anticuerpo puede separarse en monoclonales por dilución limitante, ensayo de agar blando, ensayo de separación de células excitadas por fluorescencia, o similares. Por ejemplo, en el caso de la dilución limitante, el hibridoma que produce un anticuerpo diana puede aislarse cultivando una colonia de hibridoma por dilución en serie en un medio de cultivo a una concentración de 1 célula/pocillo.  
55

Puede seleccionarse de forma adecuada un método para obtener un anticuerpo monoclonal de un hibridoma de acuerdo con el requisito de un anticuerpo monoclonal y características de un hibridoma. Los ejemplos de los mismos incluyen un método para obtener un anticuerpo monoclonal de líquido ascítico de un ratón al que se ha trasplantado el hibridoma y un método para obtener un anticuerpo monoclonal de un sobrenadante de cultivo preparado cultivando células. En el caso en el que use un hibridoma que puede proliferar en la cavidad intraperitoneal del ratón, puede obtenerse una alta concentración (varios mg/ml) de anticuerpo monoclonal del fluido peritoneal. En el caso de un hibridoma que no puede proliferar *in vivo*, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal del sobrenadante de cultivo de un cultivo celular. En este caso, aunque el anticuerpo monoclonal se obtiene a un rendimiento menor, el anticuerpo está menos contaminado con inmunoglobulina e impurezas, y el anticuerpo puede purificarse fácilmente.  
60  
65

En el caso en que se obtenga un anticuerpo de la cavidad peritoneal del ratón en la que se ha trasplantado un hibridoma, se recoge líquido peritoneal almacenado de aproximadamente 1 semana a 3 semanas después de que se hayan trasplantado los hibridomas (aproximadamente 106 células o más) a la cavidad peritoneal de ratón BALB/c con un agente inmunosupresor tal como pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) previamente administrado. En el caso de implantación de hibridoma heterólogo, se usan preferentemente un ratón desnudo y un ratón irradiado.

Por otro lado, en caso de que se recoja un anticuerpo de un sobrenadante de cultivo celular, el hibridoma se cultiva por un método de cultivo tal como el método de cultivo de alta densidad y el método de cultivo en matraz de agitación, además del método de cultivo estacionario que se usa para mantener células y se obtiene un sobrenadante de cultivo que contiene un anticuerpo. La adición de suero a un medio de cultivo provoca que el medio contenga impurezas tales como otros anticuerpos y albúmina, dando como resultado un procedimiento de purificación de anticuerpo frecuentemente complicado. Por lo tanto, es deseable reducir la cantidad de suero para añadir al medio de cultivo. Es más preferible naturalizar un hibridoma a un medio sin suero según el método habitual y cultivar con el medio sin suero. Este proceso permite la purificación fácil de anticuerpo.

Un anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir de fluido peritoneal o sobrenadante de cultivo por métodos conocidos tales como el fraccionamiento por precipitación de proteínas con sulfato de amonio o sulfato sódico, fraccionamiento con polietilenglicol, fraccionamiento con etanol, cromatografía de intercambio iónico DEAE y cromatografía de filtración en gel.

Cuando un anticuerpo monoclonal diana es un IgG de ratón, el anticuerpo puede purificarse por cromatografía de afinidad usando un vehículo unido a proteína A o un vehículo unido a inmunoglobulina anti-ratón.

Los ejemplos del primer anticuerpo monoclonal para usar para el segundo reactivo del kit de la presente invención incluyen un anticuerpo de ratón producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004 (también denominado en el presente documento en lo sucesivo "anticuerpo DD-M1653").

Los ejemplos del segundo anticuerpo monoclonal para usar para el kit de la presente invención incluyen anticuerpos de ratón producidos por hibridomas depositados en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con los números de referencia NITE BP-968 y NITE BP-969 el 23 de julio de 2010 (en lo sucesivo en el presente documento denominados "anticuerpo DD-M1039" y "anticuerpo DD-M46", respectivamente).

La relación de concentración del primer y segundo anticuerpos monoclonales en el reactivo del kit para ensayar dímero D de la presente invención no está particularmente limitada, por ejemplo, puede seleccionarse de forma adecuada del intervalo de 9:1 a 1:9.

El kit y reactivo para ensayar dímero D de la presente invención incluye partículas de vehículo con las que se conjugan o adsorben el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D. Los ejemplos del vehículo incluyen un compuesto de polímero orgánico, un compuesto inorgánico, y glóbulos rojos. Los ejemplos del compuesto polimérico orgánico incluyen agarosa insoluble, dextrano insoluble, celulosa, látex, poliestireno, un copolímero de estireno-ácido metacrílico, un copolímero de estireno-glicidil(met)acrilato, un copolímero de estireno-sulfonato de estireno, un polímero de ácido metacrílico, un polímero de ácido acrílico, un copolímero de acrilonitrilo-butadieno-estireno, un copolímero de cloruro de vinilo-éster acrílico, y acrilato de polivinil acetato. Los ejemplos del compuesto inorgánico incluyen silicio y alúmina.

La forma del vehículo no está particularmente limitada y puede ser cualquier forma, tal como una forma esférica y una forma plana. En el caso de la forma esférica, el diámetro medio de las partículas puede seleccionarse de forma adecuada mediante una máquina de medición y un intervalo adecuado es habitualmente de 0,05 a 0,5  $\mu\text{m}$ . Como material de las partículas, se prefiere particularmente látex.

Como método para sensibilizar el primer y segundo anticuerpos monoclonales para los vehículos, puede usarse un método de adsorción física o un método de conjugación química, conocidos en la técnica. Puesto que la operación de soporte es sencilla, se prefiere el método de adsorción física.

