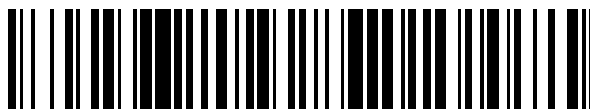


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 099**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2011** **PCT/JP2011/058286**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11125875**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011** **E 11765775 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2554673**

54 Título: **Nuevos anticuerpos monoclonales y procedimiento de análisis inmunológico del dímero D**

30 Prioridad:

01.04.2010 JP 2010084863

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.02.2018

73 Titular/es:

LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP

72 Inventor/es:

NAGAHAMA, YUTAKA;
NOZAKI, JUNKO y
SAKURAI, GEORGE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 099 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

Nuevos anticuerpos monoclonales y procedimiento de análisis inmunológico del dímero D

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales para medir con precisión dímeros D, productos digeridos con plasmina (dímero D) de fibrina estabilizada (en particular, fibrina estabilizada humana), y un procedimiento de análisis inmunológico que usa los mismos anticuerpos.

10 El término "análisis" como se usa en la presente memoria incluye detección para juzgar la presencia o ausencia de una sustancia, y medición para determinar cuantitativa o semicuantitativamente la cantidad o actividad de una sustancia.

15 **Técnica antecedente**

Los productos digeridos de fibrina estabilizada con diversas proteasas son útiles como marcadores de diagnóstico en el diagnóstico clínico. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, productos digeridos con plasmina de fibrina estabilizada (fibrina entrecruzada), es decir, monómero DD/E como unidad básica y sus polímeros (polímeros DD/E
20 tales como DXD/YY, YXY/DXXD y DXXY/YXXD) son ampliamente utilizados como marcadores de diagnóstico para la coagulación intravascular diseminada (DIC). Los productos digeridos con plasmina de fibrina estabilizada se pueden denominar colectivamente, por ejemplo, como dímero D, dímero D-D, complejo DD/E o productos de degradación de fibrina entrecruzada (XDP).

25 Las diversas proteasas también pueden digerir fibrinógeno que está presente en la sangre. Por ejemplo, productos de fibrinógeno digeridos tales como el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, que contienen uno o más dominios D y dominios E en cada una de sus moléculas que son los componentes del dímero D, pueden generarse mediante plasmina. Los productos de fibrinógeno digeridos con plasmina se pueden denominar colectivamente como FgDP.

30 El dímero D generado al digerir la fibrina estabilizada con proteasas, y los productos digeridos de fibrinógeno (FgDP) generados por digestión de fibrinógeno con proteasas a menudo pueden coexistir en la sangre de un paciente con trombosis. Ambos productos digeridos se conocen como FDP (véase la Figura 1).

35 Aunque se consideró que el componente principal del dímero D en el plasma de un paciente con trombosis era una fracción de DD/E con un peso molecular de aproximadamente 230 kDa, recientemente se sabe que los multímeros que tienen pesos moleculares más altos, tales como una fracción de DXD/YY, una fracción de YXY/DXXD y una fracción de DXXY/YXXD, son en realidad los componentes principales (consultar la literatura 1 no relacionada con patentes).

40 En los últimos años, las enfermedades subyacentes que dan como resultado la muerte por trombosis y/o embolia han mostrado una tendencia creciente, y ha estado en curso una prueba de laboratorio clínico para la detección de trombos. En una etapa temprana, se ha utilizado una medición de FDP determinando productos digeridos de fibrina/fibrinógeno en suero usando un anticuerpo policlonal contra fibrinógeno (Fbg) para el diagnóstico de trombosis. Sin embargo, este procedimiento tenía el problema de que a veces mostraba un nivel falsamente alto, debido a una eliminación insuficiente de fibrinógeno.

45 Para resolver este problema, se requirió un reactivo de dímero D que no reacciona con el fibrinógeno y puede medir solo productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D) como el complejo DD/E en paralelo con la medición de FDP.

50 Como un procedimiento para medir el dímero D, por ejemplo, un procedimiento basado en la reacción antígeno-anticuerpo (es decir, un procedimiento de aglutinación de látex o un procedimiento ELISA) en el que un anticuerpo monoclonal que reconoce el dímero D se inmoviliza en una fase sólida tal como partículas de látex o una placa plástica y se conoce el dímero D que se une al anticuerpo monoclonal inmovilizado (literatura 1 de patentes).

55 Sin embargo, en este procedimiento basado en la reacción antígeno-anticuerpo, un anticuerpo monoclonal usado actualmente inmovilizado en la fase sólida no solo reacciona con el dímero D, sino que también reacciona a veces con el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y/o el fragmento E3 que tienen estructuras similares a la del dímero D. Cuando se usan tales anticuerpos monoclonales, el anticuerpo monoclonal inmovilizado en la fase sólida se puede unir a fragmentos distintos del dímero D en el momento de la medición y, por lo tanto, a veces se obtiene un valor inexacto. También se conoce un anticuerpo monoclonal que reacciona con el dímero D a partir del documento US 6.132.719 o el documento WO 2007/013709. Los anticuerpos también son descritos por Doh (2006) Thrombosis Research 118, No. 3, páginas 353-360. Un procedimiento para producir anticuerpos de dímeros D se describe en el documento EP 0 122 478.

Para resolver estos problemas, se describen los siguientes procedimientos. A este respecto, no se puede decir que los anticuerpos monoclonales usados en los siguientes reactivos fueran específicos para el dímero D. Por ejemplo, la literatura 2 de patentes ha reportado un dímero D que mide reactivos que reacciona con multímeros de la fracción DD/E y el monómero de la fracción DD/E, pero no reacciona con la fracción X, la fracción Y, la fracción D y la fracción E, y tiene al menos 10% de reactividad con la fracción DD/E, con respecto a la reactividad con el tetrámero de la fracción DD/E. Sin embargo, se ha revelado en la literatura 3 de patentes que el anticuerpo DD-M1653 (depósito No. FERM P-19687) descrito concretamente en la literatura 2 de patentes reacciona con multímeros de la fracción DD/E y el monómero de la fracción DD/E, y la fracción X y la fracción Y, pero no reacciona con la fracción D y la fracción E, y por lo tanto, no se puede decir que este anticuerpo sea específico para el dímero D.

Además, la literatura 2 de patentes no muestra si el dímero D contenido en una muestra puede medirse de forma específica y precisa o no. La literatura 3 de patentes describe que incluso si se usa un anticuerpo monoclonal que tiene una especificidad relativamente baja para el dímero D, la cantidad real de dímero D puede medirse con precisión usando un kit de medición del dímero D que consiste en un reactivo líquido que comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una reactividad con el dímero D, y un vehículo (o una solución que contiene el vehículo) en el que se inmoviliza el anticuerpo monoclonal que tiene una reactividad con el dímero D, pero el dímero D contenido en una muestra no se puede medir fácilmente, específicamente y con precisión.

Recientemente, debido a los avances en la medicina, y los avances en el tratamiento y los fármacos terapéuticos, por ejemplo, se usa un agente trombolítico para tratar a un paciente con trombosis. Se considera que la fibrinólisis se produce de una manera que es poco probable que ocurra en el entorno fisiológico, como se describió anteriormente, y la presencia de productos digeridos de fibrinógeno que incluye el fragmento D se ha convertido en algo que no debe ignorarse. Por lo tanto, la literatura 4 de patentes revela que cuando el fragmento D está presente en una muestra, para evitar obtener un valor medido inferior al valor real, debido a la inhibición de la aglutinación por interferencia del fragmento D con una reacción de aglutinación de látex, es decir, efectos inciertos del fragmento D derivado de la muestra, se agrega previamente y en forma artificial una cantidad en exceso del fragmento D para que el dímero D pueda medirse con precisión. Sin embargo, el dímero D en una muestra no se puede medir de forma específica y precisa con el uso de solo la especificidad intrínseca de un anticuerpo.

Como se describió anteriormente, se ha deseado un reactivo del dímero D específico para productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D), pero no se ha informado un anticuerpo capaz de medir específica y precisamente el dímero D usando solo la especificidad intrínseca de un anticuerpo monoclonal, o un reactivo que comprende dicho anticuerpo.

Además, aunque la medición de FDP y del dímero D usando una muestra de plasma se ha convertido en una técnica comúnmente utilizada, ha subsistido problema de que el FDP y el dímero D rara vez muestran valores falsos altos. La literatura 2 no relacionada con patentes describe que existe la posibilidad de que el FDP y el dímero D muestren valores falsos altos, cuando se estimula la coagulación y/o la fibrinólisis recogiendo plasma de un paciente.

Listado de citas

Literatura de patentes

[Literatura 1 de patentes] Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) No. 63-79900
 [Literatura 2 de patentes] Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) No. 2006-105633
 [Literatura 3 de patentes] Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) No. 2006-234676
 [Literatura 4 de patentes] Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) No. 2001-21557

Bibliografía no relacionada con patentes

[Bibliografía 1 no relacionada con patentes] Charles W. Francis, Victor J. Marder y Grant H. Barlow; Plasmic Degradation of Crosslinked Fibrin: CHARACTERIZATION OF NEW MACROMOLECULAR SOLUBLE COMPLEXES AND A MODEL OF THEIR STRUCTURE. J. Clin. Invest. (1980) 66(5): 1033-1043.

[Bibliografía 2 no relacionada con patentes] Akimi Takada, Yoshiaki Maegawa, Yoshikazu Yamamoto, y Syuji Matuso; Study of Causes of False High Values in Plasma FDP and D-dimer Measurement. JJCLA. (2005) 30(5): 721-726.

Sumario de la invención

Problema técnico

La presente invención se ha realizado para resolver los problemas anteriores, y un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento y un reactivo para medir específica y precisamente productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D) usando al menos un anticuerpo que no es afectado por el fibrinógeno y sus productos digeridos, es decir, el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y que no reacciona con el

fragmento DD y los fragmentos E1 y E2, que se generan por disociación del monómero DD/E.

Solución al problema

En estas circunstancias, los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos, y han encontrado que el uso de al menos un anticuerpo que no reacciona con el fibrinógeno o sus productos digeridos, es decir, el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no reacciona con el fragmento DD y los fragmentos E1 y E2, que se generan disociando el monómero DD/E, no muestra un valor inferior al valor real del dímero D o un falso valor alto debido a la reacción con moléculas diferentes al dímero D. La presente invención se basa en este descubrimiento para lograr un procedimiento y un reactivo para medir específica y precisamente los productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D).

La presente invención se refiere a:

- [1] un anticuerpo específico para el monómero DD/E y los polímeros DD/E o un fragmento de los mismos caracterizado porque el anticuerpo o fragmento del mismo reacciona específicamente con el monómero DD/E y los polímeros DD/E que son productos digeridos con plasmina de fibrina humana estabilizada, y no reacciona con fibrinógeno humano o productos de fibrinógeno humano digeridos con plasmina, que incluyen el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no reaccionan con los productos de disociación del monómero DD/E, que incluyen el fragmento DD, el fragmento E1 y el fragmento E2
- [2] un hibridoma que produce el anticuerpo de [1],
- [3] un procedimiento para medir inmunológicamente el monómero DD/E y los polímeros DD/E contenidos en una muestra biológica, utilizando el anticuerpo de [1] o el fragmento del mismo, y
- [4] un reactivo para medir inmunológicamente el monómero DD/E y los polímeros DD/E, que comprende el anticuerpo de [1], o el fragmento del mismo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con el anticuerpo de la presente invención, los productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D) pueden medirse en forma específica y precisa, incluso si se analiza una muestra que se sospecha que contiene una gran cantidad de productos digeridos de fibrinógeno (FgDP) debido a hiperfibrinólisis. De acuerdo con el reactivo de látex preparado usando el anticuerpo de la presente invención, puede evitarse la inhibición de la reacción de látex por el monómero DD/E, y los productos digeridos de fibrina estabilizada (dímero D) pueden medirse con mayor precisión.

Como solo el dímero D generado por hiperfibrinólisis causado por una enfermedad puede medirse específicamente usando el anticuerpo de la presente invención, pueden evitarse los efectos de las moléculas que pueden generarse por artefactos (por ejemplo, DD derivado del monómero DD/E disociado, el dímero D modificado como se describe en el Ejemplo 7 a continuación, o similares).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente las estructuras de productos de degradación de fibrinógeno (FgDP) y productos de degradación de fibrina estabilizados (dímero D).

La Figura 2 muestra los efectos del monómero DD/E contenido en las muestras en la aglutinación de látex usando diversos anticuerpos anti-dímero D.

La Figura 3 muestra los efectos del fragmento D1 contenido en las muestras en la aglutinación de látex usando diversos anticuerpos anti-dímero D.

La Figura 4 muestra las reactividades de diversos anticuerpos anti-dímero D contra DD/E o sus fragmentos constitutivos, el fragmento D1 o el fragmento E3 como productos digeridos de fibrinógeno (FgDP), o mezclas de estos fragmentos mediante ELISA.

La Figura 5 muestra los efectos del monómero DD/E contenido en las muestras en la aglutinación de látex usando diversos anticuerpos anti-dímero D.

La Figura 6 muestra los efectos del fragmento D1 contenido en las muestras en la aglutinación de látex usando diversos anticuerpos anti-dímero D.

La Figura 7 muestra los efectos del fragmento D1 contenido en las muestras en los reactivos de látex usando el anticuerpo anti-dímero D de la presente invención, y los reactivos convencionales comercialmente disponibles del dímero D.

La Figura 8 muestra los resultados de la electroforesis y transferencia de Western (detectada con anticuerpo anti-Fbg) de (S) muestras adsorbidas de sobrenadantes por cada anticuerpo, (B) sustancias unidas a cada anticuerpo,

(P) plasma no tratado como control, que se obtuvieron mediante un tratamiento de adsorción de muestras de plasma congeladas y descongeladas con el anticuerpo de la presente invención (anticuerpo convencional para comparación).

5 Descripción de formas de realización

El procedimiento de la presente invención para medir específicamente el monómero DD/E y los polímeros DD/E puede llevarse a cabo usando un anticuerpo que no reacciona con al menos el fibrinógeno o sus productos digeridos con plasmina, es decir, el fragmento X, fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y los productos de disociación del monómero DD/E, es decir, el fragmento DD y los fragmentos E1 y E2, y que reaccionan específicamente solo con el dímero D.

(1) Anticuerpo

El anticuerpo de la presente invención se puede obtener mediante un procedimiento convencional. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal (MoAb) o un anticuerpo policlonal (PoAb), siempre que tenga las reactividades mencionadas anteriormente, y se prefiere un anticuerpo monoclonal. El origen del anticuerpo no se limita a un ratón, sino que se puede ejemplificar por una rata, un hámster, un conejo, una cabra y un caballo, y se prefiere un ratón. El anticuerpo no está limitado a IgG, sino que puede ser IgM, IgA, IgE, IgD o similares.

El anticuerpo de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, cultivando un hibridoma capaz de producir un MoAb deseado en un medio o en la cavidad abdominal de un mamífero. Tal hibridoma se puede obtener generalmente por fusión celular de mieloma de ratón con células de bazo de un ratón inmunizado con dímero D de acuerdo con el procedimiento básico de fusión celular de Kohler y Milstein [véase Nature, 256, 495 (1975)].

El medio para cultivar un hibridoma puede ser cualquier medio adecuado para el cultivo de hibridoma, y un medio ERDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd) que contiene suero bovino (Gibco), D-glucosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), se usa preferiblemente hidrogenocarbonato de sodio (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y aditivos para medio RD-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd).

Cuando el hibridoma se cultiva en un medio, se puede cultivar en condiciones de 37°C y una concentración de CO₂ del 5% durante aproximadamente 3 días. Cuando se cultiva en la cavidad abdominal de un ratón, puede cultivarse durante aproximadamente 14 días.

A partir del cultivo resultante o fluido de ascitis de un mamífero, el anticuerpo monoclonal se puede separar y purificar de acuerdo con un procedimiento comúnmente usado para aislar y purificar proteínas. Los ejemplos del procedimiento incluyen extracción por adición de sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico usando celulosa de intercambio iónico, cromatografía en columna de tamiz molecular usando un gel de tamiz molecular, cromatografía en columna de afinidad utilizando polisacárido de unión a proteína A, diálisis y liofilización.

El fragmento de anticuerpo de la presente invención, es decir, un anticuerpo que es un fragmento de MoAb de la presente invención y que contiene un sitio de unión a antígeno que reacciona específicamente con el dímero D, puede ser, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv. Estos fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, digiriendo el anticuerpo monoclonal de la presente invención con una proteasa, seguido de un procedimiento convencional para la separación y purificación de proteínas.