Cuando los vehículos son partículas, las partículas de vehículo pueden ser partículas de vehículo sensibilizadas tanto para el primer como para el segundo anticuerpos monoclonales o pueden ser una mezcla de partículas de vehículo sensibilizadas para el primer anticuerpo monoclonal y partículas de vehículo sensibilizadas para el segundo anticuerpo monoclonal. Cuando las condiciones de sensibilización del primer y segundo anticuerpos monoclonales son diferentes, es preferible sensibilizar individualmente los anticuerpos para las partículas de vehículo.

Cuando las partículas de vehículo son partículas de látex, es preferible que las partículas de vehículo sensibilizadas para el primer y segundo anticuerpos monoclonales estén suspendidas en un tampón adecuado. En ese caso, la concentración de las partículas de látex en la suspensión es preferentemente de 0,5 a 10 mg/ml, más preferentemente de 0,75 a 1,85 mg/ml. La concentración de los anticuerpos monoclonales en la suspensión es

preferentemente de 0,1 a 10 mg/ml, más preferentemente de 0,5 a 2 mg/ml.

Es preferible que la solución de tampón tenga un efecto tamponante en el intervalo de pH 5 a 10, preferentemente pH 6 a 9. Los ejemplos específicos de la misma incluyen una solución de tampón fosfato, una solución de tampón de imidazol, ácido trietanolamina clorhídrico y una solución de tampón Good. Los ejemplos de la solución de tampón Good incluyen soluciones de tampón tales como MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, Bis-Tris-Propano, ACES, MOPS, MOPSO, BES, TES, HEPES, HEPPS, Tricina, Tris, Bicina y TAPS. Entre ellas, se prefiere MOPSO.

Los tampones anteriores pueden contener aditivos tales como un agente estabilizador de proteínas (por ejemplo, BSA), un antiséptico (por ejemplo, azida sódica y fluoruro de fenilmetanosulfonilo), un ajustador de pH, un sensibilizador (por ejemplo, polivinilpirrolidona, polianión, polietilenglicol y polisacárido), sal mineral (por ejemplo, cloruro sódico y cloruro cálcico) y un inhibidor de fondo (por ejemplo, absorbente de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA)).

La invención proporciona por lo tanto un kit para ensayar dímero D (en lo sucesivo en el presente documento también denominado un kit de reactivo de la presente invención). El kit de reactivo de la presente invención incluye un primer reactivo que contiene un tampón y un segundo reactivo que contiene partículas de vehículo conjugadas o adsorbidas con el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D, más específicamente donde el primer anticuerpo monoclonal reacciona con fracción X de fibrinógeno, fracción Y de fibrinógeno y dímero D, pero no reacciona con fracciones D de fibrinógeno y E de fibrinógeno y el segundo anticuerpo monoclonal reacciona con dímero D, pero no reacciona con fracciones X de fibrinógeno, Y de fibrinógeno y E de fibrinógeno. El kit de la invención se caracteriza adicionalmente porque el primer reactivo contiene además el primer anticuerpo monoclonal.

El kit de reactivo de la presente invención es un kit de reactivo para detectar dímero D en una muestra por inmunoensayo, ensayo para reacción, por ejemplo, de partículas de látex sensibilizadas para el primer y segundo anticuerpos monoclonales con dímero D en la muestra biológica (aglutinación de látex) o similares.

La forma del kit de reactivo de la presente invención es un kit de tipo dos reactivos compuesto del primer y segundo reactivos como se ha descrito anteriormente, sin embargo, puede ser un kit de tipo un reactivo compuesto de un reactivo. Desde el punto de vista de la precisión de medición, la forma del kit de reactivo es preferentemente un kit de tipo dos reactivos compuesto del primer y segundo reactivos. En una realización más preferible, el kit de reactivo de la presente invención incluye el primer reactivo que contiene un tampón y el segundo reactivo compuesto del reactivo para ensayar dímero D de la presente invención.

Un tampón contenido en el primer reactivo que configura el kit de reactivo de la presente invención incluye un tampón similar a un tampón que puede usarse para suspender partículas de vehículo en el reactivo de la presente invención. El primer reactivo puede contener aditivos tales como el estabilizador proteico, un antiséptico, un ajustador de pH, un agente radiosensibilizador, y una sal mineral como se ha descrito anteriormente.

El primer reactivo anterior contiene por lo tanto un anticuerpo que reacciona con dímero D. Los ejemplos del anticuerpo incluyen el primer anticuerpo monoclonal y/o el segundo anticuerpo monoclonal contenido en el reactivo anterior de la presente invención. El anticuerpo contenido en el primer reactivo es preferentemente el primer anticuerpo monoclonal, más preferentemente anticuerpo DD-M1653. La concentración del anticuerpo monoclonal en el primer reactivo es preferentemente de 1 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente de 5 a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Un anticuerpo que tiene reactividad para dímero D así como reactividad para la fracción que tiene una estructura similar al dímero D, tal como fracción X y/o fracción Y se incluye en el anticuerpo monoclonal contenido en el primer reactivo. Incluso si están presentes en una muestra de ensayo fracciones X y Y, es decir, componentes que tienen una estructura similar a dímero D, el anticuerpo monoclonal en el primer reactivo se une a esas fracciones añadiendo el anticuerpo monoclonal que tiene dicha reactividad para el primer reactivo. Por lo tanto, se considera que la reactividad entre el anticuerpo monoclonal sensibilizado para vehículos en el segundo reactivo se añade posteriormente y esas fracciones se suprimen. Esto se considera porque las fracciones X y Y tienen solamente un sitio reactivo para el anticuerpo monoclonal, mientras que el dímero D tiene una pluralidad de sitios reactivos para el anticuerpo monoclonal. En consecuencia, el dímero D para medir puede reaccionar con alta especificidad al anticuerpo monoclonal sensibilizado para los vehículos, permitiendo de este modo una medición más precisa de la concentración de dímero D.