Como antígeno para preparar el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, se pueden usar monómeros DD/E o polímeros DD/E. Los ejemplos de los polímeros DD/E incluyen dímero, trímero, tetrámero y pentámero. Los hexámeros o multímeros que tienen un peso molecular mayor tienen una solubilidad pobre en agua. El antígeno puede prepararse a partir de fibrinógeno de acuerdo con un procedimiento conocido. El antígeno se puede purificar a partir de un ser humano o similar, o se puede obtener mediante técnicas de ingeniería genética. Se puede usar un antígeno comercialmente disponible.

El anticuerpo de la presente invención se puede obtener confirmando que un anticuerpo preparado no reacciona con al menos el fibrinógeno o sus productos digeridos con plasmina, es decir, el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no reaccionan con los productos de disociación del monómero DD/E, es decir, el fragmento DD y los fragmentos E1 y E2, y reacciona solo con el dímero D. Esta confirmación puede llevarse a cabo mediante un procedimiento de medición inmunológica conocido, como se muestra en los Ejemplos.

Ya que el dímero D incluye el monómero DD/E y los polímeros DD/E, y, por lo tanto, tienen diferentes tamaños moleculares y estructuras, se considera que la reactividad del anticuerpo puede verse afectada por impedimentos estéricos o similares. Si el valor medido se ve afectado o no por la relación de contenido de varias moléculas de dímero D puede confirmarse añadiendo diversas cantidades de monómero DD/E a una cantidad constante de polímeros DD/E, por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos.

(2) Procedimiento de medición y reactivo

El procedimiento de medición y el reactivo de la presente invención se pueden llevar a cabo o preparar usando el anticuerpo que no reacciona con al menos el fibrinógeno o sus productos digeridos con plasmina, es decir, el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no reacciona con los productos de disociación del monómero DD/E, es decir, el fragmento DD y los fragmentos E1 y E2, y reacciona solo con el dímero D.

El anticuerpo de la presente invención se puede usar solo para medir específicamente y con precisión el dímero D, y se puede usar una pluralidad de anticuerpos, tales como anticuerpos que tienen sitios de reconocimiento diferentes, en una combinación apropiada.

El procedimiento de medición de la presente invención se puede llevar a cabo mediante un procedimiento de medición inmunológica conocido, excepto que se usa el anticuerpo de la presente invención. Más particularmente, los ejemplos del procedimiento incluyen inmunoensayo turbidimétrico (TIA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), procedimiento de aglutinación de látex, inmunoensayo de fluorescencia e inmunocromatografía. El anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en estos procedimientos de medición inmunológicos usando el anticuerpo de la presente invención y otros anticuerpos anti-dímero D en combinación con dos o más anticuerpos. Además, dado que el dímero D se puede medir específicamente usando el anticuerpo de la presente invención solo, el anticuerpo de la presente invención se puede usar en una combinación con dos o más anticuerpos, o el anticuerpo de la presente invención se puede utilizar preferiblemente en el procedimiento de medición inmunológica que usa solo un tipo de anticuerpo de la presente invención.

En lo sucesivo, se explicará más específicamente el procedimiento de aglutinación de látex que usa un vehículo insoluble.

En el procedimiento de aglutinación de látex, cuando está contenido un anticuerpo que reacciona de forma inespecífica, la aglutinación inespecífica tiende a producirse de acuerdo con el principio del procedimiento, y no se puede realizar una medición precisa, por lo que es preferible usar solo el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos del vehículo insoluble incluyen partículas de polímero orgánico, partículas de material inorgánico y glóbulos rojos. Los ejemplos de las partículas de polímero orgánico incluyen agarosa insoluble, dextrano insoluble, celulosa y partículas de látex. Se prefieren partículas de látex y se pueden usar partículas de poliestireno, copolímero de estireno-ácido metacrílico, copolímero de estireno-(met)acrilato de glicidilo, copolímero de estireno-sulfonato de estireno, polímero de ácido metacrílico, polímero de ácido acrílico, copolímero de acrilonitrilo-butadieno-estireno, copolímero de cloruro de vinilo-éster de ácido acrílico, poli(acetato de vinilo-acrilato), o similares. Los ejemplos de las partículas de material inorgánico incluyen sílice y alúmina. El tamaño medio de partícula de la partícula se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con un aparato de medición o similar, y puede ser de 0,05 a 0,50 μm .

Los ejemplos de un procedimiento para transportar un anticuerpo en el vehículo insoluble incluyen un procedimiento de adsorción física y un procedimiento de unión química, y el procedimiento de adsorción física es preferible en términos de facilidad de operación.

Se puede agregar apropiadamente un tampón, un sensibilizador, un tensoactivo y/o una sal inorgánica. Es preferible un tampón que muestre una acción reguladora a pH 5-10, particularmente pH 6-9. Los ejemplos del tampón incluyen un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de imidazol, un tampón de trietanolamina-HCl y tampones Good. Los ejemplos de los tampones Good incluyen un tampón MES, un tampón Bis-Tris, un tampón ADA, un tampón PIPES, un tampón Bis-Tris-Propano, un tampón ACES, un tampón MOPS, un tampón BES, un tampón TES, un tampón HEPES, un tampón HEPPS, un tampón Tricina, un tampón Bicina, y un tampón TAPS.

Se puede añadir un sensibilizador para promover la velocidad de aglutinación o similar. El sensibilizador no está limitado, y pueden usarse polivinilpirrolidona, polianión, polietilenglicol, polisacáridos o similares.

Los ejemplos del tensoactivo incluyen un tensoactivo no iónico, un tensoactivo aniónico, un tensoactivo catiónico y un tensoactivo anfótero.

Se puede añadir una sal inorgánica para suprimir los efectos de la concentración de sal en una muestra o similar. Los ejemplos de la sal inorgánica incluyen cloruro de sodio y cloruro de calcio.

El reactivo de medición para medir la concentración del dímero D en una muestra puede estar en forma de un reactivo de dos componentes que consiste en un primer reactivo y un segundo reactivo, o en una forma que consiste en un reactivo. El reactivo de dos componentes que consiste en el primer reactivo y el segundo reactivo es preferible desde el punto de vista de la precisión de la medición, y se muestran ejemplos a continuación.

El primer reactivo está compuesto de un tampón, y el segundo reactivo está compuesto de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos, y se puede añadir apropiadamente un sensibilizador, un tensoactivo y/o una sal inorgánica. Una realización preferible puede ser un reactivo en el que el primer reactivo está compuesto de un tampón, un sensibilizador y una sal inorgánica, y el segundo reactivo está compuesto de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos.

Cuando la medición se lleva a cabo usando el reactivo de medición, un procedimiento en el que el primer reactivo se mezcla con una muestra en una celda de reacción, el segundo reactivo se agrega adicionalmente al mismo, y se mide ópticamente el grado de aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos; un procedimiento en el que el primer reactivo y el segundo reactivo se mezclan en una celda de reacción, se agrega adicionalmente una muestra a la misma, y se mide ópticamente el grado de aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo; o se puede utilizar algo similar.

Una muestra que puede analizarse mediante la presente invención puede ser, por ejemplo, muestras biológicas líquidas, tales como sangre, plasma, suero u orina.

Por ejemplo, la reacción de aglutinación se lleva a cabo usando el reactivo ejemplificado, y el grado de aglutinación se observa ópticamente, con respecto a las soluciones de dímero D de concentraciones conocidas y una muestra, y se comparan entre sí para determinar la concentración de dímero D en la muestra. Más particularmente, las soluciones de dímero D de concentraciones conocidas se miden a dos o más concentraciones diferentes (es preferible que esté contenida una solución que tenga una concentración de dímero D de 0 µg/ml), y se prepara una curva estándar basada en la relación entre la cantidad de cambio en la densidad óptica y las concentraciones de dímero D. A continuación, se mide la muestra, y la concentración se determina a partir de la cantidad de cambio en la densidad óptica, usando la curva estándar, y el valor se considera como la concentración de dímero D. En el procedimiento de detección óptica del grado de aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos, la medición se lleva a cabo usando un aparato óptico para medir la intensidad de la luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de la luz transmitida. Se puede seleccionar una longitud de onda apropiada para la medición de 300 a 2400 nm, preferiblemente de 300 a 1.000 nm, y más preferiblemente de 300 a 800 nm. Con respecto a un procedimiento de medición, se seleccionan el tamaño de partícula o la concentración de las partículas de látex utilizadas sensibilizadas con anticuerpo, y el tiempo de reacción, y se mide un aumento o disminución de la intensidad de luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de luz transmitida. Estos procedimientos se pueden usar en una combinación de los mismos.

Como las condiciones de la reacción inmunológica, se pueden seleccionar condiciones conocidas, y la temperatura en la reacción es preferiblemente de 10 a 50°C, y particularmente de 20 a 40°C. El tiempo de reacción puede ser seleccionado apropiadamente.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente ahora mediante, pero no se limita a, los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de antígenos y diversas moléculas

(1) Preparación del dímero D

El dímero D se preparó básicamente de acuerdo con el procedimiento de Stephanie A. Olexa y Andrei Z. Budzynski (1978); Circulación, Supl. 58, 119, el procedimiento de Olexa et al. (1979); y Biochim. Biophys. Acta 576, 39-50. Se añadieron trombina bovina (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) y cloruro de calcio al fibrinógeno humano (Enzyme Research Laboratories). La mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante 2 horas para convertir el fibrinógeno en fibrina, y se centrifugó para separar la fibrina de las sustancias no coagulables. La fibrina se suspendió en un tampón Tris-HCl (pH 7,8) que contenía cloruro de calcio. Se añadió plasmina humana (Chromogenix) a la suspensión en condiciones de 37°C. Se añadió aprotinina (Pentapharm) para detener la reacción de digestión, y el producto de reacción se pasó a través de una columna de lisina-Sefarosa para eliminar la plasmina. El eluato era una mezcla de dímero D que tenía diferentes pesos moleculares.

El eluato se aplicó a una columna de Sephacryl S-300 equilibrada con un tampón Tris-HCl (pH 7,5) que contenía cloruro de calcio (solución A), y se fraccionó mediante cromatografía de tamiz molecular usando la solución A como solución de revelado. Las fracciones resultantes se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE) y transferencia de Western para identificar y aislar fracciones del dímero D. Las fracciones del dímero D obtenidas se usaron como inmunógenos y antígenos para inmunoensayo enzimático (ELISA) o látex (LTX) para seleccionar hibridomas que produjeron un anticuerpo monoclonal anti-dímero D.

(2) Preparación del fragmento DD, el fragmento E1 y el fragmento E2

Se incubó una fracción del dímero D que tenía el peso molecular más bajo (monómero DD/E) obtenido anteriormente en una solución de 3 mol/l de urea-50 mmol/l de citrato (pH 5,5) a 37°C durante 4 horas. El producto de reacción se aplicó a una columna de Sefarosa CL-6B equilibrada con 50 mmol/l de un tampón Tris-HCl (pH 7,4)-28 mmol/l de solución de citrato de sodio-0,1 mol/l de cloruro de sodio y se desarrolló usando la misma solución. El fragmento fraccionado DD, el fragmento E1 y el fragmento E2 se identificaron y aislaron por electroforesis (SDS-PAGE) y transferencia Western.

(3) Preparación de productos de fibrinógeno humano digeridos con plasmina

Después de que se añadió cloruro de calcio al fibrinógeno humano (Enzyme Research Laboratories), se añadió además plasmina humana (Chromogenix), y se llevó a cabo una reacción a 37°C durante 2 horas. Se añadió aprotinina (Pentapharm) para detener la reacción. Se aplicó el producto de reacción a una columna de Sephacryl S-300 equilibrada con un tampón Tris-HCl (pH 7,5), y se fraccionó en el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3 mediante filtración en gel. Estos fragmentos se usaron como antígenos para ELISA o LTX para seleccionar hibridomas que produjeron un anticuerpo monoclonal anti-dímero D.

Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos monoclonales»

(1) Preparación de células de bazo inmunizadas

La solución de monómero DD/E preparada en el Ejemplo 1 se mezcló con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund hasta que se emulsionó (una mezcla de inmunógeno), y se inmunizó un ratón con la mezcla de inmunógeno por administración intracutánea (primera inmunización). Después de 2 semanas, el ratón se inmunizó de manera similar, con la mezcla de inmunógeno por administración intracutánea (segunda inmunización). El ratón se inmunizó con la mezcla de inmunógeno por administración intracutánea cada dos semanas, en total 4 veces. Después de 2 semanas desde la cuarta inmunización, la solución de monómero DD/E preparada en el Ejemplo 1 se mezcló con una cantidad igual de gel de hidróxido de aluminio, y la mezcla se administró en el bazo del ratón (inmunización final). Después de 3 días desde la inmunización final, se extrajo el bazo del ratón y se usó para la fusión celular.

(2) Fusión celular

Se recogieron células de bazo en un medio ERDF del bazo removido asépticamente. Las células del bazo se transfirieron a un tubo de centrífuga y se centrifugaron. El sedimento resultante se suspendió en un medio ERDF, y se contó el número de células de bazo vivas.

Las células de mieloma de ratón P3U1 que se habían cultivado se mezclaron con las células del bazo y se centrifugaron. El sedimento resultante se suspendió en PEG1500, y posteriormente se suspendió en un medio ERDF para fusionar las células. El sedimento se suspendió en un medio ERDF que contenía suero bovino, hipoxantina, aminopterina, timidina y RD-1. La suspensión celular se cultivó en una placa de cultivo celular de 96 pozos en una incubadora de gas de dióxido de carbono que contenía un 5% de gas dióxido de carbono.

(3) Establecimiento de hibridomas

Después de cultivar durante aproximadamente 13 días, se recogió cada sobrenadante de cultivo para confirmar la presencia del anticuerpo deseado usando un procedimiento de ELISA. Se dispensó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón diluido con solución salina regulada con fosfato (PBS) en una placa de ELISA de 96 pozos, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante la noche. La placa se lavó con Tween-20 al 0,05% que contenía solución salina regulada con fosfato (T-PBS) 4 veces. Después del lavado, se dispensó cada sobrenadante de cultivo, y la placa se dejó reposar a 4°C durante la noche. La placa se lavó con T-PBS 4 veces, y se dispensó la fracción de monómero DD/E preparada en el Ejemplo 1 y se diluyó con T-PBS, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó con T-PBS 4 veces, y se dispensó anticuerpo policlonal anti-fibrinógeno humano marcado con peroxidasa (HRP) diluido con T-PBS, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con T-PBS 4 veces, y se dispensó un reactivo TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió 1 mol/l de una solución de fosfato para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 450 nm. De forma similar, se confirmó la reactividad contra el fibrinógeno y el fragmento D1, y los hibridomas que reaccionaron con la fracción de monómero DD/E pero no reaccionaron con el fibrinógeno o el fragmento D1 se clonaron mediante dilución limitante para establecer los clones. La fusión celular anterior se repitió tres veces, y se establecieron 18 clones a partir de tres ratones inmunizados.

(4) Preparación de anticuerpos monoclonales

Cada hibridoma obtenido anteriormente se administró intraperitonealmente a un ratón BALB/c al que se le había administrado intraperitonealmente pristano. El fluido de ascitis se recogió después de aproximadamente dos semanas. El fluido de ascitis se centrifugó y se añadió gradualmente sulfato de amonio sólido al sobrenadante. La mezcla se agitó sobre hielo durante 30 minutos y se dejó reposar durante 60 minutos y se centrifugó. El precipitado resultante se disolvió en un pequeño volumen de tampón Tris-HCl (pH 7,5) (solución B) y se aplicó a una columna Q Sefarosa equilibrada con solución B. Cada anticuerpo se eluyó con solución B que contenía 0,16 mol/l de NaCl para obtener anticuerpos anti-dímero D purificados.

(5) Cribado de anticuerpos anti-dímero D mediante ELISA

Las reactividades de los anticuerpos purificados obtenidos anteriormente contra los fragmentos relacionados de

fibrinógeno se confirmaron mediante ELISA para seleccionar hibridomas. El fibrinógeno (Fbg), el monómero DD/E (mono DD/E), los polímeros DD/E (poli DD/E), el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3 se usaron como antígenos.

- 5 Los resultados se muestran en la Tabla 1. Las definiciones de los símbolos usados en la Tabla 1 se muestran en la Tabla 2. Se confirmó que 18 clones obtenidos no reaccionaron con fibrinógeno o productos digeridos de fibrinógeno (fragmentos X, Y, D1 y E3).