La solicitud proporciona además un reactivo para ensayar dímero D, que comprende:

partículas de vehículo con las que se conjugan o adsorben el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D; donde el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004 y el segundo anticuerpo monoclonal se selecciona de: un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-968 y un

anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-969.

5 En realizaciones particulares del reactivo de la invención, las partículas de vehículo se conjugan o adsorben individualmente en el primer y segundo anticuerpos monoclonales.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá específicamente un método para ensayar dímero D en una muestra biológica usando un kit para ensayar dímero D de la presente invención.

10 En primer lugar, el primer reactivo que contiene un tampón se mezcla con una muestra biológica, que se incubaba. Aquí los ejemplos de la muestra biológica incluyen suero, plasma y orina. La relación de capacidad cuando se mezcla el primer reactivo con la muestra biológica puede ser de aproximadamente 5:1 a 50:1. El tiempo de incubación puede ser de aproximadamente 1 a 10 minutos.

15 Posteriormente, el segundo reactivo que contiene partículas de vehículo sensibilizadas para el primer y el segundo anticuerpos monoclonales que tienen diferente reactividad para dímero D se añade a una mezcla del primer reactivo y la muestra biológica. La relación de capacidad cuando se mezcla la mezcla con el segundo reactivo puede ser de aproximadamente 1:0,05 a 1:1,5.

20 Cuando se añade y mezcla el segundo reactivo, se provoca agregación de partículas de vehículo en el segundo reactivo y dímero D por una reacción antígeno-anticuerpo. El nivel de agregación se mide como la variación de absorbancia por minuto. La medición se realiza preferentemente con un aparato óptico capaz de medir la intensidad de luz dispersada, absorbancia o intensidad de luz transmitida. La longitud de onda de la medición puede seleccionarse de forma adecuada del intervalo de 300 a 2400 nm, preferentemente el intervalo de 400 a 1200 nm,  
25 más preferentemente el intervalo de 600 a 1000 nm.

La concentración y/o cantidad de dímero D en la muestra biológica puede calcularse a partir de la variación de absorbancia medida usando una curva de calibración obtenida midiendo un material de referencia de dímero de D de concentración conocida.

30 El kit de reactivo de la presente invención puede utilizarse para un método para mezclar el primer reactivo con el segundo reactivo, añadir una muestra biológica a una mezcla de ambos reactivos, y medir ópticamente el nivel de agregación de partículas de vehículos.

35 EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, la presente invención se describirá en detalle. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a las siguientes realizaciones.

40 1. Confirmación de la reactividad de anticuerpos por método de inmunoprecipitación

Se examinaron las diferencias de reactividad entre anticuerpos para los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina por el siguiente método de inmunoprecipitación usando anticuerpo DD-M1653 como el primer anticuerpo monoclonal y anticuerpos DD-M1039 y DD-M46 como el segundo anticuerpo monoclonal.

45 Se hizo reaccionar un producto de degradación de fibrina (dímero D) y productos de degradación de fibrinógeno (fracciones X, Y, D y E) con anticuerpos, y después se adsorbió un producto de reacción de antígeno-anticuerpo con anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra-sepharose 4B. El sepharose 4B que tiene el producto de reacción antígeno-anticuerpo adsorbido se lavó con un líquido de limpieza (NaPB 10 mM (pH 7,0)), seguido de liberación de los antígenos conjugados en un diluyente para muestra para electroforesis SDS (glicerol 10%, SDS 2%, BPB 0,01% que contiene Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8)). Los antígenos liberados se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y se sumergieron en un tampón de transcripción (tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,02%, metanol 20% (pH 8,3)) a 1000 V durante 1 hora para transferirse a una membrana de PVDF (Bio-rad). La membrana de PVDF transferida se bloqueó con un tampón de bloqueo (leche desnatada al 5% que contiene NaPB 10 mM (pH 0,7)).  
50 Después, se sumergió la membrana de PVDF en una solución de anticuerpo policlonal de conejo anti-fibrinógeno diluida a 0,1 mg/ml con la leche desnatada al 5% que contenía NaPB 10 mM (pH 0,7), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 3 horas. La membrana de PVDF se lavó con un líquido de limpieza. Después, la membrana de PVDF se sumergió en POD marcado con anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo (DAKO) que se había diluido 500 veces con leche desnatada al 2% que contenía NaPB 10 mM (pH 0,7), seguido de reacción a  
55 temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana de PVDF se lavó con un líquido de limpieza y se desarrolló usando 4-cloro-1-naftol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bio-rad) para detectar los antígenos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	DD-M1653	DD-M1039	DD-M46
Fracción X	+	-	-



Fracción Y	+	-	-
Fracción D	-	-	W
Fracción E	-	-	-
Dímero D	+	+	+

En la Tabla 1, la marca “+” indica que cada anticuerpo reacciona con cada fracción, la marca “-” indica que cada anticuerpo no reacciona con cada fracción, y la marca “w” indica que cada anticuerpo reacciona ligeramente con cada fracción.

5 A partir de la Tabla 1, se ha descubierto que el anticuerpo DD-M1653 reacciona con fracción X, fracción Y y dímero D, pero no reacciona con fracciones D y E. Además, se ha descubierto que el anticuerpo DD-1039 y el anticuerpo DD-M46 reaccionan con el dímero D, pero no reaccionan con las fracciones X, Y y E.