Tabla 1

Clones	Fbg	Mono DD/E	Poli DD/E	X	Y	D1	E3	Tampón
MF-1	-	++	+++	-	-	-	-	-
MF-2	-	++	++	-	-	-	-	-
MF-3	-	+	++	-	-	-	-	-
MF-4	-	+	++	-	-	-	-	-
MF-5	-	+	+++	-	-	-	-	-
MF-6	-	+	+++	-	-	-	-	-
MF-7	-	++	++	-	-	-	-	-
MF-8	-	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-9	-	++	+++	-	-	-	-	-
MF-10	-	++	+++	-	-	-	-	-
MF-11	-	++	+++	-	-	-	-	-
MF-12	-	++	+++	-	-	-	-	-
MF-13	±	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-14	-	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-15	-	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-16	-	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-17	±	+++	+++	-	-	-	-	-
MF-18	-	+++	+++	-	-	-	-	-
En blanco	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2

Absorbancia	
~0,2	-
~0,5	±
~1,0	+
~1,5	++
1,5~	+++

Ejemplo 3: Preparación del reactivo para medir el dímero D mediante aglutinación de látex y evaluación de anticuerpos anti-dímero D

- 15 (1) Preparación de partículas de látex de poliestireno sensibilizadas con anticuerpo anti-dímero D

Cada anticuerpo purificado en el Ejemplo 2 se disolvió en un tampón Tris-HCl (pH 8,0) y se añadieron 5 ml de suspensión de partículas de látex de poliestireno (JSR) a la solución de anticuerpo, y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. A esta mezcla, se le añadió un tampón Tris-HCl (pH 8,0) que contenía albúmina de suero bovino (BSA), y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos, y se centrifugó. El precipitado resultante

20

se suspendió en un tampón Tris-HCl (pH 8,0) para preparar cada suspensión de látex sensibilizado con un anticuerpo anti-dímero D.

(2) Cribado de anticuerpos anti-dímero D mediante aglutinación de látex

Confirmación del efecto del monómero DD/E y el fragmento D1 en la muestra contra los anticuerpos anti-dímero D obtenidos en el Ejemplo 2

(2-1) Preparación de soluciones estándar y muestras

Como soluciones estándar, el dímero D purificado se diluyó con un tampón Tris-HCl (pH 8,0) que contenía BSA de modo que la concentración pasó a 0, 2, 8, 32, 48 y 60 µg/ml.

Por otro lado, como muestras, después de diluir el dímero D purificado (polímeros DD/E) con un tampón Tris-HCl (pH 8,0) que contenía BSA hasta una concentración de 10 µg/ml, se añadió el monómero DD/E adicionalmente a la solución de polímero DD/E de modo que la concentración del monómero DD/E pasó a ser de 0 a 20 µg/ml (cada 0, 4, 8, 12, 16 y 20 µg/ml) mientras que la concentración de los polímeros DD/E fue constante. Además, como otras muestras, se añadió el fragmento D1 a la solución de polímero DD/E de modo que la concentración del fragmento D1 pasó a ser 0 a 100 µg/ml (cada 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml) mientras la concentración de los polímeros DD/E fue constante.

(2-2) Procedimiento de medición

A 5 µl de cada solución estándar, se le añadieron 160 µl de un tampón Tris-HCl (pH 8, 0) que contenía BSA, y la mezcla se dejó en reposo a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Además, se añadieron 80 µl de la suspensión de látex sensibilizada con un anticuerpo anti-dímero D y se agitó, y se midió un cambio en un lapso de aproximadamente 10 minutos en la absorbancia a 800 nm para preparar una curva patrón. De forma similar, cada muestra preparada anteriormente se midió, y el valor medido se determinó con base en la curva patrón. La absorbancia se midió usando un analizador automático Hitachi 7170.

Parte de los resultados se muestra a continuación. Como se muestra en la Figura 2, la reacción de aglutinación de látex del anticuerpo MF-17 fue inhibida por el monómero DD/E, y cuando se usaron los otros tres anticuerpos (MF-3, MF-9 y MF-11), los valores medidos aumentaron dependiendo de la concentración de monómero DD/E añadido. Como se muestra en la Figura 3, cuando aumentó la concentración del fragmento D1, no se observaron efectos en la reacción de aglutinación del látex usando uno cualquiera de dieciocho anticuerpos incluyendo los cuatro anticuerpos anteriores.

Los anticuerpos distintos de MF-17 afectados por la presencia del monómero DD/E incluyen MF-13, MF-14, MF-15, MF-16 y MF-18. Estos anticuerpos no reaccionaron con el fragmento X, el fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no afectaron a la aglutinación del látex. Debido a que el monómero DD/E es parte del dímero D, y los anticuerpos en los que la reacción de aglutinación de látex fue inhibida por la mayor cantidad de monómero DD/E no son adecuados para un ensayo de aglutinación de látex, doce anticuerpos excepto los seis clones que tienen la misma reactividad que la de MF-17 fueron seleccionados.

(3) Confirmación de la clase de inmunoglobulinas y especificidad de los anticuerpos monoclonales

Los doce anticuerpos seleccionados se sometieron a un kit de isotipado (Dainippon Pharmaceutical) para identificar la clase de inmunoglobulina. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

No.	Clones	Subclases
1	MF-1	IgG1, κ
2	MF-2	IgG1, κ
3	MF-3	IgG1, κ
4	MF-4	IgG1, κ

(continuación)

No.	Clones	Subclases
5	MF-5	IgG1, κ
6	MF-6	IgG1, κ
7	MF-7	IgG1, κ
8	MF-8	IgG2a, κ
9	MF-9	IgG1, κ
10	MF-10	IgG2a, κ
11	MF-11	IgG1, κ
12	MF-12	IgG1, κ

En lo sucesivo, los resultados para MF-3 y MF-12 se mostrarán como clones típicos.

5 **Ejemplo 4:** Identificación del sitio de reconocimiento de anticuerpos monoclonales

(1) Confirmación por transferencia de Western

10 La transferencia de Western se llevó a cabo usando NewPAGE/Western Bleeze (Invitrogen). El esquema del procedimiento experimental fue el siguiente.

15 El fibrinógeno (Fbg), el dímero D y los productos digeridos del fibrinógeno (FgDP) se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y PAGE nativa en presencia y en ausencia de ditiotreitol. Los geles después de PAGE se usaron para llevar a cabo la transferencia de Western, es decir, inmunotinción usando un anticuerpo anti-Fbg, anticuerpo MF-13 y anticuerpo MF-12. En contraste con el anticuerpo anti-Fbg como control, no se detectaron bandas en ninguna muestra por el anticuerpo monoclonal MF-3 o MF-12.

(2) Confirmación por ELISA

20 Como se consideró a partir de los resultados de la electroforesis que la carga eléctrica provocaba la disociación del enlace E-D y el cambio en la estructura del sitio reconocido por un anticuerpo, se llevó a cabo un análisis por ELISA de una manera similar a la de Ejemplo 2, para confirmar si la presencia del enlace E-D afectaba o no a la reacción del anticuerpo.

25 El dímero D está compuesto por DD/E como unidad constitutiva, y los dominios D se unen covalentemente entre sí, y el dominio D se une eléctricamente al dominio E al reconocer la estructura tridimensional. Por lo tanto, el fragmento DD puede separarse fácilmente del fragmento E1 y del fragmento E2 mediante urea, SDS o similares. Se sabe que el fragmento separado DD y los fragmentos E1 y E2 se pueden reconstruir mediante la eliminación de la urea y volver a la misma estructura que la de la molécula original. Como el fragmento E3, que es FgDP, tiene una estructura similar a la del fragmento E1 y al fragmento E2, pero no tiene un sitio de unión al dominio D, no se puede formar el enlace E-D. Como el monómero DD/E no está disociado en el entorno del cuerpo vivo, el fragmento E1 y el fragmento E2 derivados de DD/E no se unen al fragmento D1 que es FgDP.

35 Las moléculas descritas a continuación se prepararon como antígenos para ELISA:

(1) monómero DD/E (parte del dímero D),

(2) Fragmento DD (preparado por tratamiento del monómero DD/E con urea),

40 (3) Fragmento D1 (parte de FgDP),

(4) Fragmento E1 y Fragmento E2 (preparados por tratamiento del monómero DD/E con urea),

(5) Fragmento E3 (parte de FgDP),

45 (6) Fragmento DD + Fragmentos E1 y E2 [preparados por reacción de (2) con (4) *in vitro* durante un período de tiempo predeterminado],

(7) Fragmento DD + Fragmento E3 [preparados por reacción de (2) con (5) *in vitro* durante un período de tiempo predeterminado],

50

(8) Fragmento D1 + Fragmentos E1 y E2 [preparados por reacción de (3) con (4) *in vitro* durante un período de tiempo predeterminado],

(9) Fragmento D1 + Fragmento E3 [preparados por reacción de (3) con (5) *in vitro* durante un período de tiempo predeterminado]

Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 4. El anticuerpo MF-3 y el anticuerpo MF-12 no reaccionaron con el fragmento DD (2), o el fragmento E1 y el fragmento E2 (4), que se habían disociado mediante el tratamiento del monómero DD/E con urea, pero reaccionó con una mezcla del fragmento DD y los fragmentos E1 y E2 (6), o una mezcla del fragmento D1 y los fragmentos E1 y E2 (8). Sin embargo, el anticuerpo MF-3 y el anticuerpo MF-12 no reaccionaron con una mezcla del fragmento DD y el fragmento E3 (7), o una mezcla del fragmento D1 y el fragmento E3 (9). Se demostró mediante estos resultados que el anticuerpo MF-3 y el anticuerpo MF-12 reaccionaron con una sustancia en la que el dominio D se unía al dominio E.

Como el sitio de reconocimiento del anticuerpo DD/D-1, que se usó como control, se localizó en el dominio D, el anticuerpo DD/D-1 reaccionó con el monómero DD/E (1), el fragmento DD obtenido por tratamiento con urea (2), o fragmento D1 (3), pero no reaccionó con el fragmento E1 y el fragmento E2 (4), o el fragmento E3 (5). El anticuerpo DD/D-1 también reaccionó con una mezcla del fragmento DD y los fragmentos E1 y E2 (6), una mezcla del fragmento DD y el fragmento E3 (7), una mezcla del fragmento D1 y los fragmentos E1 y E2 (8), o una mezcla del fragmento D1 y el fragmento E3 (9). Como el fragmento E3 no formó el enlace E-D con el fragmento DD o el fragmento D1, pero contenía el dominio D, la señal se detectó en el ELISA.

Cuando las reactividades del anticuerpo MF-16, en las que la reacción de látex fue inhibida por el monómero DD/E, se confirmaron mediante ELISA, el anticuerpo MF-16 reaccionó con el fragmento DD (2), pero no reaccionó con el fragmento E1 y fragmento E2 (4). Dado que el anticuerpo MF-16 reaccionó con una mezcla del fragmento D1 y los fragmentos E1 y E2 (8), se consideró que dos moléculas del fragmento D1 se unían a los fragmentos E1 y E2, y los dos dominios D estaban cerca uno del otro, y el anticuerpo reaccionó con la estructura. Los cinco anticuerpos (MF-13, MF-14, MF-15, MF-17 y MF-18) distintos del anticuerpo MF-16, en los que la reacción del látex fue inhibida por el monómero DD/E, reaccionaron con el fragmento DD (2). A partir de los resultados, estos cinco anticuerpos que tienen una reactividad contra el fragmento DD no eran adecuados como reactivo de látex del dímero D usando un único anticuerpo, debido a que la aglutinación de látex fue inhibida por el monómero DD/E.

Como se describió anteriormente, se demostró que el anticuerpo MF-3 y el anticuerpo MF-12 no reaccionaban con fragmentos derivados de FgDP, y reaccionaban específicamente con productos digeridos de fibrina, y el dímero D que tenía el enlace E-D.

Además, se consideró a partir de los resultados de transferencia Western y ELISA que el sitio de reconocimiento de estos anticuerpos era el dominio D y/o el dominio E del dímero D, que tenía el enlace E-D.

Ejemplo 5: Confirmación de la especificidad y precisión de los reactivos de aglutinación de látex usando el anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo convencional

La reactividad del anticuerpo MF-12 y el anticuerpo DD/D-1 contra el monómero DD/E y el fragmento D1 en polímeros DD/E se confirmó de manera similar a la del Ejemplo 3. Como se muestra en las Figuras 5 y 6, cuando se usó el anticuerpo MF-12, los valores medidos aumentaron dependiendo de la concentración del monómero DD/E añadido, y la reacción de aglutinación del látex no se inhibió por el fragmento D1. Por el contrario, cuando se usó el anticuerpo DD/D-1, la reacción de aglutinación del látex se inhibió dependiendo de la concentración del monómero DD/E o del fragmento D1 añadido.

Ejemplo 6: Confirmación de la especificidad y precisión del reactivo para medir el dímero D de la presente invención

Se usó una muestra que contenía el dímero D purificado (polímeros DD/E) y el fragmento D1 preparado en el Ejemplo 3 para comparar el anticuerpo MF-12 con los reactivos convencionales del dímero D (productos A, B y C). La medición se llevó a cabo de acuerdo con los manuales adjuntos, usando un analizador automático Hitachi 7170. La medición usando el anticuerpo MF-12 se llevó a cabo mediante la aglutinación de látex descrita en el Ejemplo 3.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se confirmó que cuando se usaron los tres reactivos convencionales del dímero D, los valores medidos del dímero D disminuyeron de forma dependiente de un aumento en la cantidad de fragmento D1 contenido en la muestra, y cuando se usó el reactivo que usa el anticuerpo MF-12, el fragmento D1 no afectó al valor medido del dímero D a una concentración de 100 µg/ml o menos.

Se confirmó a partir de los resultados que el reactivo para medir el dímero D usando el anticuerpo MF-12 no se vio afectado por el fragmento D1, que era un producto digerido de fibrinógeno, y el dímero D podía medirse con precisión, en comparación con los reactivos convencionales del dímero D

Ejemplo 7: Confirmación e inspección de la especificidad del reactivo para medir el dímero D de la presente

invención en muestras de plasma

Se midieron muestras de plasma con adición de citrato para confirmar la diferencia en la especificidad del reactivo para medir el dímero D de la presente invención y el reactivo convencional para medir el dímero D utilizado en el Ejemplo 6. El producto A se usó como el reactivo convencional para medir el dímero D. La medición se llevó a cabo de manera similar a la del Ejemplo 6.

Para la inspección, las muestras congeladas que se habían preparado como muestras de plasma con adición de citrato se descongelaron a 37°C durante 30 minutos y se usaron. Se seleccionan dos resultados típicos de 12 especímenes, y se presentan en la Tabla 4. En el espécimen 1, los valores medidos de dímero D no cambiaron en el reactivo convencional y el reactivo (anticuerpo MF-12) de la presente invención, independientemente del número de ciclos de congelación y descongelación. En el espécimen 2, el valor del dímero D medido utilizando el reactivo convencional aumentó aproximadamente tres veces debido a la congelación y descongelación. Por el contrario, tal cambio significativo no se observó cuando se usó el reactivo del dímero D de la presente invención que usa el anticuerpo MF-12 (Tabla 4).

Se informó en la bibliografía 2 no relacionada con patentes que el coágulo de fibrina se formó en muestras de plasma en casos raros. Se consideró que el dímero D original no cambió por la congelación y descongelación de la muestra, pero el coágulo de fibrina formado por el artefacto se modificó para generar el dímero D, y como resultado, aumentó el valor medido por el procedimiento convencional.

Tabla 4

	Reactivo convencional	Reactivo convencional	MF-12	MF-12
	Congelación-descongelación (una vez)	Congelación-descongelación (dos veces)	Congelación-descongelación (una vez)	Congelación-descongelación (dos veces)
Espécimen 1	27,52	26,89	15,23	16,76
Espécimen 2	45,89	145,70	21,96	26,43

Para investigar la causa de la variación en el valor medido debido a la congelación y descongelación del espécimen 2, se usaron el anticuerpo de la presente invención (anticuerpo MF-12) y el anticuerpo convencional (anticuerpo DD/D-1) para llevar a cabo el tratamiento de adsorción del espécimen, y se analizaron los sobrenadantes (S) resultantes, las sustancias que se unen a cada anticuerpo (B), y el plasma no tratado (P) mediante transferencia de Western. Más particularmente, la fracción (S), la fracción (B) y la fracción (P) se sometieron a electroforesis mediante SDS-PAGE al 3-8% en condiciones no reductoras, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se detectaron usando un anticuerpo anti-Fbg. Los resultados se muestran en la Figura 8. Los carriles S1 y B1 indican los resultados del anticuerpo DD/D-1, y los carriles S2 y B2 indican los resultados del anticuerpo MF-12. Las flechas a la izquierda indican Fbg, productos digeridos con plasmina de fibrina estabilizada (XDP, YD, DD y E1E2) y productos digeridos de fibrinógeno (X, Y y D1).

En el espécimen 1, cuando se comparó la sustancia unida al anticuerpo DD/D-1 (B1) con la unida al anticuerpo MF-12 (B2), no hubo diferencia, excepto que la banda del fragmento D1 se detectó en B1. Esto se debe a que el anticuerpo DD/D-1 reconoce el dominio D. Sin embargo, en el espécimen 2 en el que el valor del dímero D aumentó debido a congelación y descongelación, además de la banda del fragmento D1, se detectó una banda con un peso molecular menor que el del fragmento E2 en el carril B1 (la estrella y flecha en el centro). Por el contrario, esta banda no fue detectada por el anticuerpo MF-12. Se consideró que esta banda se derivaba del fragmento E, porque no se detectó mediante transferencia de Western usando un anticuerpo que reconocía el dominio D.