## 10 2. Preparación de reactivo para ensayar dímero D y kit de reactivo

### (1) Preparación de fracciones moleculares altas y bajas de dímero D

15 Se disolvió fibrinógeno humano (Fibrinógeno Humano con Plasminógeno Agotado; Enzyme Research Lab) en Tampón TRIS 0,05 M (pH 7,4) a una concentración de 6,62 mg/ml, seguido de adición de cloruro cálcico (concentración final: 25 mM), trombina humana (2 U/ml) y factor XIII (concentración final; 10 µg/ml, Fibrogammin P; Aventis Pharma Limited) a la solución resultante. El fibrinógeno se convirtió en fibrina por incubación a 37 °C durante 18 horas.

20 Los bloques de fibrina formados en cada solución de reacción se lavaron agitando en 300 ml de tampón TRIS 0,05 M durante aproximadamente 1 hora. Los bloques de fibrina lavados se separaron con una cuchilla, que se resuspendió en 3,5 ml (para fracción molecular alta) y 1,5 ml (para fracción molecular baja) de tampón TRIS 0,05 M. Se añadió plasmina a cada una de las suspensiones a una concentración final de 25 mU/ml y se hizo reaccionar con agitación a 37 °C.

25 0,75 horas después, se añadió aprotinina a la solución de reacción para la fracción molecular alta a una concentración final de 1000 U/ml para detener la reacción de degradación. El producto resultante se filtró con un filtro de 5 µm para obtener una fracción molecular alta de dímero D (digestión de 0,75 horas de fibrina con plasmina).  
30 20 horas después de la adición de plasmina, se añadió aprotinina a la solución de reacción para la fracción molecular baja a una concentración final de 1000 U/ml para detener la reacción de degradación. El producto resultante se filtró con un filtro de 5 µm para obtener una fracción molecular baja de dímero D (digestión de 20 horas de fibrina con plasmina).

### (2) Preparación de reactivo para ensayar dímero D

#### 35 (2-1) Preparación del primer reactivo

Se añadió anticuerpo DD-M1653 a un tampón preparado mezclando cada reactivo a concentraciones finales mostradas en la Tabla 2 para tener una concentración final de 10 µg/ml, que se mezcló. El líquido mezclado  
40 preparado de este modo se ajustó a pH 7,1 con hidróxido sódico acuoso 1 M y se diluyó a 1 litro con agua ultrapura, dando como resultado la producción de un primer reactivo que contenía un tampón.

[Tabla 2]

Reactivo	Concentración final	Fabricante
MOPSO	75,5 mM	DOJINDO Laboratories
Cloruro sódico	0,677 M	MANAc Incorporated.
Azida sódica	0,10%	Kishida Chemical Co., Ltd.
BSA	1,5%	PROLIAN Inc.
Agua ultrapura	Cantidad adecuada	

45 (2-2) Preparación de reactivo para ensayar dímero D que contiene partículas de vehículo sensibilizadas para anticuerpos

#### (2-2-1) Conversión de anticuerpo a F(ab')<sub>2</sub>

50 (i) Conversión de anticuerpo DD-M1653 a F(ab')<sub>2</sub>

Se mezcló pepsina (aproximadamente 3500 unidades/mg de prot.) (SIGMA) y anticuerpo DD-M1653 en una solución de tampón citrato 50 mM (pH 3,7) a una relación en peso de 1:20 y se permitió que la mezcla reposara a 37 °C durante 1 hora. Se añadió una solución tris 3 M a la mezcla para ajustar el pH a 8,0 y se preparó una solución mezclada.

Se situó una columna cargada con Superdex 200 pg (GE Healthcare) en un sistema AKTA prime plus (GE Healthcare) y la columna se equilibró con un tampón de equilibrado (ácido 3,3-dimetil glutámico 3,3 mM que contenía tris(hidroximetil)amino metano 3,3 mM).

Pasando el tampón de equilibrado a través de una columna a un caudal de 1 ml/min, se aplicó una centésima o menos del volumen del gel de la solución mezclada anterior al mismo, y se inició inmediatamente el fraccionamiento del eluyente de columna. Se recogió un volumen de hasta aproximadamente 1,5 veces el volumen del gel y se recuperaron colectivamente los picos basándose en la absorbancia de la solución obtenida. La absorbancia de la solución recuperada se midió para calcular la concentración del anticuerpo.

#### (ii) Conversión de anticuerpo DD-M1039 a F(ab')<sub>2</sub>

Se disolvieron papaína (aproximadamente 2,8 unidades) (SIGMA) y L-cisteína, a concentraciones finales de 2 mg/ml y 6,1 mg/ml, respectivamente en un tampón de ácido acético 0,1 M (pH 5,5)/EDTA 3 mM (en lo sucesivo en el presente documento denominado tampón de ácido acético). La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La solución de reacción se convirtió a un tampón de ácido acético usando un tubo de centrifuga de ultrafiltración (Amicon YM-5) (correspondiente a un peso molecular de punto de corte de 10.000); Millipore). La concentración de papaína se determinó a partir de la absorbancia de la solución obtenida. El anticuerpo DD-M1039 se disolvió en la solución de modo que el peso de papaína fuera un veinteavo del anticuerpo. Después se incubó la solución resultante a 37 °C durante 30 minutos, seguido de adición de yodoacetamida a la solución de reacción obtenida a una concentración de 30 mM.

Se situó una columna cargada con 200 pg de Superdex (GE Healthcare) en un sistema AKTA prime plus (GE Healthcare) y la columna se equilibró con un tampón de equilibrado (ácido 3,3-dimetil glutámico 3,3 mM que contenía tris(hidroximetil)amino metano 3,3 mM).

Mientras se pasaba el tampón de equilibrado a través de una columna a un caudal de 1 ml/min, se aplicó al mismo una centésima o menos del volumen de gel de la solución mezclada anterior, y se inició inmediatamente el fraccionamiento del eluyente de columna. Se recogió un volumen de hasta aproximadamente 1,5 veces el volumen del gel y se recuperaron colectivamente los picos basándose en la absorbancia de la solución obtenida. La absorbancia de la solución recuperada se midió para calcular la concentración del anticuerpo.