Se considera que la presencia de la fracción E que tiene un peso molecular inferior al del fragmento E2 es el fragmento E3 generado por la digestión de fibrinógeno, pero es poco probable que el fragmento E3 esté presente solo en B1, porque el anticuerpo DD/D-1 reconoce el dominio D. Además, dado que el fragmento E3 no tiene la capacidad de unirse al dominio D, como se describe en el Ejemplo 4, el fragmento E3 no se une al dominio D y no se une al anticuerpo DD/D-1.

A partir de estos resultados, hubo una alta posibilidad de que el dímero D aumentado debido a la congelación y descongelación fuera generado por artefactos, y se sugirió que el dímero D era una molécula en la que se había modificado DD/E, el enlace E-D no era normal, y la fracción E que tenía un bajo peso molecular estaba contenida.

Como se describió anteriormente, se demostró que el reactivo del dímero D de la presente invención que usa el anticuerpo MF-12 era un reactivo que no se veía afectado por el dímero D generado por el artefacto y que era capaz de medir con precisión el nivel del dímero D en el cuerpo vivo.

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo de la presente invención puede usarse en la medición de productos digeridos por plasmina de fibrina estabilizada (dímero D), que es útil como marcador de diagnóstico para la coagulación intravascular diseminada (DIC).

- 5 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, son posibles diversos cambios y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo específico para el monómero DD/E y polímeros DD/E o un fragmento del mismo **caracterizado porque** el anticuerpo o fragmento del mismo reacciona específicamente con el monómero DD/E y los polímeros DD/E que son productos digeridos por plasmina de fibrina humana estabilizada, y no reacciona con fibrinógeno humano o productos de fibrinógeno humano digeridos con plasmina, que incluyen el fragmento X, fragmento Y, el fragmento D1 y el fragmento E3, y no reacciona con los productos de disociación del monómero DD/E, que incluyen el fragmento DD, el fragmento E1 y el fragmento E2.
- 10 2. Un hibridoma que produce el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un procedimiento para medir inmunológicamente el monómero DD/E y los polímeros DD/E contenidos en una muestra biológica, usando el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 4. Un reactivo para medir inmunológicamente el monómero DD/E y los polímeros DD/E, que comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

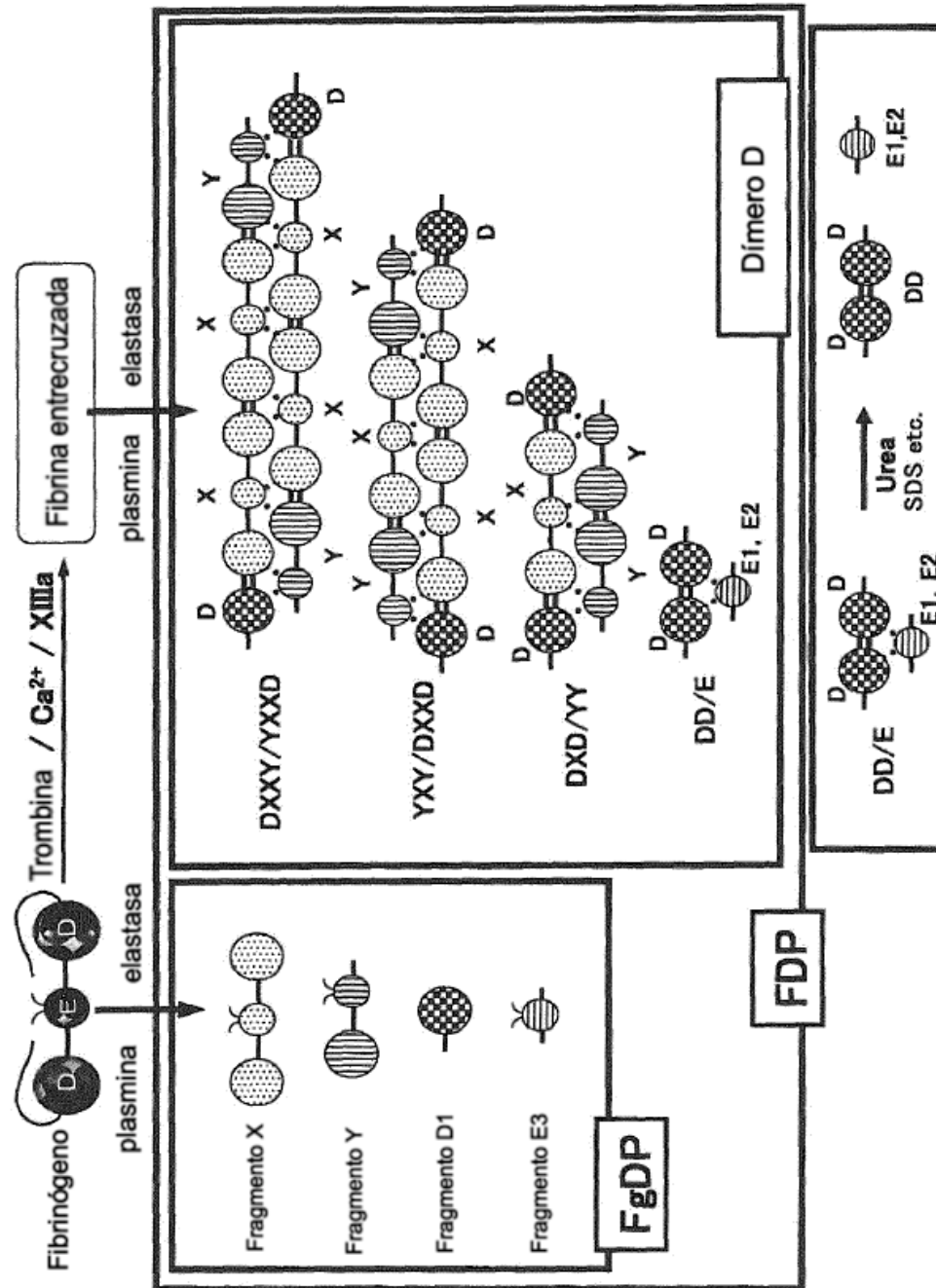


Figura 2

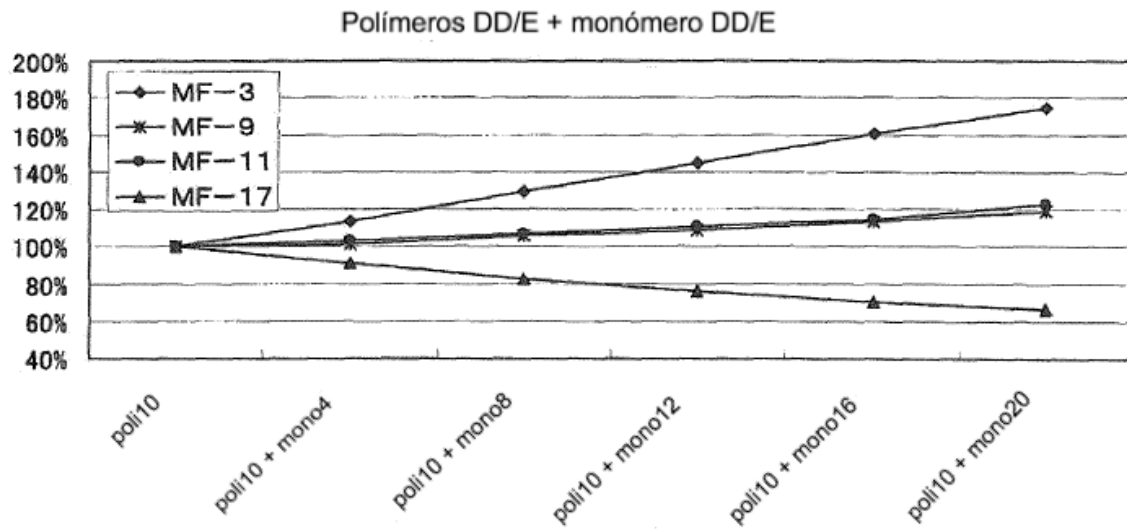


Figura 3

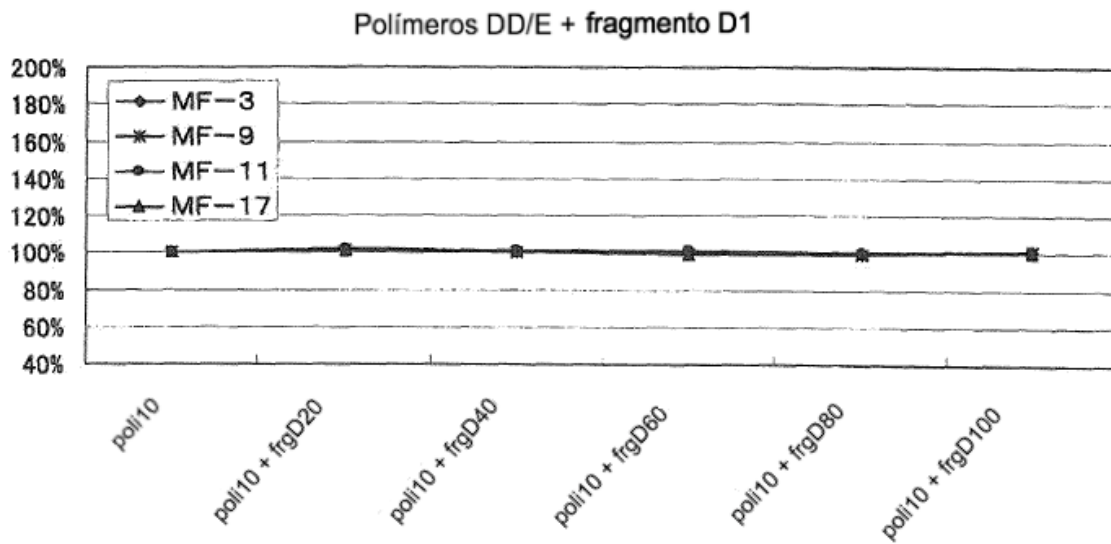


Figura 4

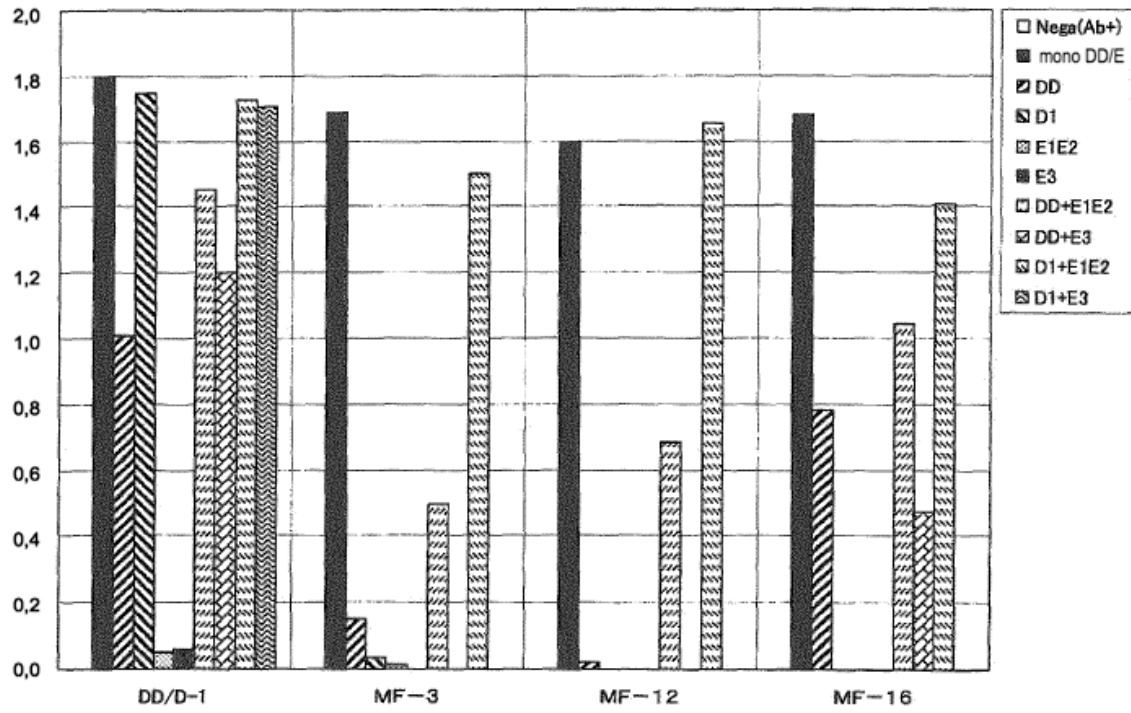


Figura 5

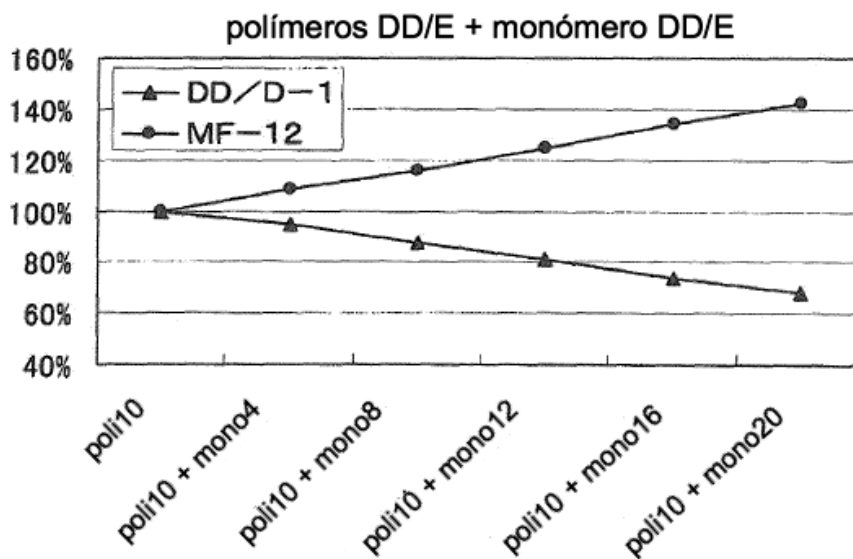


Figura 6

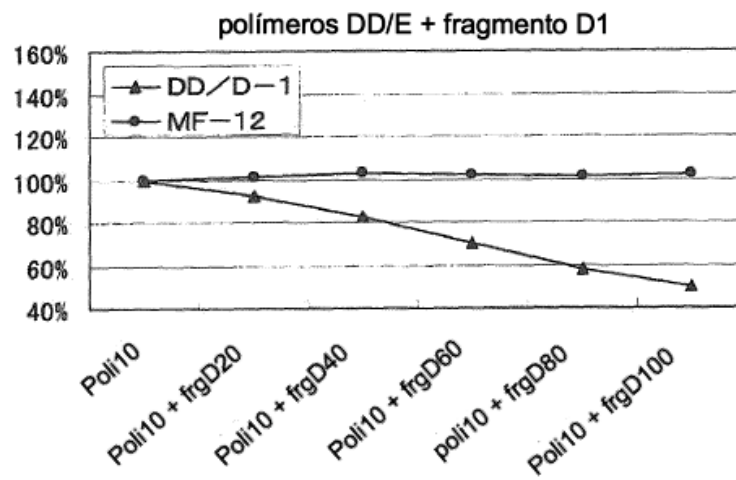


Figura 7

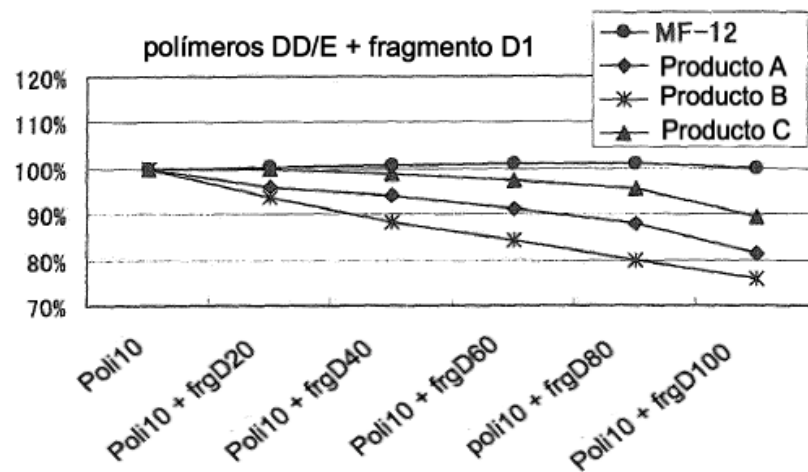


Figura 8