#### (iii) Conversión de anticuerpo DD-M46 a F(ab')<sub>2</sub>

Se realizó conversión del anticuerpo DD-M46 a F(ab')<sub>2</sub> de la misma manera que se describe en (ii) de Conversión de anticuerpo DD-M1039 a F(ab')<sub>2</sub> excepto que se usó anticuerpo DD-M46 en lugar de anticuerpo DD-M1039.

#### (2-2-2) Sensibilización de anticuerpo a partículas de látex

##### (i) Sensibilización de anticuerpo DD-M1653 para partículas de látex

Se mezcló anticuerpo DD-M1653 con una solución de ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico 50 mM/NaCl 150 mM de modo que la concentración final cuando se convirtió anticuerpo DD-M1653 a F(ab')<sub>2</sub> fue de 1,25 mg/ml. Después, la solución mezclada se mezcló con una solución de látex al 25% (relación en peso) (diámetro de partícula de 0,238 µm; SEKISUI MEDICAL CO., LTD.).

Se añadió una solución de ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico 50 mM/solución de NaCl 150 mM/BSA 2%, en una cantidad equivalente, a la mezcla resultante, que se mezcló, seguido de centrifugación a 10 °C y 38400 xg durante 60 minutos. El sobrenadante se retiró y se añadió al precipitado una solución de ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico 50 mM/solución de NaCl 150 mM/BSA 2%/sacarosa 3%, en una cantidad igual a la de sobrenadante.

El líquido mezclado obtenido de este modo se sonicó usando un homogeneizador ultrasónico (fabricado por Otake Seisakusho) en condiciones de enfriamiento en hielo. Además, el producto resultante se sonicó usando un aparato de tratamiento ultrasónico (Dr. Hielscher GmbH UP-200S) en condiciones de enfriamiento en hielo para obtener una suspensión de partículas de látex sensibilizadas para anticuerpo DD-M1653.

##### (ii) Sensibilización de anticuerpo DD-M1039 para partículas de látex

Se mezcló el anticuerpo DD-M1039 con una solución de ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico 50 mM/NaCl

150 mM de modo que la concentración final cuando se convirtió anticuerpo DD-M1039 a F(ab')<sub>2</sub> fue de 1,25 mg/ml. Se preparó una suspensión de partículas de látex sensibilizadas para anticuerpo DD-M1039 del mismo modo que se ha descrito en el (i) anterior de Sensibilización de anticuerpo DD-M1653 para partículas de látex.

5 (iii) Sensibilización de anticuerpo DD-M46 para partículas de látex

Se mezcló el anticuerpo DD-M46 con una solución de ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico 50 mM/NaCl 150 mM de modo que la concentración final cuando el anticuerpo DD-M46 se convirtió a F(ab')<sub>2</sub> fue de 1,56 mg/ml. Se preparó una suspensión de partículas de látex sensibilizadas para anticuerpo DD-M46 de la misma manera que se ha descrito en el (i) anterior de Sensibilización de anticuerpo DD-M1653 para partículas de látex.

(2-2-3) Preparación del segundo reactivo

Se preparó un reactivo para ensayar dímero D que contenía partículas de vehículo sensibilizadas para dos tipos de anticuerpos monoclonales mezclando una suspensión de partículas de látex sensibilizadas para anticuerpo DD-M1653 con una suspensión de partículas de látex sensibilizadas para anticuerpo DD-M1039 o anticuerpo DD-M46. El reactivo para ensayar el dímero D se usó como un segundo reactivo para la siguiente medición.

20 (3) Confirmación de la reactividad de anticuerpos para el dímero D por aglutinación de látex.

Se examinaron las diferencias de reactividad entre anticuerpo DD-M1653, anticuerpo DD-M1039 y anticuerpo DD-M46 para los productos de degradación de fibrina/fibrinógeno por la aglutinación de látex de acuerdo con los siguientes procedimientos.

25 Las fracciones moleculares altas y bajas del dímero D preparadas en el (1) anterior se diluyeron 100 veces con un tampón TBST para producir muestras de ensayo. Se mezclaron 6 µl de las muestras de ensayo con 84 µl del primer reactivo preparado en el (2-1) anterior y se incubaron a 37 °C durante 3 minutos. La reacción de aglutinación de látex se inició mezclando la solución de reacción obtenida con 84 µl de una suspensión de partículas de látex sensibilizadas individualmente para los anticuerpos preparados en el (2-2) anterior. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 800 nm después de 1 minuto y 2 minutos desde el inicio de la reacción usando CS-2000i (SYSMEX CORPORATION). La variación de absorbancia por minuto se determinó a partir de estos resultados de medición. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

35 Como resulta evidente a partir de la Fig. 1, el anticuerpo DD-M1653 reacciona con fracciones moleculares altas y bajas del dímero D. Se descubrió que el anticuerpo DD-M1039 y el anticuerpo DD-M46 reaccionan con la fracción molecular alta de dímero D, pero tienen reactividad con la fracción molecular baja de dímero D que es diferente de la del anticuerpo DD-M1653, y estos anticuerpos tienen reactividad débil con la fracción molecular baja del dímero D en comparación con anticuerpo DD-M1653. Es decir, se descubrió que el anticuerpo DD-M1653, anticuerpo DD-M1039 y anticuerpo DD-M46 tienen reactividad diferente para el dímero D.

40 Por lo tanto, el reactivo para ensayar dímero D preparado en el (2-2) anterior es un reactivo que contiene partículas de vehículo sensibilizadas para el primer y segundo anticuerpos monoclonales que tienen diferente reactividad para el dímero D.

45 3. Examen de la reactividad del reactivo para ensayar dímero D de la presente invención para el dímero D

Se midió un patrón de referencia del dímero D usando el reactivo para ensayar dímero D de la presente invención preparado en el 2 anterior.

50 El reactivo producido en el 2 (2-1) anterior se usó para preparar el primer reactivo. El reactivo producido en el 2 (2-2) anterior se usó para preparar el segundo reactivo. El porcentaje de mezclado (relación en volumen) de la suspensión de partículas de látex para las que se sensibilizan individualmente cada uno de los anticuerpos en el segundo reactivo se muestra en la Tabla 3 posterior. La cantidad total de los anticuerpos en el segundo reactivo es la misma que la de cualquier porcentaje de mezcla de los segundos reactivos.

55

[Tabla 3]

		Ejemplo Comparativo 1	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo Comparativo 2
Porcentaje de mezclado de anticuerpo	<b>DD-M1653</b>	<b>100%</b>	<b>90%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>0%</b>
	<b>DD-M1039</b>	<b>0%</b>	<b>10%</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>

		Ejemplo Comparativo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo Comparativo 4
Porcentaje de mezclado de anticuerpo	<b>DM-1653</b>	<b>100%</b>	<b>90%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>0%</b>
	<b>DD-M46</b>	<b>0%</b>	<b>10%</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>

Se diluyó un patrón de referencia de dímero D NEO (SYSMEX CORPORATION) para preparar una solución de dímero D que tuviera una concentración de 1 µg/ml. La solución se usó como una muestra de ensayo. Se mezclaron 6 µl de la muestra de ensayo y 84 µl del primer reactivo y se incubaron a 37 °C durante 3 minutos. La reacción de aglutinación de látex se inició mezclando la solución de reacción obtenida con 84 µl de cada uno de los segundos reactivos de los Ejemplos 1 a 6 y los ejemplos comparativos 1 a 4. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 800 nm después de 1 minuto y 2 minutos desde el inicio de la reacción usando CS-2000i. Se determinó la variación de absorbancia por minuto a partir de estos resultados de medición. Los resultados se muestran en las Figs. 2 y 3.

Como resulta evidente a partir de las Figs. 2 y 3, los reactivos para ensayar el dímero D de los Ejemplos 1 a 6 tienen alta reactividad para dímero D en comparación con los reactivos de ejemplos Comparativos.

4. Examen de la sensibilidad de medición de reactivo para ensayar dímero D de la presente invención para dímero D en región de baja densidad.

Con respecto a la sensibilidad de medición para dímero D en una región de baja densidad, el reactivo para ensayar dímero D (Ejemplo 1) de la presente invención se comparó con el reactivo convencional para ensayar dímero D (ejemplo Comparativo 1).

Se diluyó un patrón de referencia de dímero D NEO (SYSMEX CORPORATION) para preparar una solución de dímero D que tuviera una concentración de 0,25 µg/ml. La solución se usó como una muestra de ensayo. Se mezclaron e incubaron 6 µl de la muestra de ensayo y 84 µl del primer reactivo preparado en (2-1) del ejemplo Experimental 1 a 37 °C durante 3 minutos. La reacción de aglutinación de látex se inició mezclando la solución de reacción obtenida con 84 µl de cada uno de los segundos reactivos del Ejemplo 1 y el ejemplo Comparativo 1. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 800 nm después de 1 minuto y 2 minutos desde el inicio de la reacción usando CS-2000i. Se determinó la variación de absorbancia por minuto a partir de estos resultados de medición. También se midió una muestra de ensayo (0 µg/ml) que no contenía dímero D de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Se calcularon el valor medio (Media) del valor medido y la desviación típica (DT) en 10 muestras de cada muestra de ensayo. Los límites superior e inferior de la variación del valor medio se calcularon añadiendo el doble de la desviación típica al valor de la media (+2DT) y restando el doble de la desviación típica del valor de la medida (-2DT). Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Muestra	Ejemplo 1		Ejemplo Comparativo 1	
	0 µg/ml	0,25 µg/ml	0 µg/ml	0,25 µg/ml
1	0,0000	0,0007	0,0000	0,0002
2	0,0002	0,0007	0,0000	0,0002
3	0,0001	0,0007	0,0000	0,0002
4	0,0000	0,0010	0,0000	0,0001
5	0,0000	0,0011	0,0000	0,0005
6	0,0000	0,0007	0,0000	0,0001
7	0,0000	0,0008	0,0000	0,0003
8	0,0001	0,0008	0,0000	0,0003
9	0,0001	0,0009	0,0000	0,0001
10	0,0000	0,0008	0,0000	0,0002
Media	0,00005	0,00082	0,00000	0,00022
DT	0,00007	0,00014	0,00000	0,00012
2DT	0,00014	0,00028	0,00000	0,00025

Muestra	Ejemplo 1		Ejemplo Comparativo 1	
	0 µg/ml	0,25 µg/ml	0 µg/ml	0,25 µg/ml
+2DT	0,00019	0,00110	0,00000	0,00047
-2DT	-0,00009	0,00054	0,00000	-0,00003

5 En el reactivo del Ejemplo 1, se descubrió que el valor medio -2DT en 0,25 µg/ml de la muestra de ensayo es mayor que el valor medio +2DT en 0 µg/ml de la muestra de ensayo. Esto muestra que el límite superior de la variación del resultado de medición de 0 µg/ml de la muestra de ensayo no solapa con el límite inferior de la variación del resultado de medición de 0,25 µg/ml de la muestra de ensayo.

10 Por otro lado, en el reactivo del ejemplo Comparativo 1, se descubrió que el valor medio (-2DT) en 0,25 µg/ml de la muestra de ensayo es menor que el valor medio (+2DT) en 0 µg/ml de la muestra de ensayo. Esto muestra que el límite superior de la variación del resultado de medición de 0 µg/ml de la muestra de ensayo puede solapar con el límite inferior de la variación del resultado de medición de 0,25 µg/ml de la muestra de ensayo.

15 Por lo tanto, se ha sugerido que la muestra de ensayo que no contiene dímero D puede distinguirse de la muestra de ensayo que contiene dímero D en una región de baja densidad usando el reactivo del Ejemplo 1, mientras que es imposible distinguir entre las muestras de ensayo usando el reactivo del ejemplo Comparativo 1. Por lo tanto, el reactivo para ensayar dímero D de la presente invención puede medir el dímero D en una región de baja densidad con alta sensibilidad.

**REIVINDICACIONES**

1. Un reactivo para ensayar dímero D, que comprende:

5 partículas de vehículo con las que se conjugan o adsorben el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con el dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D;  
donde el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004 y el segundo anticuerpo monoclonal se selecciona de: un anticuerpo producido por un  
10 hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-968 y un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-969.

15 2. El reactivo para ensayar el dímero D de acuerdo con la reivindicación 1, donde las partículas de vehículo se conjugan o adsorben individualmente con el primer y segundo anticuerpos monoclonales.

3. Un kit para ensayar el dímero D, que comprende:

20 un primer reactivo que contiene un tampón; y  
un segundo reactivo que contiene partículas de vehículo conjugadas o adsorbidas con el primer y segundo anticuerpos monoclonales que reaccionan con el dímero D, pero tienen diferente reactividad para dímero D;  
donde el primer anticuerpo monoclonal reacciona con la fracción X de fibrinógeno, fracción Y de fibrinógeno y dímero D, pero no reacciona con las fracciones D de fibrinógeno y E de fibrinógeno, y el segundo anticuerpo monoclonal reacciona con el dímero D, pero no reacciona con las fracciones X de fibrinógeno, Y de fibrinógeno  
25 y E de fibrinógeno; y  
donde el primer reactivo contiene además el primer anticuerpo monoclonal.

30 4. El kit para ensayar dímero D de acuerdo con la reivindicación 3, donde el primer reactivo contiene un anticuerpo que reacciona con la fracción X, fracción Y de fibrinógeno y dímero D, pero no reacciona con las fracciones D y E de fibrinógeno.

5. El kit de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde las partículas de vehículo se conjugan o adsorben individualmente con el primer y segundo anticuerpos monoclonales.

35 6. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el primer anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada con el número de referencia FERM BP-11393 el 17 de febrero de 2004.

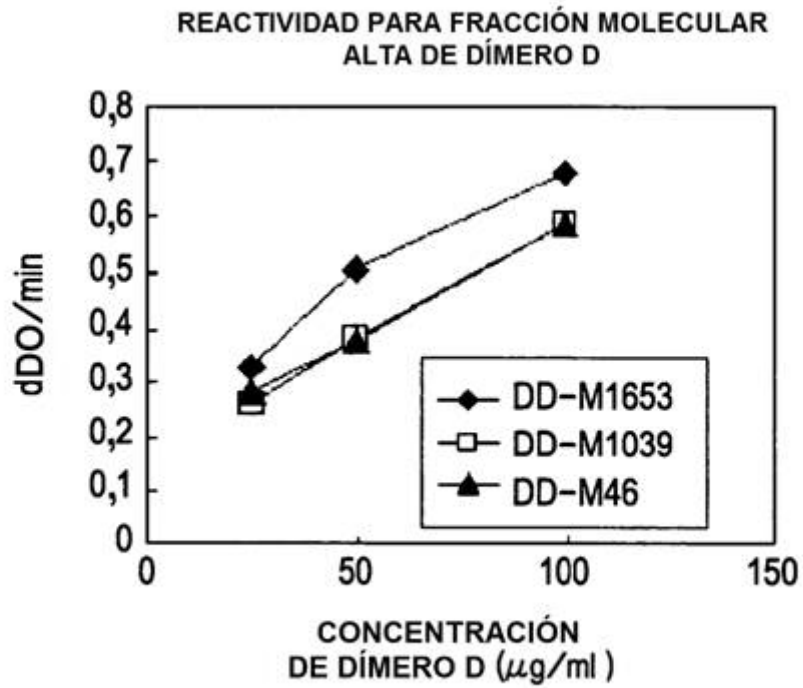
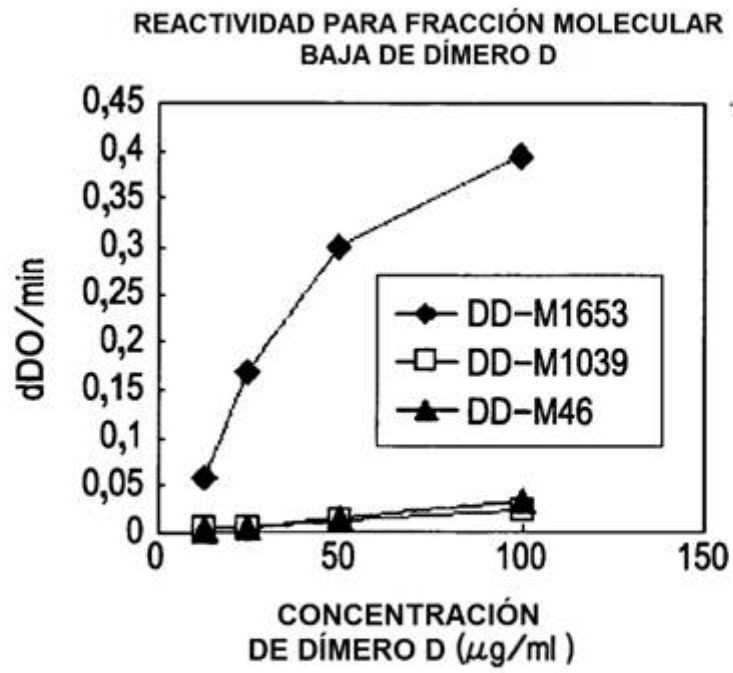
40 7. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el segundo anticuerpo monoclonal no reacciona con la fracción D de fibrinógeno.

8. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el segundo anticuerpo monoclonal reacciona con la fracción D de fibrinógeno.

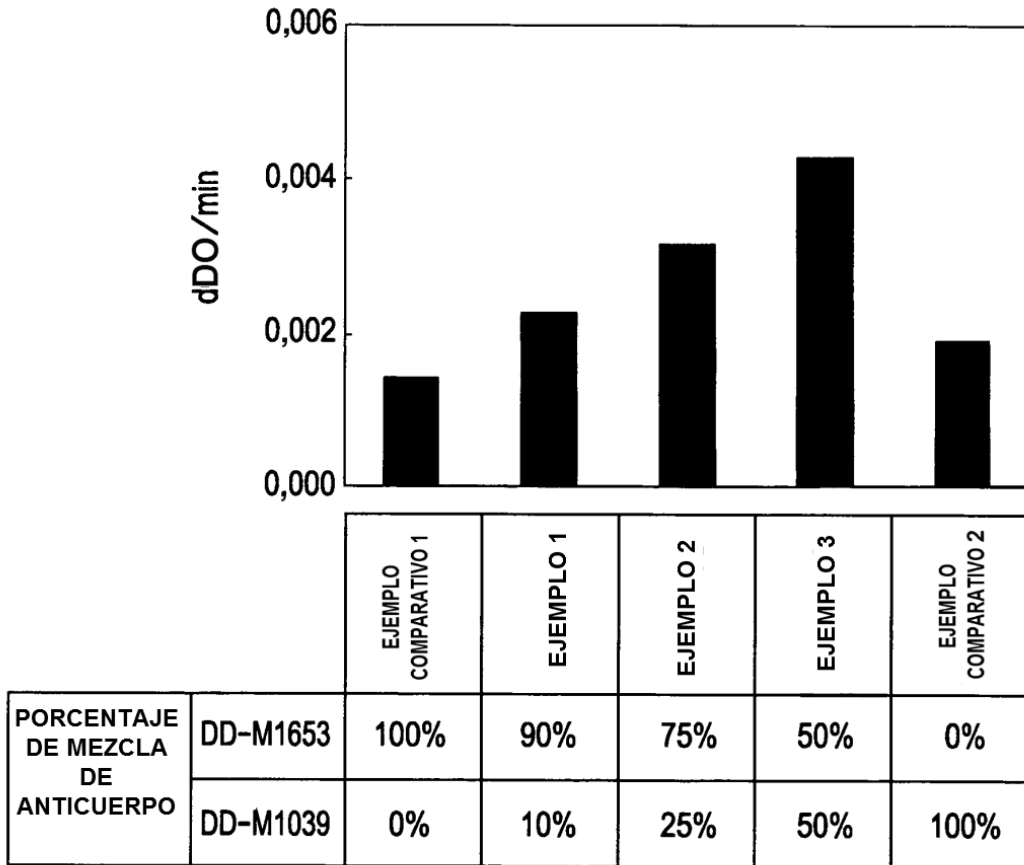
45 9. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-968.

50 10. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 u 8, donde el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación con el número de referencia NITE BP-969.

FIG. 1

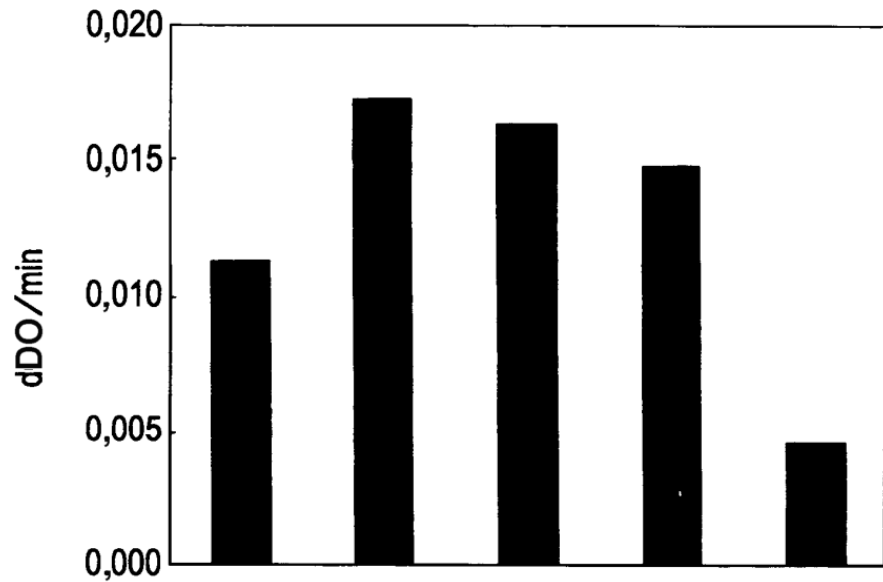


**FIG. 2**





**FIG. 3**



		EJEMPLO COMPARATIVO 3	EJEMPLO 4	EJEMPLO 5	EJEMPLO 6	EJEMPLO COMPARATIVO 4
PORCENTAJE DE MEZCLA DE ANTICUERPO	DD-M1653	100%	90%	75%	50%	0%
	DD-M46	0%	10%	25%	50%	100%